



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



Instituto
de Biología
Funcional
y Genómica



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

StREGTomyces
Regulación génica en *Streptomyces*

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA

DOCTORADO EN BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA

TESIS DOCTORAL

**Estudio funcional y metabolómico del
gen *bfr* y de las posibles quinasas del
regulador maestro Aor1 en la producción de
antibióticos de *Streptomyces coelicolor***

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor con
mención “Doctor internacional”

Javier García Martín

Salamanca, 2026

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

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada “**Estudio funcional y metabolómico del gen *bfr* y de las posibles quinasas del regulador maestro Aor1 en la producción de antibióticos de *Streptomyces coelicolor***”, presentada por D. Javier García Martín para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, dentro del programa de Doctorado en Biología Funcional y Genómica, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Universidad de Salamanca (CSIC/USAL).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, extienden el presente certificado en Salamanca, a 9 de abril de 2026.

Fdo: Dr. Ramón Santamaría Sánchez

Fdo: Dra. Margarita Díaz Martínez

Firma del doctorando: Javier García Martín

Financiación

La presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de un contrato puente financiado por la **“Escalera de Excelencia”** de la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (CYL-2917-03), a un contrato predoctoral dentro del programa **“Convocatoria 2021 de ayudas para financiar 25 contratos predoctorales de la Universidad de Salamanca, cofinanciadas por el Banco de Santander (Programa III: Ayudas para contratos predoctorales)”** y a un contrato predoctoral de la **convocatoria de 2022 de “Ayudas para la formación de profesorado universitario (FPU)”** del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Ref.: **FPU22/00747**). El programa FPU 2022 también financió la estancia internacional (Ref.: **FPU2022-00059**).

El trabajo realizado ha sido financiado a través de los proyectos **PID2019-107716RB-I00** y **PID2022-140962OB-I00**, ambos concedidos por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y la Agencia Estatal de Investigación.

El Instituto de Biología Funcional y Genómica (centro mixto de la Universidad de Salamanca y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas), donde se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral, ha recibido apoyo económico a través del programa **“Escalera de Excelencia” CLU-2017-03/14-20** (Junta de Castilla y León/Fondo Europeo de Desarrollo Regional) y del programa **“DEEP Max 2024” Deep-MaX-2024_IBFG** (Consejo Superior de Investigaciones Científicas).

Agradecimientos

Embarcarme en la tesis doctoral ha sido uno de los mayores retos profesionales y personales de mi vida. Este camino ha acabado exitosamente gracias a muchas personas, por lo que esta sección va a ocupar un espacio considerable, digno de aquellas personas que se mencionan.

Las primeras personas a las que agradecer son mis dos directores de tesis, Ramón y Marga. Ambos me acogisteis como estudiante en prácticas y me guiasteis por el camino del investigador en bacterias raras de colores, y como resultado, además de este trabajo y todo lo que hay detrás, habéis formado a un chico lleno de ilusión que ha cumplido su sueño de ser científico.

Ramón, gracias por transmitirme tu curiosidad infinita a la hora de observar cualquier fenómeno natural, por ínfimo que parezca; por la confianza depositada en mí, no solo como director, sino para cualquier inquietud personal; por tus consejos científicos llenos de rigor y tu excelente dirección ante cualquier problema biológico; por compartir conmigo tus inquietudes científicas cuando Murphy te ponía a prueba, y debatir juntos cómo solventar los resultados tediosos que te encontrabas; por las charlas informales donde me enseñaste pequeñas cosas “de bota”, precedidas por un “a ver, el biotecnólogo”; y, por supuesto, por aportar vitaminas y minerales con tus deliciosas manzanas y peras (mis favoritas) y, ocasionalmente, con alguna otra fruta o verdura.

Marga, gracias también por la confianza que siempre has transmitido, tanto en lo profesional como en lo personal; por aportar tu punto de vista científico, siempre con alguna aproximación que yo no había pensado; por guiarme en la docencia práctica y hacerme un pequeño hueco en la enseñanza de la Microbiología; por la amplia comprensión y empatía que siempre has demostrado; por las charlas informales en el laboratorio y fuera de él; y por tu capacidad de gestión para compaginar la economía del laboratorio, la vicedirección del centro, las gestiones de artículos y la co-dirección del grupo.

La siguiente persona que merece agradecimientos es Joana. Desde que “Alien: Covenant” y el profesor Layton nos unieron, has sido un pilar fundamental durante la carrera y fuera de ella. Siempre me has enseñado cómo ser más autosuficiente, cómo analizar los problemas desde otra perspectiva y cómo avanzar cuando las dudas me invaden. Cabe destacar que también me descubriste el mundo del ejercicio y el gimnasio, aportando significativamente a mi salud física y mental. Siempre estaré profundamente agradecido, eres la hermana que nunca tuve.

Otro pilar fundamental en la carrera ha sido Pablo. Gracias por ser mi amigo, por escucharme y aportar siempre tu visión a las pequeñas cosas, formales o informales. También, gracias por engancharme completamente a la escalada deportiva.

Por nuestro laboratorio “StREGtomyces” han pasado muchas personas, y de todas he aprendido algo. Gracias a todos los compañeros que han compartido espacio y experimentos conmigo: Ana, Carolina,

Clara, Helena, Ricardo, Kike (gracias por haber sido un excelente aprendiz y haber confiado en mí para dirigir tu TFM), Ramiro y Cristina. Quiero hacer mención especial a María, por ser mi amiga en los mejores y peores momentos, por su *graphic design is my passion* y ayudarme en todo lo que implique ordenadores o maquetaciones varias, y por confiar en mí para los problemas dentro y fuera del labo; y a Eva, por haber sido una madre dentro del laboratorio, por siempre preocuparse por mí (en todos los ámbitos) y por su disposición inquebrantable en ayudarnos experimental y personalmente.

Otras personas del IBFG han contribuido también a que la tesis sea un camino más ameno. En el ámbito profesional, gracias a Bea y Carlos, por su labor en MicroMundo y enseñarme en la docencia y la divulgación, siempre contando conmigo y siendo grandes mentores; y gracias a José Antonio, por confiar en mí como ayudante de prácticas y transmitirme su profesionalidad en la ciencia. En lo personal, gracias a Lydia, que me ha acompañado desde la carrera y ha sido una gran amiga dentro y fuera de la ciencia.

El grupito de café del IBFG también ha sido un apoyo en los descansos entre experimentos. Gracias sobre todo a la “vecina”, Verónica, por su apoyo científico al dejarme robar sus reactivos y aparatos y por ser una amiga increíble al compartir buenos y malos momentos. Gracias a Pilar, por ser excelente vecina y siempre sacar una sonrisa. Gracias a Mari y Laura, las vecinas del otro lado, que han estado ahí desde mis inicios en el IBFG y me han acompañado en mi desarrollo científico y personal. Respecto a más compañeros, y amigos, mi más profundo agradecimiento a mis “panas”: Rubén, Anita, Rodrigo, Mario, Marisa, Jesús e Irene. Me aceptasteis como vuestro amigo en mis peores momentos y me demostrasteis que, aunque seamos muy distintos, podemos ser amigos de verdad para lo bueno y para lo malo. Gracias por lo que me habéis aportado y por lo que todavía nos queda por vivir.

Gracias también a otras tantas personas del IBFG, que me han ayudado a nivel profesional y personal. El trabajo que se hace en nuestro centro es, en parte, gracias a todos los que trabajan en los servicios comunes y a las personas que están dispuestas a ayudar con nuevas técnicas y enfoques.

Mis amigos del máster han sido otro apoyo en estos últimos años. Jorge, Ana y Elena, gracias por haber sido mis amigos y también por vuestro apoyo constante, científico y personal. Mención especial tiene Shara, que siempre me comprende a la perfección y fue un apoyo crucial durante la estancia, gracias por escucharme y brindarme tus consejos y tu gran amistad.

Otras personas de Salamanca han tenido un papel especial durante la tesis. Gracias a los que habéis sido mis amigos: Clara, Javi, Ángel, Eva y Jessica. Gracias sobre todo a Diego, siempre te has preocupado por mí y hemos compartido varias aventuras, que espero continúen. Gracias a Patri, por ser una gran amiga durante y después de la carrera, con la que compartir reflexiones de la vida y

locura cotidiana. Gracias especialmente también a Bea, por haber sido un apoyo incondicional tanto en Talavera como en Salamanca.

Fuera de Salamanca, mis “patatas angustiadas” han sido el mayor apoyo que he tenido. Gracias a todos mis amigos de confianza: Marta, Dan, Irene, Sergio, Borja, Sonia, Sandra, Edu, Patri y Carlos. Siempre me habéis apoyado en todos los momentos, os habéis preocupado por mí como un miembro de vuestra familia, me habéis ayudado a crecer como persona y me demostráis una amistad infinita que es muy difícil de encontrar. Gracias también a mis amigos del instituto (Yanira, Raúl, Víctor y Antonio), por brindarme su amistad en los momentos intermitentes en los que estoy por Talavera e integrarme en vuestros planes. También agradecer a Sergio “minisergi”, por haber sido uno de mis mejores amigos y comprenderme siempre tan bien; a Sheila, por su bonita amistad y nuestro fanatismo compartido por “la Lola”; y a Alfre, por incluirme en sus aventuras.

Mi amiga Sara ha sido también un apoyo fundamental durante la estancia y después de ella, al final de la tesis. Gracias por escucharme siempre, por empatizar conmigo, por la gran amistad que me das y por ayudarme a crecer como persona. Nos hemos ayudado mutuamente y ha sido un honor que me hayas brindado la oportunidad de ser tu amigo.

Mi núcleo familiar, mis padres y mi hermano, David, han sido un apoyo durante toda la etapa universitaria, a pesar de no entender mucho de lo que estudio o hago. Gracias a ellos por el apoyo económico y logístico, por desear siempre lo mejor para mí y luchar por ello, por apoyar siempre mis metas profesionales y por el amor transmitido. De mi familia también quiero destacar a dos de mis primas, Marta y Nuria, por ser como hermanas, compartir risas infinitas y el apoyo que nos damos siempre cuando hay algún problema.

Gracias a todas aquellas personas que, durante mis 3 meses de estancia internacional, me ayudaron a desarrollarme como persona. Gracias a Gabriele y Anne por alojarme en su casa y gracias a Emma por toda la ayuda que me brindó antes y durante la estancia. A nivel profesional, quiero agradecer a Gilles por aceptarme en su laboratorio durante esos meses, y sobre todo, a Helga por la excelente supervisión y ayudarme a sentirme aceptado como un miembro más. Muchas personas del grupo MBT fueron esenciales durante mi primera gran experiencia internacional: Isa, Andrea, Sam, Augustin, Lina, Le, Sten, Anna, Rachel, Simona, Emtinan, Bai... Me ayudasteis a nivel científico, a trabajar en un ambiente totalmente nuevo, y me enseñasteis que soy capaz de adaptarme a nuevos grupos y experiencias siendo yo mismo. Nunca olvidaré la gran experiencia que fue salir de mi zona de confort y ser aceptado por tan excelentes compañeros.

También quiero mencionar, si bien es inusual en este tipo de escritos, a todas aquellas personas transitorias que han formado parte de mis amistades y, por diferentes circunstancias y perspectivas, se distanciaron de mi camino. Citando a la cantante Leire Martínez, “gracias por lo aprendido con y sin vosotros”.

Y, por último, quiero darme un mensaje a mí mismo: gracias por no rendirte; gracias por seguir adelante a pesar de todas las dificultades, sobre todo sociales, que has sobrellevado; gracias por haber pedido ayuda cuando lo necesitabas; gracias por haber mantenido tu actitud curiosa y aprender de todas las buenas personas que te rodean; y gracias por convertirte en la mejor versión de ti y reconstruirte. Has llegado hasta aquí y puedes con más, independientemente de lo que te depare el futuro incierto en la ciencia. Sigue siendo tú mismo, sigue mejorando por ti y vuelca tu entusiasmo en las próximas aventuras, sabiendo que la gente de verdad que has conocido seguirá ahí contigo.



ÍNDICES Y ABREVIATURAS

“A los ojos de los demás, soy parte del mundo, pero cuando lo observo desde mi propio punto de vista, yo no estoy en él. Lo que veo es el mundo. Como un observador. Soy el "punto de vista" que crea el mundo. No puedo pertenecer a él”.

- Ergo Proxy (del anime *Ergo Proxy*) (2006).

Índice de contenidos

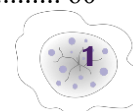
Abreviaturas	13
Resumen	21
Abstract	23

Introducción

I.1 – La era post-antibióticos	27
I.1.1 – Los antibióticos y la resistencia	27
I.1.2 – Desarrollo de nuevos antibióticos	29
I.2 – Bacterias del género <i>Streptomyces</i>	31
I.2.1 – <i>Streptomyces</i> y su potencial biotecnológico	31
I.2.2 – <i>Streptomyces coelicolor</i> : el organismo modelo	32
I.3 – Regulación del metabolismo secundario en <i>Streptomyces</i>	35
I.3.1 – Elementos implicados en regulación.....	35
I.3.2 – Sistemas de dos componentes (TCS).....	38
I.4 – Influencia del hierro en <i>Streptomyces</i>	42
I.4.1 – Homeostasis del hierro.....	42
I.4.2 – Bacterioferritinas.....	44
Antecedentes y objetivos	49

Resultados: capítulo 1

R.1.1 – Efecto del gen <i>bfr</i> en la diferenciación y la producción de antibióticos.....	53
R.1.1.1 – Fenotipo de colonias, crecimiento y cuantificación de antibióticos	53
R.1.1.2 – Fenotipo de unidades formadoras de colonias en medios complejos	55
R.1.1.3. – Sobreexpresión de <i>bfr</i>	56
R.1.2 – Efecto del hierro en la producción de antibióticos	57
R.1.2.1 – Fenotipo en medio NMMP sólido	57
R.1.2.2 – Cuantificación de antibióticos en medio NMMP líquido	59
R.1.2.3 – Detección de la actividad antibiótica en medio sólido	60



R.1.2.4 – Valoración de los niveles de hierro en <i>S. coelicolor</i> M145 y Δbfr	62
R.1.2.5 – Efecto de los quelantes de hierro	63
R.1.3 – Efecto de las especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo	65
R.1.3.1 – Tolerancia al estrés oxidativo	65
R.1.3.2 – Niveles de ROS.....	65
R.1.3.3 – Efecto de compuestos antioxidantes.....	67
R.1.4 – Estudio proteómico.....	70
R.1.4.1 – Proteínas de clústeres de metabolitos secundarios.....	72
R.1.4.2 – Proteínas de regulación del metabolismo secundario y conservones	75
R.1.4.2.1 – Conservones.....	76
R.1.4.3 – Proteínas de estrés oxidativo y respiración.....	77
R.1.4.4 – Proteínas de la envuelta celular y transportadores.....	79
R.1.4.5 – Proteínas de estrés osmótico	80
R.1.4.6 – Proteínas de desarrollo (diferenciación, esporulación y germinación).....	81
R.1.4.7 – Proteínas de metabolismo primario	83
R.1.4.8 – Proteínas ribosómicas y relacionadas con procesos en el ADN	84
R.1.4.9 – Otras proteínas.....	84
R.1.4.10 – Resumen de los resultados de proteómica	85
R.1.5 – Estudio de la producción de sideróforos.....	85
R.1.6 – Estudio del gen <i>bfd</i> mediante CRISPR de interferencia	88
R.1.7 – Conclusiones del capítulo.....	90
R.1.8 – Publicaciones científicas.....	90

Resultados: capítulo 2

R.2.1 – Identificación de las HK asociadas a Aor1	91
R.2.1.1 – Selección de HK candidatas	91
R.2.1.2 – Estudio filogenético de ortólogos de <i>aor1</i> y su HK asociada.....	95
R.2.2 – Fenotipo de los mutantes de delección en las HK candidatas a fosforilar Aor1	96
R.2.2.1 – HK huérfanas: <i>SCO3750</i> y <i>SCO6424</i>	96



R.2.2.2 – Sistema <i>SCO2359/SCO2358</i>	100
R.2.2.3 – Sistema <i>SCO2215/SCO2216</i>	103
R.2.2.3.1 – Estudio de la inhibición de <i>SCO2215</i>	103
R.2.2.3.2 – Estudio de la delección de <i>SCO2216</i> y <i>SCO2215/SCO2216</i>	104
R.2.3 – Fosforilación <i>in vitro</i> de Aor1 por SCO3750.....	107
R.2.4 – Interacción HK-Aor1 mediante ensayos de dos híbridos	113
R.2.5 – Relación entre <i>aor1</i> y el sistema <i>abrC</i>.....	117
R.2.6 – Conclusiones de este capítulo	120

Resultados: capítulo 3

R.3.1 – Realización del ensayo metabolómico.....	121
R.3.1.1 – Selección de medio de cultivo	121
R.3.1.2 – Extracción de compuestos	123
R.3.2 – Análisis inicial de los datos	124
R.3.3 – Estudio descriptivo de los metabolomas.....	125
R.3.3.1 – Metaboloma del mutante Δbfr	126
R.3.3.2 – Metaboloma del mutante $\Delta abrA$	127
R.3.3.3 – Metaboloma del mutante $\Delta aor1$	129
R.3.3.2 – Metaboloma del mutante $\Delta SCO3750$	131
R.3.3.1 – Metaboloma del mutante $\Delta SCO2359$	132
R.3.3.1 – Metaboloma del mutante $\Delta SCO2359/2358$	133
R.3.4 - Conclusión general del capítulo	136

Discusión de resultados

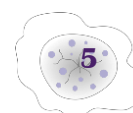
D.1 – El papel del gen <i>bfr</i> en <i>S. coelicolor</i>	139
D.1.1 – Almacenamiento de hierro	139
D.1.2 – Entrada de hierro y señalización por sideróforos	140
D.1.3 – Bfr en estrés oxidativo y como donadora de hierro.....	142
D.2 – HK asociadas a Aor1.....	145
D.3 – Implicación en el metaboloma de los sistemas estudiados	151



Conclusiones/Conclusions.....	157
Materiales y métodos	
M.1 - Microorganismos empleados.....	161
M.1.1 - Conservación de microorganismos.....	162
M.2 - Medios de cultivo.....	162
M.2.1 - Antibióticos empleados	165
M.3 - Condiciones de cultivo	165
M.3.1 – Ensayos fenotípicos	166
M.4 – Manipulación de ácidos nucleicos	166
M.4.1 - Extracción de vectores en <i>Escherichia coli</i>	166
M.4.2 - Extracción de ADN genómico de <i>Streptomyces coelicolor</i>	166
M.4.3 – Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	167
M.4.4 - Electroforesis en gel de agarosa	168
M.4.5 – Purificación de ADN desde gel de agarosa o digestión enzimática.....	168
M.5 – Vectores	168
M.5.1 – Consideraciones generales en el manejo y construcción de vectores	168
M.5.2 – Vectores utilizados.....	169
M.5.3 - Construcción de los vectores generados.....	169
M.5.3.1 - Vectores para la construcción de mutantes (derivados de pCRISPR-Cas9).....	170
M.5.3.2 - Vectores para complementación de mutantes (derivados de pKC796)	171
M.5.3.3 - Vectores para sobreexpresión (derivados de pN702GEM3).....	171
M.5.3.4 - Vectores para producción de proteínas (derivados de pET22b[+])	171
M.5.3.5 - Vectores para ensayo BACTH.....	172
M.5.3.6 - Vectores para inhibición de la expresión génica mediante CRISPRi (derivados de pCB-1).172	
M.6 - Introducción de vectores en microorganismos	173
M.6.1 - Transformación de <i>Escherichia coli</i>	173
M.6.2 - Transformación de <i>Streptomyces coelicolor</i>	173
M.6.3 - Conjugación <i>Escherichia coli</i> – <i>Streptomyces coelicolor</i>	174



M.7 – Obtención de mutantes con CRISPR-Cas9	175
M.7.1 – Inhibición de genes por CRISPRi	175
M.8 – Manipulación de proteínas	176
M.8.1 – Cuantificación de proteínas	176
M.8.2 – Producción de proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	176
M.8.3 – Extracción de proteínas de <i>Escherichia coli</i>	177
M.8.4 – Purificación de proteínas etiquetadas con cola de histidinas	177
M.8.5 – Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)	177
M.8.6 – Electroforesis de proteínas	178
M.8.6.1 - Phos-tag	178
M.8.7 – Tinción de geles de poliacrilamida con proteínas	178
M.8.8 – Western blot	179
M.8.9 – Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i>	179
M.8.10 – Extracción de proteínas general de <i>Streptomyces coelicolor</i>	180
M.8.11 – Proteómica	180
M.8.11.1 - Extracción de proteínas	180
M.8.11.2 - Proteómica cuantitativa	180
M.9 – Ensayos de dos híbridos BACTH	181
M.10 - Análisis de la producción de antibióticos	182
M.10.1 – Producción de undecilprodigiosina (RED) y actinorrodina (ACT)	182
M.10.2 – Antibiógramas y antibiótico dependiente de calcio (CDA)	183
M.10.2.1 - Antibiótico dependiente de calcio (CDA)	183
M.10.2 – Producción de coelimicinas	184
M.11 – Ensayos con hierro y sideróforos	184
M.11.1 – Cuantificación del hierro lábil y total de <i>Streptomyces coelicolor</i>	184
M.11.2 – Ensayos con quelantes de hierro	185
M.11.3 – Cuantificación indirecta de sideróforos	185
M.12 – Ensayos relacionados con especies reactivas de oxígeno	185



M.12.1 - Ensayo de tolerancia a estrés oxidativo.....	185
M.12.2 – Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	185
M.12.3 – Ensayos con <i>scavengers</i> de ROS	186
M.13 – Metabolómica.....	186
M.13.1 – Extracción de metabolitos y análisis HPLC-MS.....	186
M.13.2 – Análisis informático de los datos.....	187
M.14 – Bioinformática, programas informáticos y bases de datos utilizados.....	189
M.14.1 – Ácidos nucleicos y construcción de vectores.....	190
M.14.2 – Alineamientos de secuencias y árboles filogenéticos entre HK asociadas a ortólogos de Aor1.....	190
M.14.3 – Análisis de proteínas y proteómica	191
M.14.4 – Metabolómica	191
M.14.5 – Análisis de imágenes	192
M.14.6 – Estadística	192
M.14.7 – Bibliografía.....	192
M.14.8 – Ofimática	192
Bibliografía	195



Índice de figuras

Introducción

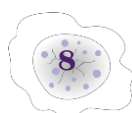
Figura I.1. Muertes globales por bacterias resistentes a antibióticos.	29
Figura I.2. Antibióticos y resistencias a lo largo de los años.	30
Figura I.3. Ciclo vital de <i>Streptomyces</i>	31
Figura I.4. Genoma de <i>S. coelicolor</i>	33
Figura I.5. Pigmentación de <i>S. coelicolor</i>	34
Figura I.6. Regulación del metabolismo secundario de <i>S. coelicolor</i>	36
Figura I.7. Señalización de un TCS.	38
Figura I.8. Genes de metabolismo secundario y estrés osmótico alterados en el mutante $\Delta aorI$	41
Figura I.9. Homeostasis del hierro.	42
Figura I.10. Bacterioferritinas.	45

Resultados: capítulo 1

Figura R.1.1. Fenotipo del mutante Δbfr	53
Figura R.1.2. Producción de antibióticos pigmentados en Δbfr	54
Figura R.1.3. Complementación del mutante Δbfr	54
Figura R.1.4. Fenotipo de colonias en medios ricos.	56
Figura R.1.5. Sobreexpresión de <i>bfr</i>	57
Figura R.1.6. Fenotipo de Δbfr con variación de hierro.	58
Figura R.1.7. Fenotipo de colonias con variación de hierro.	59
Figura R.1.8. Fenotipo en NMMP líquido.	60
Figura R.1.9. Producción de antibióticos pigmentados con variación de hierro.	60
Figura R.1.10. Antibiograma desde NMMP.	61
Figura R.1.11. Antibiograma desde LB.	61
Figura R.1.12. Medida de los niveles de hierro.	63
Figura R.1.13. Quelantes de hierro.	64
Figura R.1.14. Tolerancia a estrés oxidativo.	65



Figura R.1.15. Medida de las ROS.....	66
Figura R.1.16. Experimento inicial con antioxidantes.	67
Figura R.1.17. Efecto de la tiourea.....	68
Figura R.1.18. Efecto del triptófano.....	69
Figura R.1.19. Efecto del ácido ascórbico.....	70
Figura R.1.20. Gráficos de volcán de la proteómica.	71
Figura R.1.21. Diagrama de Venn y clasificación de proteínas.	72
Figura R.1.22. Proteínas con abundancia diferencial de los clústeres <i>act</i> y <i>red</i>	73
Figura R.1.23. Producción de CDA y coelimidinas en <i>S. coelicolor</i> Δbfr	74
Figura R.1.24. Proteínas con abundancia diferencial de otros BGC.	75
Figura R.1.25. Proteínas con abundancia diferencial relacionadas con regulación del metabolismo secundario.....	76
Figura R.1.26. Proteínas con abundancia diferencial pertenecientes a conservones.....	77
Figura R.1.27. Proteínas con abundancia diferencial relacionadas con oxidación.....	79
Figura R.1.28. Proteínas con abundancia diferencial relacionadas con transporte de moléculas y estrés de la envuelta celular.....	80
Figura R.1.29. Proteínas con abundancia diferencial de estrés osmótico.....	81
Figura R.1.30. Proteínas con abundancia diferencial implicadas en germinación, crecimiento, diferenciación y esporulación.....	82
Figura R.1.31. Proteínas con abundancia diferencial relacionadas con metabolismo primario.	83
Figura R.1.32. Proteínas con abundancia diferencial relacionadas con metabolismo de ácidos nucleicos.....	84
Figura R.1.33. Proteínas con abundancia diferencial de función hipotética.	85
Figura R.1.34. Producción de sideróforos en $\Delta abrA$ y Δbfr	87
Figura R.1.35. Producción de sideróforos en $\Delta abrC$, $\Delta aor1$ y Δbfr	87
Figura R.1.36. CRISPRi para inhibir <i>bfd</i>	89



Resultados: capítulo 2

Figura R.2.1. Predicción de STRING.	92
Figura R.2.2. Similitud de proteínas de <i>S. coelicolor</i> con las HK de otros <i>Streptomyces</i> asociadas a un ortólogo de Aor1.	94
Figura R.2.3. Estudio filogenético de Aor1 y SCO3750.....	96
Figura R.2.4. Comprobación de la delección de <i>SCO3750</i>	97
Figura R.2.5. Comprobación de la delección de <i>SCO6424</i>	97
Figura R.2.6. Fenotipo de los mutantes Δ <i>SCO3750</i> y Δ <i>SCO6424</i>	98
Figura R.2.7. Ensayo de complementación del mutante Δ <i>SCO3750</i>	99
Figura R.2.8. Sobreexpresión de <i>SCO3750</i>	99
Figura R.2.9. Comprobación de la delección de <i>SCO2359</i>	100
Figura R.2.10. Comprobación de la delección de <i>SCO2358</i>	101
Figura R.2.11. Comprobación de la delección de <i>SCO2359/SCO2358</i>	101
Figura R.2.12. Fenotipo de los mutantes Δ <i>SCO2359</i> , Δ <i>SCO2358</i> y Δ <i>SCO2359/2358</i>	102
Figura R.2.13. Inhibición de <i>SCO2215</i> por CRISPRi.....	104
Figura R.2.14. Comprobación de la delección de <i>SCO2216</i>	105
Figura R.2.15. Comprobación de la delección de <i>SCO2215</i> y <i>SCO2216</i>	105
Figura R.2.16. Fenotipo de los mutantes Δ <i>SCO2216</i> y Δ <i>SCO2215/2216</i>	106
Figura R.2.17. Primera prueba de producción de SCO3750.	108
Figura R.2.18. Producción de SCO3750 en fracciones solubles.	109
Figura R.2.19. Producción de Aor1.....	110
Figura R.2.20. Optimización de la producción de SCO3750 entera.	111
Figura R.2.21. Purificación de proteínas.....	112
Figura R.2.22. Ensayo de fosforilación de Aor1 <i>in vitro</i>	113
Figura R.2.23. BACTH AbrA1-AbrA2.....	115
Figura R.2.24. BACTH AbrA1-Aor1.....	115
Figura R.2.25. BACTH SCO3750-Aor1.....	116
Figura R.2.26. BACTH SCO2215-Aor1.....	116

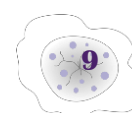


Figura R.2.27. BACTH SCO2359-Aor1.	117
Figura R.2.28. Fenotipo de los mutantes en HK del sistema <i>abrC</i>	118
Figura R.2.29. Sobreexpresión de <i>aorI</i> en mutantes <i>abrC</i>	119
Figura R.2.30. Comprobación de la sobreexpresión de <i>aorI</i>	120

Resultados: capítulo 3

Figura R.3.1. Fenotipo de la cepa silvestre y los mutantes en los tres medios compatibles con el ensayo metabolómico.	122
Figura R.3.2. Actividad antibiótica en ISP2.	123
Figura R.3.3. PCA del ensayo metabolómico.	124
Figura R.3.4. Mapa de calor de los metabolomas.	125

Discusión de resultados

Figura D.1. Esquema de la influencia de los TCS y de Bfr en la señalización por sideróforos.	142
Figura D.2. Modelo del funcionamiento de Bfr en <i>S. coelicolor</i>	144
Figura D.3. Modelo del funcionamiento de SCO3750.	147
Figura D.4. Modelo del funcionamiento de SCO2215 (HK) y SCO2216 (RR).	148
Figura D.5. Modelo del funcionamiento de SCO2359 (HK) y SCO2358 (RR).	149
Figura D.6. Modelo de las HK relacionadas con Aor1 y los medios de cultivo en los que responden.	151

Materiales y métodos

Figura M.1. Esquema de la construcción de los moldes de delección mediante PCR solapante.	171
Figura M.2. Flujo de trabajo resumido para el ensayo BACTH.	182
Figura M.3. Flujo de trabajo de metabolómica.	189



Índice de tablas

Resultados: capítulo 2

Tabla R.2.1. Predicción de HK asociadas a Aor1.	91
Tabla R.2.2. Cepas de <i>Streptomyces</i> utilizadas para el análisis bioinformático de Aor1.....	93

Resultados: capítulo 3

Tabla R.3.1. Compuestos anotados en la comparación del metaboloma de Δbfr y M145.....	127
Tabla R.3.2. Compuestos anotados en la comparación del metaboloma de $\Delta abrA$ y M145.....	128
Tabla R.3.3. Compuestos anotados en la comparación del metaboloma de $\Delta aorI$ y M145.....	130
Tabla R.3.4. Compuestos anotados en la comparación del metaboloma de $\Delta SCO3750$ y M145..	131
Tabla R.3.5. Compuestos anotados en la comparación del metaboloma de $\Delta SCO2359$ y M145..	133
Tabla R.3.6. Compuestos anotados en la comparación del metaboloma de $\Delta SCO2359/2358$ y M145.	135

Materiales y métodos

Tabla M.1. Microorganismos empleados en la tesis doctoral.	161
Tabla M.2. Antibióticos empleados.	165
Tabla M.3. Programas de PCR generales.....	167
Tabla M.4. Programa de PCR empleado para la polimerasa Biotools.	168
Tabla M.5. Enzimas de restricción empleadas.....	169
Tabla M.6. Programa de PCR para CRISPR/Cas9.....	170
Tabla M.7. Protocolo de Golden Gate.....	173

Anexos

Tabla A.1. Vectores utilizados y contruidos en esta tesis doctoral.....	229
Tabla A.2. Oligonucleótidos empleados en esta tesis doctoral.	233
Tabla A.3. Comparación del metaboloma de Δbfr y M145.	241
Tabla A.4. Comparación del metaboloma de $\Delta abrA$ y M145.....	248
Tabla A.5. Comparación de los metabolomas de $\Delta aorI$ y M145.	257



Tabla A.6. Comparación de los metabolomas de $\Delta SCO3750$ y M145.	272
Tabla A.7. Comparación de los metabolomas de $\Delta SCO2359$ y M145.	280
Tabla A.8. Comparación de los metabolomas de $\Delta SCO2359/2358$ y M145.	286

Abreviaturas

abe	Incremento de antibióticos en sobreexpresión (del inglés <i>antibiotic enhancement upon overexpression</i>)
Abr	Regulador de antibióticos (del inglés <i>antibiotic regulator</i>)
AC	Adenilato ciclasa
ACT	Actinorrodina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosómico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AN	Agar nutritivo
Aor	Regulador huérfano de antibióticos (del inglés <i>antibiotic orphan regulator</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	Colección americana de cultivos tipo (del inglés <i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenosín trifosfato (del inglés <i>adenosin triphosphate</i>)
BACTH	Ensayo de dos híbridos bacteriano con adenilato ciclasa (del inglés <i>Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid Assay</i>)
BCIP	5-bromo-3- cloro-3-indolil fosfato (del inglés <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>)
Bfd	Ferredoxina asociada a bacterioferritina (del inglés <i>bacterioferritin-associated ferredoxin</i>)
Bfr	Bacterioferritina
BGC	Clúster de genes biosintéticos (del inglés <i>biosynthetic gene cluster</i>)
BIP	2,2'-bipiridilo
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos (del inglés <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BPS	Ácido bazofenantrilsulfónico (del inglés <i>bathophenanthroline disulfonic acid</i>)
BSA	Seroalbúmina bovina (del inglés <i>bovine serum albumin</i>)

CAA	2-cloroacetamida
CAS	Chrome Azurol S
CDA	Antibiótico dependiente de calcio (del inglés <i>calcium dependent antibiotic</i>)
CDS	Sistema de introducción del calibrante (del inglés <i>calibrant delivery system</i>)
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
ChEBI	Base de datos de entidades químicas de interés biológico (del inglés <i>Chemical Entities of Biological Interest</i>)
CID	Disociación inducida por colisión (del inglés <i>collision-induced dissociation</i>)
COCONUT	Colección de productos naturales en abierto (del inglés <i>COLlection of Open NatUral producTs</i>)
CPK	Poliquétido críptico, hace referencia a las coelomicinas (del inglés <i>cryptic polyketide</i>)
CRISPR	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas (del inglés <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>)
CRISPRi	Técnica de interferencia mediante CRISPR ("i" del inglés <i>interference</i>)
CSR	Reguladores situados en clústeres (del inglés <i>cluster-situated regulators</i>)
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio (del inglés <i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>)
CUBIC	Sistema de CRISPRi inducible por cumato (del inglés <i>Cumate-based inducible CRISPRi</i>)
cvn	Conservón
DCFH2-DA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DDA	Adquisición dependiente de datos (del inglés <i>data dependent acquisition</i>)
DO	Densidad óptica
Dps	Proteínas de unión a ADN en células en inanición (del inglés <i>DNA binding proteins from starved cells</i>)
DTT	Ditiotreitol
DtxR	Reguladores de toxina diftérica (del inglés <i>diphtheria toxin regulator</i>)
ECF	Función extracitoplasmática (del inglés <i>extracytoplasmic function</i>)
ecr	Expresión coordinada con RED (del inglés <i>expression coordinated with red</i>)
EDTA	Ácido etilendiamiotetraacético (del inglés <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)

ESI	Ionización por electrospray (del inglés <i>Electrospray ionization</i>)
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
Ftn	Ferritina
Fur	Reguladores de la toma de hierro (del inglés <i>ferric uptake regulator</i>)
GNPS	Red social de productos naturales global (del inglés <i>Global Natural Products Social Networking</i>)
GTP	Guanosín trifosfato (del inglés <i>guanosin triphosphate</i>)
HK	Histidina quinasa
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas (del inglés <i>High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
IMP	Inosina monofosfato
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
KEGG	Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas (del inglés <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>)
LB	Medio "caldo lisogénico" (del inglés <i>lysogeny broth</i>)
m/z	Relación masa/carga
Mb	Megabases
MEGA	Programa de análisis de genética molecular evolutiva (del inglés <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (del inglés <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
NBT	Nitrotetrazolio azul (del inglés <i>Nitroterazolium Blue</i>)
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica (del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NPAAtlas	Atlas de productos naturales (del inglés <i>The Natural Products Atlas</i>)
Nsd	Afecta negativamente a la diferenciación fisiológica de <i>Streptomyces</i> (del inglés <i>negatively affecting Streptomyces physiological differentiation</i>)
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases
PCA	Análisis de componentes principales (del inglés <i>Principal Component Analysis</i>)

PCD	Muerte celular programada (del inglés <i>programmed cell death</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDA	Medio agar de patata y dextrosa (del inglés <i>Potato Dextrose Agar</i>)
ppGpp	Guanosina 3'-difosfato 5'-trifosfato
p/v	Porcentaje peso/volumen
QTOF	Cuadripolo acoplado a tiempo de vuelo (del inglés <i>Quadrupole Time-of-Flight</i>)
rar	Restauración del micelio aéreo en el mutante <i>amfR</i> (del inglés <i>restoration of aerial mycelium in amfR mutant</i>)
RED	Undecilprodigiosina
RGB	Sistema de colores "rojo, verde y azul" (del inglés <i>Red, Green, Blue</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>reactive oxygen species</i>)
Rpf	Factor promotor de la resurrección (del inglés <i>resuscitation-promoting factor</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RR	Regulador de respuesta
SARP	Proteínas de regulación de antibióticos de <i>Streptomyces</i> (del inglés <i>Streptomyces antibiotic regulatory proteins</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SFM	Medio harina, soja y manitol (del inglés <i>Soy Flour Mannitol</i>)
sgRNA	Ácido ribonucleico (ARN) de guía único (del inglés <i>single guided RiboNucleic Acid</i>)
STAS	Transportador de sulfato y antagonista de factor antisigma (del inglés <i>sulphate transporter and AntiSigma factor antagonist</i>)
STRING	Herramienta de búsqueda para la recuperación de genes y proteínas que interaccionan (del inglés <i>Search Tool for the Retrieval of INteracting Genes/Proteins</i>)
TB	Medio "caldo fantástico" (del inglés <i>terrific broth</i>)
TCA	Ácido tricloroacético
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina (del inglés <i>tris(2-carboxyethyl)phosphine</i>)
TCS	Sistema de dos componentes (del inglés <i>two-component system</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético

TSA/TSB	Caldo o agar triptona soja (del inglés <i>Tryptic Soy Agar/Broth</i>)
UA	Unidades de absorbancia o unidades arbitrarias
UFC	Unidades formadoras de colonias
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YEPD	Medio "extracto de levadura, peptona y dextrosa" (del inglés <i>yeast extract, peptone and dextrose</i>)



RESUMEN

ABSTRACT

“El tiempo está pasando tan rápido, ahora mismo quisiera quejarme ante Einstein. ¿Sabes? Que el tiempo avance lento o rápido depende de la percepción. La teoría de la relatividad es tan romántica, y a la vez tan triste...”.

- Makise Kurisu (del anime *Steins;Gate*) (2011-2015).

Resumen

Debido a la crisis generada por las bacterias resistentes a antibióticos, es necesario identificar nuevas moléculas con potencial antibiótico que permitan tratar las infecciones bacterianas actuales. Uno de los abordajes para conseguir este objetivo es el estudio de la regulación de la producción de antibióticos por microorganismos productores. Entre ellos, las bacterias del género *Streptomyces* poseen un gran potencial, dada su gran cantidad de genes que permiten la síntesis de metabolitos secundarios. Estos genes están muy controlados por factores de regulación que integran señales externas e internas, de modo que caracterizar estas redes es crucial para comprender qué factores son necesarios para incrementar la producción de antibióticos y para despertar genes no activados en condiciones de laboratorio, que puedan ser claves para la producción de nuevas moléculas.

En este trabajo, se ha profundizado en el estudio de las redes de regulación de *S. coelicolor*, organismo modelo del género *Streptomyces*. Los sistemas de dos componentes (TCS) en estas bacterias cumplen un papel esencial en el control del desarrollo y del metabolismo. Algunos TCS descritos en nuestro grupo de investigación intervienen en la producción de antibióticos en *S. coelicolor*, y todos ellos regulan el gen *bfr*, que codifica la bacterioferritina Bfr. Entre estos TCS destaca el regulador huérfano Aor1, que tiene gran influencia en la expresión del genoma de *S. coelicolor* y cuya histidina quinasa asociada, encargada de activarlo, se desconoce.

En primer lugar, en esta tesis se describe el papel de la bacterioferritina codificada por el gen *bfr* en el desarrollo de *S. coelicolor* mediante el estudio del mutante de delección Δbfr . Bfr es un elemento necesario para una correcta diferenciación y producción de antibióticos (actinorrodina, prodigiosinas y coelimicinas) en medios de cultivo complejos, mientras que en medio mínimo su efecto depende de la concentración de hierro y del estado (sólido o líquido) del medio. Bfr está implicada en la homeostasis del hierro, pero esta no es su función principal al no alterarse los niveles de hierro en el mutante Δbfr . La ausencia de *bfr* causa cambios a nivel proteómico: aumenta la abundancia de proteínas de estrés oxidativo (y los niveles de especies reactivas de oxígeno en el mutante), del antibiótico dependiente de calcio y de proteínas de respiración, mientras que disminuye la abundancia de proteínas de desarrollo, de varios clústeres para biosíntesis de metabolitos y de traducción. Además, varias proteínas de señalización alteran sus niveles en el mutante Δbfr . Con los datos de esta tesis, se propone un modelo en el que Bfr es necesaria para donar hierro a proteínas de regulación importantes para la síntesis de metabolitos secundarios.

En cuanto al regulador huérfano Aor1, mediante varias estrategias, se han identificado varias quinasas que podrían estar asociadas a este regulador: SCO3750 (quinasa huérfana), SCO2215 (asociada al regulador SCO2216) y SCO2359 (asociada al regulador SCO2358). La asociación entre estas proteínas y Aor1 se ha estudiado mediante la generación de mutantes de delección y CRISPR de

interferencia, y se ha validado mediante ensayos de dos híbridos. También se ha estudiado brevemente la relación entre el sistema AbrC, previamente caracterizado en el laboratorio, con Aor1. Aún quedan por caracterizar las señales a las que responden estas proteínas y su mecanismo de regulación.

Finalmente, se realizó un estudio metabolómico de varias cepas de interés relacionadas con los TCS estudiados en este trabajo: la cepa silvestre y los mutantes $\Delta abrA$, Δbfr , $\Delta aor1$, $\Delta SCO3750$, $\Delta SCO2359$ y $\Delta SCO2359/2358$. Muchos de los metabolitos anotados al comparar los metabolomas de cada mutante con el silvestre no se pudieron identificar con exactitud, lo cual refleja el conocimiento que falta en el metabolismo de *S. coelicolor*. La identificación de estos metabolitos sería clave para profundizar en los mecanismos de regulación de estos sistemas.

En conclusión, esta tesis caracteriza en gran medida el papel de *bfr* en la red regulatoria de la producción de antibióticos de *S. coelicolor*, y profundiza en la red molecular del regulador huérfano Aor1 mediante su relación con nuevos elementos no descritos anteriormente (la quinasa huérfana SCO3750 y los TCS SCO2215/2216 y SCO2359/2358) y con el sistema AbrC. Además, este trabajo inicia el estudio metabolómico de estos sistemas involucrados en la síntesis de antibióticos y propone su estudio más detallado para comprender las redes de regulación de *S. coelicolor* y mejorar la producción y descubrimiento de metabolitos secundarios.

Abstract

Due to the crisis caused by antibiotic-resistant bacteria, it is necessary to identify new molecules with antibiotic potential that can treat current bacterial infections. One approach to achieve this goal is to study the regulation of antibiotic production by antibiotic-producing microorganisms. Among these, bacteria from the genus *Streptomyces* have great potential, given their large number of genes that enable the synthesis of secondary metabolites. These genes are tightly controlled by regulatory factors that integrate external and internal signals, so characterizing these networks is crucial to understand which factors are necessary to increase antibiotic production and to turn on genes that are not activated under laboratory conditions, which may be key to the production of new molecules.

In this work, we have delved deeper into the study of the regulatory networks of *S. coelicolor*, a model organism of the *Streptomyces* genus. Two-component systems (TCS) in these bacteria play an essential role in controlling development and metabolism. Some TCS described in our research group are involved in the production of antibiotics in *S. coelicolor*, and all of them regulate the *bfr* gene, which encodes the bacterioferritin Bfr. Among these TCS, the orphan regulator Aor1 stands out, which has a major influence on the expression of the genome of *S. coelicolor* and whose associated histidine kinase, responsible for activating it, is unknown.

Firstly, this thesis describes the role of the bacterioferritin codified by the *bfr* gene in the development of *S. coelicolor* by studying the Δbfr deletion mutant. Bfr is a necessary element for the correct differentiation and production of antibiotics (actinorhodin, prodigiosins and coelimycins) in complex culture media, while in minimal media its effect depends on the iron concentration and the state (solid or liquid) of the medium. Bfr is involved in iron homeostasis, but this is not its main function, as iron levels are not altered in the Δbfr mutant. The lack of *bfr* produces changes at the proteomic level: the abundance of proteins linked to oxidative stress (and levels of reactive oxygen species in the mutant), calcium-dependent antibiotic and respiration proteins increases, while the abundance of developmental proteins, various clusters for metabolites biosynthesis and translation proteins decreases. In addition, several signaling proteins alter their levels in the Δbfr mutant. Based on the data from this thesis, a model is proposed in which Bfr is necessary to donate iron to regulatory proteins important for the synthesis of secondary metabolites.

As for the orphan regulator Aor1, several strategies have been used to identify several kinases that could be associated with this regulator: SCO3750 (orphan kinase), SCO2215 (associated with the regulator SCO2216) and SCO2359 (associated with the regulator SCO2358). The association between these proteins and Aor1 has been studied by generating deletion mutants and CRISPR interference and has been validated by two-hybrid assays. The relationship between the AbrC system,

previously characterized in the laboratory, and Aor1 has also been briefly studied. The signals these proteins respond to, and their regulatory mechanism, remain to be characterized.

Finally, a metabolomic study was performed on several strains of interest related to the TCS studied in this work: the wild-type strain and the mutants $\Delta abrA$, Δbfr , $\Delta aor1$, $\Delta SCO3750$, $\Delta SCO2359$ and $\Delta SCO2359/2358$. Many of the metabolites noted when comparing the metabolomes of each mutant with the wild type could not be identified with certainty, reflecting the lack of knowledge about the metabolism of *S. coelicolor*. The identification of these metabolites would be key to further understanding the regulatory mechanisms of these systems.

In conclusion, this thesis largely characterizes the role of *bfr* in the regulatory network of antibiotic production in *S. coelicolor* and delves into the molecular network of the orphan regulator Aor1 through its relationship with new, previously undescribed elements (the orphan kinase SCO3750 and the TCS SCO2215/2216 and SCO2359/2358) and with the AbrC system. Furthermore, this work initiates the metabolomic study of these systems involved in antibiotic synthesis and proposes more detailed studies to understand the regulatory networks of *S. coelicolor* and improve the production and discovery of secondary metabolites.



INTRODUCCIÓN

“Cuando morimos, nuestra energía no desaparece, simplemente cambia de forma. Nos convertimos en parte de algo más grande, parte del universo”.

- Jemma Simmons (de la serie *Marvel: agentes de S.H.I.E.L.D.*) (2013).

I.1 – La era post-antibióticos

I.1.1 – Los antibióticos y la resistencia

Antes del año 1940, las infecciones causadas por bacterias y las complicaciones clínicas derivadas de estas infecciones suponían la mayor causa de muerte en la población (Baquero, 2021). A partir del descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming, en 1928, y de trabajos posteriores en la producción de antibióticos por microorganismos, como los trabajos de Selman Waksman a partir de los años 1930, los antibióticos fueron introducidos en la medicina y supusieron una revolución (Hutchings et al., 2019; Iskandar et al., 2022).

Además del tratamiento de infecciones bacterianas, los antibióticos son esenciales en varios procedimientos de la medicina actual, como los trasplantes, operaciones y el tratamiento del cáncer (Hutchings et al., 2019). Si bien los antibióticos son herramientas cruciales en la medicina, su uso inadecuado y abusivo en la salud humana, animal y vegetal ha fomentado que las bacterias se expongan a los antibióticos de manera innecesaria en su entorno (Gil-Serna et al., 2025; Irfan et al., 2022).

Esta exposición a antibióticos, en concentraciones por debajo de las inhibitorias, resulta en una presión selectiva que favorece que las bacterias adquieran mecanismos de resistencia, bien por mutación ante la exposición a agentes externos o por transferencia horizontal de genes de resistencia. Así, las bacterias adquieren mecanismos para que los antibióticos se vuelvan ineficaces, entre los que se encuentran la modificación o rotura del antibiótico, bombas de expulsión una vez el antibiótico ha entrado en la célula, reducción de la permeabilidad para que el antibiótico no entre o modificación de las dianas originales frente a las que actuaba el antibiótico (Irfan et al., 2022; Iskandar et al., 2022; Khan et al., 2024). El mayor problema lo ocasionan las denominadas “superbacterias”, que han adquirido mecanismos de resistencia para varios antibióticos. Entre estas, destacan las bacterias del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.), que son las que más contribuyen a la resistencia a varios antibióticos y a las infecciones a nivel mundial (Hetta et al., 2025).

La resistencia a antibióticos es un fenómeno natural (Paun et al., 2026): en ambientes sin intervención humana, se han encontrado genes de resistencia a antibióticos (Iskandar et al., 2022). Sin embargo, este fenómeno se ha acelerado en los últimos años debido a la actividad humana. Como ya se ha mencionado, el uso excesivo de antibióticos en tratamientos, tanto humanos como animales, y en profilaxis favorece la evolución de las bacterias, y este consumo global no ha parado de aumentar (Irfan et al., 2022; Khan et al., 2024). Otros factores como el cambio climático, la desigualdad en los

sistemas de salud y procedimientos de higiene (como el saneamiento de agua, la gestión de residuos...) entre los países del mundo y la falta de medidas de control de infecciones en centros de salud también contribuyen a que la resistencia a antibióticos se disperse. La resistencia a antibióticos es un problema que debe abordarse desde una perspectiva *One Health*, teniendo en consideración la salud animal y la del medio ambiente, no solo la humana (Iskandar et al., 2022).

Los datos más completos, del año 2019, estiman que este problema de salud causó casi 5 millones de muertes, una cantidad mucho mayor a lo estimado (Figura I.1) (Murray et al., 2022), y las últimas previsiones estiman que, para 2050, podría haber más de 8 millones de muertes a nivel mundial, sobre todo en ciertas regiones del mundo como África y Asia (Naghavi et al., 2024). Se estima que el aumento de las bacterias resistentes a antibióticos cause escenarios donde los antibióticos usados en clínica no surtan ningún efecto y donde los hospitales se conviertan en zonas de transmisión de infecciones nosocomiales con resistencia a antibióticos. Además, el gasto económico derivado de costes sanitarios por esta problemática también está aumentando (Irfan et al., 2022).

A pesar de su gran importancia, este problema de salud es muchas veces nombrado como la “pandemia silenciosa”, pues las bacterias que llevan determinantes genéticos de resistencia pueden viajar, en el mundo globalizado actual, como parte de la microbiota de viajeros durante desplazamientos o en transporte de productos alimenticios o animales (Gil-Serna et al., 2025). Además, debido a esta globalización, los genes y factores responsables de la resistencia a antibióticos pueden dispersarse en ambientes con bacterias que nunca se expusieron a antibióticos (Khan et al., 2024).

Si bien esta introducción se ha centrado en la resistencia a antibióticos, hay que tener en cuenta que se puede hablar, en general, de resistencia a antimicrobianos, pues también otros microorganismos no bacterianos y potencialmente patógenos están adquiriendo resistencia a sus respectivos tratamientos (Gil-Serna et al., 2025).

INTRODUCCIÓN

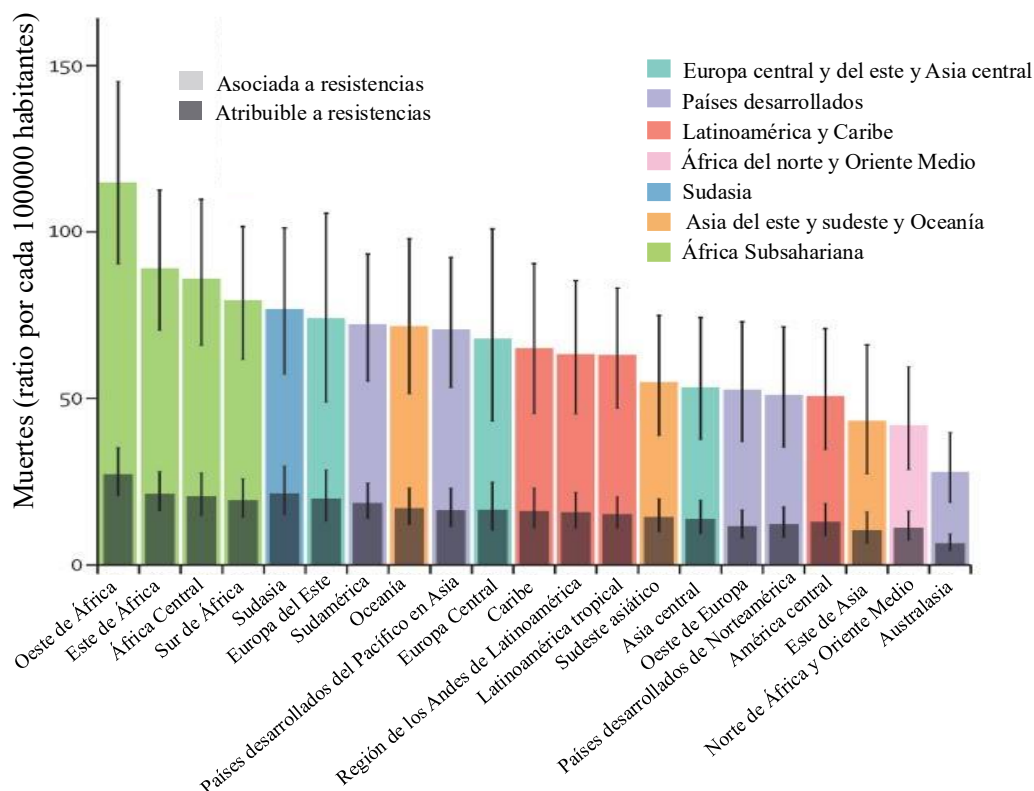


Figura I.1. Muertes globales por bacterias resistentes a antibióticos. Muertes asociadas a infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos por regiones. Adaptado de Murray et al., 2022.

I.1.2 – Desarrollo de nuevos antibióticos

La resistencia a antibióticos es un problema de salud global. Las bacterias multirresistentes, sobre todo las del grupo ESKAPE, son las que más preocupan por su alta virulencia, la evolución de sus perfiles de resistencia a antibióticos y las pérdidas que generan, tanto a nivel de vidas humanas como a nivel económico en gastos sanitarios (Hetta et al., 2025).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado diversas iniciativas para controlar la expansión de las bacterias resistentes a antibióticos, a nivel político y sanitario (Khan et al., 2024; World Health Organization, 2024, 2025). Estas iniciativas deben ser incorporadas a nivel individual por cada país. Por ejemplo, en España, existe el Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos (Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN), 2025). Además, a nivel social, existen iniciativas para concienciar a la población sobre la resistencia a los antibióticos, como el proyecto MicroMundo (Gil-Serna et al., 2025).

Una de las prioridades de la OMS es el descubrimiento de nuevos antibióticos. Desde la llamada “era dorada” de los antibióticos, entre los años 1940 y 1970, muy pocos nuevos antibióticos han sido descubiertos, lo cual no es suficiente para tratar las crecientes infecciones causadas por bacterias resistentes (Figura I.2) (Alam et al., 2022; Iskandar et al., 2022; Khan et al., 2024).

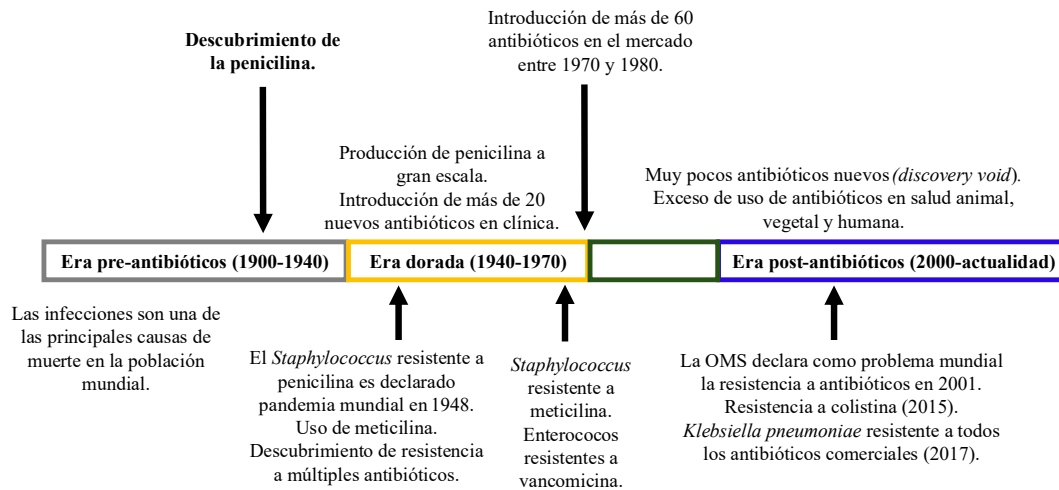


Figura I.2. Antibióticos y resistencias a lo largo de los años. Diagrama temporal del descubrimiento de antibióticos y aparición de resistencias. Adaptado de Khan et al., 2024

Se están llevando a cabo varias estrategias de investigación para elaborar nuevos tratamientos frente a las bacterias resistentes a antibióticos, como es el uso de virus bacteriófagos, el descubrimiento de nuevas moléculas con potencial antibiótico o inhibidores de la virulencia de estas bacterias. Aunque el número de iniciativas es elevado, el proceso de comercialización de un nuevo agente terapéutico conlleva mucho tiempo, en general más de 10 años, y un enorme coste económico. De todas las moléculas que se ensayan, muy pocas llegan a fases posteriores a la investigación preclínica, y por ello las grandes farmacéuticas son reticentes a invertir en investigación de nuevos antibióticos debido a la poca posibilidad de obtener beneficios (Iskandar et al., 2022; Miethke et al., 2021).

A pesar de estos inconvenientes, sobre todo a nivel de financiación, un paso crucial en el descubrimiento de nuevas terapias sigue siendo la investigación de los “productos naturales”, es decir, metabolitos secundarios producidos por microorganismos con potencial biotecnológico, entre los cuales se encuentran los antibióticos (Miethke et al., 2021; Rütten et al., 2022; Santos-Aberturas & Vior, 2022). En la naturaleza, los microorganismos producen antibióticos como defensa frente a la presencia de otros microorganismos, entre otras funciones dentro de su hábitat, y por ello, esta síntesis está muy controlada por señales del entorno (Hutchings et al., 2019). Existe todavía un gran potencial natural de antibióticos producidos por microorganismos, y entender cómo se controla su producción (como se detallará más adelante) es crucial para la mejora en la producción de antibióticos o el descubrimiento de nuevas moléculas que permitan seguir contribuyendo a la medicina moderna.

I.2 – Bacterias del género *Streptomyces*

I.2.1 – *Streptomyces* y su potencial biotecnológico

Los actinomicetos (bacterias del filo *Actinomycetota*) son microorganismos muy abundantes en el suelo y en otros ambientes, como los sedimentos marinos, que poseen un gran potencial para la producción de compuestos con actividad biológica (Salwan & Sharma, 2020; Santos-Aberturas & Vior, 2022; van Bergeijk et al., 2020). Se estima que dos tercios de los productos naturales con actividad farmacéutica proceden de actinomicetos, y la mayoría de ellos son sintetizados por bacterias del género *Streptomyces* (Hutchings et al., 2019; Salwan & Sharma, 2020).

Las bacterias del género *Streptomyces* son bacterias Gram-positivas filamentosas, con alto contenido en guanina y citosina (G + C) en sus genomas (incluso más del 70 %), que de media tienen un tamaño de 8-9 megabases (Mb) (Schlimpert & Elliot, 2023). Su ciclo de vida es comparable al de un hongo: estas bacterias forman un micelio vegetativo que, en condiciones adversas, genera un micelio aéreo que da lugar a las esporas para la dispersión y reinicio del ciclo (Figura I.3). Es en estas condiciones adversas donde, en general, se activa la producción de metabolitos secundarios como los antibióticos (Barbuto Ferraiuolo et al., 2021; Schlimpert & Elliot, 2023). En algunos casos, como en *S. venezuelae* ante la falta de glucosa o por la acción de volátiles, se puede activar un crecimiento exploratorio, visible como colonias rugosas de gran tamaño (Jones & Elliot, 2017).

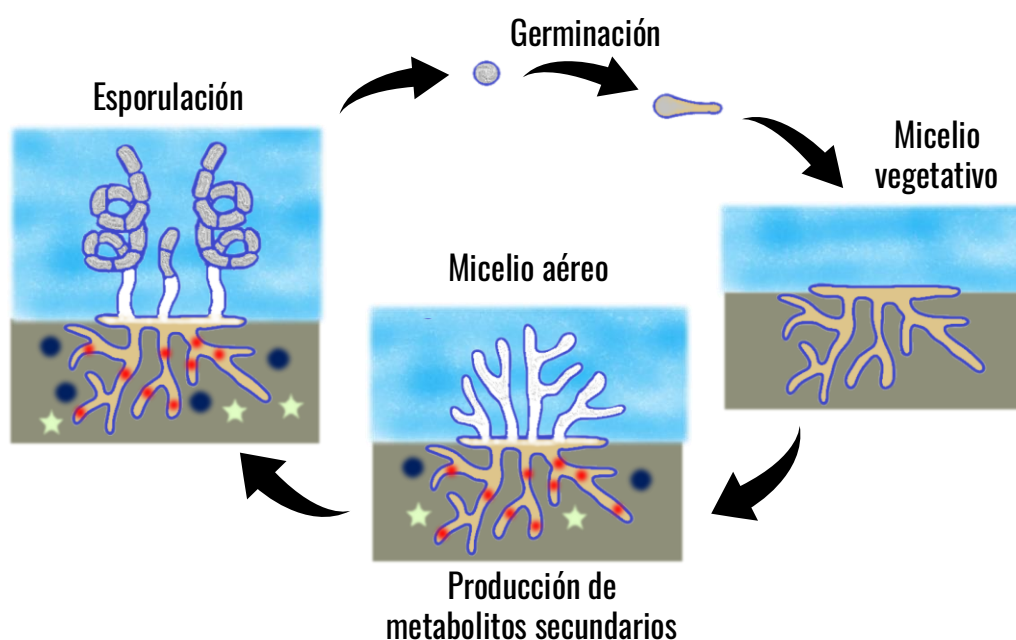


Figura I.3. Ciclo vital de *Streptomyces*.

El potencial biotecnológico de este género se debe al gran tamaño de sus genomas y a que contienen entre 25 y 70 clústeres de genes biosintéticos (BGC) por genoma (Alam et al., 2022; Donald et al., 2022). Los BGC son agrupaciones de genes que codifican las enzimas y otros elementos (como

elementos de regulación y transporte) necesarios para la biosíntesis de moléculas bioactivas (Santos-Aberturas & Vior, 2022). En la naturaleza, los productos naturales, como los antibióticos, pueden tener diversas funciones, como la competición y la señalización con otros microorganismos, la asociación de actinomicetos con plantas (Hutchings et al., 2019; Nai & Meyer, 2018) o la regulación del metabolismo oxidativo (Virolle, 2020), y en general se conoce muy poco de la función ecológica de estos metabolitos microbianos y de las condiciones necesarias para su biosíntesis (Senges et al., 2018).

Se ha observado que los microorganismos que contienen gran cantidad de BGC, no solo los actinomicetos (por ejemplo, muchas especies de hongos), solo muestran una pequeña parte de todo su potencial bioquímico en condiciones de laboratorio: se estima que tres cuartas partes de toda la capacidad de estos microorganismos para sintetizar productos naturales se encuentra silenciada en condiciones experimentales por la falta de las señales específicas y circunstancias necesarias para su activación (Donald et al., 2022; Hutchings et al., 2019; van Bergeijk et al., 2020). Por ello, para desbloquear este potencial silenciado, es necesario entender la función de los metabolitos secundarios en la fisiología del microorganismo productor, así como las interacciones ecológicas de los actinomicetos con su entorno para, finalmente, comprender, a nivel molecular, qué señales y elementos bacterianos controlan la activación de los BGC (van Bergeijk et al., 2020).

1.2.2 – *Streptomyces coelicolor*: el organismo modelo

Uno de los organismos modelo para el estudio de *Streptomyces*, y sobre todo para el estudio de la producción de metabolitos secundarios, es *Streptomyces coelicolor* A3(2). *S. coelicolor* posee un genoma linear de 8,6 Mb (Figura I.4), con 8275 genes y los elementos genéticos móviles SCP1 y SCP2, que fue secuenciado en 2002 (Bentley et al., 2002). Desde entonces, se han desarrollado varias herramientas genéticas para su estudio (Schlimpert & Elliot, 2023). En esta tesis doctoral, la cepa modelo empleada es *S. coelicolor* A3(2) M145, que carece de los elementos genéticos móviles SCP1 y SCP2 (Nodwell, 2019). A partir de este momento, la información de *S. coelicolor* hará referencia a la cepa M145.

El ciclo de vida de *S. coelicolor*, en el laboratorio, es análogo al descrito en el apartado anterior en medio sólido, mientras que en medio líquido, *S. coelicolor* no diferencia el micelio aéreo ni esporula (Jones & Elliot, 2018; Manteca, Jung, et al., 2010; Yagüe et al., 2014). Durante la diferenciación del micelio aéreo, que ocurre en medio sólido, parte del micelio vegetativo sufre una muerte celular programada (PCD) para liberar nutrientes que usará el micelio restante y para liberar antibióticos que protegen estos nutrientes de competidores (Tenconi et al., 2018; Vladimirov et al., 2023). El micelio aéreo de *S. coelicolor* es de color blanco, mientras que las esporas unigenómicas son de color gris (Figura I.5). La pigmentación permite, a nivel visual, detectar alteraciones en el desarrollo, muy ligado al metabolismo secundario (Nodwell, 2019).

INTRODUCCIÓN

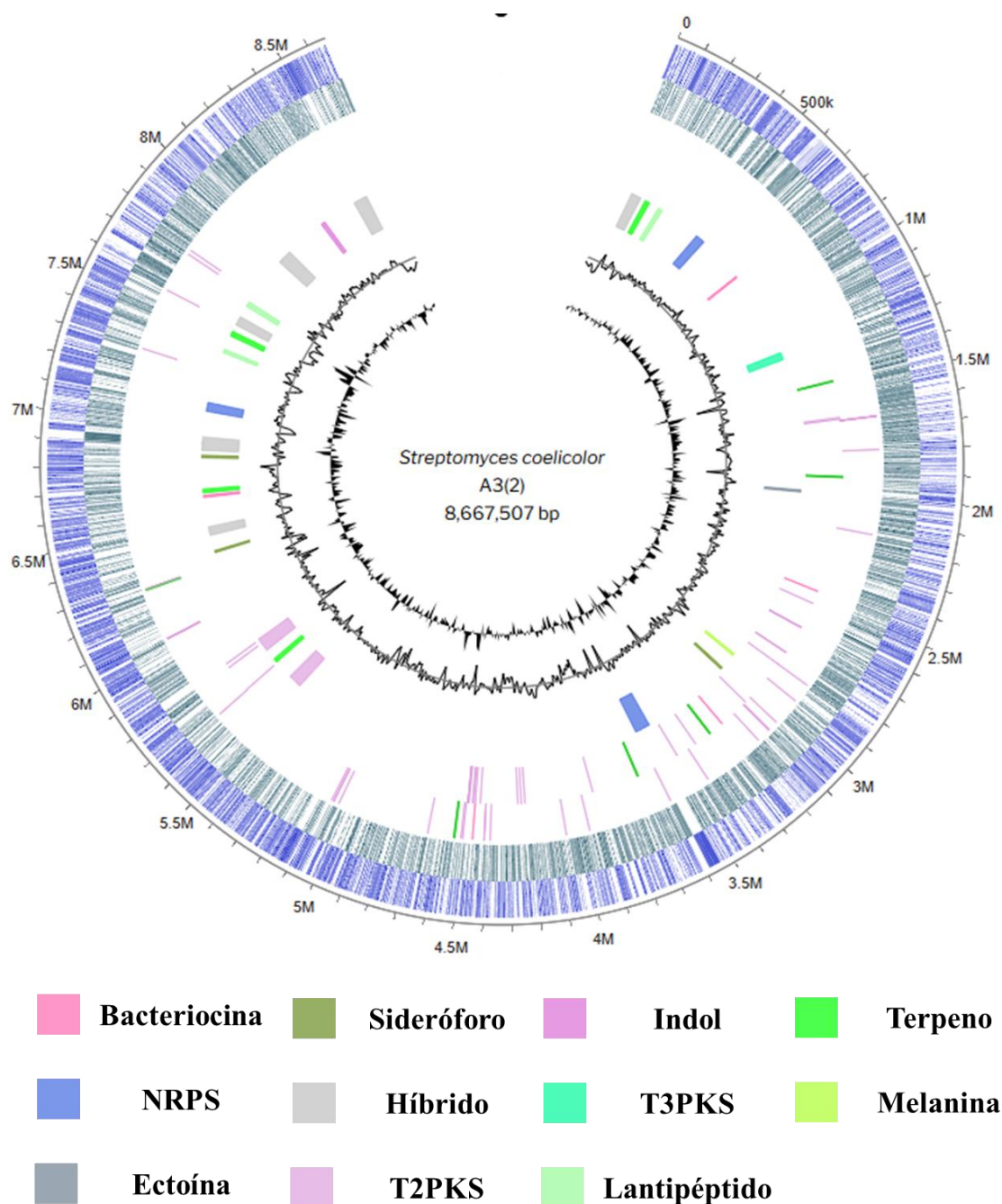


Figura I.4. Genoma de *S. coelicolor*. Representación circular del genoma de *S. coelicolor* y BGC predichos por el software AntiSMASH (indicados por colores), extraído de https://morfdb.org/projects/Microbiology/ActinoBase/genome/GCF_000203835.1/view (accedido el 2 de febrero de 2026).

S. coelicolor también facilita el estudio del metabolismo secundario y de cómo se activan los genes necesarios para la biosíntesis de compuestos gracias a los pigmentos que produce. Las prodigiosinas, entre las que destaca la undecilprodigiosina (RED), son compuestos de color rojo implicados en la PCD e intracelulares (permanecen dentro de las células y, por ende, de las colonias durante el crecimiento en medio de cultivo) (Nodwell, 2019; Tenconi et al., 2018), y la actinorrodina (ACT) es un compuesto azul a pH neutro y básico, perteneciente al grupo de los poliquétidos, que se secreta al

medio (Figura I.5) (C. Li et al., 2021; Schlimpert & Elliot, 2023). Ambos compuestos tienen actividad antibiótica y se utilizan como modelos de estudio (P. Li et al., 2022; Schlimpert & Elliot, 2023).

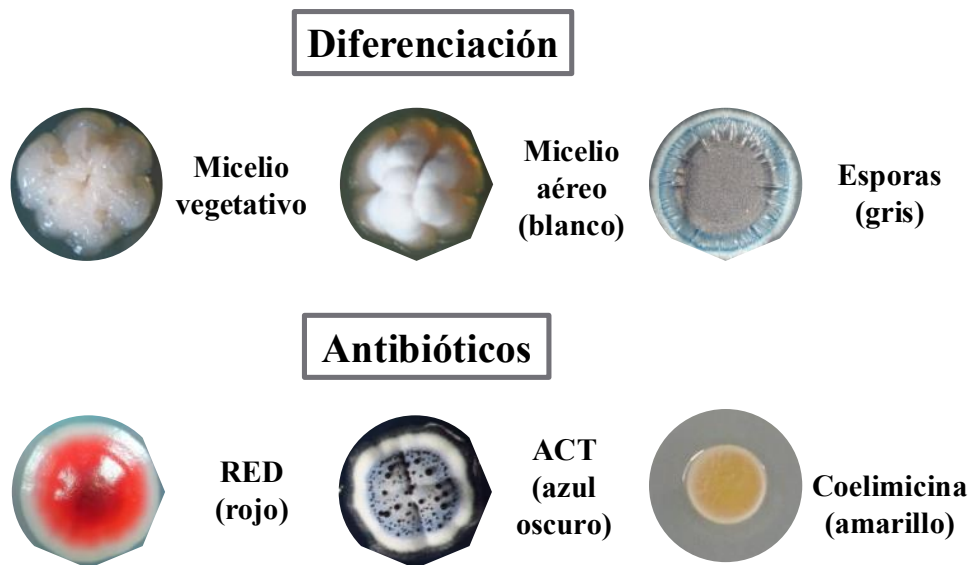


Figura I.5. Pigmentación de *S. coelicolor*. Fenotipo de las distintas fases de la diferenciación y de la pigmentación producida por los antibióticos en las colonias de *S. coelicolor*.

Otros dos antibióticos son producidos por *S. coelicolor* en el laboratorio en las condiciones adecuadas. El antibiótico dependiente de calcio (CDA) es incoloro, y como su nombre indica, su actividad antibiótica es inducida por presencia de calcio en el medio (Goodyear et al., 2025; Hojati et al., 2002). Las coelimidinas son una familia de compuestos derivados de un clúster denominado *cpk* (por ser considerado un “poliquétido críptico” durante años), y entre ellos, la denominada coelimidina P1 o yCPK, de color amarillo, es un derivado del antibiótico coelimidina A que ha perdido su actividad antibiótica (Figura I.5) (Bednarz et al., 2021; Nodwell, 2019).

En el genoma de *S. coelicolor* hay 27 BGC (Schlimpert & Elliot, 2023): si bien, además de los antibióticos mencionados, se conoce el producto de varios BGC, como la geosmina u otros compuestos (Challis, 2014), algunos de estos BGC permanecen silenciados (no activos) en condiciones de laboratorio o son crípticos (de producto no identificado) (Figura I.4) (Challis, 2014; Nett et al., 2009). A pesar de ser un organismo modelo y de haber mucho conocimiento generado respecto a él, gran parte de sus genes está sin caracterizar. Por lo tanto, *S. coelicolor* sigue siendo una herramienta para entender cómo *Streptomyces* controla la producción de metabolitos secundarios (Schlimpert & Elliot, 2023).

I.3 – Regulación del metabolismo secundario en *Streptomyces*

I.3.1 – Elementos implicados en regulación

La expresión genética de los metabolitos secundarios en *Streptomyces* está controlada por multitud de factores y elementos de regulación. Dentro de los BGC hay genes que codifican los llamados reguladores situados en clústeres (CSR), que controlan directamente la expresión de genes dentro del clúster e incluso genes externos al BGC. En *Streptomyces*, muchas de estas proteínas reguladoras pertenecen a la familia de proteínas de regulación de antibióticos en *Streptomyces* (SARP). Las SARP, a su vez, están reguladas por otras proteínas de regulación (Figura I.6), las cuales suelen ser proteínas pleiotrópicas o reguladores globales que controlan metabolismo primario, secundario y la diferenciación morfológica, conectando así la expresión de los BGC en todos los niveles del desarrollo (Augustijn et al., 2024; van Bergeijk et al., 2020).

Algunos de los elementos más estudiados son los que controlan la diferenciación y que también influyen en el metabolismo secundario. Estos incluyen los genes *bld* (sus mutantes no desarrollan micelio aéreo y quedan “calvos”, *bald* en inglés), los genes *whi* (sus mutantes producen micelio aéreo blanco, *white* en inglés, pero no esporas grises) y los genes *wbl* (*WhiB-like*), específicos de actinomicetos. Estos genes forman parte de una cascada de señalización donde intervienen señales secretadas al medio y donde está involucrado el sistema PTS (sistema fosfotransferasa), encargado de importar fuentes de carbono y que, en *S. coelicolor*, fosforila proteínas necesarias para el desarrollo (Rigali et al., 2006).

Las proteínas implicadas en regulación son controladas por señales externas o por redes de otras proteínas reguladoras y señales intracelulares (Figura I.6) (van Bergeijk et al., 2020). En algunos casos, los regulones de estas proteínas son más específicos: por ejemplo, las proteínas pleiotrópicas BldD, implicada en diferenciación (Den Hengst et al., 2010), y DasR, más orientada a metabolismo primario y secundario (Świątek-Połatyńska et al., 2015), controlan un número similar de genes, pero sus regulones solapan muy poco a pesar de ser proteínas necesarias para una correcta diferenciación y producción de antibióticos (Augustijn et al., 2024). En otros casos, la regulación está interconectada: un BGC puede ser controlado por múltiples elementos, y una proteína de regulación puede controlar varios BGC (van Bergeijk et al., 2020).

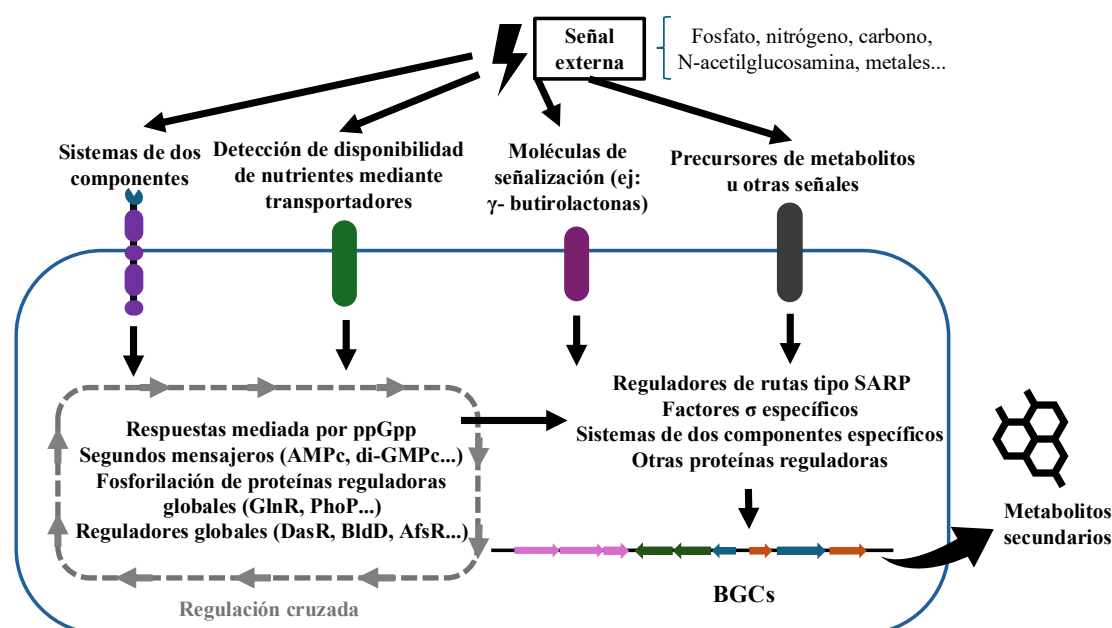


Figura I.6. Regulación del metabolismo secundario de *S. coelicolor*. Esquema adaptado de Hoskisson & Fernández-Martínez, 2018.

S. coelicolor posee en su genoma unos 800 genes que codifican proteínas reguladoras (van Bergeijk et al., 2020). Dentro de las proteínas globales o pleiotrópicas, se pueden resaltar Crp, que controla genes del metabolismo primario del carbono y de producción de antibióticos (Gao et al., 2012); DasR, un represor que deja de actuar al unirse a glucosamina-6-fosfato (derivado de la N-acetilglucosamina) (Rigali et al., 2008) y que controla la expresión de una gran cantidad de genes, que incluyen metabolismo primario, el regulador de hierro DmdR1 y genes de regulación de los cuatro antibióticos principales (ACT, RED, CDA y coelimicinas) de *S. coelicolor* (Abreu et al., 2024; Craig et al., 2012; Rigali et al., 2008; Świątek-Połatyńska et al., 2015); AtrA, que interviene en la producción de ACT, la esporulación y tiene efectos antagónicos respecto a DasR al activar el transportador NagE2 (reprimido por DasR) y la síntesis de ACT (Świątek-Połatyńska et al., 2015; Urem, Świątek-Połatyńska, et al., 2016); o Aor1, una proteína de regulación que afecta a más de la mitad del genoma en *S. coelicolor* y de la cual se hablará más adelante (Antoraz et al., 2017).

Estas proteínas globales controlan la biosíntesis de metabolitos secundarios a través de los reguladores específicos de los BGC de forma directa o indirecta. Entre estos reguladores específicos están: ActII-ORF4 (del clúster *act*) (C. Li et al., 2021; G. Liu et al., 2013), RedD (del clúster *red*) (Tenconi et al., 2018), CdaR (del clúster *cda*) (G. Liu et al., 2013; Ryding et al., 2002) o CpkO y CpkN para el clúster *cpk* (Bednarz et al., 2021). Existen además otras vías de control: por ejemplo, el gen *bldA* codifica un ARN transferente de leucina para el codón UUA, poco frecuente en *Streptomyces*, y su mutación impide la traducción de genes que incluyen este codón, como *adpA/bldH*, que codifica una proteína pleiotrópica necesaria para la diferenciación; o genes que codifican proteínas activadoras de metabolitos secundarios, como *actII-ORF4* y *actIII-ORF2*, para

INTRODUCCIÓN

activar la síntesis de ACT, o *redZ*, para activar la síntesis de RED (Lambert et al., 2014; G. Liu et al., 2013). Estos clústeres están controlados también por las γ -butirolactonas, cuyos receptores, ScbR y ScbR2, regulan principalmente el clúster *cpk* (que incluye los genes relacionados con síntesis y regulación de las γ -butirolactonas), pero también influyen en los otros BGC (Bednarz et al., 2021; G. Liu et al., 2013).

Estos datos reflejan todo el conocimiento que aún queda por determinar respecto a las señales que activan las proteínas de regulación y al propio mecanismo de acción de estas proteínas. Descubrir las señales que controlan todas estas redes y entender cómo funcionan a nivel molecular y cómo se conectan entre ellas abriría el camino a la activación de los BGC silenciosos y, así, al descubrimiento de nuevos antibióticos o a la mejora de la producción de metabolitos secundarios de interés (van Bergeijk et al., 2020).

En la comprensión de estas redes moleculares, juegan un papel importante las técnicas experimentales de biología de sistemas y alto rendimiento. La transcriptómica (estudio de los ARNs transcritos) sigue siendo una técnica crucial para identificar los niveles de expresión de genes de interés y cómo estos cambian ante las condiciones estudiadas (N. Lee et al., 2021). Debido a que no siempre hay una correspondencia en *Streptomyces* entre niveles de ARN y proteína (N. Lee et al., 2021), la proteómica (estudio de las proteínas presentes) puede reflejar mejor las interacciones moleculares, sobre todo con el entorno (D.-W. Kim et al., 2005), y complementa los datos a nivel transcriptómico, pues las proteínas son las moléculas efectoras de las reacciones bioquímicas (D. Yang et al., 2014). Así, la proteómica ha sido muy empleada en el estudio de *Streptomyces* para elucidar la influencia de genes reguladores y de distintas condiciones de cultivo en los niveles de proteínas, efectoras de los procesos metabólicos, tanto en la diferenciación (Manteca et al., 2006; Manteca, Jung, et al., 2010; Manteca, Sanchez, et al., 2010) como en el estudio de la regulación del metabolismo secundario (D.-W. Kim et al., 2005; Lejeune et al., 2022; Linardi et al., 2022) y su relación con el metabolismo primario (Gubbens et al., 2012).

Además, tanto para el descubrimiento de nuevas moléculas como para el estudio de su regulación, es interesante emplear técnicas de metabolómica, que informan de los metabolitos presentes en las condiciones estudiadas (Netzker et al., 2015). Estos metabolitos reflejan el estado fisiológico de las células en estudio y dan información precisa sobre qué procesos bioquímicos se están llevando a cabo. Esto cobra especial importancia en el estudio del metabolismo secundario (Dwivedi et al., 2019). La metabolómica ofrece una representación de los niveles de las moléculas que intervienen en los procesos celulares de *Streptomyces* (Kol et al., 2010; Nitta et al., 2020) y permite descubrir nuevos detalles de las rutas bioquímicas (Lim et al., 2018) y nuevos metabolitos implicados en estos procesos, pues incluso los organismos muy estudiados, como *S. coelicolor*, producen moléculas aún

no caracterizadas (Traxler et al., 2013). Para unos estudios más completos, lo ideal es combinar técnicas transcriptómicas, proteómicas y metabolómicas (N. Lee et al., 2021; Senges et al., 2018).

I.3.2 – Sistemas de dos componentes (TCS)

Dentro de todos los elementos de regulación en las bacterias, los sistemas de dos componentes (TCS) ocupan un lugar importante. Estos sistemas permiten a las bacterias regular su metabolismo a las condiciones del entorno (Wadach et al., 2025) y están implicados en multitud de procesos, como puede ser la resistencia a antibióticos (Tierney & Rather, 2019).

Como su nombre indica, en general, estos sistemas están compuestos por dos elementos, aunque hay algunos sistemas atípicos, de los que se hablará más adelante.

En la mayoría de los TCS en la membrana celular se encuentra el elemento sensor, la histidina quinasa (HK), una proteína transmembrana con un dominio sensor que puede ser extracelular, intracelular o transmembrana, que detecta una señal específica, y un dominio catalítico en el interior celular. Cuando dicha señal es detectada, la HK dimeriza y es autofosforilada en un residuo de histidina. Este fosfato será posteriormente transferido al otro elemento del TCS, el regulador de respuesta (RR). Al recibir el fosfato en un residuo de aspártico, el RR se activa, también dimeriza y realiza su función (Cruz-Bautista et al., 2023; Jin et al., 2023; Sánchez de la Nieta et al., 2022). Normalmente, esta función implica cambios en la expresión génica, sea por activación o represión de genes mediante unión o separación del ADN (Figura I.7), pero en otros casos, el RR tiene actividades distintas, como unión a ARN o actividad enzimática. Independientemente del efecto del RR, la respuesta es posteriormente atenuada mediante la desfosforilación del RR, ya sea por la actividad fosfatasa que también posee la HK o por otras proteínas (Wadach et al., 2025).

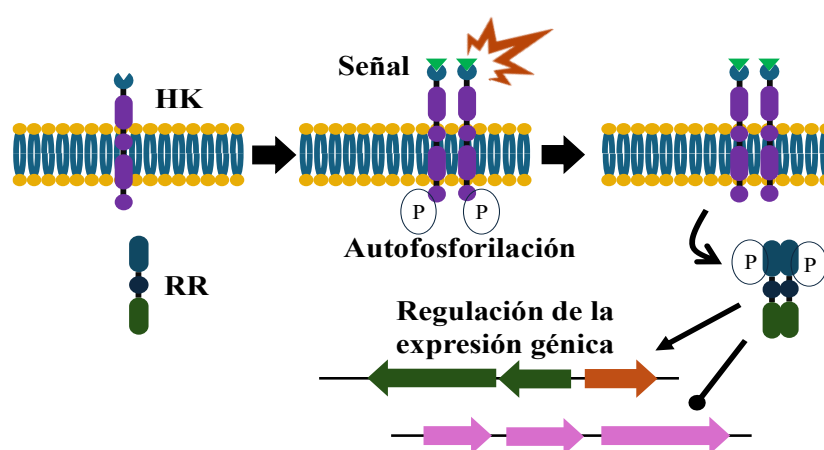


Figura I.7. Señalización de un TCS. Esquema general del funcionamiento de un TCS cuya respuesta es influir en la expresión génica.

En *Streptomyces* hay una gran cantidad de TCS: el genoma de *S. coelicolor* codifica 110 HK y 87 RR, que forman 66 pares HK-RR (TCS canónicos), dos grupos de tres (dos HK y un RR) y el resto son elementos huérfanos (41 HK huérfanas y 18 RR huérfanos) (Sánchez de la Nieta et al., 2022),

INTRODUCCIÓN

que se tratarán posteriormente. Como ya se ha explicado, *Streptomyces* posee un genoma con BGC cuya expresión debe coordinarse acorde a las necesidades de la bacteria y las señales del medio externo. Así, los TCS actúan como receptores de estas señales y conmutadores de la expresión génica (Cruz-Bautista et al., 2023; Jin et al., 2023; Sánchez de la Nieta et al., 2022).

Las señales que activan los TCS son muy diversas y desconocidas en la mayoría de los casos. Algunas de las señales conocidas son: cambios de pH, de temperatura, moléculas concretas, estados de oxidación/reducción... En algunos casos, se sabe a qué señales responden los TCS de *Streptomyces*: PhoR/PhoP responde a niveles de fosfato, varios TCS responden a los niveles de glucosa, DraK/DraR responde a los niveles de nitrógeno, etc. No obstante, en muy pocos casos, la señal concreta es conocida, como es el caso del TCS VanR/VanS, que responde a vancomicina (Cruz-Bautista et al., 2023; Sánchez de la Nieta et al., 2022), o de GluK/GluR, que responde a glutamato (L. Li et al., 2017). Debido a la amplia naturaleza de señales a la que responden las HK sensoras, tanto físicas como químicas, es difícil identificar las señales concretas y la mayoría de TCS estudiados responden a señales aún desconocidas o poco caracterizadas, lo cual abre la investigación a la búsqueda de estas señales para comprender cómo se activan y controlan estos TCS con la intención de mejorar la producción de metabolitos secundarios de interés (Jin et al., 2023; Wadach et al., 2025).

Algunos TCS interactúan con otros elementos. Por ejemplo, la HK AfsK, al estar inactiva, se une a la proteína KbpA, que impide su autofosforilación. Ante una señal desconocida, KbpA se disocia y AfsK fosforila a su RR, AfsR, que activa la transcripción del gen *afsS*, cuyo producto, la proteína AfsS, activa la expresión de los genes *actII-ORF4* y *redD*. Además, AfsS puede ser fosforilado, en menor medida, por las HK PkaG y AfsL. Este TCS y sus elementos asociados están conservados en algunos *Streptomyces* y también controlan el metabolismo secundario (Hao et al., 2023). Otro ejemplo, también conservado en *Streptomyces*, es el TCS MtrB-MtrA (HK-RR) y la lipoproteína LpqB (Hoskisson & Hutchings, 2006). Este TCS, en *S. coelicolor*, interviene en la producción de antibióticos (Zhu et al., 2020).

Al igual que ocurre con otras proteínas reguladoras, como se describió en el apartado anterior, los TCS no solo regulan el metabolismo secundario, sino que su acción abarca varios procesos que solapan algunas redes de regulación entre sí. Por ejemplo, el TCS AfsQ1/Q2, además de activar la producción de antibióticos, sobre todo de las coelimicinas (Chen et al., 2016), regula genes de metabolismo de carbono y reprime genes de asimilación de nitrógeno, activados por la proteína reguladora GlnR (R. Wang et al., 2013). Uno de los sistemas más importantes es el sistema PhoR/PhoP, cuya función principal es activar la toma de fosfato ante la escasez de este elemento, pero también controla genes del metabolismo del nitrógeno (compitiendo el RR PhoP por los sitios de unión de GlnR), de respiración oxidativa y de producción de antibióticos, entre otros. Además de solapar con el regulón de GlnR, los genes controlados por PhoP también solapan con aquellos



regulados por AfsS (Martín et al., 2017). Otro de los ejemplos citados anteriormente, el RR MtrA, también posee regulación cruzada al controlar genes regulados por PhoP (Zhu et al., 2021) y GlnR (Zhu et al., 2019).

Dentro de los TCS relacionados con la producción de antibióticos, se encuentran los llamados Abr (*Antibiotic regulator*). Dos TCS canónicos (con una HK y un RR) han sido descritos como reguladores negativos de la producción de antibióticos: el sistema *abrA* (Rico, Yepes, et al., 2014) y el sistema *abrB* (Sánchez de la Nieta et al., 2020). Estos no están limitados solo al metabolismo secundario: el sistema *abrA* responde a hierro e influye en la producción de sideróforos (Antoraz Martín, 2018; Rico, Yepes, et al., 2014), mientras que *abrB* está implicado en la expresión del clúster *van* para resistir los efectos de la vancomicina (Sánchez de la Nieta et al., 2020).

Otro TCS relacionado con la producción de antibióticos es el sistema *abrC*. Este sistema cuenta con dos HK, *abrC1* y *abrC2*, y un RR, *abrC3*. Si bien ambas HK pueden fosforilar y activar a AbrC3, la HK AbrC2 es la principal encargada de esta función, mientras que AbrC1 tendría un papel en inactivar AbrC3 para controlar sus niveles (Rodríguez et al., 2015). El TCS completo es un activador de la producción de antibióticos mediante la acción del RR AbrC3, que activa la expresión de genes codificantes de proteínas reguladoras como *actIII-ORF4*, *bdtA* o *absR1* (Rico, Santamaría, et al., 2014).

Normalmente, los genes que codifican los dos elementos (o tres, como en el caso de *abrC*) del TCS están adyacentes en el genoma. Sin embargo, existen TCS no canónicos denominados huérfanos. Estos consisten en HK o RR cuyos genes no están adyacentes a otro gen de un elemento de TCS (un gen de HK sin gen de RR al lado y viceversa). En estos casos, el elemento que acompaña en la señalización o en la respuesta génica es desconocido. Existen algunos casos donde se ha descrito la relación entre elementos huérfanos, como la HK OhkA (SCO1596) y el RR OrrA (SCO3008), relacionados con la producción de antibióticos y la diferenciación (G. Zheng et al., 2021); o el RR huérfano SCO3818, que es activado por la HK SCO0203, la cual forma parte del TCS SCO0203-0204, y que intervienen en la producción de ACT (W. Wang et al., 2009). Este último es un ejemplo de regulación cruzada con interacción directa, donde una HK de un TCS canónico se asocia también a un RR huérfano: los TCS canónicos tienen, en general, poca interacción directa con elementos de otros TCS (Sánchez de la Nieta et al., 2022) y la regulación cruzada se da a nivel de los genes controlados por varios elementos de los TCS que solapan (Jin et al., 2023); no obstante, sobre todo cuando se trata de elementos huérfanos, esta interacción directa entre varios elementos de regulación existe (Sánchez de la Nieta et al., 2022).

Entre los elementos huérfanos, destaca el RR Aor1 (*Antibiotic orphan regulator 1*). La proteína Aor1 es necesaria para una correcta diferenciación y producción de antibióticos. Además, la delección del gen *aor1* origina cambios en gran cantidad de genes (aproximadamente la mitad del genoma)



INTRODUCCIÓN

implicados en metabolismo secundario (Figura I.8), diferenciación y respuesta a estrés (Antoraz et al., 2017). Como RR huérfano que es, hasta el momento no se ha caracterizado qué HK es capaz de activarlo.

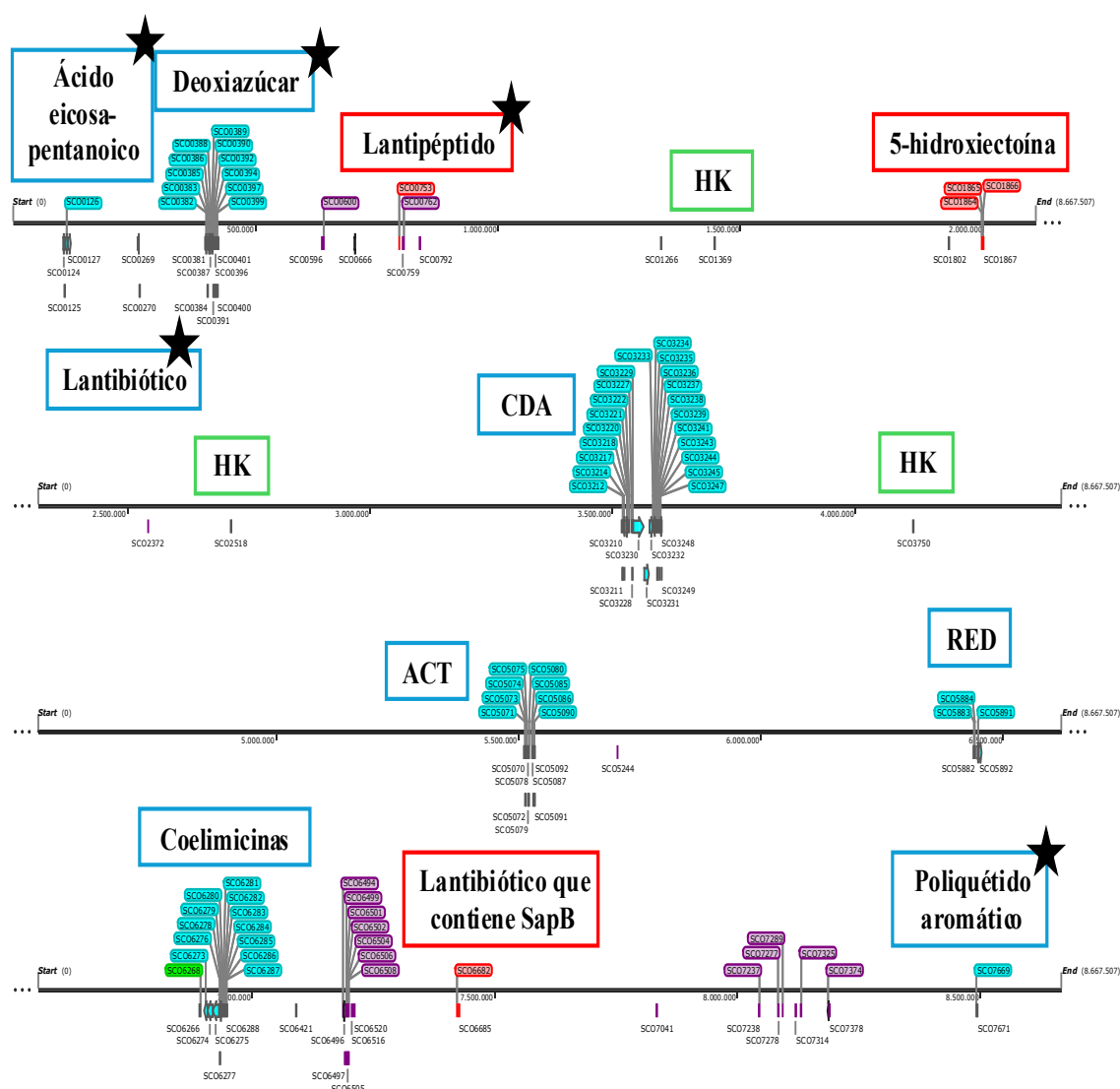


Figura I.8. Genes de metabolismo secundario y estrés osmótico alterados en el mutante $\Delta aor1$. Tanto los genes en morado como los genes en rojo están sobreexpresados en el mutante: los genes en rojo pertenecen a BGC, y los genes en morado están relacionados con estrés osmótico. Los genes mostrados en azul y en verde están subexpresados en el mutante: en azul se muestran los genes de BGC, y en verde, genes que codifican HK. Con una estrella negra se indican los BGC silenciados en condiciones experimentales. Figura realizada con SnapGene a partir de los datos de Antoraz et al., 2017.

Como se ha descrito en este apartado, los TCS son fundamentales para comprender la red de regulación de *Streptomyces*. Los pasos necesarios para entender dicha red comprenden caracterizar cómo se asocian los distintos elementos de los TCS y determinar a qué señales responden.

Entre las señales que se encuentran en el medio y que influyen en el metabolismo de *Streptomyces* se encuentra el hierro. De hecho, ya se mencionó que el sistema AbrA de *S. coelicolor* responde a este elemento (Rico, Yepes, et al., 2014). La homeostasis del hierro está ligada a la regulación del metabolismo secundario: el gen *bfr*, implicado en esta homeostasis (como se describe más adelante),

está regulado por varios sistemas que controlan la producción de antibióticos, como AbrA (Antoraz Martín, 2018), AbrB (Sánchez de la Nieta et al., 2020), AbrC (Rico, Santamaría, et al., 2014) y AorI (Antoraz et al., 2017). Estos datos sugieren que el hierro tiene importancia en la señalización ligada a la producción de antibióticos.

I.4 – Influencia del hierro en *Streptomyces*

I.4.1 – Homeostasis del hierro

El hierro es un elemento esencial en los seres vivos, pues es un cofactor de muchas enzimas implicadas en transporte de electrones o reacciones de oxidación-reducción. El átomo de hierro puede encontrarse en una forma reducida, Fe^{2+} , u oxidada, Fe^{3+} . La forma reducida (Fe^{2+}) es aquella que permite que el hierro funcione como cofactor de proteínas, mientras que la forma oxidada (Fe^{3+}) es insoluble a pH neutro. La forma reducida es muy reactiva, y puede reaccionar con el oxígeno molecular o especies derivadas en la reacción de Fenton, que da lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS), dañinas a altos niveles dentro de las células (Bradley et al., 2020; Guo et al., 2022).

Por ello, los niveles de hierro deben estar regulados para no llevar a un exceso de hierro y posibles reacciones adversas. En bacterias, esta regulación se realiza a través de los reguladores Fur. Cuando hay mucho hierro en el medio, este se une a las proteínas Fur, que actúan, en general, como represores de la transcripción de genes de toma de hierro, mientras que activan aquellos necesarios para su almacenamiento (Figura I.9). Por ejemplo, uno de los efectos más característicos de estos reguladores es la represión de los genes para sintetizar sideróforos, las moléculas necesarias para captar hierro del exterior (Bradley et al., 2020).

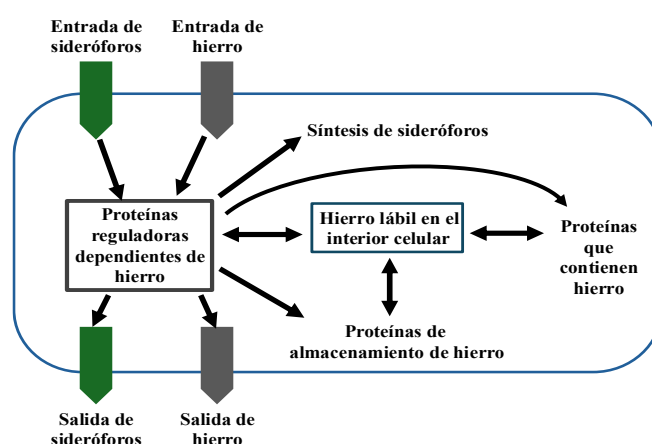


Figura I.9. Homeostasis del hierro. Las proteínas reguladoras dependientes de hierro, cuando aumenta la concentración de hierro, reducen los procesos de toma de hierro y aumentan la producción de proteínas con hierro (almacenamiento u otras) y la salida de este elemento. Cuando disminuye el hierro, el efecto es el contrario. Esquema adaptado de Bradley et al., 2020

INTRODUCCIÓN

En bacterias Gram-positivas con alto contenido en G + C, como *Streptomyces*, las proteínas de la familia DtxR son las que actúan como reguladores Fur. Además de controlar el metabolismo del hierro, estas proteínas reguladoras intervienen en otros procesos. Por ejemplo, en *S. avermitilis*, IdeR activa la producción de avermectina y la esporulación por medio de WhiG (Cheng et al., 2018).

En *S. coelicolor*, el hierro tiene un papel importante en el desarrollo. Esta especie produce dos familias de sideróforos: las deferoxaminas y las coeliquelinas. Las deferoxaminas son necesarias para la diferenciación y podrían tener un papel regulatorio más allá de la captación de hierro (Tierrafría et al., 2011). Los propios sideróforos, y/o el hierro que transportan, forman parte de las señales externas cuyos gradientes condicionan la correcta expresión de los genes de *S. coelicolor* durante la diferenciación y la producción de antibióticos (Zacharia et al., 2021). Además, varios mutantes en genes de desarrollo, como varios genes *bld* o genes del sistema PTS, tienen alterada la producción de sideróforos, lo que relaciona el hierro y los sideróforos con las cascadas de señalización necesarias para la diferenciación y el metabolismo (Lambert et al., 2014). Esta relación, no obstante, no está caracterizada. Las deferoxaminas son también producidas por otros *Streptomyces*, y son necesarias para un correcto desarrollo (Yamanaka et al., 2005). *S. venezuelae*, ante la deficiencia de hierro, activa su crecimiento exploratorio y utiliza estas deferoxaminas para captar el hierro en el área explorada (Shepherdson et al., 2023).

S. coelicolor posee dos proteínas de la familia IdeR, DmdR1 y DmdR2. DmdR1 parece ser la más importante y, como se ha descrito para los reguladores Fur, es capaz de reprimir la expresión de genes para la síntesis de sideróforos cuando hay hierro abundante dentro de la célula (Tunca et al., 2007). La proteína DmdR1 es necesaria para una correcta esporulación y producción de antibióticos en algunos medios de cultivo. Existe, también, un gen antiparalelo a *dmdR1*, denominado *adm*. Ambas proteínas, DmdR1 y Adm, son necesarias para la producción de sideróforos y antibióticos y para la diferenciación, aunque Adm por sí sola actúa como regulador negativo del metabolismo secundario en algunos medios (Tunca et al., 2009). Además de este enlace entre DmdR1 y el metabolismo secundario, el gen *dmdR1* está controlado por DasR: la presencia de N-acetilglucosamina, convertida dentro de la célula en glucosa-6-fosfato, libera la represión que ejerce DasR sobre el gen *dmdR1* y, al producirse la proteína DmdR1, se reprime la producción de sideróforos (Craig et al., 2012). Toda la red de regulación que enlaza a la proteína reguladora DmdR1, el hierro y el metabolismo secundario no está aún caracterizada, pero estos datos reflejan que hay una relación entre estos elementos.

Existen otras proteínas reguladoras que intervienen en la homeostasis del hierro y el estrés oxidativo. CatR, que responde a estrés oxidativo e induce la producción de catalasa CatA, también activa la producción de la proteína VtIA, que expulsa hierro (Y. Kim et al., 2021). Otra proteína relacionada con hierro y estrés oxidativo es HbpS, una proteína extracelular que, al ser oxidada debido al estrés

oxidativo del medio, activa la HK SenS que, a su vez, activa a su RR, SenR, el cual activa respuestas antioxidantes (Busche et al., 2016). La proteína homóloga HbpS de *S. reticuli* es capaz de secuestrar hierro para evitar el aumento del estrés oxidativo (Wedderhoff et al., 2013).

Otro elemento importante sujeto a regulación por hierro es el gen *bldN*, necesario para el correcto desarrollo. Si bien este gen no posee las secuencias de unión de DmdR1, denominadas *iron boxes*, su expresión es inducida por hierro. Esta regulación podría comenzar desde los elementos que controlan los niveles de BldN, como la proteína AdpA, cuyas señales activadoras aún se desconocen (Traxler et al., 2012).

Además de los genes para sintetizar sideróforos, Fur o IdeR controlan los niveles de proteínas de almacenamiento de hierro de la familia de las ferritinas.

I.4.2 – Bacterioferritinas

Las proteínas de la familia de las ferritinas son proteínas que se ensamblan en cápsulas con 24 subunidades (excepto las miniferritinas). Dentro de estas cápsulas es donde el hierro, en forma de hierro oxidado (Fe^{3+}), es almacenado. Así, el hierro permanece en un estado inerte y seguro dentro de la célula. Este hierro pasa al interior de las ferritinas gracias a unos canales y centros ferroxidasas que oxidan el Fe^{2+} y forman un mineral hidratado de hierro en la cavidad de las subunidades. Cuando el hierro es necesario en la célula, es reducido a Fe^{2+} y se libera del interior (Figura I.10 A). En algunos casos, esta liberación ocurre gracias a la colaboración de una proteína pequeña de tipo ferredoxina, que aporta los electrones necesarios (Bradley et al., 2020; Guo et al., 2022).

Dentro de esta familia hay tres tipos de proteínas: ferritinas (Ftn), bacterioferritinas (Bfr) y proteínas Dps o miniferritinas. Mientras que las ferritinas poseen dos subunidades que se ensamblan en un complejo esférico, las ferritinas bacterianas están formadas por una única subunidad. Por otro lado, las bacterioferritinas y las Dps son exclusivas de bacterias. Las bacterioferritinas se diferencian de las ferritinas en la presencia de 12 grupos hemo en las interfases de las subunidades (Figura I.10 A), que facilitan el intercambio de electrones para la oxidación y reducción de hierro, aunque no son estrictamente necesarios (Bradley et al., 2020; Guo et al., 2022). Las Dps son proteínas más pequeñas, de 12 subunidades, generalmente encargadas de proteger el ADN ante condiciones de estrés oxidativo, pero también ejercen esta función mediante su capacidad para unir y almacenar hierro (Orban & Finkel, 2022; Williams & Chatterji, 2023).

INTRODUCCIÓN

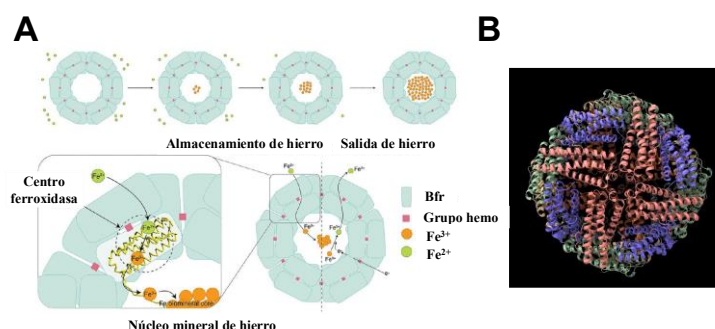


Figura I.10. Bacterioferritinas. A. Esquema del funcionamiento de una bacterioferritina, aplicable también a las otras proteínas de la familia, adaptado de Jobichen et al., 2023. B. Estructura de la bacterioferritina de *S. coelicolor*, PDB: 5XX9.

En bacterias, la presencia de ferritinas o bacterioferritinas depende del organismo, así como la función que estas ejercen. En *Escherichia coli*, la ferritina es la encargada principal del almacenamiento de hierro (Bradley et al., 2020). *Mycobacterium tuberculosis* emplea la ferritina como almacén de hierro en condiciones de alta concentración de este elemento, mientras que la bacterioferritina actúa ante menores niveles (Khare et al., 2017). *Pseudomonas aeruginosa* emplea la bacterioferritina como almacén principal de hierro y una ferredoxina asociada a bacterioferritina (Bfd) para liberar el hierro (Eshelman et al., 2017).

En *Streptomyces*, en general, no hay genes de ferritinas, por lo que las bacterioferritinas son las principales proteínas de almacenamiento de hierro (Cheng et al., 2018). Además de su función en la homeostasis del hierro y el estrés oxidativo, las bacterioferritinas en los actinomicetos pueden tener otras funciones: por ejemplo, en *Saccharopolyspora pogona*, la bacterioferritina estimula la producción de butenil-espinosina y el metabolismo del carbono (Tang et al., 2021).

S. coelicolor posee tres Dps (DpsA, DpsB y DpsC) y una bacterioferritina. Estas Dps están involucradas en la correcta esporulación (Facey et al., 2009) y DpsA puede almacenar hierro (Hitchings et al., 2014), pero el papel detallado en la homeostasis del hierro de estas proteínas se desconoce. Por otro lado, la bacterioferritina, Bfr (codificada por el gen *bfr/SCO2113*) (Figura I.10 B), es capaz de almacenar hierro en su interior, aunque no posea los grupos hemo característicos de estas proteínas (Jobichen et al., 2023). Además, el gen *bfr* está acompañado del gen *bfd/SCO2114*, que codifica una ferredoxina asociada a bacterioferritina.

El papel de Bfr en *S. pogona* es de los pocos ejemplos donde se describe la relación entre bacterioferritinas y metabolismo secundario en actinomicetos (Tang et al., 2021). En *S. coelicolor*, como se comentó anteriormente, el gen *bfr* está controlado por los TCS que regulan el metabolismo secundario: el RR AbrC3 regula y activa directamente este gen (Rico, Santamaría, et al., 2014), mientras que la expresión de *bfr* cambia en los mutantes $\Delta abrA$ (baja su expresión) (Antoraz Martín, 2018), $\Delta abrB$ (baja su expresión) (Sánchez de la Nieta et al., 2020) y $\Delta aor1$ (sube su expresión) (Antoraz et al., 2017). En este organismo modelo, Bfr es un elemento más en la red de regulación

del metabolismo secundario que no se había tenido en cuenta hasta los trabajos presentados en esta tesis doctoral y esto sugiere que, en otros actinomicetos, como ocurre en *S. pogona*, las proteínas de la familia de las ferritinas intervienen en más funciones, además del almacenamiento de hierro, como otro factor adicional en la señalización ligada al metabolismo secundario.



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

“La ciencia es el poder del hombre”.

- Gendo Ikari (del anime *Neon Genesis Evangelion*) (1995).

Antecedentes y objetivos

Esta tesis doctoral parte del conocimiento generado con el estudio de varios TCS involucrados en controlar la producción de antibióticos en *S. coelicolor* realizados con anterioridad en el grupo.

Los TCS relacionados con la producción de antibióticos (*abr*) estudiados previamente, independientemente de su efecto positivo o negativo respecto a la producción de antibióticos, convergen en una regulación del gen *bfr* (Antoraz et al., 2017; Rico, Yepes, et al., 2014; Sánchez de la Nieta et al., 2020). Esta regulación es más evidente en el sistema *abrC*, ya que AbrC3 se une al promotor de *bfr* y activa su expresión (Rico, Santamaría, et al., 2014). Durante el desarrollo de esta tesis fue caracterizada la bacterioferritina de *S. coelicolor* a nivel estructural y funcional en cuanto a su capacidad de almacenar hierro (Jobichen et al., 2023), pero hasta antes del trabajo presentado en esta tesis, no había estudios sobre la función de *bfr* en el metabolismo secundario.

Por otro lado, basándonos en los trabajos previos, el RR Aor1 suscita especial interés debido a su gran influencia en el genoma de *S. coelicolor* y el fenotipo de su mutante de delección, muy afectado en la producción de antibióticos (Antoraz et al., 2017). El gen *aor1* es huérfano, y hasta la fecha solo se ha descrito su posible relación con el sistema *abrC* en trabajos de tesis doctorales (Rico García, 2014; Yepes García, 2010) y por la similitud de la proteína Aor1 con el RR AbrC3 (Antoraz et al., 2017). Caracterizar qué HK activa a Aor1 ayudaría a comprender mejor a qué señales responde para activar la producción de antibióticos.

Los TCS relacionados con *bfr* se han caracterizado con anterioridad a nivel transcripcional. Durante el desarrollo de la tesis, se planteó complementar el estudio de los mutantes $\Delta abrA$ (por su relación con el metabolismo del hierro) (Antoraz Martín, 2018; Rico, Yepes, et al., 2014) y $\Delta aor1$, junto a algunos mutantes obtenidos en este trabajo (como se describe más adelante), con una aproximación metabolómica, más enfocada en el estado fisiológico a nivel de las moléculas producidas (Dwivedi et al., 2019). Así, se planteó la estancia internacional realizada en esta tesis, en el laboratorio del Prof. Dr. Gilles van Wezel en el Instituto de Biología de la Universidad de Leiden (Países Bajos).

El trabajo de esta tesis tiene como **objetivo general** profundizar en los mecanismos moleculares que intervienen en la regulación del metabolismo secundario de *S. coelicolor*, con el fin de aplicar ese conocimiento a este organismo u otros *Streptomyces* para mejorar la producción de moléculas de interés biotecnológico mediante manipulación de los elementos que conforman la red de regulación.

De manera más concreta, los objetivos de la tesis son estudiar el papel de la bacterioferritina en el metabolismo secundario de *S. coelicolor* y caracterizar los elementos que activan al regulador huérfano Aor1. Los **objetivos específicos** de la tesis son los siguientes:

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1. Caracterizar el papel del gen *bfr* en el desarrollo y la producción de antibióticos en *S. coelicolor*, así como el papel que tiene el hierro en estos procesos.
2. Identificar y estudiar las HK que potencialmente activen al regulador huérfano Aor1.
3. Analizar el metaboloma de mutantes de delección en los genes de interés en este trabajo para identificar diferencias ocasionadas por la ausencia de estos genes y relacionadas con la producción de antibióticos.



RESULTADOS

“Estamos limitados por nuestras experiencias; son la prisión de nuestra conciencia. Pero, al final, el alma humana siempre buscará la verdad”.

- Samus Aran en el videojuego *Metroid Fusion* (2002).

Capítulo 1: el gen *bfr* en *S. coelicolor*

Como ya se mencionó en la Introducción y en los Antecedentes de esta tesis, el gen *bfr/SCO2113* está regulado por varios TCS implicados en la producción de antibióticos en *S. coelicolor* e incluso es diana directa del RR AbrC3 (Antoraz et al., 2017; Rico, Santamaría, et al., 2014; Sánchez de la Nieta et al., 2020). Esto suscitó el interés del laboratorio por estudiar este gen y su posible implicación en la producción de antibióticos.

Este estudio se inició con un Trabajo Fin de Máster del laboratorio en el que, mediante la metodología CRISPR-Cas9 (Tong et al., 2015), se construyó el plásmido pCRISPR-Bfr para deletar este gen y se obtuvo el mutante de delección Δbfr (García Abad, 2019). En este trabajo inicial se caracterizó parcialmente este mutante, y en esta tesis doctoral se ha profundizado más en el estudio de *bfr*.

R.1.1 – Efecto del gen *bfr* en la diferenciación y la producción de antibióticos

R.1.1.1 – Fenotipo de colonias, crecimiento y cuantificación de antibióticos

Tras la obtención del mutante, se realizó un ensayo fenotípico inoculando gotas de 5 μ L que contenían $5 \cdot 10^5$ esporas en distintos medios sólidos de cultivo para comprobar, a nivel cualitativo, si la producción de antibióticos pigmentados estaba afectada en el mutante Δbfr respecto a la cepa silvestre M145. Como se observa en la Figura R.1.1, Δbfr tiene un retraso en la diferenciación del micelio aéreo blanco y en la producción de antibióticos, sobre todo de ACT. Este retraso es más notable en LB y en YEPD.

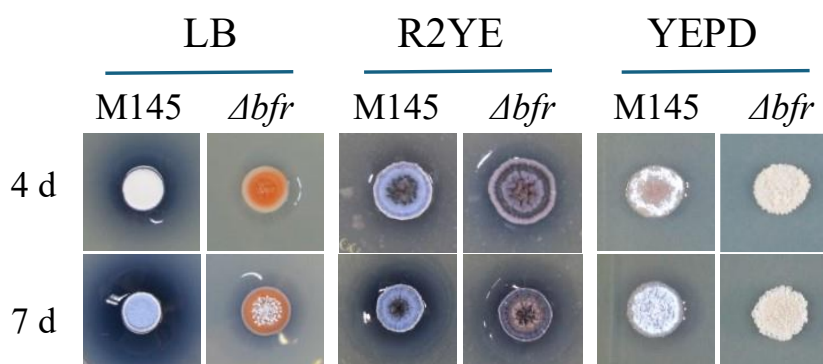


Figura R.1.1. Fenotipo del mutante Δbfr . Fenotipo de la cepa silvestre M145 y el mutante Δbfr en LB, R2YE e YEPD a los 4 y 7 días de crecimiento.

Respecto al efecto en medios líquidos, el medio LB fue seleccionado como medio para la cuantificación de los antibióticos al presentar un fenotipo llamativo (retraso en diferenciación y

producción de ACT) y repetitivo y una producción de RED y ACT a tiempos cortos de estudio (en medio YEPD, ya sea sólido o líquido, la producción de ACT tarda bastante, hasta unos 6-8 días). El retraso y disminución en la producción de antibióticos en medio LB sólido se correspondía con una menor producción de estos en medio líquido respecto a la cepa silvestre (Figura R.1.2). Este medio, LB, fue empleado en diversos estudios posteriores, descritos en este capítulo, como medio complejo de referencia, debido a la reproducibilidad del medio y del fenotipo observado.

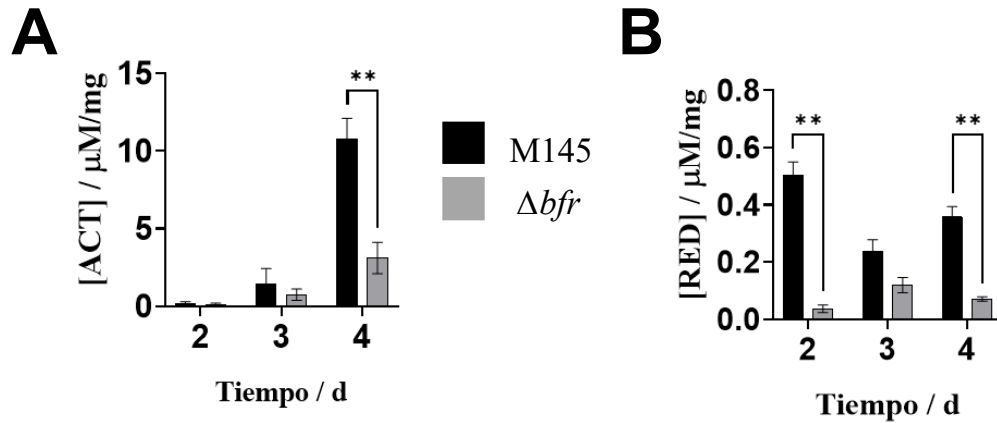


Figura R.1.2. Producción de antibióticos pigmentados en Δbfr . Comparación de la producción de actinorrodina (A) y undecilprodigiosina (B) en medio LB líquido. Los dos asteriscos (**) representan un p-valor menor a 0,01.

En el Trabajo Fin de Máster previo a esta tesis, se comprobó que los efectos de la delección del gen *bfr* revertían al fenotipo silvestre al complementar el mutante, es decir, al reintroducir el gen *bfr* con el plásmido integrativo pKC-Bfr (García Abad, 2019; García-Martín et al., 2024). Aun así, hay que tener en cuenta que el gen no se inserta en su posición original, sino en el sitio *attB*, lo cual puede dar lugar a complementaciones parciales o a no complementar el fenotipo, suponiendo que no haya efectos polares de la mutación. No obstante, en este caso, la complementación en LB y en R2YE con este sistema se observó sin problemas (Figura R.1.3).

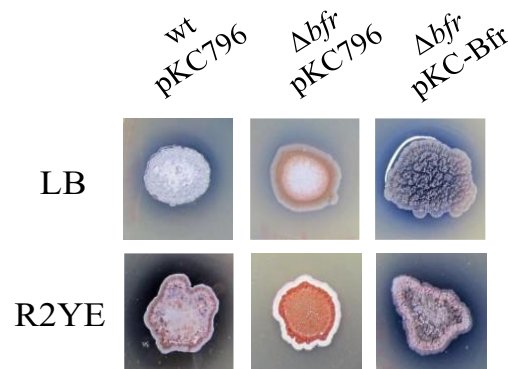


Figura R.1.3. Complementación del mutante Δbfr . Complementación realizada en LB y R2YE tras 7 días de crecimiento. Figura adaptada de García Abad, 2019.

R.1.1.2 – Fenotipo de unidades formadoras de colonias en medios complejos

Se realizó, además, un ensayo fenotípico a partir de diluciones de esporas en una batería de diferentes medios complejos disponibles en el laboratorio, de manera que las colonias formadas correspondían a una unidad formadora de colonia (UFC). Los resultados se muestran en la Figura R.1.4.

En LB, R2YE e YEPD, los resultados son iguales a los observados en el apartado anterior, aunque los fenotipos se observan a tiempos más largos. En LB, Δbfr formó colonias rojas, sin micelio aéreo, mientras que el silvestre diferenció y produjo ACT, en forma de gotas, encima de la colonia. En R2YE, ambas cepas fueron muy parecidas en cuanto a coloración (roja y azul, producción de ACT y RED). En YEPD, Δbfr formó colonias rugosas y amarillas, sin micelio aéreo, mientras que la cepa M145 formó un micelio aéreo blanco.

Otros medios ricos mostraron un fenotipo similar al que ocurre en LB. En AN Scharlau, Δbfr formó colonias rojas que diferenciaron su micelio aéreo a partir de 7 días, y M145 generó micelio aéreo con gotas de ACT, menores que en LB (no se observó coloración azul en la colonia). En BHI, Δbfr generó colonias de borde amarillo y centro rojo (producción de RED), mientras que el silvestre diferenció de manera similar a lo ocurrido en YEPD. De nuevo, el retraso de diferenciación y producción de antibióticos se observó en PDA: las colonias adoptaron un aspecto rugoso en ambas cepas, con zonas de micelio aéreo y zonas de RED en el silvestre y solo micelio vegetativo amarillento en el mutante.

El medio TSA es un medio muy rico, que se utiliza diluido 10 veces para algunos ensayos de aislamiento de microorganismos en el laboratorio. Las UFC de Δbfr en TSA sin diluir se desarrollaron con un fenotipo similar al de LB (colonias rojas con borde amarillo), y las de M145 formaron micelio aéreo a los 6 días. Al diluir 10 veces el medio, el mutante Δbfr fue capaz de diferenciar en el centro de las colonias y producir gotas de ACT, mientras que el silvestre diferenció en toda la colonia, más rápido que en TSA sin diluir, y produjo gotas grandes del antibiótico pigmentado. Estos resultados concuerdan con el ciclo de vida de *Streptomyces*, en el que la diferenciación y el metabolismo secundario se activan ante condiciones adversas como la falta de nutrientes (van Bergeijk et al., 2020), si bien el fenotipo del mutante Δbfr es más drástico en medio TSA sin diluir.

Se puede observar que la diferenciación varía, sobre todo la producción de antibióticos pigmentados, en los distintos medios empleados. Debido a su composición compleja (véase el apartado “M.2” de “Materiales y métodos”), es difícil asociar las variaciones observadas con señales o ingredientes concretos del medio; no obstante, el defecto en diferenciación y síntesis de antibióticos pigmentados del mutante Δbfr se mantiene, independientemente de la diferenciación de la cepa silvestre (Figura R.1.4).

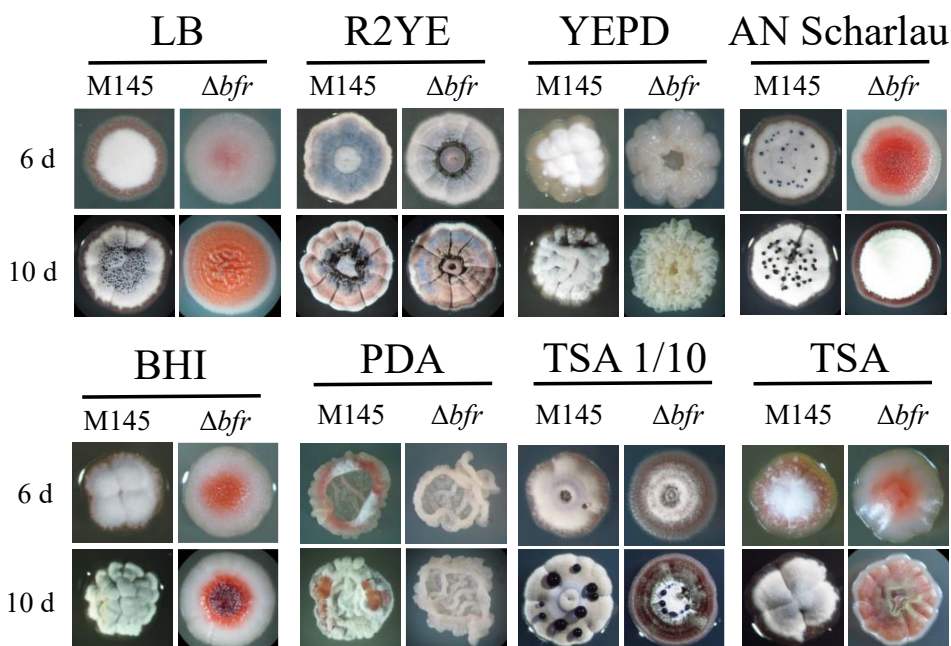


Figura R.1.4. Fenotipo de colonias en medios ricos. Colonias de la cepa silvestre M145 y el mutante Δbfr generadas desde esporas individuales en distintos medios ricos a los 6 y 10 días de crecimiento.

En resumen, en este ensayo se ha observado un retraso en el mutante Δbfr en la diferenciación y la producción de antibióticos en la mayoría de los medios complejos utilizados. Esto, junto al fenotipo que presenta el mutante Δbfr en los ensayos en gota (Figura R.1.3), refuerza la importancia de este gen en estos procesos. El efecto en medios mínimos se describe más adelante.

R.1.1.3. – Sobreexpresión de *bfr*

Por otro lado, al igual que se estudió el efecto de la ausencia de *bfr*, se planteó qué efecto podría tener la sobreexpresión de dicho gen. Si Bfr fuese un elemento inductor de la producción de antibióticos, cabría esperar un aumento, aunque fuese ligero, de la producción de estos compuestos. Mediante la construcción del plásmido multicopia pNBfr (Tabla A.1), se comprobó el efecto de la sobreexpresión de *bfr* en la cepa M145, comparando la cepa con el plásmido vacío pN702GEM3 (control) y la cepa con pNBfr. Esta sobreexpresión, sin embargo, no tuvo un efecto positivo en la síntesis de los antibióticos pigmentados (Figura R.1.5 A). En medio sólido, se aprecia un ligero retraso en la aparición de micelio aéreo en LB y en R2YE y, a tiempos largos, en YEPD; por otro lado, solo se aprecia una diferencia en la producción de ACT en medio YEPD, en el cual es menor respecto al control. Mientras, en medio líquido solo se observó una diferencia estadística en la producción de RED: la cepa con pNBfr produjo menos antibiótico rojo a los 3 días respecto al control (Figura R.1.5 B).

Por lo tanto, la sobreexpresión de *bfr* no contribuye a un incremento en la producción de antibióticos ni altera significativamente su diferenciación.

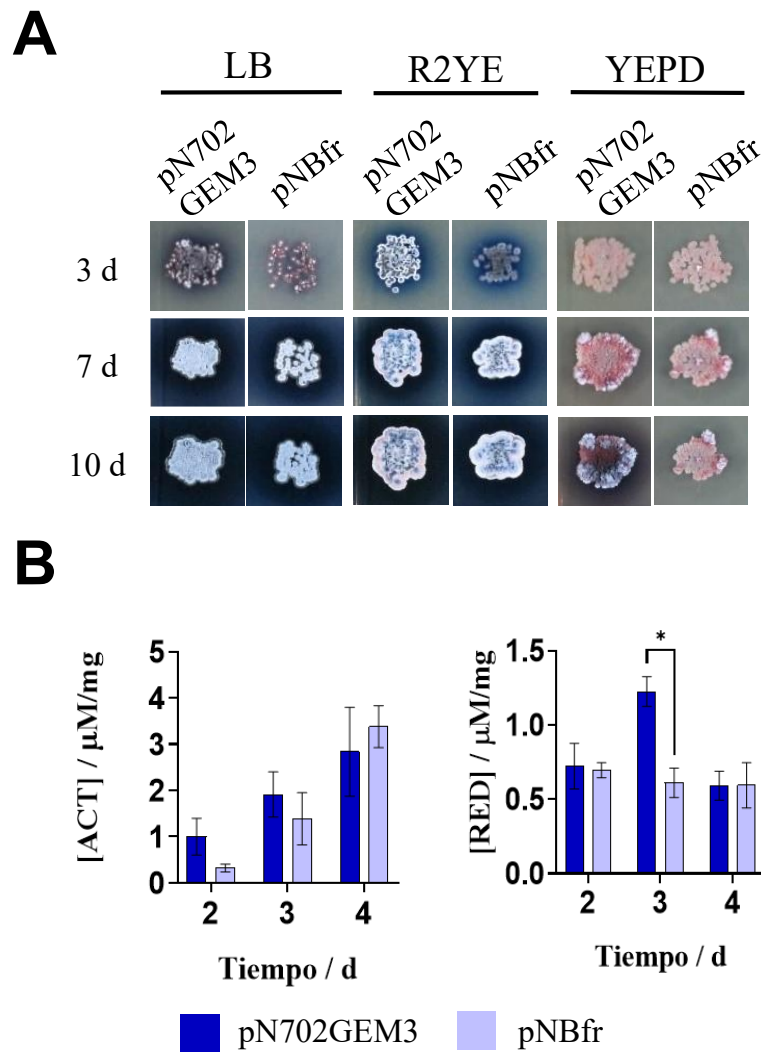


Figura R.1.5. Sobreexpresión de *bfr*. Comparación de la sobreexpresión de *bfr* (plásmido multicopia pNBfr) en la cepa silvestre M145 con la cepa control (lleva el plásmido vacío pN702GEM3). **A.** Fenotipo en LB, R2YE e YEPD. **B.** Producción de ACT y RED en LB líquido. Un asterisco (*) representa un p-valor menor a 0,05.

R.1.2 – Efecto del hierro en la producción de antibióticos

R.1.2.1 – Fenotipo en medio NMMP sólido

Como se comentó en la Introducción, *bfr* codifica una bacterioferritina, una proteína implicada en el metabolismo de hierro, capaz de almacenar este elemento en su cavidad interior (Jobichen et al., 2023). En otras bacterias, la falta de ferritina o bacterioferritina supone un desajuste en el metabolismo del hierro (Bradley et al., 2020; Eshelman et al., 2017; Khare et al., 2017).

Una vez comprobado que existía un claro fenotipo del mutante Δbfr respecto a la cepa silvestre en los medios complejos estudiados, como LB o YEPD, y dada la función de almacenaje de hierro de la proteína Bfr, se planteó la hipótesis de trabajo de que la concentración y/o la disponibilidad de hierro en las células fuera la causa de este fenotipo. En estos medios es difícil estimar la cantidad de

elementos, como el hierro, presente entre los distintos lotes de medio o incluso en los ingredientes complejos (como extracto de levadura). Por lo tanto, para este estudio se utilizó el medio mínimo NMMP que permitía controlar los oligoelementos añadidos. La receta original de NMMP (apartado “M.2” de “Materiales y métodos”) incluye una concentración final de hierro de 4 μM (Hopwood et al., 1985). Además de esta concentración, se ensayaron otras dos, una por debajo (10 nM) y otra por encima (2 mM), para comprobar si la diferente concentración de hierro en ausencia de la bacterioferritina tenía algún efecto fenotípico.

El ensayo fenotípico desde gotas en NMMP se muestra en la Figura R.1.6. En NMMP con 10 nM y 4 μM de hierro, el mutante Δbfr presentó menor diferenciación que el silvestre, pero no hay tanta falta de micelio aéreo a los 8 días como ocurre en algunos medios ricos (como LB o YEPD). Llamaron la atención, principalmente, tres cosas: en medio NMMP con bajo hierro (10 nM) hay un retraso en la diferenciación del mutante; en NMMP estándar (4 μM de hierro), el mutante produjo un halo de ACT mayor a los 8 días; y en NMMP con 2 mM de hierro, ambas cepas no diferencian el micelio aéreo blanco y, en el caso de Δbfr , las colonias adquieren un tono rojo (de RED o derivados), solo presente en el borde en las colonias silvestres.

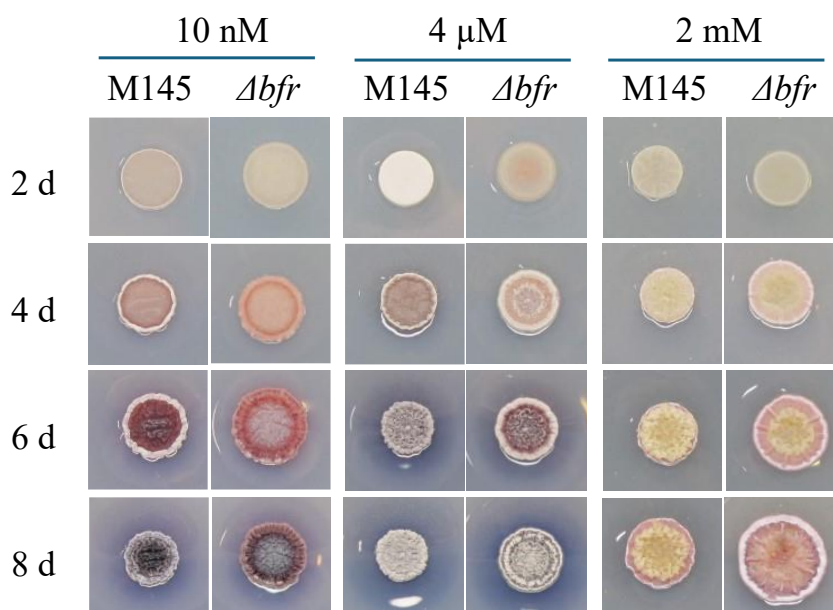


Figura R.1.6. Fenotipo de Δbfr con variación de hierro. Fenotipo de la cepa silvestre M145 y el mutante Δbfr en NMMP con tres concentraciones de hierro (10 nM, 4 μM y 2 mM), a partir de gotas de esporas ($5 \cdot 10^5$ esporas), durante 8 días de crecimiento.

Al igual que con los medios complejos, se ensayó el fenotipo de UFC en estos medios. El fenotipo observado en cuanto a diferenciación se parece al observado en el ensayo fenotípico en gota (que poseen mayor densidad de células), pero sin observar halos de ACT en ninguna de las dos cepas ensayadas. Con 10 nM de hierro, en este caso, se acentuó más el retraso de diferenciación en Δbfr ; que formó colonias rojas de micelio vegetativo, respecto a la cepa silvestre, que diferenció parcialmente (colonias no totalmente blancas). En NMMP con 4 μM de hierro (concentración normal

RESULTADOS: CAPÍTULO 1

en el medio), Δbfr presentó menor diferenciación que el silvestre. Por último, al igual que sucedía en el ensayo en gota, la concentración de 2 mM inhibió la diferenciación: si bien el silvestre produjo micelio aéreo, este dio lugar después a colonias ligeramente amarillentas en el centro con rugosidades, mientras que Δbfr produjo micelio aéreo de poca densidad (poca intensidad de blanco) (Figura R.1.7).

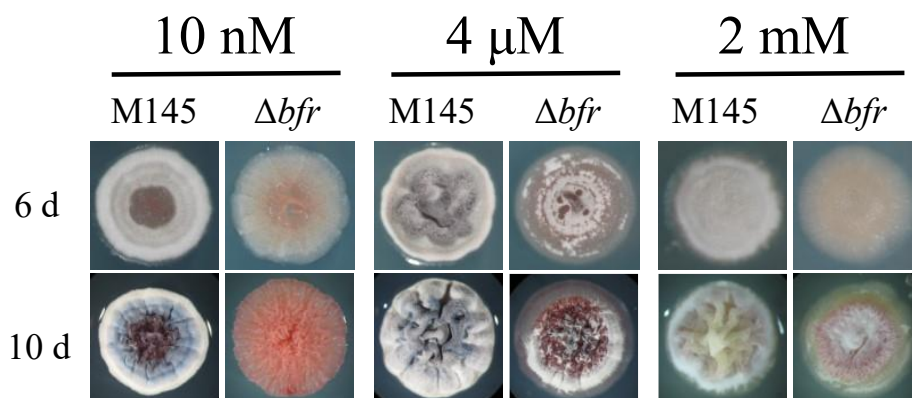


Figura R.1.7. Fenotipo de colonias con variación de hierro. Colonias de la cepa silvestre M145 y el mutante Δbfr en NMMP con tres concentraciones de hierro (10 nM, 4 μ M y 2 mM).

Estas diferencias, desde UFC y ensayo en gota, indicaban que la cantidad de hierro presente en este medio mínimo sí influía en el metabolismo secundario y diferenciación de *S. coelicolor* M145 y Δbfr , lo cual genera fenotipos dependientes de la concentración de hierro del medio.

R.1.2.2 – Cuantificación de antibióticos en medio NMMP líquido

Dado que en LB las diferencias cualitativas en producción de antibióticos observadas en medio sólido se correspondieron con las diferencias cuantitativas obtenidas en medio líquido, se quiso comprobar si en NMMP sucedía lo mismo. Por lo tanto, se decidió cuantificar la cantidad de RED y ACT producidas en NMMP líquido a las tres concentraciones de hierro estudiadas (10 nM, 4 μ M y 2 mM) a lo largo del tiempo hasta 8 días.

Antes de la cuantificación, de forma visual ya se observaban diferencias en los cultivos líquidos en NMMP (Figura R.1.8), y los datos cuantitativos concuerdan con lo observado visualmente por color. El mutante Δbfr comenzó la producción de ACT a los 6 días en NMMP con 4 μ M de hierro, igualando la producción del silvestre a los 8 días. Con la concentración más alta de hierro (2 mM), la síntesis de ACT fue menor en el mutante Δbfr respecto a la cepa M145, que produjo la cantidad más alta de ACT comparando los tres tipos de NMMP líquidos (Figura R.1.9 A). La producción de RED fue muy baja en NMMP y fue menor en la cepa Δbfr (Figura R.1.9 B).

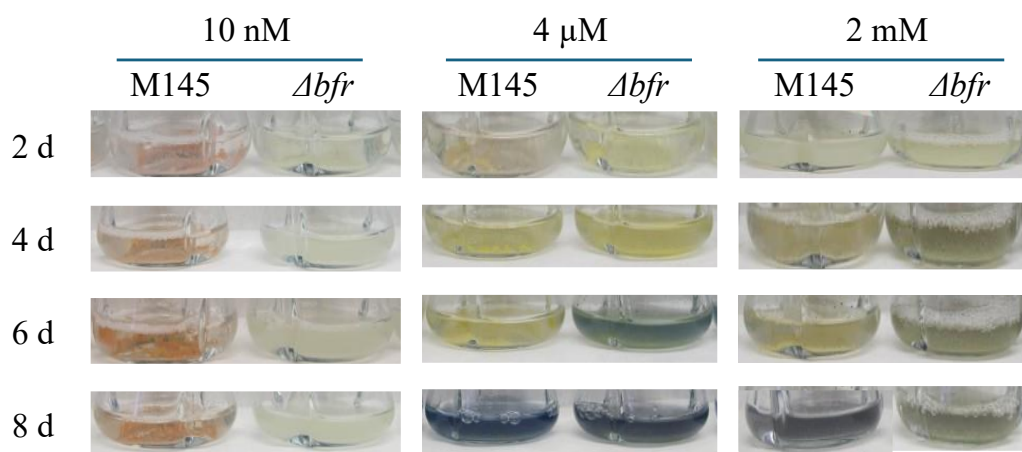


Figura R.1.8. Fenotipo en NMMP líquido. Cultivos líquidos de la cepa silvestre M145 y el mutante Δbfr en NMMP con tres concentraciones de hierro (10 nM, 4 μ M y 2 mM).

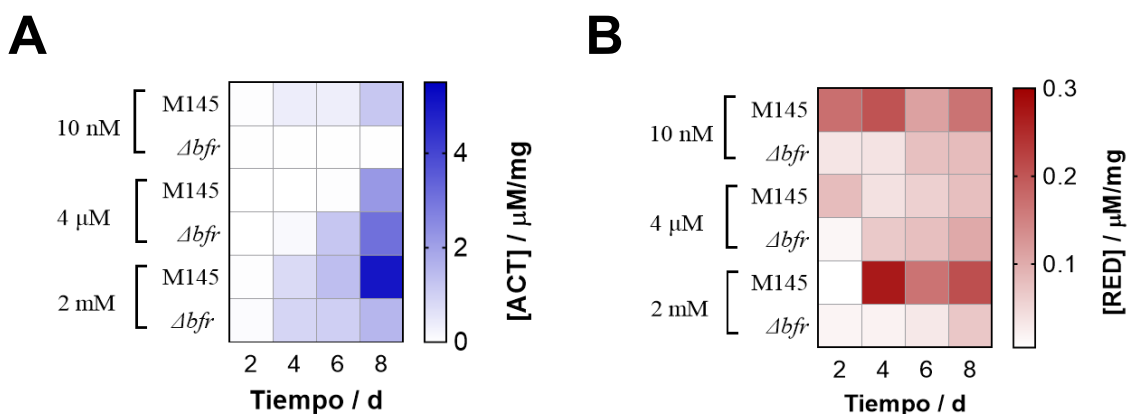


Figura R.1.9. Producción de antibióticos pigmentados con variación de hierro. Mapas de calor que muestran la cuantificación de antibióticos pigmentados en las cepas M145 y Δbfr en las tres concentraciones de hierro ensayadas. **A.** Producción de ACT (azul). **B.** Producción de RED (roja).

Estos resultados mostraron que la concentración de hierro presente en el medio de cultivo es uno de los múltiples factores que afectan a la producción de antibióticos y que su efecto depende en parte de la presencia de la proteína Bfr, dado el diferente comportamiento fenotípico del mutante Δbfr respecto a la cepa silvestre. Además, en este caso, en el medio NMMP, el comportamiento de ambas cepas difiere también entre cultivo sólido y el líquido, con una diferencia más notable en la concentración más alta de hierro (2 mM).

R.1.2.3 – Detección de la actividad antibiótica en medio sólido

La cuantificación de los antibióticos pigmentados (ACT y RED) en medio sólido se complementó con un antibiograma para comprobar si las concentraciones de hierro en NMMP influían en la actividad antibiótica general de *S. coelicolor*. Se realizó un antibiograma frente a *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* y *E. coli* en medio BHI, YEPD y LB, respectivamente, utilizando

RESULTADOS: CAPÍTULO 1

tacos de micelio de M145 y Δbfr previamente crecidos durante 8 días en NMMP con distintas cantidades de hierro (apartado “M.10.2” de “Materiales y métodos”).

Los resultados se muestran en la Figura R.1.10. En cuanto a las bacterias Gram-positivas ensayadas como sensibles, los cultivos de *S. coelicolor* con la menor concentración de hierro, 10 nM, son los que presentaron mayor actividad antibiótica frente a ambas cepas (*S. epidermidis* y *M. luteus*), comparada con la actividad antibiótica de *S. coelicolor* crecido con 4 μ M de hierro. Los cultivos en 2 mM de hierro no tuvieron actividad antibiótica. Por otro lado, ninguna de las condiciones de ambas cepas, silvestre y mutante Δbfr , indujo actividad antibiótica contra la bacteria Gram-negativa, *E. coli*. No hubo diferencias significativas entre ambas cepas (M145 y Δbfr) en ninguno de los casos donde se observó halo de inhibición.

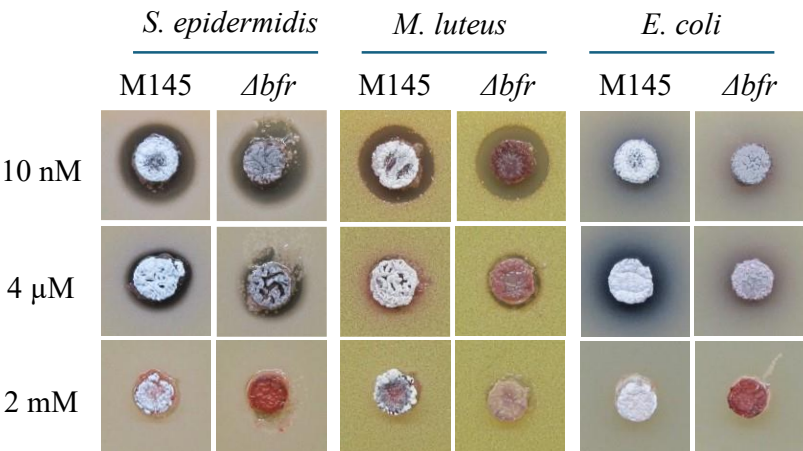


Figura R.1.10. Antibiograma desde NMMP. Antibiograma realizado con las cepas M145 y Δbfr crecidas previamente en NMMP sólido con distinta concentración de hierro (10 nM, 4 μ M y 2 mM) durante 8 días.

Además, se comprobó la actividad antibiótica obtenida a partir de cultivos previos de las dos cepas (silvestre y mutante) en LB sólido. En este caso, la actividad frente a las Gram-positivas sí que fue menor en el mutante Δbfr respecto a la cepa silvestre, apreciándose claras diferencias. No se observó actividad antibiótica frente a *E. coli* en las condiciones ensayadas (Figura R.1.11).

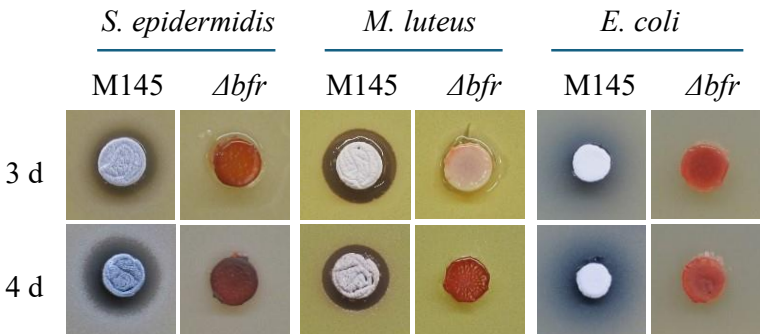


Figura R.1.11. Antibiograma desde LB. Antibiograma realizado con las cepas M145 y Δbfr crecidas en LB durante 3 o 4 días.

En resumen, en medio mínimo, la baja concentración de hierro activa la actividad antibiótica de ambas cepas, mientras que en el medio complejo LB, al igual que sucede con los antibióticos pigmentados, la actividad general baja cuando se elimina el gen *bfr*.

R.1.2.4 – Valoración de los niveles de hierro en *S. coelicolor* M145 y Δbfr

El distinto comportamiento de las dos cepas de estudio respecto a la concentración de hierro en NMMP llevaba a pensar que *bfr* poseía un papel importante en la homeostasis del hierro, es decir, en su disponibilidad en la célula para llevar a cabo diferentes procesos (en este caso la producción de antibióticos o la diferenciación). En otras bacterias, la delección de la ferritina o bacterioferritina origina cambios en los niveles de hierro intracelulares de la bacteria, lo cual influye en su fisiología (Eshelman et al., 2017).

Para comprobar si las diferencias observadas en la producción de antibióticos se debían a diferencias en las concentraciones de hierro intracelular, se procedió a determinar la cantidad de hierro presente en las células en las condiciones ensayadas en el apartado anterior: cultivos líquidos de M145 y Δbfr en NMMP con 10 nM, 4 μ M y 2 mM de hierro, con muestras cada 2 días durante 8 días totales.

Para esto, se utilizó el compuesto ferene-S, que forma un complejo con el catión Fe^{2+} cuantificable mediante colorimetría (Fish, 1988). Dentro de las células, el hierro puede estar como hierro disponible en el citosol (hierro lábil) o acoplado a otras macromoléculas, y como ocurre en las ferritinas, puede ser almacenado en forma de Fe^{3+} . Para medir ambos tipos de hierro, lábil y total, se adaptaron protocolos de la bibliografía empleados con células procariotas o eucariotas: se empleó una digestión más suave, con lisozima, y una menor concentración de ácido ascórbico para medir el hierro lábil (Abbasi et al., 2021), mientras que se empleó una digestión más agresiva y una mayor concentración de ácido ascórbico, que reduce todo el hierro liberado de macromoléculas, para medir el hierro total (Punchi Hewage et al., 2020). El procedimiento se detalla en el apartado “M.11.1” de “Materiales y métodos”.

Los resultados de la cuantificación de hierro para las concentraciones de 4 μ M y 2 mM se muestran en la Figura R.1.12. Esta figura no muestra resultados relativos a la menor concentración de hierro, 10 nM, ya que no se pudieron obtener medidas de hierro a partir de los cultivos correspondientes. No hubo diferencias significativas entre las concentraciones de 4 μ M (Figura R.1.12 A) ni de 2 mM (Figura R.1.12 B) de hierro, tanto lábil como total, entre las dos cepas de estudio. Es decir, la ausencia de bacterioferritina en *S. coelicolor* no causa cambios detectables en las cantidades de hierro dentro de la bacteria, aunque sí influya en el metabolismo secundario de manera diferencial según la cantidad de hierro disponible en NMMP, como hemos descrito previamente.

De igual forma, se comprobaron los niveles de hierro en el medio complejo LB (que contiene una concentración de hierro aproximada de 1,8 μ M), para comprobar si esta igualdad de niveles de hierro

RESULTADOS: CAPÍTULO 1

lábil y total ocurría también. Como se puede observar en la Figura R.1.12 C, en LB tampoco hubo diferencias significativas en los niveles de hierro entre las cepas M145 y Δbfr .

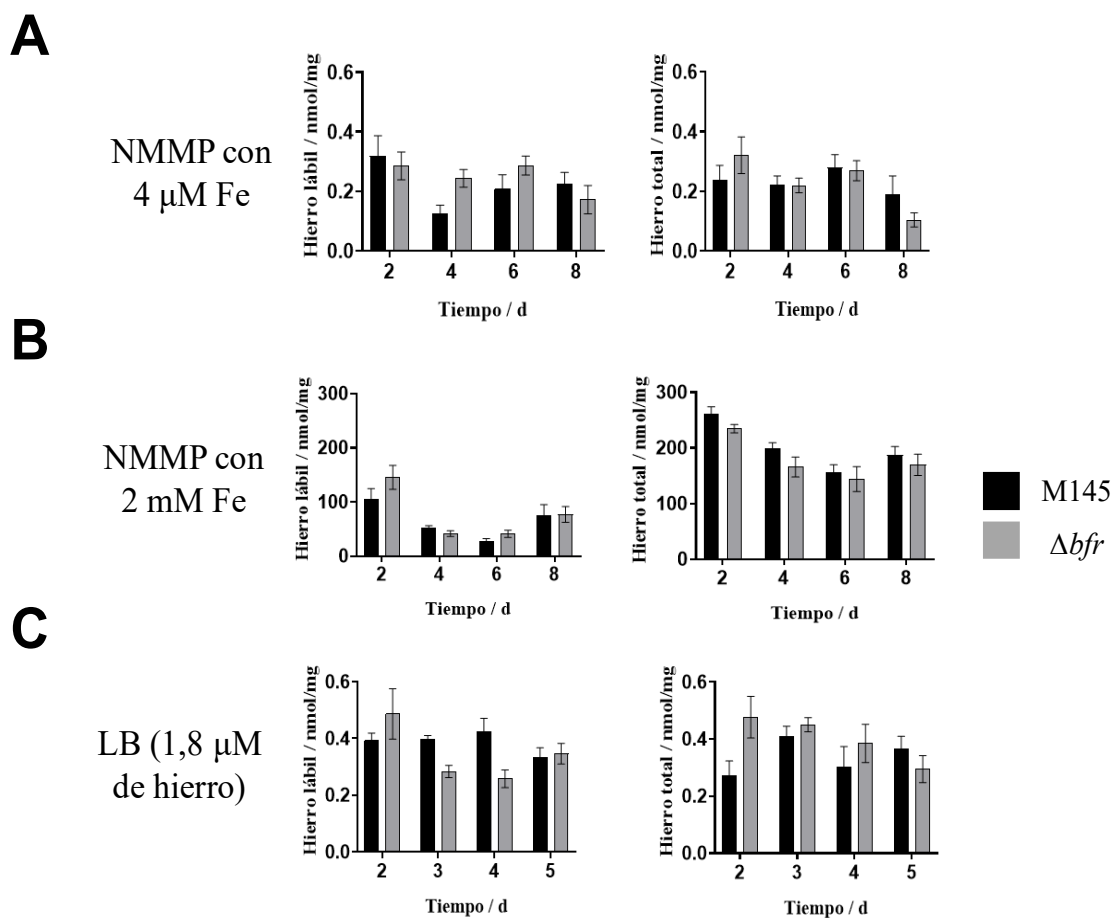


Figura R.1.12. Medida de los niveles de hierro. Hierro lábil (izquierda) y total (derecha) medido en cultivos líquidos de *S. coelicolor* M145 y Δbfr . **A.** Medidas en NMMP con 4 μ M de hierro (durante 8 días). **B.** Medidas en NMMP con 2 mM de hierro (durante 8 días). Nótese la diferencia de escala en el eje de ordenadas respecto al resto de gráficas. **C.** Medidas en LB (de 2 a 5 días).

R.1.2.5 – Efecto de los quelantes de hierro

Otra forma de estudiar el papel del hierro en la fisiología de un microorganismo es analizar el efecto del uso de quelantes de hierro en el medio. En *S. coelicolor*, esta metodología fue empleada utilizando bipyridilo (BIP) para estudiar la inducción de la producción de ACT en medio CYE (N. Lee et al., 2020). En esta tesis, se estudió el efecto de dos quelantes de hierro: el ya mencionado BIP, que secuestra el hierro intra y extracelular al ser permeable, y el ácido bazofenantrilsulfónico (BPS), que solo secuestra el hierro extracelular al no entrar en las células (Hassett et al., 1998).

Nuevamente, el medio LB sólido fue el medio elegido para el ensayo. Se ensayaron las siguientes concentraciones de ambos quelantes: 0, 50, 100, 200 y 300 μ M.

A mayor BIP se observó una menor diferenciación de la cepa silvestre y una bajada de producción de ACT. Por otro lado, en el mutante Δbfr se observaron pequeños puntos de producción de micelio aéreo con 50 μ M de BIP cuya cantidad disminuía según aumentaba la concentración del quelante. A la mayor concentración ensayada, 300 μ M, ambas cepas solo produjeron micelio sustrato (no hay micelio blanco ni producción de antibióticos coloreados) (Figura R.1.13 A). Por otra parte, el BPS afectó a la diferenciación de la cepa silvestre a los 4 días con 100 μ M, y en las dos concentraciones más altas (200 y 300 μ M) se bloqueó completamente la diferenciación a micelio aéreo. En cuanto a la producción de ACT, a mayor concentración de BPS, más se redujo la ACT secretada. El mutante Δbfr indujo pequeños puntos de micelio aéreo y un poco de producción de ACT con 50 μ M de BPS, y en el resto de las concentraciones mantuvo un fenotipo de gotas de micelio rojizas (Figura R.1.13 B).

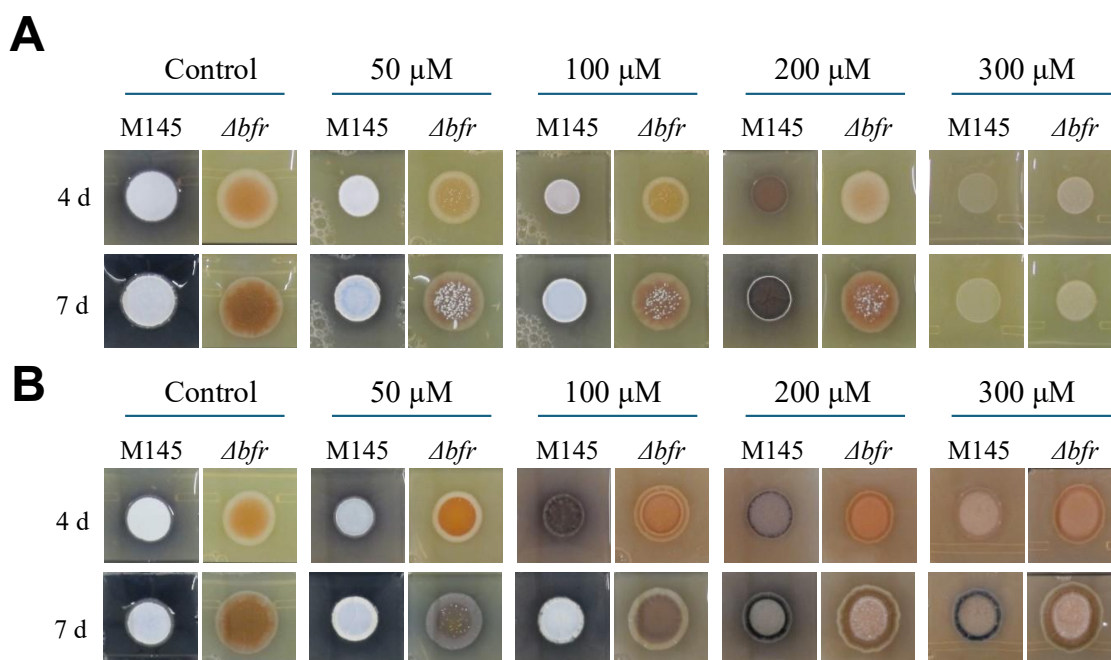


Figura R.1.13. Quelantes de hierro. Efecto de los quelantes de hierro en el fenotipo de la cepa silvestre M145 y el mutante Δbfr en LB. **A.** Efecto del bipiridilo (BIP, quelante de hierro intra y extracelular). **B.** Efecto del BPS (quelante de hierro extracelular).

Por lo tanto, utilizando esta técnica se corrobora la importancia de la disponibilidad de hierro en los procesos de diferenciación y producción de ACT observada en los apartados anteriores. Cabe destacar que el bloqueo de la disponibilidad de hierro mediante quelantes, bien de forma extracelular o general (intra y extracelular), afecta al desarrollo de *S. coelicolor*. La cepa silvestre disminuye su diferenciación y producción de antibióticos con los quelantes, mientras que Δbfr induce parches de diferenciación, principalmente con BIP, en concentraciones de 50 a 200 micromolar.

R.1.3 – Efecto de las especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo

R.1.3.1 – Tolerancia al estrés oxidativo

Una de las ventajas que ofrece el almacenamiento de hierro dentro de ferritinas es impedir que un exceso de hierro, en su forma reducida y disponible en el citoplasma, reaccione con oxígeno y se generen ROS a niveles tóxicos. Se ha descrito que la ausencia de ferritinas en las bacterias, en general, aumenta la susceptibilidad al estrés oxidativo, como ocurre en *Agrobacterium tumefaciens* o *S. pogona* (Bradley et al., 2020; Tang et al., 2021; J. Yang et al., 2020).

Para comprobar si tenía lugar este posible papel protector de la bacterioferritina Bfr ante el estrés oxidativo en *S. coelicolor*, se realizó un ensayo de supervivencia tras un tratamiento con diferentes concentraciones de H_2O_2 (4, 8 y 20 mM) (véase el apartado M.12.1 de “Materiales y métodos”) comparando las cepas silvestre y mutante. El comportamiento observado fue el contrario al esperado: el mutante Δbfr fue significativamente más tolerante al estrés oxidativo que la cepa silvestre en todas las concentraciones ensayadas (Figura R.1.14). Este interesante resultado demostraba que, en *S. coelicolor*, Bfr tiene una relación con el estrés oxidativo diferente a la descrita en la literatura para este tipo de moléculas. Es decir, su ausencia no daría lugar a una mayor producción de ROS que afectara a su supervivencia celular.

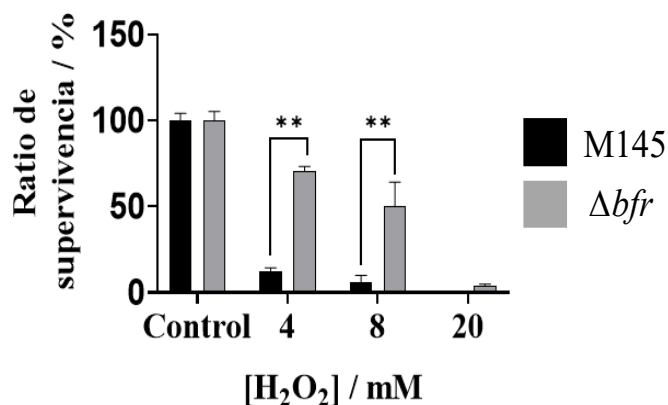


Figura R.1.14. Tolerancia a estrés oxidativo. Dos asteriscos (**) representan un p-valor menor a 0,01.

R.1.3.2 – Niveles de ROS

Del resultado del apartado anterior se deduce que existe una relación no esperada entre estrés oxidativo y la proteína Bfr. En varios trabajos se ha descrito que hay un nexo entre el metabolismo oxidativo (ligado a la producción de ROS) dentro de *S. coelicolor* y su metabolismo secundario, con un posible papel antioxidante de algunos de los antibióticos en el desarrollo normal de este organismo

(Esnault et al., 2017; Virolle, 2020). Para comprobar si existía este vínculo se quiso comprobar si las diferencias observadas en la producción de antibióticos entre las cepas M145 y Δbfr se correlacionaban con diferencias en los niveles de ROS.

De este modo se procedió a medir las concentraciones de ROS en las cepas M145 y Δbfr en las diferentes condiciones de cultivo en las que habíamos observado diferencias en la producción de antibióticos.

Las medidas de ROS se realizaron utilizando 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA) 10 μ M (ver apartado "M.12.2" de "Materiales y métodos") a partir de cultivos líquidos análogos a los ensayos anteriores: NMMP con distintas concentraciones de hierro (10 nM, 4 μ M y 2 mM) y medio LB como medio complejo. Todos los cultivos de NMMP se procesaron a día 8; y, además, a día 6 en NMMP con 4 μ M de hierro, al ser el momento en el cual Δbfr adelanta la producción de ACT respecto al silvestre (Figura R.1.8 y Figura R.1.9). Los cultivos de LB se procesaron a los 3 y 4 días.

En los resultados no se muestran los resultados de NMMP con 10 nM de hierro, pues no se obtuvieron medidas de ROS de estos cultivos. A día 6 en NMMP con 4 μ M de hierro, cuando Δbfr produce ACT, las cantidades de ROS son un poco menores respecto a la cepa silvestre (Figura R.1.15 A). En el resto de las condiciones, se observó que Δbfr acumula mayor cantidad de ROS respecto a la cepa silvestre a tiempo final de estudio (8 días en NMMP y 4 en LB) (Figura R.1.15 B y C). Aunque en NMMP con 2 mM de hierro no hubo diferencias significativas (Figura R.1.15 B), la tendencia también fue de mayor producción de ROS en la cepa Δbfr .

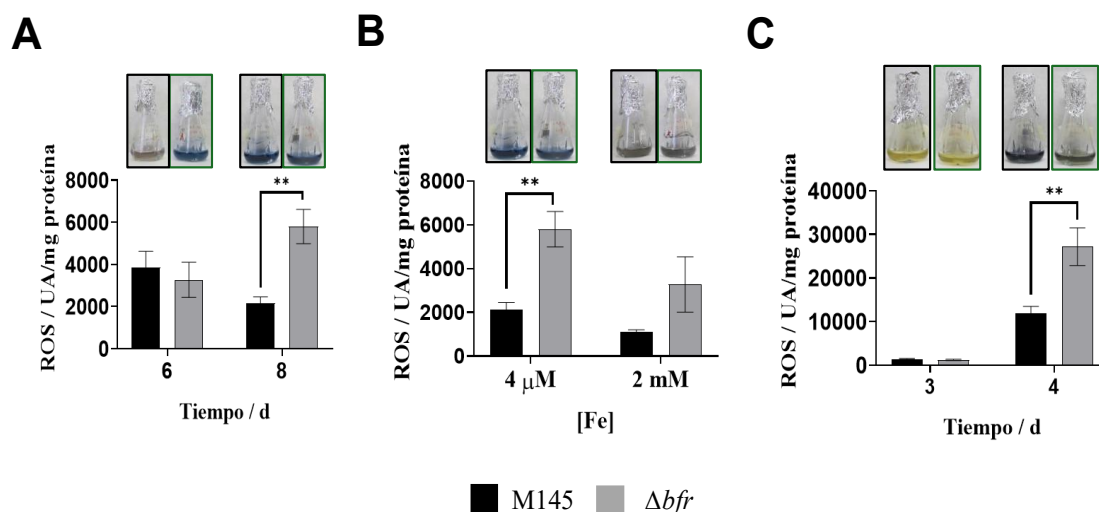


Figura R.1.15. Medida de las ROS. Niveles intracelulares de ROS en las cepas M145 y Δbfr . En la parte superior se muestran fotos del aspecto de los cultivos líquidos (representación cualitativa de la producción de ACT). Dos asteriscos (**) representan un p-valor menor a 0,01. **A.** Medidas en NMMP con 4 μ M de hierro a los 6 y 8 días de cultivo. **B.** Comparación, a día 8, de los niveles de ROS en NMMP con 4 μ M de hierro y con 2 mM de hierro. **C.** Medida en LB a los 3 y 4 días.

Por lo tanto, en el mutante Δbfr hay una mayor cantidad de ROS que en la cepa silvestre en las condiciones ensayadas coincidiendo con los momentos de menor producción de ACT respecto al

RESULTADOS: CAPÍTULO 1

silvestre. Sin embargo, estos niveles no deben de alcanzar niveles tóxicos dado que paradójicamente Δbfr es más tolerante al estrés oxidativo.

R.1.3.3 – Efecto de compuestos antioxidantes

Como la cepa Δbfr produjo mayor cantidad de ROS en las condiciones de estudio, se planteó que inhibir estas ROS podría tener algún efecto. Se ensayó el efecto de varias moléculas con potencial antioxidante o con capacidad de neutralizar las ROS (*scavengers* de ROS) que estaban descritas en la bibliografía: tiourea (Dewachter et al., 2016; Keren et al., 2013), ácido ascórbico (Goswami et al., 2007; Maclean et al., 2008), manitol (Brinkman et al., 2016; Goswami et al., 2007) y triptófano (Sabbahi et al., 2008, 2018).

En un primer ensayo se utilizó una concentración de 10 mM de cada molécula en LB líquido (Figura R.1.16). La tiourea redujo la producción de ACT en Δbfr , el triptófano indujo un crecimiento en esferas de micelio grandes en ambas cepas y el ácido ascórbico retrasó mucho el crecimiento de la cepa silvestre. El manitol favoreció algo más de crecimiento en el mutante Δbfr , respecto a su control en LB, a día 4, pero no se observaron diferencias a día 7 y, por ello, no se consideró para ensayos posteriores. Las moléculas con un efecto (tiourea, manitol y triptófano) se volvieron a ensayar en LB, tanto sólido como líquido, utilizando más concentraciones: 0, 5, 10 y 20 mM.

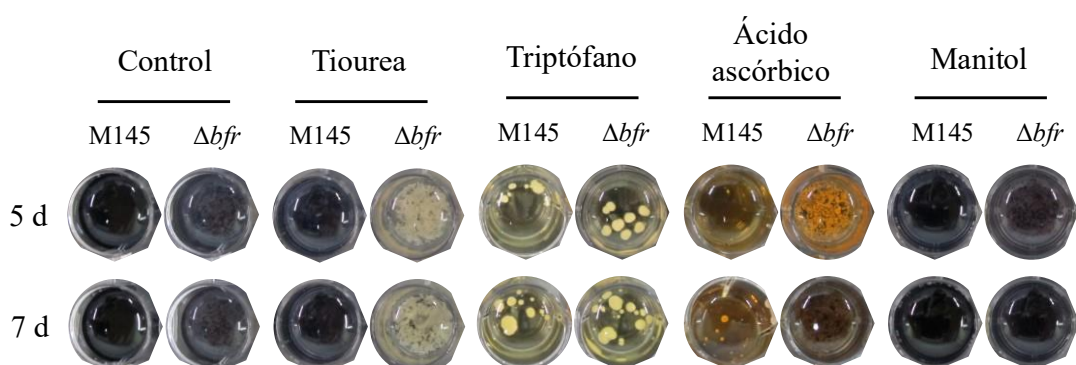


Figura R.1.16. Experimento inicial con antioxidantes. Primer experimento en LB líquido para valorar el efecto de varios antioxidantes a concentración 10 mM en las cepas silvestre M145 y Δbfr .

En este segundo ensayo se observó que la tiourea reducía la producción de ACT de Δbfr en medio líquido (no hay coloración azul-gris) a todas las concentraciones ensayadas, mientras que la cepa silvestre reducía esta producción (coloración oscura menos intensa) a concentraciones elevadas de 20 mM (Figura R.1.17 A). En medio sólido, la tiourea inhibió la producción de ACT en ambas cepas, lo cual fue más notable en la cepa silvestre (en Δbfr se puede ver a 7 días de crecimiento al comparar con el control sin tiourea) (Figura R.1.17 B). En general, la acción de la tiourea reduce la producción de ACT en ambas cepas.

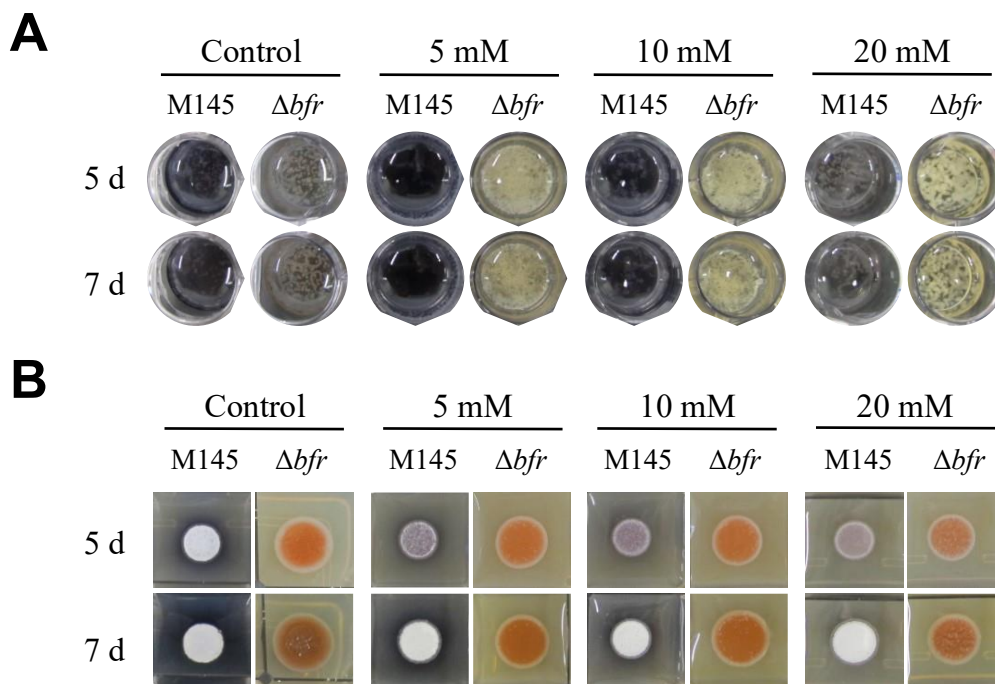


Figura R.1.17. Efecto de la tiourea. Crecimiento de las cepas M145 y Δbfr con tiourea a concentraciones 5, 10 y 20 mM en medio LB. **A.** Efecto en medio líquido. **B.** Efecto en medio sólido.

El triptófano indujo un crecimiento en agregados grandes de micelio en LB líquido a partir de 10 mM. La cepa silvestre produjo ACT en esta concentración a tiempos finales, pero no con 20 mM (Figura R.1.18 A). Por otro lado, en medio sólido hubo una inducción de ACT en ambas cepas (a tiempos finales en Δbfr), con menor diferenciación en la cepa silvestre a mayor concentración de triptófano hasta conseguir ausencia de micelio aéreo con 20 mM (Figura R.1.18 B). El triptófano produjo un efecto muy distinto en medio líquido y sólido, y al ser un aminoácido implicado en metabolismo y capaz de regular la expresión génica (Palazzotto et al., 2015), estos resultados no aportaron información al papel del estrés oxidativo en Δbfr .

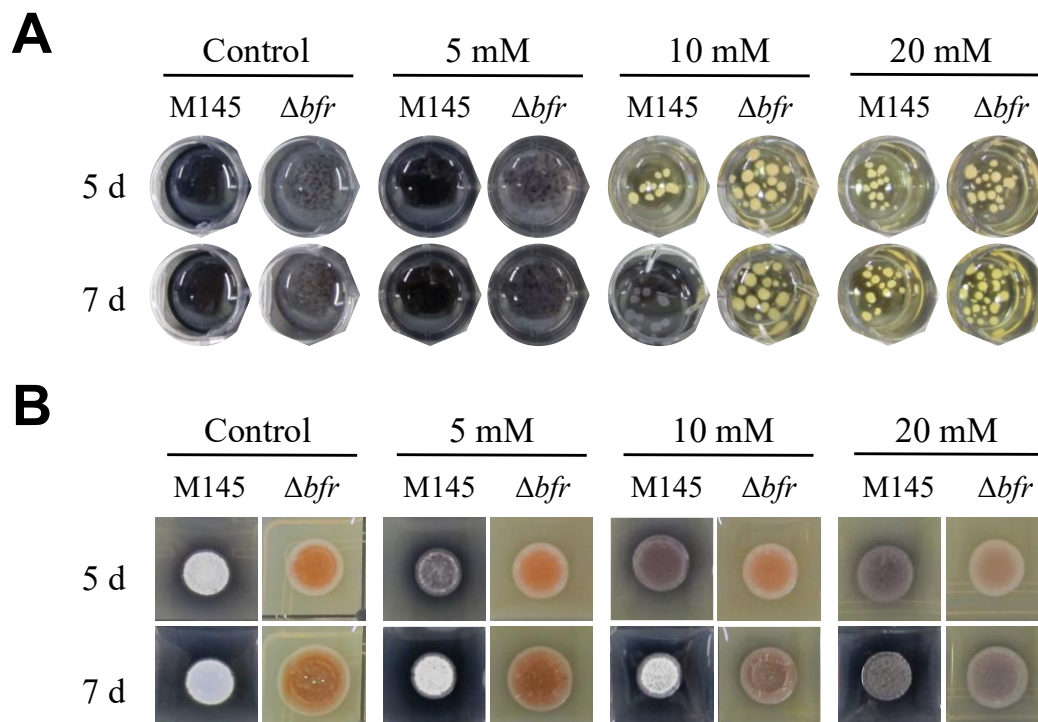


Figura R.1.18. Efecto del triptófano. Crecimiento de las cepas M145 y Δbfr con triptófano a concentraciones 5, 10 y 20 mM en medio LB. **A.** Efecto en medio líquido. **B.** Efecto en medio sólido.

Por último, el ácido ascórbico en medio líquido redujo el crecimiento de ambas cepas: con 10 mM se formaron esferas de micelio grandes, con mayor crecimiento en el mutante Δbfr , y con 20 mM no hubo nada de crecimiento (Figura R.1.19 A). En medio sólido, la cepa Δbfr fue más sensible a la presencia del ácido ascórbico al inhibir su producción de ACT con 5 mM y dejar de crecer a partir de 10 mM. La cepa silvestre creció a 10 mM, con menor diferenciación y producción de antibióticos pigmentados, pero no creció a 20 mM (Figura R.1.19 B). Si bien en líquido la acción antioxidante del ácido ascórbico afecta de manera similar a ambas cepas, el mutante Δbfr es más afectado en sólido, lo que indica que las ROS son importantes para el desarrollo de este mutante.

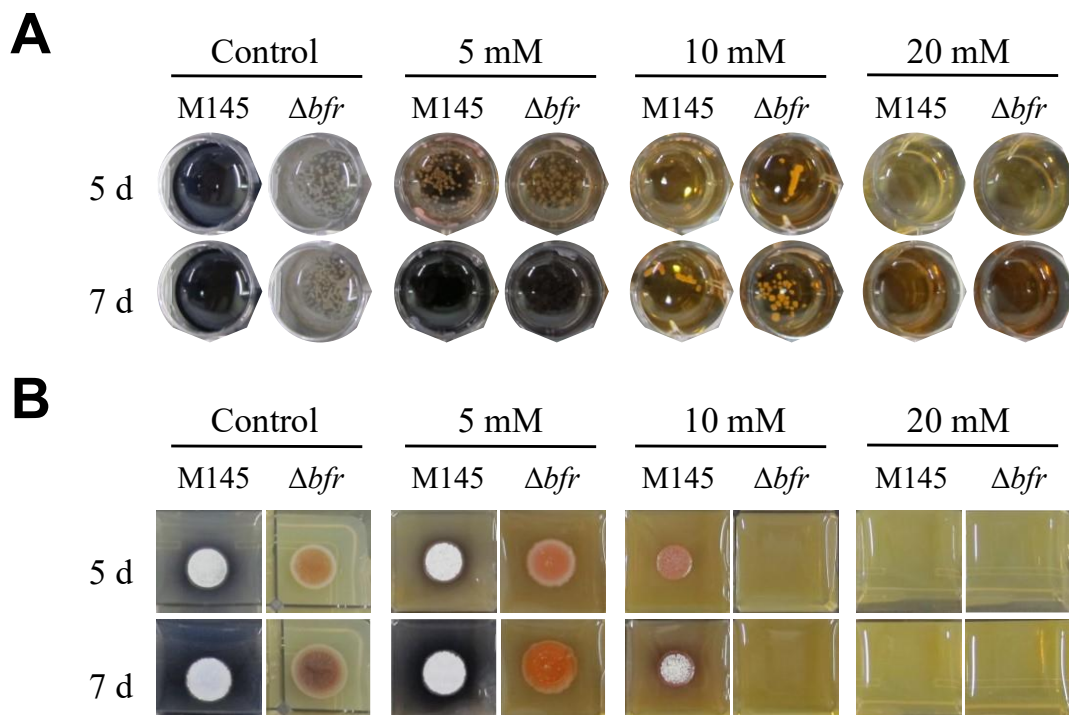


Figura R.1.19. Efecto del ácido ascórbico. Crecimiento de las cepas M145 y Δbfr con ácido ascórbico a concentraciones 5, 10 y 20 mM en medio LB. **A.** Efecto en medio líquido. **B.** Efecto en medio sólido

Los resultados de estos ensayos corroboran la relación entre estrés oxidativo y el desarrollo tanto de la cepa silvestre como del mutante Δbfr . De nuevo, el comportamiento de cultivos sólidos y líquidos es diferente, y las distintas moléculas con poder antioxidante tienen distinto efecto: la cepa Δbfr es insensible a los efectos de tiourea en LB sólido (e inhibe su producción de ACT en líquido) y se ve más afectada que la cepa silvestre por la presencia del ácido ascórbico en el medio sólido.

R.1.4 – Estudio proteómico

Entender qué procesos de *S. coelicolor* están afectados debido a la ausencia del gen *bfr* requería análisis adicionales. En principio, se optó por un análisis proteómico cuantitativo que, como resultado, ofreciera una lista de las proteínas con diferente abundancia entre las dos cepas comparadas, M145 y Δbfr ; que nos permitiera dilucidar las rutas metabólicas y de señalización que estaban afectadas por la ausencia de la bacterioferritina Bfr y, por ende, su importancia en esos procesos metabólicos.

El medio de cultivo elegido para este ensayo fue, de nuevo, el medio LB sólido, por el fenotipo diferencial fuerte y reproducible de la cepa Δbfr , así como por el rápido crecimiento de ambas cepas observado en este medio. Se eligieron dos tiempos de cultivo de estudio: 3 y 4 días. Así, se recolectó micelio de las cepas M145 y Δbfr a partir de placas de LB con celofán, a los tiempos de estudio

RESULTADOS: CAPÍTULO 1

indicados, y se extrajeron las proteínas como se detalla en el apartado “M.8.11.1” de “Materiales y métodos”.

Los extractos proteínicos obtenidos se enviaron al Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología, en Madrid. En este servicio, se cuantificaron las proteínas diferencialmente representadas entre las cepas M145 y Δbfr , y como resultado se obtuvo una lista de todas las proteínas identificadas (3521, un 43 % del proteoma de *S. coelicolor*) con una cuantificación relativa de la cantidad de proteínas o *fold change*, representado como el logaritmo en base 2 de la relación entre cantidad de proteína en Δbfr y en M145; y una significación estadística asociada. Se tomó el p-valor de 0,05 como umbral estadístico. Así, las proteínas analizadas fueron las representadas en color rojo (más representadas en el mutante Δbfr respecto al silvestre) y azul (menos representadas en el mutante Δbfr) en los gráficos de volcán de la Figura R.1.20.

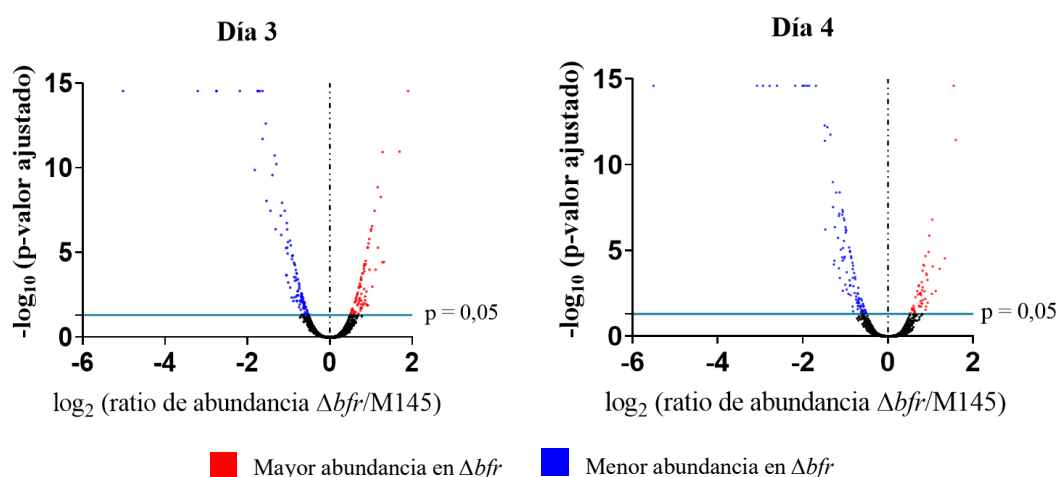


Figura R.1.20. Gráficos de volcán de la proteómica. Se representan, en ambos tiempos de estudio (3 y 4 días a la izquierda y a la derecha, respectivamente), las proteínas diferencialmente presentes entre las cepas M145 y Δbfr que sobrepasan el umbral estadístico (línea horizontal azul) en el estudio proteómico.

En el ensayo de 3 días, 204 proteínas estaban diferencialmente representadas (90 más abundantes en el mutante y 114 menos abundantes), y a los 4 días, 159 (51 más abundantes en el mutante y 108 menos abundantes). 125 proteínas eran comunes entre estos dos días (Figura R.1.21 A).

A continuación, se describirán las proteínas más importantes que se hallaron en el análisis según la función que desempeñan (Figura R.1.21 B). En las figuras de este apartado se seguirá el mismo esquema de colores: las proteínas en rojo serán aquellas con mayor abundancia en Δbfr respecto al silvestre (logaritmo del *fold change* positivo), mientras que las azules serán las que poseen menor abundancia en Δbfr (logaritmo del *fold change* negativo).

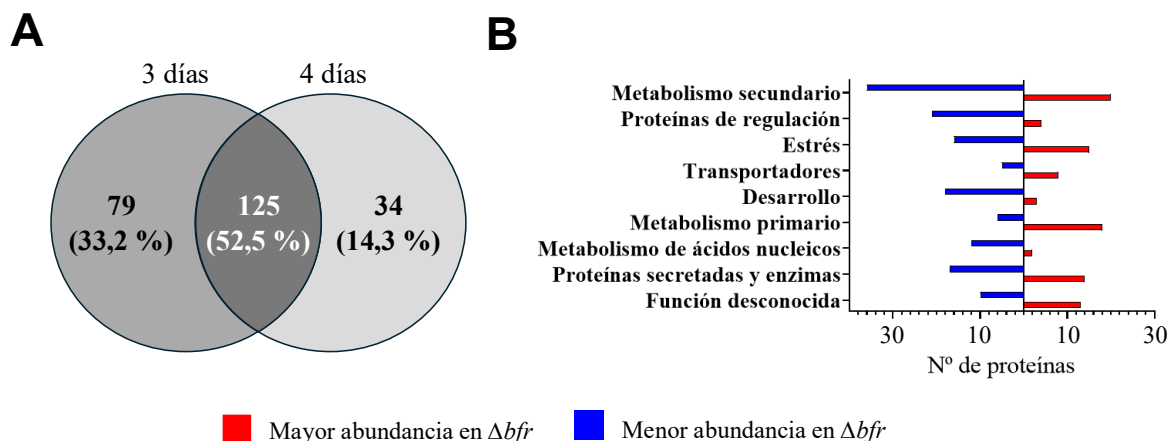


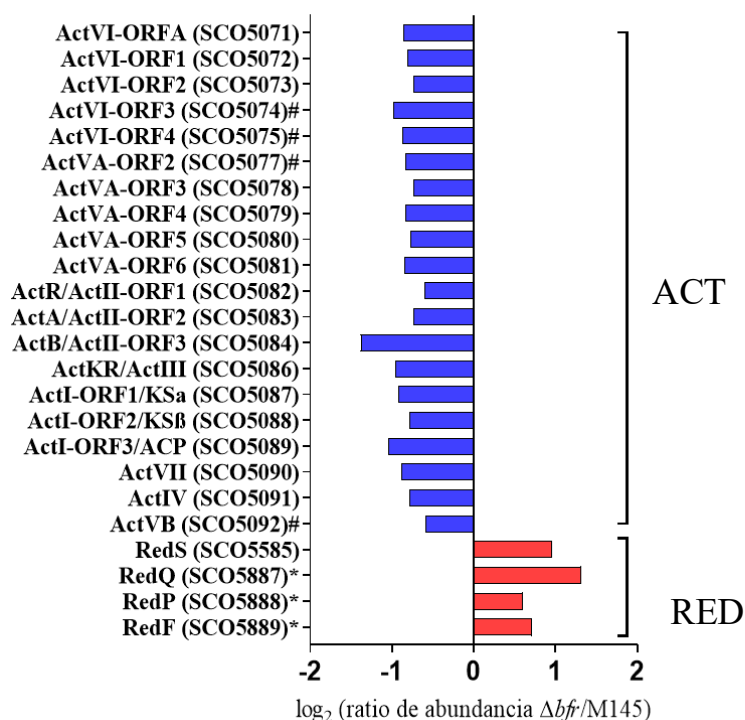
Figura R.1.21. Diagrama de Venn y clasificación de proteínas. A. Diagrama de Venn mostrando el número de proteínas diferencialmente representadas entre las cepas M145 y Δbfr comunes y no comunes detectadas en ambos días. B. Diagrama de barras que muestra las clases en las que se han agrupado las proteínas de estudio.

R.1.4.1 – Proteínas de clústeres de metabolitos secundarios

En medio LB, una de las características fenotípicas más notables en la cepa Δbfr era el retraso en la producción de ACT. Todas las proteínas del clúster *act* (*SCO5071-SCO5092*) detectadas (15 de 22) poseían menor abundancia en el mutante. Todas las proteínas detectadas estaban involucradas en su biosíntesis excepto la proteína ActVI-ORFA (*SCO5071*), que actúa como activador de la producción de ACT (C. Li et al., 2021) (Figura R.1.22).

En cuanto a las proteínas del clúster *red*, fue inesperada la mayor representación de 4 proteínas en el mutante respecto al silvestre, pues el mutante produce menos RED en LB (Figura R.1.2). Tres de esas proteínas están involucradas en su biosíntesis y solo superaron el umbral estadístico a día 3: RedP (*SCO5888*), RedQ (*SCO5887*) (Mo et al., 2008) y RedF (*SCO5898*) (Cerdeño et al., 2001). RedS (*SCO5585*), de función desconocida, superó el umbral en ambos días (Figura R.1.22).

RESULTADOS: CAPÍTULO 1



■ Mayor abundancia en Δbfr ■ Menor abundancia en Δbfr

Figura R.1.22. Proteínas con abundancia diferencial de los clústeres *act* y *red*. Las proteínas marcadas con un asterisco (*) solo se detectaron en el día 3, y las marcadas con almohadilla (#), en el día 4.

Hasta el momento, no se habían analizado fenotípicamente la presencia de los otros antibióticos producidos por *S. coelicolor* en las cepas en estudio. Sin embargo, el análisis proteómico reveló una mayor representación de 14 proteínas del clúster *cda* (SCO3210-SCO3249) implicadas en la biosíntesis de este antibiótico dependiente de calcio. Por lo tanto, estos datos se complementaron con un bioensayo de producción de CDA con *Bacillus subtilis* como bacteria testigo (apartado “M.10.2.1” de “Materiales y métodos”). Como se observa en la Figura R.1.23 A, había una mayor producción de CDA del mutante Δbfr respecto a la cepa silvestre, corroborando de este modo la correspondencia con los datos proteómicos.

Otras moléculas producidas por *S. coelicolor* son las coelimicinas, entre las que se encuentran las coelimicinas amarillas (yCPKs) P1 y P2 y la coelimicina A, con actividad antibiótica (Bednarz et al., 2019). Respecto a las proteínas producidas a partir del BGC de síntesis de estas moléculas (clúster *cpk*), la proteína ScF (SCO6272), que transforma las yCPKs en abCPK (Gottelt et al., 2010), poseía mayor abundancia en la cepa Δbfr ; no obstante, el resto de proteínas, implicadas en la biosíntesis, presentaban menor abundancia. El ensayo de producción de estas moléculas reveló, de manera cualitativa, que la cepa Δbfr producía menor cantidad de estas moléculas (Figura R.1.23 B).

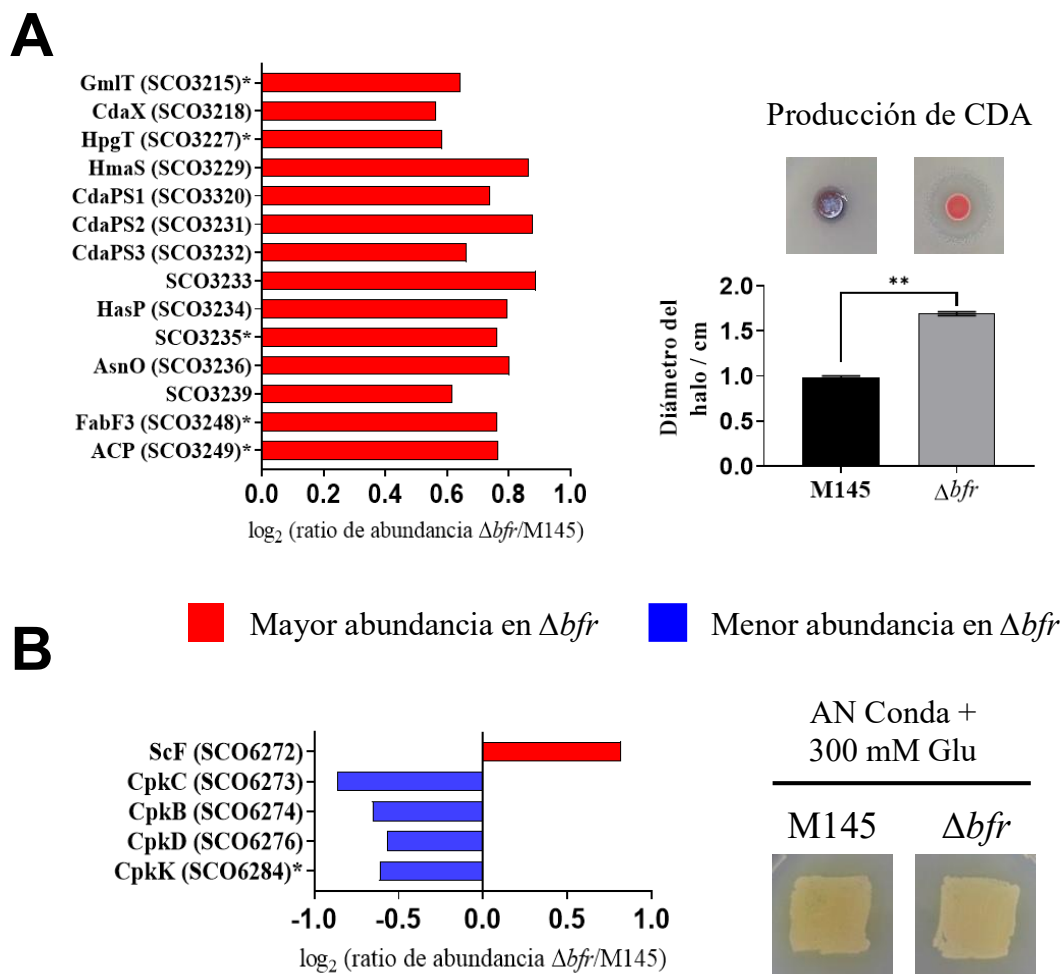
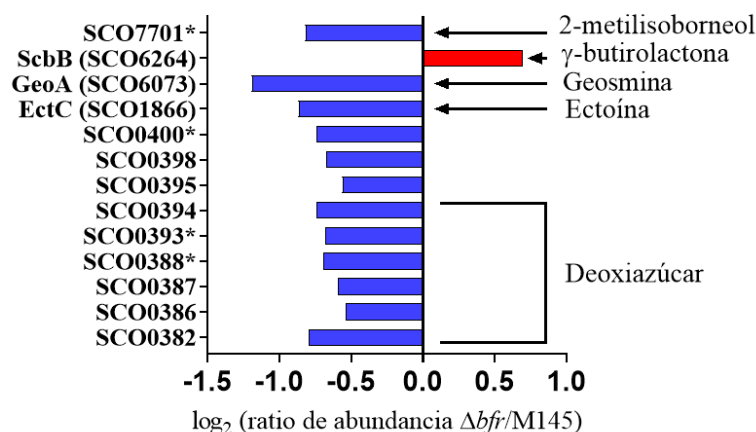


Figura R.1.23. Producción de CDA y coelimicinas en *S. coelicolor* Δbfr . En la cuantificación diferencial, las proteínas marcadas con un asterisco (*) solo se detectaron en el día 3. **A.** Proteínas con abundancia diferencial del clúster *cda* (izquierda) y bioensayo de producción de CDA (derecha). Los dos asteriscos (**) indican un p-valor menor a 0,01. **B.** Proteínas con abundancia diferencial del clúster *cpk* (izquierda) y ensayo de producción de coelimicinas en medio AN Conda suplementado con glutamato (derecha).

Por último, otras proteínas procedentes de otros BGC se identificaron con diferente abundancia. Nueve proteínas del clúster críptico para un deoxiazúcar (*SCO0381-SCO0401*), homólogo al clúster *ste* de *Streptomyces* sp. 139 que permite la síntesis del exopolisacárido ebosina (Świątek-Połatyńska et al., 2015), tenían menor abundancia en el mutante Δbfr . Otras proteínas con menor abundancia en esta cepa respecto a la cepa silvestre fueron EctC (SCO1866), implicada en la síntesis del osmoprotector ectoína (Kol et al., 2010), y la geosmina sintasa (SCO6073) (Jiang et al., 2007). En cuanto a proteínas con mayor abundancia, se detectó por encima del umbral ScbB (SCO6264), implicada en la síntesis de γ -butirolactonas (Biarnes-Carrera et al., 2018) (Figura R.1.24).

RESULTADOS: CAPÍTULO 1



■ Mayor abundancia en Δbfr ■ Menor abundancia en Δbfr

Figura R.1.24. Proteínas con abundancia diferencial de otros BGC. Las proteínas marcadas con un asterisco (*) solo se detectaron en el día 3.

R.1.4.2 – Proteínas de regulación del metabolismo secundario y conservones

Como se explicó en los antecedentes de este trabajo, uno de los intereses para estudiar *bfr* fue su identificación como diana de la proteína reguladora AbrC3, que activa la producción de antibióticos (Rico, Santamaría, et al., 2014). Esta relación entre *bfr* y una proteína de regulación de la producción de antibióticos condujo a estudiar, en este apartado, las proteínas involucradas en esta regulación. Si bien los resultados son variados, al haber muchos elementos poco descritos y formar parte de una red, sí se evidenciaron cambios en diversos elementos previamente estudiados por otros grupos de investigación, como se expone a continuación.

Como se comentó anteriormente, 4 proteínas del clúster *red* se detectaron con mayor abundancia en la cepa Δbfr . Algunas proteínas del clúster *ecr* (SCO2517-2519), que activa la producción de RED (C. Wang et al., 2007), se detectaron también con mayor abundancia en esta cepa: la HK EcrA2 (SCO2519) (por encima del umbral estadístico solo a día 4) y la bomba EcrB.

Otra HK estudiada en la bibliografía y detectada en este estudio con mayor abundancia en el mutante, en este caso solo en el día 3, fue MtrB (SCO3012), que pertenece al sistema MtrA-MtrB-LpqB (Hoskisson & Hutchings, 2006). Esta HK activa a su RR, MtrA, que a su vez activa la producción de micelio aéreo (P. Zhang et al., 2017) y reprime la producción de antibióticos (Som et al., 2017; Zhu et al., 2020).

Respecto a proteínas con menor abundancia en el mutante Δbfr respecto a la cepa M145, se detectaron tres proteínas del clúster *abe* (SCO3287-3290), que se ha descrito como posible sistema de señalización y activador de la producción de ACT (Hindra et al., 2010). Los elementos detectados

fueron las proteínas de membrana AbeB (SCO3288) y AbeC (SCO3289) y la proteína con dominio de unión a nucleótidos cíclicos AbeD (SCO3290).

En este análisis se detectaron algunas proteínas del grupo de proteínas XRE/DUF397, estudiadas previamente en nuestro laboratorio como elementos de regulación en la producción de antibióticos (Riascos et al., 2023). En concreto, se detectaron dos proteínas XRE, SCO4678 y SCO5125, con menor abundancia en la cepa Δbfr .

Por último, en esta categoría de proteínas se encuentran dos con baja abundancia relativa en la cepa Δbfr : NsdB (SCO7252) y EshA (SCO7699). NsdB se ha descrito como represora de la producción de antibióticos en algunos medios de cultivo (Z. Li et al., 2007), mientras que EshA, de muy baja abundancia relativa en Δbfr , es necesaria para mantener niveles de ppGpp apropiados para la producción de ACT y la diferenciación en algunos medios de cultivo (N. Saito et al., 2006) (Figura R.1.25).

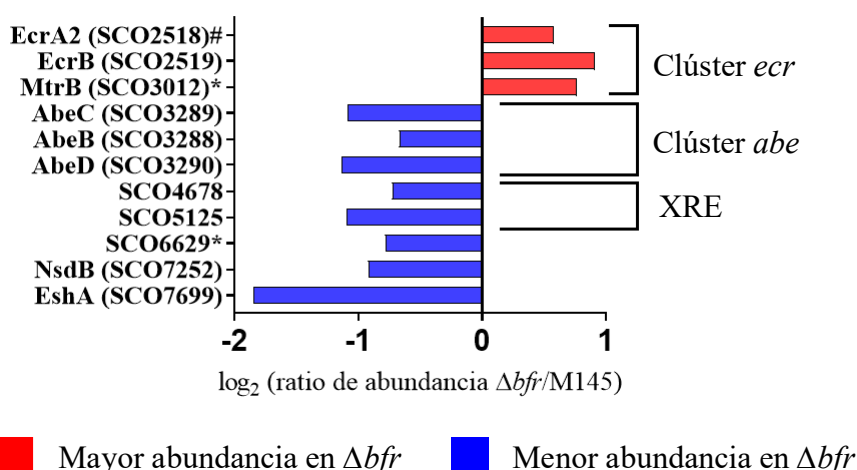


Figura R.1.25. Proteínas con abundancia diferencial relacionadas con regulación del metabolismo secundario. Las proteínas marcadas con un asterisco (*) solo se detectaron en el día 3, y las marcadas con almohadilla (#), en el día 4.

R.1.4.2.1 – Conservones

Dentro del apartado de proteínas de regulación, tienen especial interés varias proteínas de los operones llamados “conservones”, o *cvn*. Los genes de estos operones codifican proteínas similares a sistemas de proteínas G eucariotas: una HK (CvnA), dos proteínas hipotéticas (CvnB y CvnC) y una proteína de unión a ATP o GTP (CvnD). En *S. coelicolor* hay identificados 13 conservones, y además, 4 de ellos poseen un gen adicional que codifica una proteína de citocromo P450 (CvnE) (Komatsu et al., 2006).

El primer conservón, *cvn1* (SCO5541-SCO5544), interviene en la inhibición de la producción de antibióticos y la diferenciación en presencia de altas concentraciones de glucosa, mediante el control del factor SigU, que reprime la diferenciación y la producción de antibióticos (Takano et al., 2011).

RESULTADOS: CAPÍTULO 1

De este conservón, las proteínas CvnA1 (SCO5544) y CvnB1 (SCO5543) estaban más representadas en el mutante Δbfr .

El conservón 7 está implicado en la interacción de *S. coelicolor* con otros organismos y posee un gen adicional, *cvnF7* (SCO6798), que codifica una proteína de unión a nucleótidos cíclicos homóloga a CvnF8 (SCO6939), que interviene en regulación de algunos BGC (Bonet et al., 2021). La proteína CvnF7 tuvo menor abundancia en la cepa Δbfr :

El operón *cvn9* (SCO1626-1630) o *rar* codifica proteínas que reprimen la diferenciación y el metabolismo secundario (Komatsu et al., 2006). Cuatro proteínas de este clúster estaban menos representadas en el mutante Δbfr : RarA/CvnA9 (SCO1630), RarB/CvnB9 (SCO1629), RarC/CvnC9 (SCO1628) y RarE/CvnE9 (SCO1626).

Los últimos elementos de conservones identificados en este análisis pertenecían al conservón 11 (SCO0584-0588) y poseían menor abundancia en la cepa Δbfr . CvnA11 (SCO0588) ha sido descrita como posible elemento regulatorio de genes (Castro-Melchor et al., 2010) y del metabolismo del nitrógeno (Finn et al., 2018). También se detectaron las proteínas CvnD11 (SCO0585, solo a día 4) y CvnE11 (SCO0584) (Figura R.1.26).

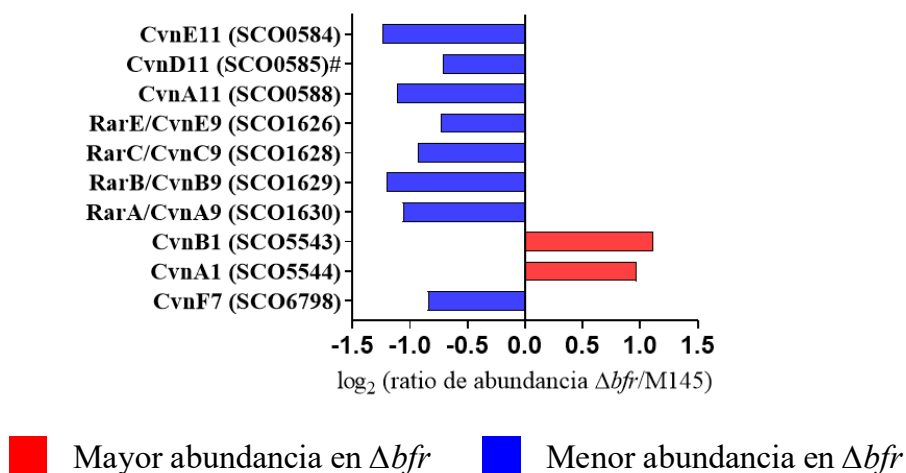


Figura R.1.26. Proteínas con abundancia diferencial pertenecientes a conservones. Las proteínas marcadas con almohadilla (#) solo se detectaron en el día 4.

R.1.4.3 – Proteínas de estrés oxidativo y respiración

Fue de especial interés estudiar qué proteínas relacionadas con el estrés oxidativo aparecían en el experimento de proteómica para explicar la mayor tolerancia al estrés oxidativo (Figura R.1.14) y mayor concentración de ROS en el mutante (Figura R.1.15).

Todas las proteínas relacionadas con la respiración (subunidades del complejo I de la cadena respiratoria, subunidades del complejo *bcc-aa3* y subunidades de la ATPasa) presentaron mayor abundancia en el mutante Δbfr . Este también fue el caso de GabD (SCO7035), una succinato-aldehído



deshidrogenasa que produce NADH (Lejeune et al., 2022) (Figura R.1.27 A). Esto apuntaba a un mayor consumo de O₂, que podría explicar el mayor crecimiento observado respecto al silvestre.

Un mayor consumo de O₂ podría producir una hipoxia más temprana. El TCS OsdK/DevS-OsdR/DevR (SCO0203-0204) es el encargado de activar respuestas de dormición ante la hipoxia (Urem, Świątek-Połatyńska, et al., 2016). Dos proteínas activadas por OsdR se detectaron con mayor abundancia en Δbfr : SCO2367, una peptidasa secretada (Urem, Świątek-Połatyńska, et al., 2016), y SCO6164, homóloga a DksA de *E. coli* (Aldridge et al., 2013), un factor de transcripción que regula la función de la ARN polimerasa mediante los niveles de ppGpp (Łyżeń et al., 2016; Travis & Schumacher, 2022).

También se detectaron en mayor abundancia en Δbfr , aunque solo a día 3, dos subunidades de la nitrato reductasa principal de *S. coelicolor*, Nar2, también reguladas positivamente por OsdR: NarG2 (SCO0216, subunidad catalítica) y NarI2 (SCO0219, subunidad γ) (Fischer et al., 2019). El óxido nítrico se ha relacionado con la producción de RED y ACT en ciertos umbrales de concentración y con un retraso en la diferenciación (Honma et al., 2021, 2022; Sasaki et al., 2016). Por otra parte, la subunidad NarH1 (SCO6534) de la nitrato reductasa Nar1 (encargada de reducir nitrato en esporas), presentó menor abundancia en Δbfr en los dos días estudiados.

Las subunidades de Nar2 también son controladas, en este caso reprimidas, por la proteína Tdd8 (SCO2368), implicada en la homeostasis del calcio y la represión de genes de estrés oxidativo y dormición (Daigle et al., 2015). En el mutante Δbfr se identificaron otras dos proteínas reprimidas por Tdd8 que también aparecieron con mayor abundancia respecto a la cepa silvestre: SCO168 (proteína de unión a nucleótidos cíclicos de la familia CRP/FNR) y SCO0169 (una cistationina β -sintasa hipotética) (Daigle et al., 2015). La cistationina es un intermediario en la síntesis de cisteína que, a su vez, es precursora del micotiol, implicado en protección ante estrés oxidativo y nitrosativo (Nakajima et al., 2015; Yoshizumi et al., 2023). Otra proteína relacionada con el micotiol se detectó con mayor representación en Δbfr a día 3: SCO2763 es un transportador ABC activado por SigR durante estrés oxidativo que transporta conjugados de micotiol (M. Kim et al., 2012)

Otras dos proteínas relacionadas directamente con estrés oxidativo fueron detectadas. Por un lado, con mayor abundancia en Δbfr , MetQ (SCO1557), una lipoproteína que introduce metionina en la célula y cuyo gen se activa ante estrés oxidativo (Busche et al., 2016). Por otro lado, con menor abundancia en Δbfr , AhpC (SCO5032), una alquil hidroperóxido reductasa activada por OxyR en estrés oxidativo y cuya función es neutralizar el H₂O₂ endógeno (Hahn et al., 2002).

Las tioredoxinas están implicadas en respuestas a estrés oxidativo. Se detectaron dos proteínas de membrana con dominios tioredoxina y menor abundancia en Δbfr : SCO2035, una proteína más abundante en micelio multinucleado (Manteca, Sanchez, et al., 2010), y SCO2989 (solo detectada en día 3), sin datos en la bibliografía.

RESULTADOS: CAPÍTULO 1

Finalmente, la respuesta a metabolitos con actividad redox, como la ACT y sus precursores, era más baja en la cepa Δbfr . En esta respuesta interviene SoxR (SCO1697), que activa la expresión de 5 genes ante la presencia de ACT y sus derivados (Dela Cruz et al., 2010; Shin et al., 2011). Cuatro de las cinco proteínas codificadas por estos genes se detectaron con menor abundancia en Δbfr a día 3: EcaA (SCO7008), un transportador ABC; EcaB (SCO1909), una monooxigenasa que podría modificar la ACT; EcaD (SCO4266), una quinona reductasa dependiente de NADPH y activada por la proteína reguladora ActVI-ORFA (detectada en menor cantidad en Δbfr respecto a la cepa silvestre, como se describe en el apartado R.4.2.1) (C. Li et al., 2021); y SCO2478, una flavín reductasa dependiente de NADPH (Figura R.1.27 B).

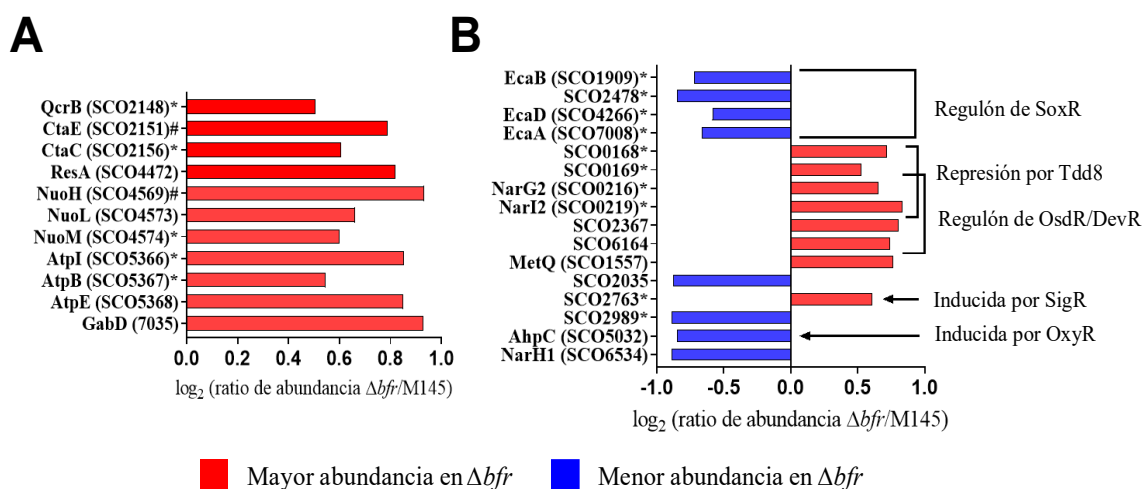


Figura R.1.27. Proteínas con abundancia diferencial relacionadas con oxidación. Las proteínas marcadas con un asterisco (*) solo se detectaron en el día 3, y las marcadas con almohadilla (#), en el día 4. **A.** Proteínas de respiración. **B.** Proteínas de estrés oxidativo.

R.1.4.4 – Proteínas de la envuelta celular y transportadores

Varias proteínas de membrana cambiaron su patrón de abundancia entre las dos cepas comparadas. Muchas de ellas poseen una función de transportador hipotética, mientras que algunas han sido descritas experimentalmente. Entre ellas, se encontraron SCO1655 (más abundante en Δbfr), un transportador de oligopéptidos (F. Li et al., 2014), y KdpB (SCO3717, también más abundante en el mutante), una subunidad de un transportador de potasio (Alonso-Fernández et al., 2022). En el día 3 se detectó también, en este caso en menor abundancia en Δbfr , el transportador hipotético de metales y sideróforos SCO0996 (Dulermo et al., 2023).

Varias proteínas de membrana están relacionadas con el estrés de la envuelta celular. Este estrés está regulado por el factor sigma de función extracitoplasmática (ECF) SigE. Tres proteínas cuyos genes están regulados por este factor presentaron mayor abundancia en Δbfr : SCO4134, una posible oxidorreductasa similar a la 4-cresol deshidrogenasa de *Pseudomonas putida*; SCO4471, una lipoproteína relacionada con estrés ante antibióticos y lisozima; y SCO5213 (solo detectada en el día

3), una metalopeptidasa (Tran et al., 2019). Otras dos proteínas relacionadas con estrés de membrana se detectaron, en este caso en menor abundancia, en Δbfr : SCO3110 (en el día 4) y SCO3111 (Figura R.1.28). Estas dos forman parte de un transportador ABC asociado al estrés producido por antibióticos dirigidos a la pared celular (Hesketh et al., 2011).

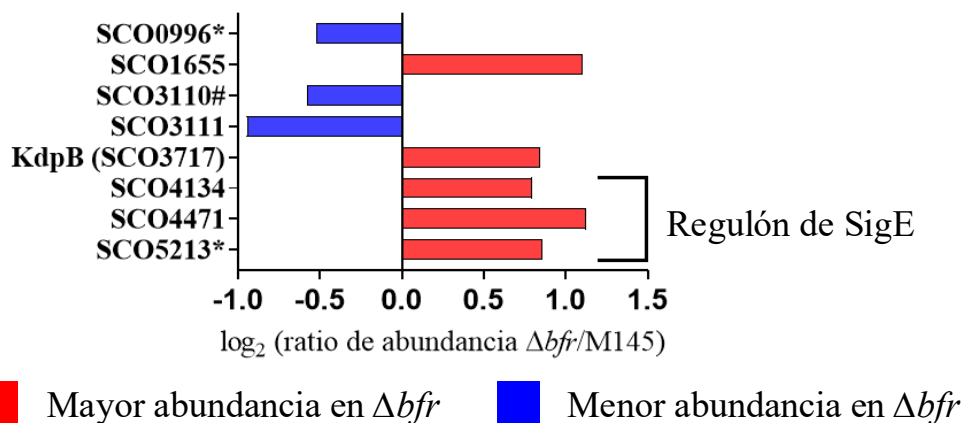


Figura R.1.28. Proteínas con abundancia diferencial relacionadas con transporte de moléculas y estrés de la envuelta celular. Las proteínas marcadas con un asterisco (*) solo se detectaron en el día 3.

R.1.4.5 – Proteínas de estrés osmótico

Respecto al estrés osmótico, el factor encargado de su control en *S. coelicolor* es SigB (Cho et al., 2001). SigB no se detectó en el estudio proteómico, pero sí se detectaron proteínas reguladas por SigB o relacionadas. El factor anti-sigma de SigB, RsbA (SCO0599), encargado de liberar a SigB durante condiciones de estrés (Kormanec et al., 2016), poseía menor abundancia en el mutante Δbfr . Esto, sin embargo, no se correspondía con una mayor actividad general de proteínas activadas por SigB: algunas proteínas del regulón de este factor estaban más representadas en la cepa Δbfr , como SCO3343, una proteína con dominio GsmA de maduración de paredes celulares en esporas (Cho et al., 2001), y SCO6014 (detectada solo en el día 3), un posible transportador de aminoácidos (Sevcikova et al., 2021); mientras que otras proteínas presentaban menor abundancia en el mutante, como la posible proteína reguladora de la familia cistationina beta-sintasa SCO5207 (Cho et al., 2001).

Como se comentó en el apartado “R.4.1”, se observó la menor representación en el mutante de EctC (SCO1866), necesaria para la síntesis de ectoína en estrés osmótico (Kol et al., 2010). Otras proteínas implicadas en estrés osmótico y también con menor abundancia en Δbfr fueron la proteína de la familia de las ferritinas DpsA (SCO0596), también implicada en diferenciación (Facey et al., 2009, 2011), y SmpA (SCO2529) (Figura R.1.29), una metaloproteasa que activa a la catalasa CatB en diferenciación y protección frente a estrés (H.-S. Kim et al., 2013).

RESULTADOS: CAPÍTULO 1

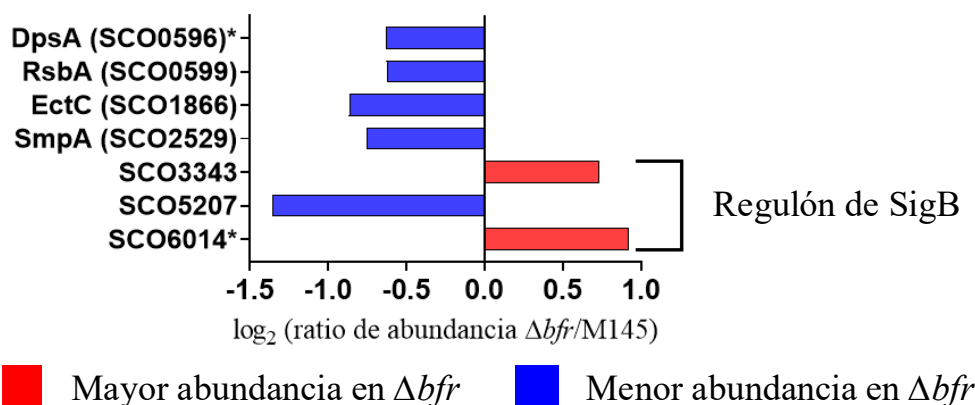


Figura R.1.29. Proteínas con abundancia diferencial de estrés osmótico. Las proteínas marcadas con un asterisco (*) solo se detectaron en el día 3.

R.1.4.6 – Proteínas de desarrollo (diferenciación, esporulación y germinación)

Además del fenotipo de menor producción de antibióticos pigmentados en LB, en el mutante Δbfr llama la atención el retraso en la diferenciación (Figura R.1.1). Esto se correspondía con una bajada general de la cantidad de proteínas implicadas en el desarrollo de *S. coelicolor* en la cepa Δbfr respecto a la cepa silvestre (Figura R.1.30).

Entre las proteínas con una menor expresión en Δbfr en ambos días de estudio, se encontraron las siguientes:

- DpsA (SCO0596, detectada en el día 3) está implicada en la condensación de los nucleoides durante la esporulación (Facey et al., 2009).
- SCO1756 es una proteína no caracterizada y posiblemente implicada en la diferenciación al aumentar sus niveles en el micelio multinucleado que forma las hifas aéreas (Yagüe et al., 2013).
- RpfC (SCO3098) es una proteína de la familia de promotores de resurrección (Rpf) que rompe la pared celular en germinación (Sexton et al., 2015).
- BldN (SCO3323) es un factor sigma de tipo ECF que controla la expresión de chaplinas y rodlinas (Bibb et al., 2012; Den Hengst et al., 2010) y cuya producción es inducida por hierro (Traxler et al., 2012).
- BldM/WhiK (SCO4768, detectado en el día 3) es activado por BldN para formar micelio aéreo (Den Hengst et al., 2010; Elliot et al., 2001).
- BdtA (SCO3328, detectado en el día 4) es un factor de transcripción que parece estar involucrado en diferenciación (Elliot et al., 2001).
- SCO4920 es homólogo a SdrA de *S. avermitilis*, implicado en esporulación (Ulanova et al., 2013).

- BldB (SCO5723, detectado en el día 4) regula la esporulación (Eccleston et al., 2006).
- WhiH (SCO5819) es un factor de transcripción necesario para la la septación del micelio aéreo durante el proceso de formación de esporas (Persson et al., 2013).
- EshB (SCO5249) es una proteína de unión a nucleótidos cíclicos necesaria para la esporulación (Tian et al., 2007).
- SCO5029 es una proteína relacionada con las proteínas Rpf (Haiser et al., 2009; Sexton et al., 2015).
- FilP (SCO5396, detectada en el día 3) es una proteína de citoesqueleto que interviene en el crecimiento (Bagchi et al., 2008).

Entre las proteínas reguladoras de la expresión génica con menores niveles en Δbfr también se encuentran algunas que inhiben la diferenciación, como RsbN (SCO3324), el factor anti-sigma de BldN (Bibb et al., 2012); RsfA (SCO4677), un factor anti-sigma que inhibe a SigF, necesario para esporular (E. S. Kim et al., 2008), y a BldG, un factor anti-anti sigma que controla la activación de SigH en estrés osmótico (Mingyar et al., 2014); y CabC (SCO7647), una proteína de unión a calcio cuya bajada de niveles en la célula se ha asociado con menor diferenciación (S.-L. Wang et al., 2008).

Tan solo una proteína relacionada con estos procesos, detectada en el día 4, tuvo mayor abundancia en la cepa Δbfr : Cis1 (SCO4242) (Figura R.1.30). Esta proteína interviene en la PCD durante el desarrollo (Vladimirov et al., 2023).

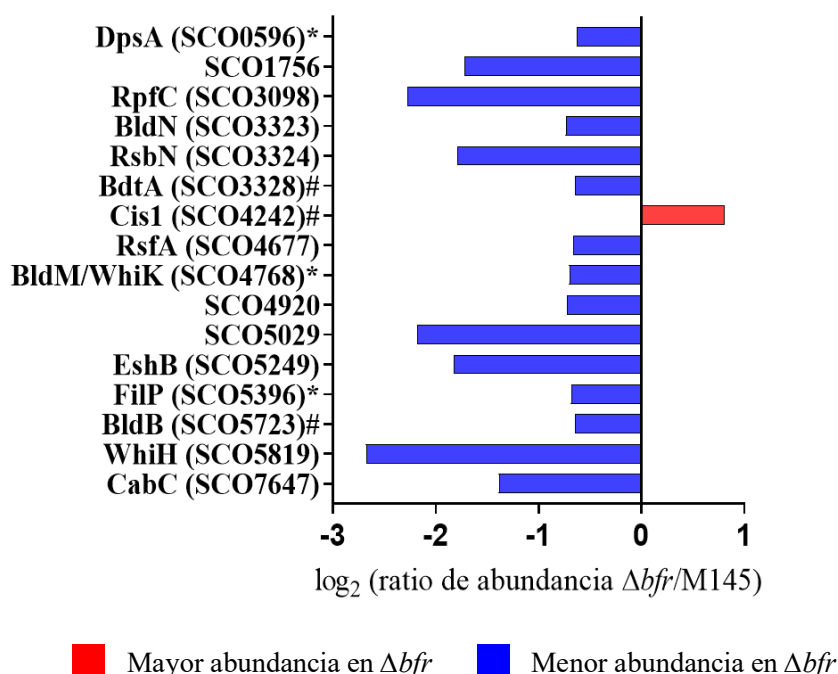


Figura R.1.30. Proteínas con abundancia diferencial implicadas en germinación, crecimiento, diferenciación y esporulación. Las proteínas marcadas con un asterisco (*) solo se detectaron en el día 3, y las marcadas con almohadilla (#), en el día 4.

RESULTADOS: CAPÍTULO 1

R.1.4.7 – Proteínas de metabolismo primario

Varias proteínas relacionadas con el **metabolismo de glúcidos**, no implicadas en glucólisis o ciclo de Krebs, se detectaron con mayor abundancia en el mutante Δbfr . Se detectaron dos proteínas de transporte de azúcares: XylF (SCO6009), para el transporte de xilosa (Swiatek et al., 2013), y BxlE1 (SCO7028), para xilobiosa (A. Saito et al., 2008). También se encontraron dos enzimas: CsnB (SCO2024), una quitosana (Viens et al., 2015), y DagB (SCO3487, solo detectada en el día 3), una agarasa (Temuujin et al., 2012).

En cuanto al **metabolismo de lípidos**, un componente esencial de la acetil-CoA carboxilasa implicada en la síntesis de ácidos grasos, AccB (SCO5535) (Diacovich et al., 2002), presentó menores niveles en Δbfr respecto a la cepa silvestre. En la síntesis de ácidos grasos también interviene FabH (SCO2388) (Revill et al., 2001), detectada en el día 4 con menor abundancia en Δbfr . Por otro lado, dos proteínas relacionadas con el metabolismo del colesterol presentaron mayor abundancia en Δbfr : SCO4781 (detectada en el día 4) es homóloga a la colesterol oxidasa ChoD de *M. tuberculosis* (Brzostek et al., 2013) y SCO5420 es una colesterol esterasa hipotética, capaz de degradar detergentes para su uso como fuente de carbono (Schniete et al., 2020).

Por último, respecto al **metabolismo de aminoácidos**, SerA (SCO5515, detectada en el día 3), de la síntesis de serina (Tiffert et al., 2011), y ArgG (SCO7036), de la síntesis de arginina (Pérez-Redondo et al., 2012), poseían menor abundancia en Δbfr respecto a la cepa silvestre (Figura R.1.31).

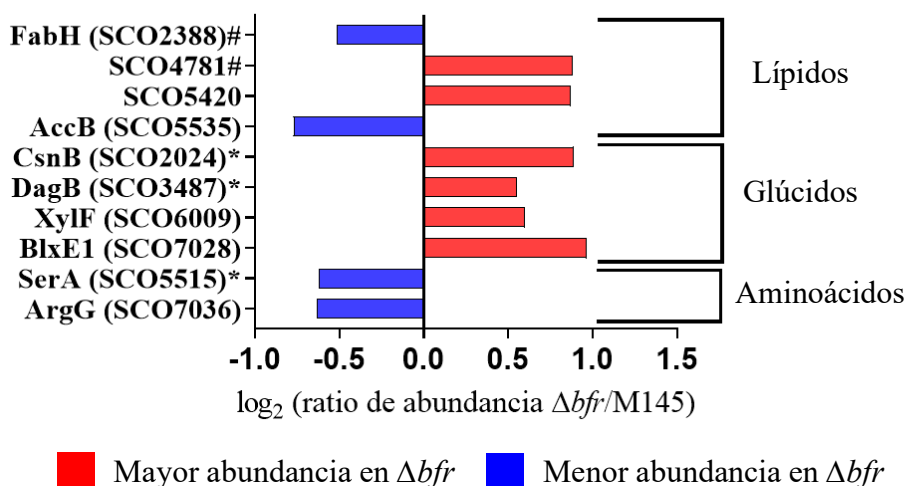


Figura R.1.31. Proteínas con abundancia diferencial relacionadas con metabolismo primario. Las proteínas marcadas con un asterisco (*) solo se detectaron en el día 3, y las marcadas con almohadilla (#), en el día 4.

R.1.4.8 – Proteínas ribosómicas y relacionadas con procesos en el ADN

Los resultados de proteómica sugieren que el mutante Δbfr posee menor eficiencia en la traducción del ARN al detectar ocho proteínas del ribosoma, tanto de la subunidad 30 S como de la subunidad 50 S, con menor abundancia en el mutante (Figura R.1.32).

Entre las proteínas detectadas y relacionadas con el ADN se identificó AdnA (SCO5183), la proteína con mayor abundancia relativa en Δbfr respecto al silvestre. AdnA está implicada en la recombinación del ADN (L. Zhang et al., 2014). Otra proteína más abundante en el mutante fue SCO3619, que pertenece a la familia YbaB/EbfC de proteínas asociadas al nucleóide y con posible papel en la reparación del ADN. También se detectó, en el día 3, LexA (SCO5803), que reprime la respuesta SOS en condiciones normales (Fornelos et al., 2016), con menor abundancia en el mutante (Figura R.1.32).

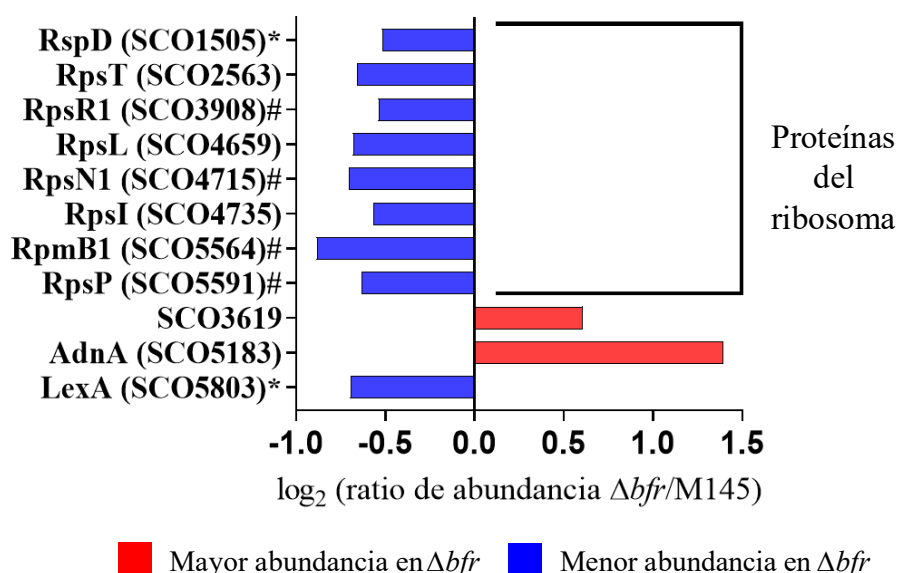


Figura R.1.32. Proteínas con abundancia diferencial relacionadas con metabolismo de ácidos nucleicos. Las proteínas marcadas con un asterisco (*) solo se detectaron en el día 3, y las marcadas con almohadilla (#), en el día 4.

R.1.4.9 – Otras proteínas

En este último apartado se engloban algunas proteínas hipotéticas o poco caracterizadas. Si bien la falta de datos en bibliografía no aporta ninguna explicación al fenotipo de la cepa Δbfr , estas proteínas poseen los niveles más altos o bajos de abundancia relativa, lo que podría indicar un papel importante relacionado con *bfr*.

Entre las proteínas con muy bajos niveles en Δbfr respecto al silvestre, se encontraron: CabE (SCO0141, la proteína con la menor abundancia relativa Δbfr /M145 de todas las proteínas detectadas), una proteína de unión a calcio (S.-L. Wang et al., 2008); SCO4796, de la familia de endopeptidasas/amidasas NlpC/P60 (Haiser et al., 2009); SCO5176, una posible reductasa

RESULTADOS: CAPÍTULO 1

dependiente de NADH; y SCO7573, una proteína con dominio de transporte de sulfato y antagonista de factores anti-sigma (STAS).

Respecto a las proteínas con muy altos niveles de abundancia en Δbfr , destacan SCO4255, que contiene un dominio DUF4157; SCO7436, una hipotética benzaldehído deshidrogenasa dependiente de NAD; y SCO7442 (Figura R.1.33), una proteína de conjugación hipotética que es más abundante en cultivos líquidos (Yagüe et al., 2014).

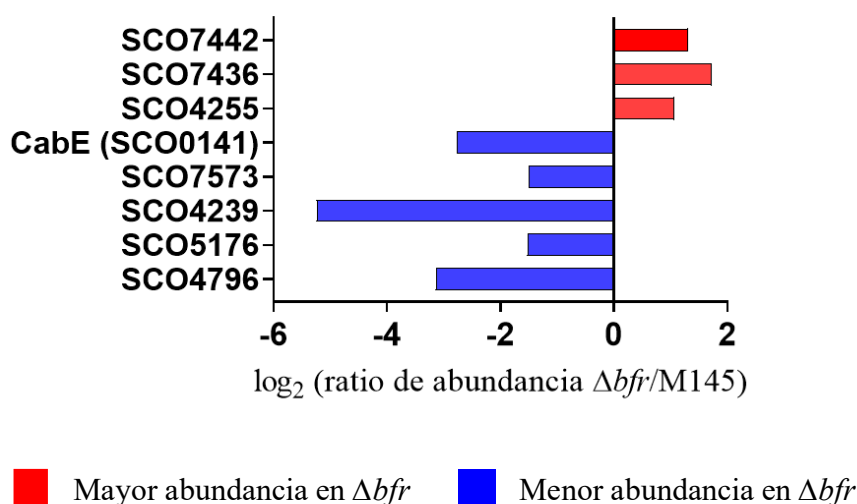


Figura R.1.33. Proteínas con abundancia diferencial de función hipotética.

R.1.4.10 – Resumen de los resultados de proteómica

Toda la información escrita en el apartado R.4 demuestra que el gen *bfr* es importante para el correcto desarrollo de *S. coelicolor* y que su ausencia genera cambios notables en el proteoma. En cuanto a procesos celulares, se ve una bajada general, en la cepa Δbfr , en proteínas de diferenciación y traducción, mientras que hay una subida en proteínas implicadas en estrés oxidativo y respiración. Las proteínas detectadas que regulan el metabolismo secundario no siguen un mismo patrón, pero la presencia de varias de ellas, algunas poco caracterizadas como los conservones, afirman la relación de *bfr* con la producción de antibióticos. Estos datos, además, han demostrado la mayor producción de CDA y la menor producción de coelimicinas y otros metabolitos secundarios (según la menor cantidad de sus proteínas biosintéticas), además del efecto ya observado en la ACT y la RED.

Estos resultados se profundizarán en la “Discusión”.

R.1.5 – Estudio de la producción de sideróforos

El estudio de la relación del hierro y *Streptomyces* suscitó también el interés por el estudio de los sideróforos, que poseen un papel positivo en el desarrollo en *S. coelicolor* (Lambert et al., 2014;

Tierrafría et al., 2011) y en otros *Streptomyces* se ha hipotetizado la posible función de sideróforos en procesos celulares más allá de la toma de hierro (Ni et al., 2023). Para observar la producción de sideróforos, se adaptaron ensayos con medio CAS (Alexander & Zuberer, 1991).

Si bien este capítulo, y el estudio de la relación entre el hierro y la producción de antibióticos, se ha centrado en el mutante Δbfr , en estos experimentos se incluyeron también los mutantes en los TCS previamente estudiados, cuyos análisis transcriptómicos dieron pistas de la implicación del gen *bfr* en la producción de antibióticos. Los mutantes incluidos fueron $\Delta abrA$, $\Delta abrC$ y $\Delta aorI$. En estos mutantes, la expresión del gen *bfr* baja en $\Delta abrA$ y $\Delta abrC$, mientras que sube en $\Delta aorI$. Los ensayos de RNA-Seq de los 3 mutantes, sin embargo, no son directamente comparables por haberse realizado en distintos medios de cultivo (esos medios se seleccionaron atendiendo al mayor fenotipo de cada mutante): NMMP para $\Delta abrA$ (Antoraz Martín, 2018), AN Scharlau para $\Delta abrC$ (Rico, Santamaría, et al., 2014) y LB para $\Delta aorI$ (Antoraz et al., 2017). Por ello, para comparar la producción de sideróforos por Δbfr y la de estos mutantes en las condiciones de los RNA-Seq previamente realizados, se realizaron los ensayos en los medios mencionados. En todos los casos, cada mutante se comparó con la cepa M145.

Se probaron dos métodos, que dieron el mismo resultado: placas con medio CAS (Ortúzar et al., 2020) a las que se les colocan en la superficie membranas de celofán con las gotas de micelio previamente crecidas (Lambert et al., 2014) en el medio de interés, y CAS en cobertera sobre gotas en el medio de interés (Pérez-Miranda et al., 2007). Si bien el método de cobertera es más cómodo, en algunos casos, como ocurre con el medio LB, el CAS en cobertera no produjo halos vistosos.

En experimentos previos, el mutante $\Delta abrA$ se había crecido en NMMP con concentración de hierro estándar, 4 μ M. Como el sistema AbrA responde a hierro (Rico, Yepes, et al., 2014), para este ensayo se probaron, además, las otras dos concentraciones, 10 nM y 2 mM. Mientras que $\Delta abrA$ no mostró diferencias significativas en la producción de sideróforos respecto al silvestre en NMMP con 10 nM de hierro, el mutante Δbfr produjo mayor cantidad respecto al silvestre (Figura R.1.34 A). En NMMP con 4 μ M, $\Delta abrA$ produce más sideróforos que el silvestre en los días 1 y 2 del ensayo (Figura R.1.34 B), lo cual concuerda con la mayor expresión de genes de biosíntesis de sideróforos (Antoraz Martín, 2018). Como el gen *bfr* posee menor expresión en el mutante $\Delta abrA$, se esperaba un resultado similar en cuanto a la producción de sideróforos (de aumento de su producción) en el mutante Δbfr crecido en NMMP con 4 μ M de hierro; no obstante, este mutante produjo menos sideróforos que la cepa silvestre en los dos primeros días de estudio (Figura R.1.34 B). En NMMP con 2 mM, tanto $\Delta abrA$ como Δbfr también producían menos sideróforos que la cepa silvestre, con diferencias significativas en el último día de estudio (día 3) (Figura R.1.34 C).

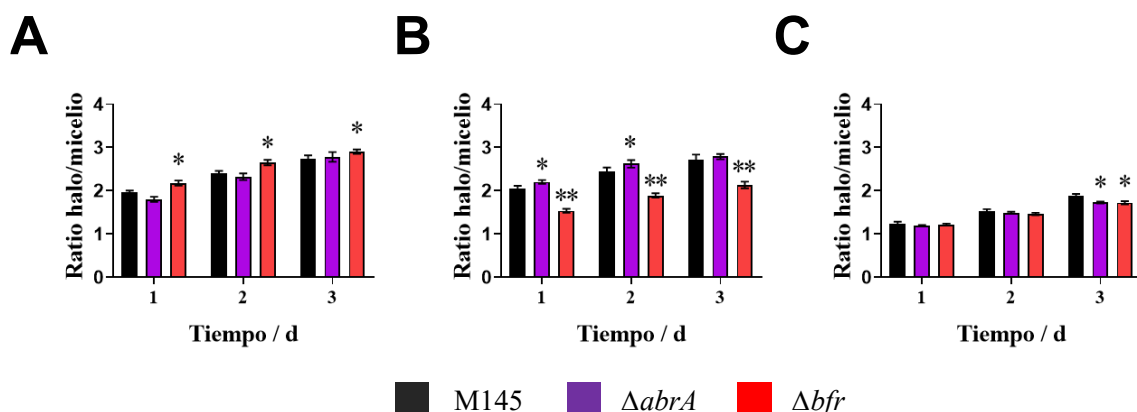


Figura R.1.34. Producción de sideróforos en $\Delta abrA$ y Δbfr . Comparación de la producción de sideróforos de los mutantes $\Delta abrA$ (en morado) y Δbfr (en rojo) con la cepa silvestre M145 (en negro) en NMMP. Un asterisco (*) indica un p-valor menor a 0,05 respecto a la cepa silvestre; y dos asteriscos (**), menor a 0,01. A. Producción con 10 nM de hierro. B. Producción con 4 μ M de hierro. C. Producción con 2 mM de hierro.

El RR AbrC3 controla directamente la expresión de *bfr* (Rico, Santamaría, et al., 2014). En medio AN, tanto $\Delta abrC$ como Δbfr produjeron más sideróforos que la cepa silvestre en los días 1 y 2 de estudio, mientras que la producción de Δbfr fue algo menor respecto al silvestre en el día 3 (Figura R.1.35 A). Si bien AbrC3 regula más elementos, este resultado indica que, en medio AN, la bacterioferritina activada por AbrC3 afecta negativamente a la producción de sideróforos.

La última comparación realizada fue entre $\Delta aor1$ y Δbfr en medio LB. El mutante Δbfr produce menos sideróforos que el silvestre, mientras que $\Delta aor1$ produce más (Figura R.1.35 B). En este medio, hay una mayor expresión del gen *bfr* en $\Delta aor1$ (Antoraz et al., 2017), y la tendencia en la producción de sideróforos en $\Delta aor1$ y Δbfr parece indicar que Bfr, en LB, afecta positivamente a esta producción, entre otros tantos genes que podrían afectar en el mutante $\Delta aor1$.

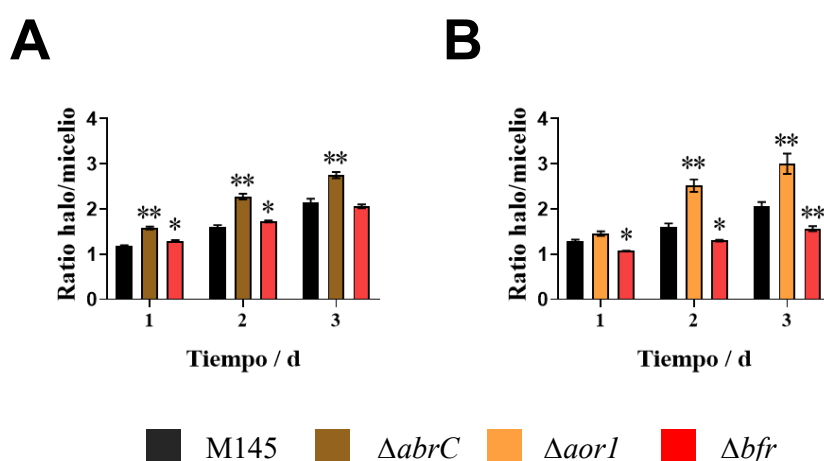


Figura R.1.35. Producción de sideróforos en $\Delta abrC$, $\Delta aor1$ y Δbfr . Comparación de la producción de sideróforos entre el mutante Δbfr (en rojo) y los mutantes $\Delta abrC$ (en marrón) y $\Delta aor1$ (en naranja), en las condiciones de los experimentos de transcriptómica realizados anteriormente. En todos los casos se compara la producción con la cepa silvestre M145 (en negro). Un asterisco (*) indica un p-valor menor a 0,05; y dos asteriscos (**), menor a 0,01. A. Producción de sideróforos en Δbfr y $\Delta abrC$ en AN Scharlau. B. Producción de sideróforos en Δbfr y $\Delta aor1$ en medio LB.

Como se puede observar, la producción de sideróforos varía en cada medio de cultivo y *bfr* afecta a esta producción, aunque en los datos de proteómica no se hayan detectado proteínas relacionadas con hierro y sideróforos (solo algunas como SCO0996, BldN o DpsA). En $\Delta abrC$ y $\Delta aorI$, la alteración en la producción de sideróforos podría deberse, al menos parcialmente, a la alteración en la expresión de *bfr*, mientras que en $\Delta abrA$ el efecto podría ser por la acción directa de este sistema de regulación.

R.1.6 – Estudio del gen *bfd* mediante CRISPR de interferencia

En otros organismos, como *P. aeruginosa*, el gen de la bacterioferritina se encuentra adyacente a un gen que codifica una ferredoxina asociada a bacterioferritina (*bfd*) y se ha descrito que esta ferredoxina ayuda a liberar el hierro contenido en la bacterioferritina cuando es necesario (Behm et al., 2025; Expert et al., 2008). En el caso de *S. coelicolor* el gen *SCO2114*, adyacente a *bfr/SCO2113*, codifica una hipotética ferredoxina.

Para estudiar este gen y comprobar si su función correspondía con la descrita en la bibliografía para otros microorganismos, se planteó, inicialmente, generar un mutante de delección con CRISPR-Cas9 y analizar su fenotipo; no obstante, el gen *bfd/SCO2114* es un gen muy pequeño (252 nt) y no se pudieron diseñar ARN guías específicos, con ningún o pocos *off-targets*, adecuados contra este gen mediante las herramientas disponibles para ello (Benchling y Cas-OFFinder). Por lo tanto, para abordar un estudio inicial de este gen, se aprovechó la estancia internacional en el laboratorio del Prof. Dr. Gilles P. van Wezel, en el Instituto de Biología de la Universidad de Leiden, para inhibir el gen de interés con la tecnología CUBIC, mediante un CRISPRi (de interferencia) utilizando una Cas9 inactiva (dCas9) (Bai & van Wezel, 2023).

Si bien las herramientas usadas para CRISPR-Cas9 convencional no permitieron encontrar una guía específica con pocos *off-targets*, sí se pudo diseñar un espaciador específico para *bfd* y, a partir del plásmido pCB-1, se construyó el plásmido de interferencia pCB-bfd, como se detalla en el apartado “M.5.3.6” de “Materiales y métodos”. Con presencia de cumato en el medio, este plásmido permite la producción de la proteína dCas9 y la expresión del espaciador específico de *bfd*. De este modo el espaciador dirige la unión de dCas9 al gen *bfd*, e inhibe su expresión sin cortarlo.

El plásmido pCB-bfd se conjugó con las dos cepas principales estudiadas en este capítulo: la cepa silvestre M145 y el mutante Δbfr . De esta forma, se podría valorar el efecto de la inhibición de *bfd* en *S. coelicolor* silvestre, simulando un mutante de delección en *bfd*, y en el mutante Δbfr , lo cual simularía un doble mutante en *bfr* y *bfd*.

RESULTADOS: CAPÍTULO 1

La inhibición se analizó con dos concentraciones de cumato, 20 y 100 μM , en gotas de esporas en distintos medios de cultivo: LB, R2YE, YEPD y NMMP estándar (4 μM de hierro). Estos resultados fenotípicos se observan en la Figura R.1.36.

En medio LB, la inhibición de la expresión de *bfd* retrasa, pero no compromete totalmente, la diferenciación del micelio aéreo de la cepa silvestre (menor aparición de micelio aéreo) y retrasa la esporulación (no se ve pigmentación gris). En la cepa Δbfr no hay un fenotipo aparente adicional de la inhibición del gen *bfd* (Figura R.1.36 A).

En medio R2YE el fenotipo con cumato y sin cumato (controles) no se diferencia mucho: la cepa silvestre forma micelio aéreo blanco alrededor del micelio cuando se inhibe *bfd*, mientras que el mutante Δbfr produce micelio más oscuro (Figura R.1.36 B).

En YEPD, el fenotipo es similar: la producción de RED (naranja-rojo) en el silvestre se inhibe cuanto más cumato hay en el medio (cuanto más se inhibe *bfd*). Las colonias de Δbfr se mantienen siempre iguales, con micelio vegetativo amarillo y rugosidades (Figura R.1.36 C).

Por último, en NMMP, la inhibición de *bfd* impide la síntesis de ACT (halos oscuros y tonalidad morada en el micelio) en la cepa silvestre, y en el mutante Δbfr impide la diferenciación del micelio aéreo blanco-gris en el centro (Figura R.1.36 D).

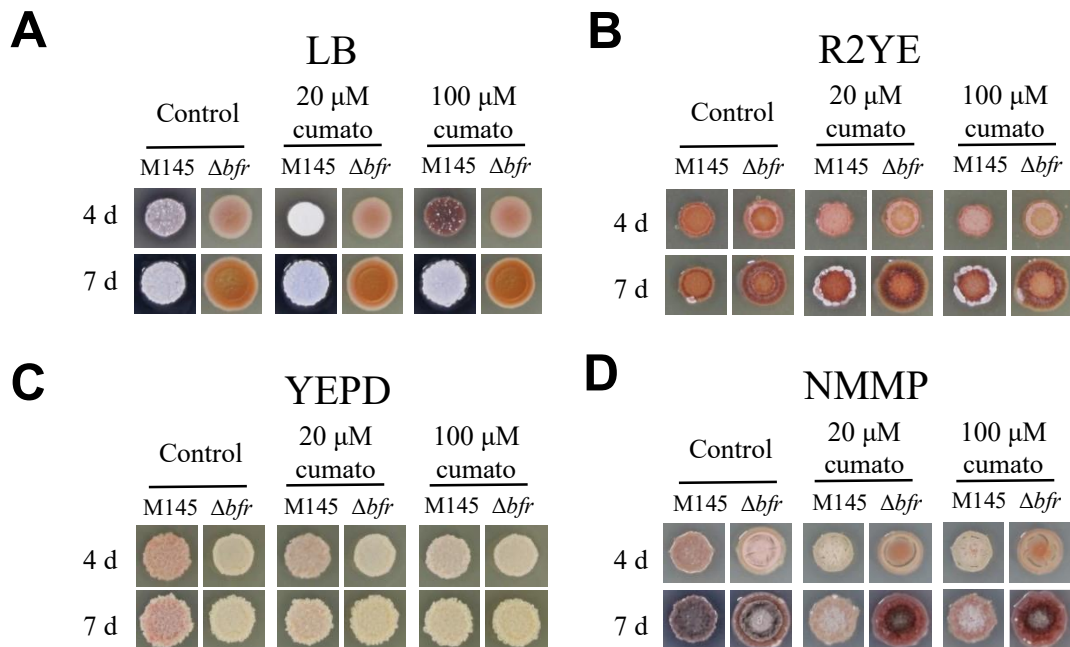


Figura R.1.36. CRISPRi para inhibir *bfd*. Ensayo de inhibición del gen *bfd* mediante la adición de cumato (20 y 100 μM) a las cepas M145 y Δbfr con el plásmido pCB-bfd. **A.** Medio LB. **B.** Medio R2YE. **C.** Medio YEPD. **D.** Medio NMMP.

Estos resultados indican que *bfd* afecta levemente a la diferenciación y la producción de antibióticos en algunos medios de cultivo en la cepa silvestre. El fenotipo de la inhibición de *bfd* es menos drástico

que el de la falta de *bfr*, y la inhibición de *bfd* en el mutante Δbfr no tiene ningún efecto aditivo ni perjudica la viabilidad de la cepa.

R.1.7 – Conclusiones del capítulo

Todos los resultados de este bloque confirman la implicación de *bfr* en el metabolismo secundario y la diferenciación de *S. coelicolor*. De manera general, el mutante Δbfr tiene un retraso en diferenciación y producción de antibióticos. En este fenotipo el estrés oxidativo tiene un papel importante. La proteómica muestra que varias proteínas implicadas en distintos procesos celulares están afectadas en el mutante.

En el apartado de “Discusión de resultados” se profundizará en el modelo propuesto para el papel de la bacterioferritina acorde a los resultados experimentales.

R.1.8 – Publicaciones científicas

Parte de los resultados de este capítulo de tesis se publicaron en la revista *Microbial Cell Factories* (índice de impacto 4,9 en 2024). Se incluye a continuación la información del artículo publicado y un código QR para un acceso directo a la publicación:

García-Martín, J., García-Abad, L., Santamaría, R.I. & Díaz, M. “Functional connexion of bacterioferritin in antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*”. *Microb Cell Fact* **23**, 234 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02510-1>

Research | [Open access](#) | Published: 24 August 2024

Functional connexion of bacterioferritin in antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*

Javier García-Martín, Laura García-Abad, Ramón I. Santamaría  & Margarita Díaz 

Microbial Cell Factories **23**, Article number: 234 (2024) | [Cite this article](#)



Capítulo 2: histidina quinasas asociadas

al regulador huérfano Aor1

La delección del gen *aor1/SCO2281* en *S. coelicolor* reduce drásticamente la producción de antibióticos y cambia la expresión de, aproximadamente, la mitad de sus genes (Antoraz Martín, 2018; Antoraz et al., 2017). A diferencia de los genes de TCS convencionales, el gen que codifica el RR Aor1 no va acompañado en el genoma de un gen codificante de HK, que sería la encargada de detectar una señal específica y activar el regulador. Por lo tanto, se trata de un RR huérfano del que se desconoce la quinasa o quinasas que lo regulan.

Dado el gran impacto que la delección de *aor1* tiene en la producción de antibióticos, este capítulo de la tesis se centró en la búsqueda de las HK que podrían estar asociadas con Aor1 y su estudio inicial.

R.2.1 – Identificación de las HK asociadas a Aor1

R.2.1.1 – Selección de HK candidatas

Previamente en el laboratorio, se había utilizado la herramienta web Prediction of Interaction Specificity in Two-component Systems para predecir qué HK podrían estar interaccionando con Aor1 (<https://www.swissregulon.unibas.ch/cgi-bin/TCS.pl>) (Burger & Van Nimwegen, 2008). Esta herramienta en línea identificó cinco posibles HK, siendo SCO3750 la que poseía mayor probabilidad de interacción (67 % de probabilidad) (Tabla R.2.1). La segunda HK identificada era SCO6424, con una probabilidad unas 3 veces menor (19 %). Otras HK con una menor probabilidad fueron SCO0211 (6 %), que forma parte del regulón de OsdR/DevS (Urem, van Rossum, et al., 2016), y las HK del sistema AbrC, AbrC1/SCO4598 (5 %) y AbrC2/SCO4597 (2 %) (Tabla R.2.1) (Rico, Santamaría, et al., 2014).

Tabla R.2.1. Predicción de HK asociadas a Aor1. Resultado de la herramienta Prediction of Interaction Specificity in Two-component Systems. Acceso el 19 de diciembre de 2025.

HK	Probabilidad de interacción con Aor1
SCO3750	0,66729485
SCO6424	0,192854545
SCO0211	0,0617260435
AbrC1/SCO4598	0,052660324
AbrC2/SCO4597	0,0254642485

Esta predicción sirvió como punto de partida para enfocar el estudio en los dos genes con mayor probabilidad, *SCO3750* y *SCO6424*. Aun así, se amplió el análisis de la posible asociación de *aor1* con otras HK adicionales, en este caso seleccionadas mediante dos aproximaciones diferentes.

La primera aproximación y más directa fue el uso de la base de datos STRING (Szklarczyk et al., 2023), que determina interacciones entre genes/proteínas basándose en datos experimentales, de coexpresión, homologías, etc., existentes en la literatura. Esta herramienta identificó una relación de *aor1* con los genes adyacentes, *SCO2280* (codifica un regulador de la familia TetR) y *SCO2282* (codifica una proteína hipotética), que se transcriben con *aor1* como un operón (Antoraz et al., 2017). Los otros genes/proteínas detectados/as fueron HK, algunas ya previamente identificadas por la herramienta de predicción anterior: *SCO3750*, *SCO6424*, *AbrC1* y *AbrC2*. Sin embargo, aparecieron otras nuevas HK susceptibles de estudio: *SCO1744/AbrA1*, *SCO2215*, *SCO2359* y *SCO4667* (Figura R.2.1).

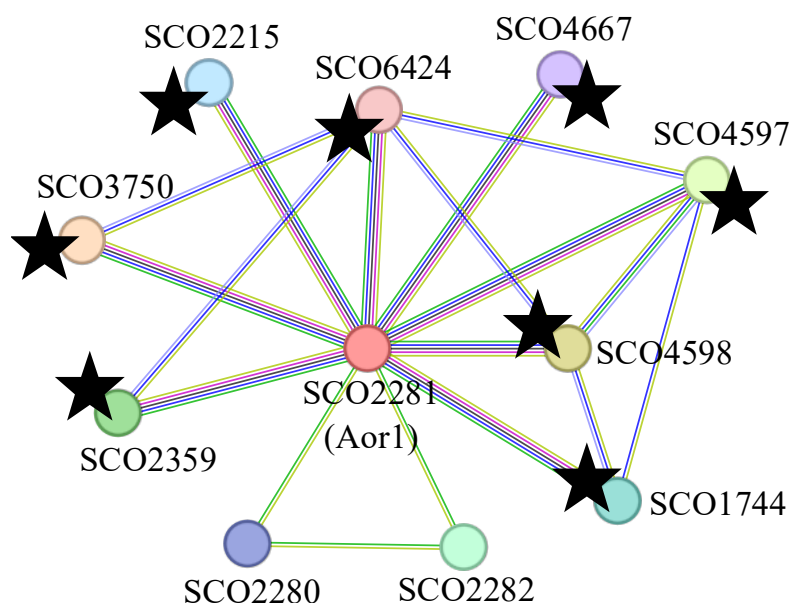


Figura R.2.1. Predicción de STRING. Red de interacciones experimentales y predichas de Aor1 y otras proteínas en *S. coelicolor* realizada por STRING. Los nodos acompañados de una estrella indican que esa proteína es una HK.

La segunda aproximación surgió a partir de la pregunta: ¿son los ortólogos al RR *aor1* también huérfanos en otros *Streptomyces* o están acompañados de una HK? Para responder a esta pregunta, se consultó la homología de la proteína Aor1 en el NCBI mediante un BLAST. Se comprobó manualmente, a través del navegador genómico del NCBI, si había presencia o no de un gen de HK adyacente al gen ortólogo de *aor1*. Se estudiaron 22 *Streptomyces* con género y especie identificados (Tabla R.2.2): 19 de ellos identificados mediante los alineamientos en el NCBI, y se añadieron las dos especies, además de *S. coelicolor*, incluidas en la base de datos StrepDB: *S. lividans* y *S. venezuelae*. En la Tabla R.2.2 se listan los *Streptomyces* incluidos en este análisis, con la presencia o ausencia de un gen de HK al lado del gen del ortólogo de *aor1*.

RESULTADOS: CAPÍTULO 2

Tabla R.2.2. Cepas de *Streptomyces* utilizadas para el análisis bioinformático de Aor1.

Cepa	Accession Number GenBank	Presencia de un gen de HK adyacente al gen ortólogo de Aor1
<i>S. coelicoflavus</i> NBC 00357	CP107977.1	No
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	CP042324.1	No
<i>S. hyderabadensis</i> JCM 17657	GCA_020404845.1	No
<i>S. lienomycini</i> DSM 41475	CP116257	No
<i>S. lividans</i> TK24	CP009124.1	No
<i>S. rubrogriseus</i> NBRC 15455	GCF_003112595.1	No
<i>S. tendae</i> 139	CP043959.1	No
<i>S. violaceorubridus</i> NRRL B-16381	GCA_000717995.1	No
<i>S. acidicola</i> K1PN6	GCA_009377235.1	Sí
<i>S. albicerus</i> TRM68295	GCA_008905045.1	Sí
<i>S. asoensis</i> H2S5	CP049838.1	Sí
<i>S. auriantiacus</i> NRLL ISP-5412	GCA_001418335.1	Sí
<i>S. avermitilis</i> MA-4680	BA000030.4	Sí
<i>S. camponoticapitis</i> 2H-TWYE14	GCA_014646115.1	Sí
<i>S. fuscichromogenes</i> CGMCC 4.7110	GCA_014645815.1	Sí
<i>S. humi</i> MUSC 119	GCA_001005085.2	Sí
<i>S. liliifuscus</i> ZYC-3	CP066831.1	Sí
<i>S. nigra</i> 452	CP029043.1	Sí
<i>S. nodosus</i> ZJB2016050	CP071465.1	Sí
<i>S. pseudovenezuelae</i> NBC 00598	CP107755.1	Sí
<i>S. toyocaensis</i> NRRL 15009	GCA_000725125.1	Sí
<i>S. umbrinus</i> CECT 3212	GCA_024648905.1	Sí
<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	CP029197.1	Sí

La atención se centró en aquellos *Streptomyces* cuyo ortólogo de *aor1* no es huérfano, es decir, tiene un gen de HK asociado que posiblemente regularía al ortólogo de *aor1*. De las 22 especies analizadas, se encontró una HK adyacente al gen ortólogo de *aor1* en 15 *Streptomyces* (Tabla R.2.2). Las secuencias proteínicas de estas HK se guardaron a partir del NCBI y se usaron como *queries* en la herramienta “BLAST Web Interface for *Actinomycetales* genome data” de la web Genome Project of *Streptomyces avermitilis* (http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/blast_local/index.html). De esta forma, estas HK, asociadas a un RR homólogo de *aor1*, se compararon con todas las proteínas de *S. coelicolor* y, así, se pudo estudiar qué HK de *S. coelicolor* se parecen a las asociadas a un gen “*aor1*” de otros *Streptomyces*.

En la Figura R.2.2 se representan los porcentajes de identidad del BLAST en el eje de abscisas y la significación estadística en el eje de ordenadas. La HK de *S. coelicolor* más parecida a las HK consultadas es SCO3750 (la que posee mayor probabilidad en la herramienta de predicción). Le siguen otras 5 HK ya identificadas en STRING: las dos HK del sistema AbrC (SCO4598/AbrC1 y SCO4597/AbrC2), SCO4667, SCO2215 y SCO2359. SCO2215 es también una HK que, en algunos alineamientos, mostraba muy alta significación estadística.

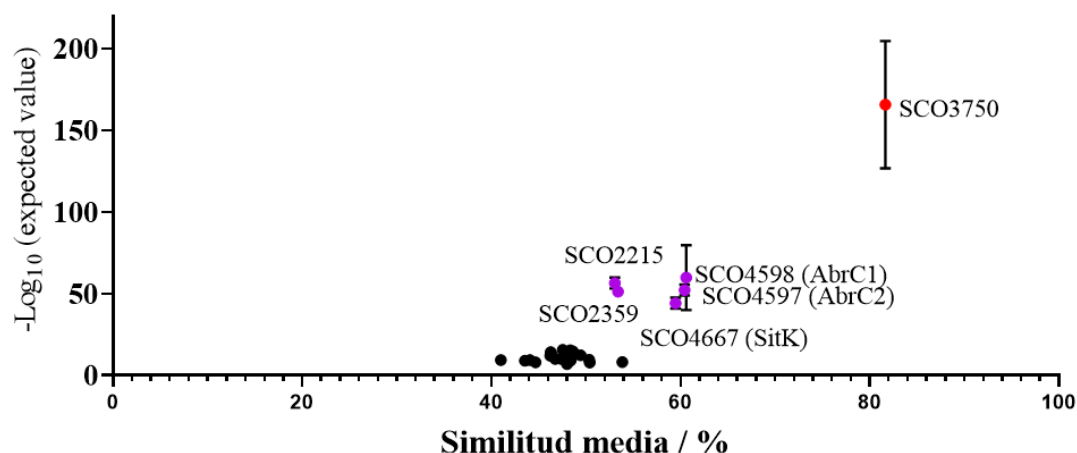


Figura R.2.2. Similitud de proteínas de *S. coelicolor* con las HK de otros *Streptomyces* asociadas a un ortólogo de Aor1. El eje de ordenadas representa la significación estadística. Cada punto representa una proteína y su barra de error representa la desviación estándar de la significación estadística en los distintos alineamientos. Los puntos siguen el código de colores de la herramienta BLAST utilizada: en rojo se muestra la proteína con mayor similitud (SCO3750), y en morado, las proteínas con significación alta. Realizado a partir de los datos de BLAST Web Interface for *Actinomycetales* genome data.

La hipótesis de partida para comprobar de forma experimental la conexión entre estas HK y *aor1* consistía en que, si una HK es capaz de activar a Aor1 en ciertas condiciones, el fenotipo del mutante $\Delta aor1$ y el mutante de delección en el gen de la HK correspondiente deberían ser iguales o muy similares en esas condiciones de cultivo. También se partió de la hipótesis de que más de una HK podría estar involucrada en la regulación de Aor1 y que cada una podría tener un papel en diferentes medios de cultivo.

La HK SitK/SCO4667 había sido estudiada con anterioridad y está implicada en inhibir la esporulación en condiciones de superenrollamiento del ADN, pero en las condiciones de cultivo estudiadas, sin problemas de superenrollamiento del ADN, la delección de *sitK* no producía ningún efecto (Gongerowska-Jac et al., 2021). Por ello, se descartó el estudio de esta HK en este trabajo.

El fenotipo de los mutantes de delección $\Delta abrC1$ y $\Delta abrC2$ fue descrito previamente en nuestro laboratorio: mientras que $\Delta abrC1$ produce mayor cantidad de antibióticos que la cepa silvestre, $\Delta abrC2$ y el mutante doble $\Delta abrC1/C2$ no presentan diferencias (Rodríguez et al., 2015). Estos fenotipos no se parecen al fenotipo del mutante $\Delta aor1$, como cabría esperar si estas HK fuesen activadoras del RR huérfano; aun así, se decidió ahondar en el estudio de estas HK, como se explicará posteriormente en este capítulo, mediante la sobreexpresión de *aor1* sobre las cepas con delecciones del sistema *abrC* (ver apartado “R.2.5”).

De este modo, aquellas HK con poca o nula información en bibliografía y susceptibles de estar implicadas en la regulación de Aor1 fueron seleccionadas para su estudio en esta tesis doctoral. El análisis de los genes que codifican las HK seleccionadas para su estudio mostró lo descrito a continuación. Los genes *SCO3750* (HK más probable asociada a *aor1*) y *SCO6424* (segunda HK

RESULTADOS: CAPÍTULO 2

según la herramienta de predicción) codifican HK huérfanas, lo cual las hace interesantes para fosforilar a un RR huérfano. Se ha descrito que la HK SCO6424 podría interactuar con otros TCS, como el RR GarR que actúa como regulador negativo de la producción de antibióticos (Cruz-Bautista et al., 2024). Los otros dos genes, *SCO2215* y *SCO2359*, forman parte de dos TCS canónicos: *SCO2215/SCO2216* y *SCO2359/SCO2358*, es decir, están acompañadas por un gen codificante de un RR (Sánchez de la Nieta et al., 2022). En bibliografía, el único dato encontrado relativo a estos genes corresponde a la HK *SCO2359*, cuya expresión aumenta ante un tratamiento con bacitracina (antibiótico que afecta a la pared celular) (Hesketh et al., 2011).

R.2.1.2 – Estudio filogenético de ortólogos de *aorI* y su HK asociada

Con todos los *Streptomyces* utilizados en los alineamientos, incluidos en la Tabla R.2.2, se realizó un estudio filogenético, basado en ADNr 16 S, para comprobar si la presencia o ausencia de una HK ortóloga a SCO3750 y adyacente a un ortólogo de *aorI* podía tener algún contexto evolutivo. Los programas y softwares utilizados se detallan en “Materiales y métodos”, apartado “M.14.2”.

La Figura R.2.3 muestra todo el estudio realizado a partir de los datos de ADNr 16 S del NCBI y Silva, los datos del navegador genómico del NCBI y StrepDB y las comparaciones de secuencias. No todos los *Streptomyces* cuyo *aorI* es huérfano (distancia menor a 1000 pb en la Figura) se agrupan en el árbol filogenético (flechas *aorI* en rojo en la Figura R.2.3) (*S. rubrogriseus* y *S. violaceorubidus* son las dos especies que se agrupan fuera del resto); pero todos ellos conservan el contexto genómico de *aorI* de *S. coelicolor*, con un gen de regulador TetR aguas abajo y una metiltransferasa RSM22 aguas arriba, y todos ellos tienen 95 % o más de similitud entre su ortólogo de AorI y la proteína de *S. coelicolor* (cifras al lado de las flechas rojas en la Figura R.2.3). Respecto a los *Streptomyces* cuyo gen ortólogo a *aorI* no conserva este contexto genómico, los ortólogos de AorI de *S. venezuelae* (58 % de similitud), *S. avermitilis* (60 % de similitud) y de *S. nodosus* (60 % de similitud) son los que más difieren de la proteína de *S. coelicolor*, el resto de las especies tienen un ortólogo con más de 80 % de similitud. La presencia o ausencia de un gen de transportador ABC aguas arriba del gen homólogo a SCO3750 no sigue un patrón (flechas SCO3750 en verde en la Figura R.2.3).

En conclusión, la mayoría de las cepas con un *aorI* huérfano son cercanas en términos filogenéticos y conservan el contexto genómico del regulador.

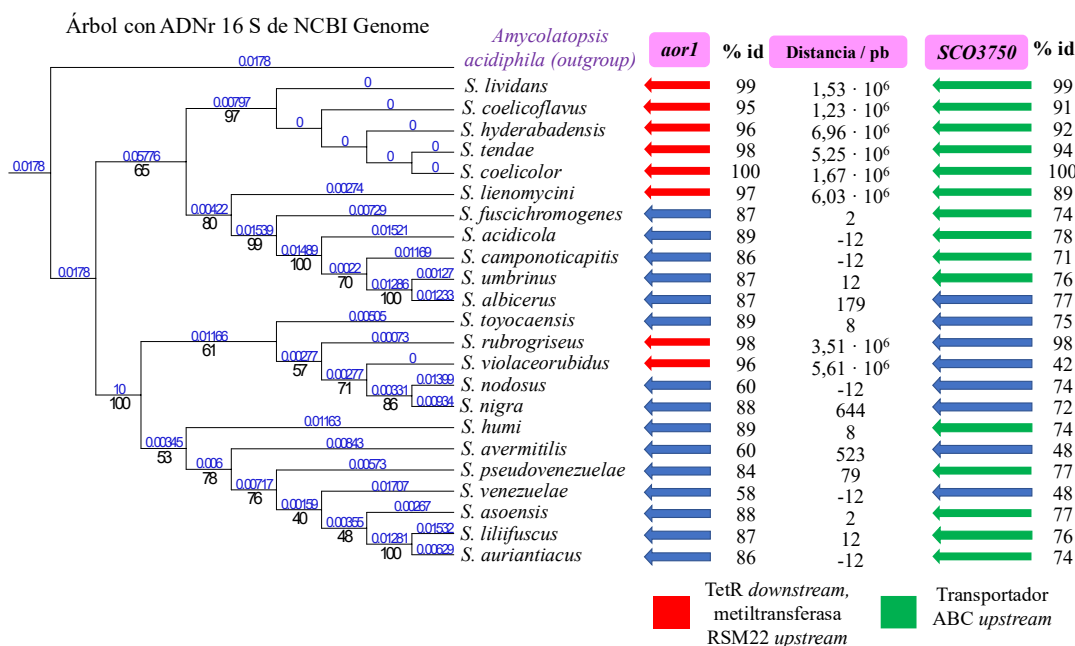


Figura R.2.3. Estudio filogenético de Aor1 y SCO3750 A la izquierda se muestra el árbol filogenético realizado con los *Streptomyces* de la Tabla R.2.2, a partir de datos de ADNr 16 S del NCBI y Silva, donde los números azules representan la distancia evolutiva y, los negros, los porcentajes la evaluación del árbol mediante *bootstrap*. A la derecha, se muestra la identidad de cada homólogo de Aor1 y de SCO3750 (en ambos casos se representa la homología a nivel de proteína) con Aor1 y SCO3750 de *S. coelicolor*. Entre ambos se muestra la distancia que hay entre los genes *aor1* y *SCO3750* en cada organismo (los ortólogos de *aor1* que no son huérfanos tienen una distancia menor a 1000 pb respecto al gen de la HK, y una distancia negativa indica solapamiento de los genes). Los colores rojo y verde indican conservación del contexto genómico con los genes TetR y RSM22 y/o con el transportador ABC. El color azul de las flechas indica que no se conserva este contexto genómico.

R.2.2 – Fenotipo de los mutantes de delección en las HK candidatas a fosforilar Aor1

R.2.2.1 – HK huérfanas: *SCO3750* y *SCO6424*

Las dos HK huérfanas seleccionadas fueron las primeras en ser estudiadas. Como se detalla en el apartado “M.5.3.1” de “Materiales y métodos”, se diseñaron guías específicas para la delección de ambos genes por el sistema CRISPR-Cas9 y se construyeron los plásmidos correspondientes para estas delecciones: pCRISPR-3750 y pCRISPR-6424. Estos plásmidos, una vez comprobados en *E. coli*, se transfirieron por conjugación a *S. coelicolor* y se obtuvieron los mutantes. Estos mutantes se comprobaron mediante PCR a partir de ADN genómico (Figura R.2.4 para *SCO3750* y Figura R.2.5 para *SCO6424*).

RESULTADOS: CAPÍTULO 2

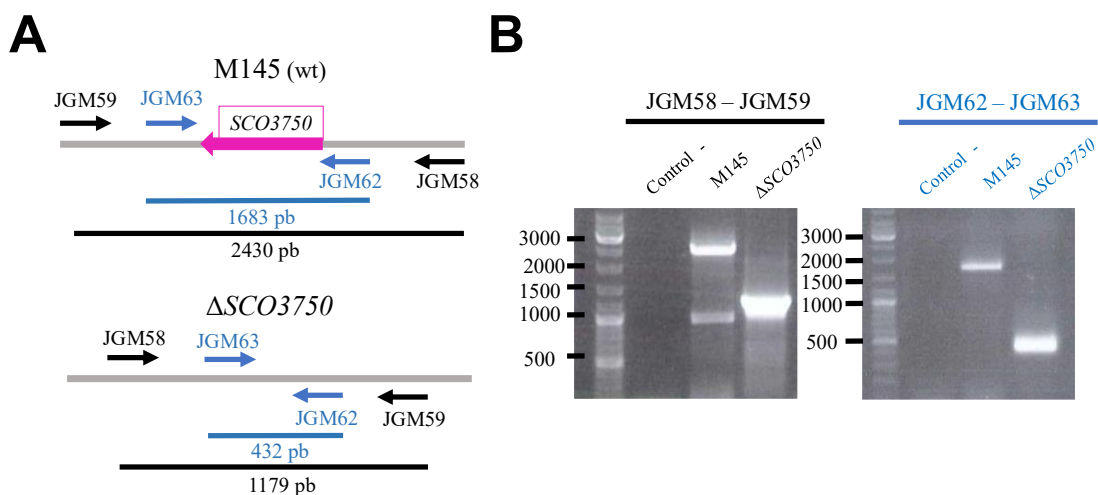


Figura R.2.4. Comprobación de la delección de *SCO3750*. **A.** Esquema de los oligonucleótidos empleados para comprobar la delección y sus productos de PCR. **B.** Resultado de la amplificación con distintos oligonucleótidos.

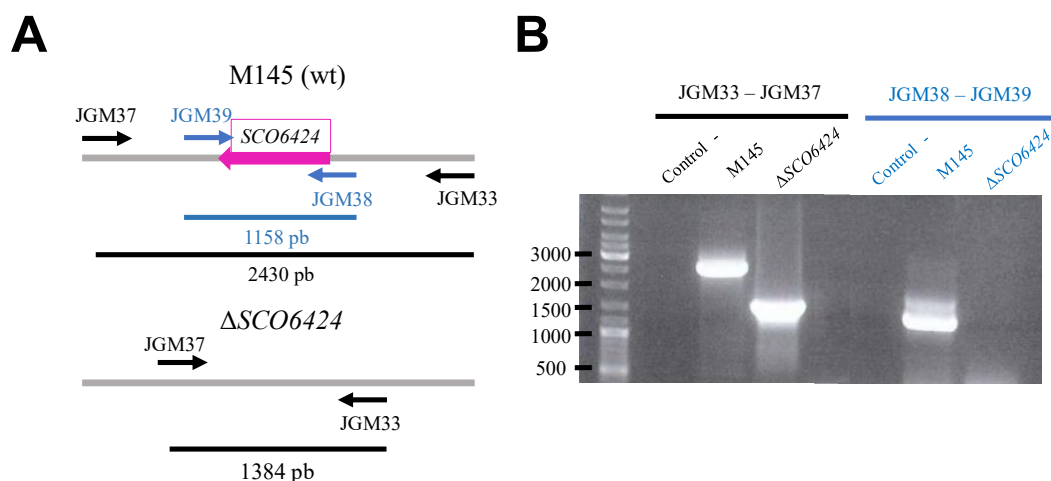


Figura R.2.5. Comprobación de la delección de *SCO6424*. **A.** Esquema de los oligonucleótidos empleados para comprobar la delección y sus productos de PCR. **B.** Resultado de la amplificación con distintos oligonucleótidos.

Los fenotipos de los mutantes de delección de estas HK se muestran en la Figura R.2.6, en comparación con la cepa silvestre y el mutante $\Delta aor1$. Se pudo observar el retraso en diferenciación y producción de ACT del mutante $\Delta aor1$ respecto al silvestre en los medios ricos empleados (LB, R2YE e YEPD), mientras que en medio mínimo hay menor diferenciación y esporulación (micelio más rojizo y menos grisáceo que el silvestre).

En los mutantes obtenidos de las HK, se buscaba si existía un fenotipo similar al de $\Delta aor1$ en alguno de los medios estudiados. Esto podría indicar que estuvieran en la misma ruta de señalización. El mutante $\Delta SCO3750$ presentó un fenotipo dependiente de medio y de mayor producción de ACT en LB, R2YE y NMMP que el silvestre. En LB se observó una alteración en la diferenciación (el borde no diferenció y no hay esporas grises) (Figura R.2.6 A). En medio R2YE, la cepa $\Delta SCO3750$ presentó diferenciación (micelio blanco) en el borde (Figura R.2.6 B). El fenotipo más interesante se obtuvo en medio YEPD: tanto $\Delta aor1$ como $\Delta SCO3750$ presentaron el mismo fenotipo, de micelio

amarillento sin producción de antibióticos, incluso con menor diferenciación en el mutante $\Delta SCO3750$ (Figura R.2.6 C). En NMMP, se observó un adelanto de la diferenciación y la esporulación (mayor color gris) respecto al silvestre (Figura R.2.6 D).

El otro mutante de HK huérfana, $\Delta SCO6424$, produjo más ACT (halo azul más grande y/o tonalidad más oscura) que el silvestre en los medios ricos (Figura R.2.6 A, B y C), y diferenció antes en NMMP (Figura R.2.6 D). Este fenotipo indicaba una implicación del gen $SCO6424$ como posible regulador negativo de la producción de ACT y la diferenciación (puesto que su delección aumenta estos procesos), pero no como HK relacionada directamente con *aor1*.

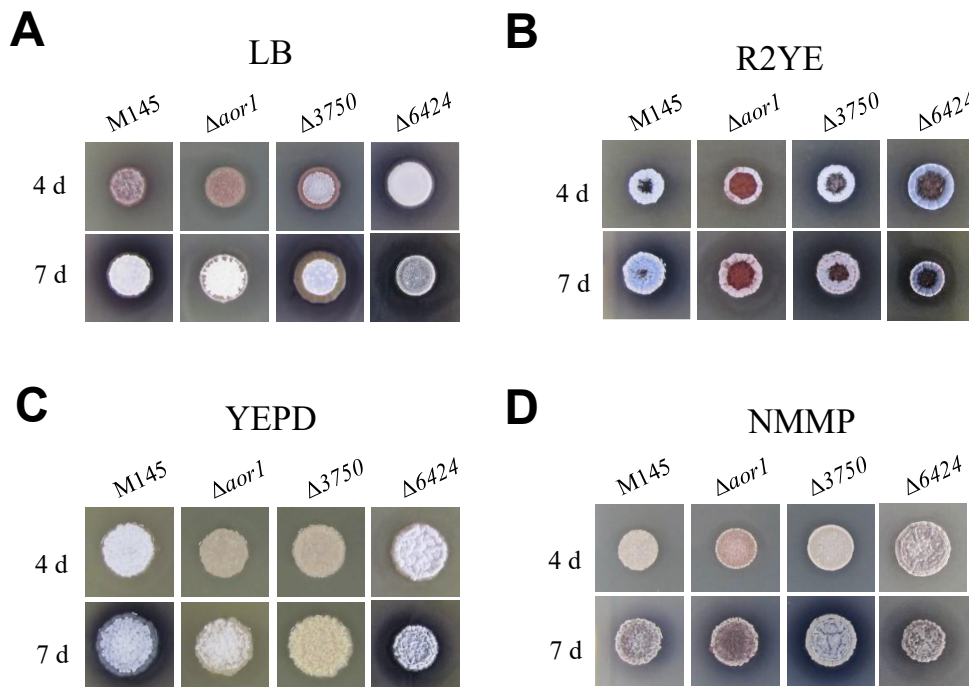


Figura R.2.6. Fenotipo de los mutantes $\Delta SCO3750$ y $\Delta SCO6424$. Comparación de los mutantes $\Delta SCO3750$ y $\Delta SCO6424$ con la cepa silvestre M145 y el mutante $\Delta aor1$. **A.** Medio LB. **B.** Medio R2YE. **C.** Medio YEPD. **D.** Medio NMMP.

Dada la similitud fenotípica entre los mutantes $\Delta aor1$ y $\Delta SCO3750$ en YEPD, se realizó la complementación del mutante $\Delta SCO3750$ con el plásmido integrativo pKC3750. Al introducir el plásmido pKC3750 en la cepa $\Delta SCO3750$ se restaura el fenotipo silvestre (comparando con la cepa M145 que lleva el plásmido vacío pKC796) (Figura R.2.7). La complementación demuestra que el fenotipo observado en la cepa $\Delta SCO3750$ se debe a la delección del gen $SCO3750$.

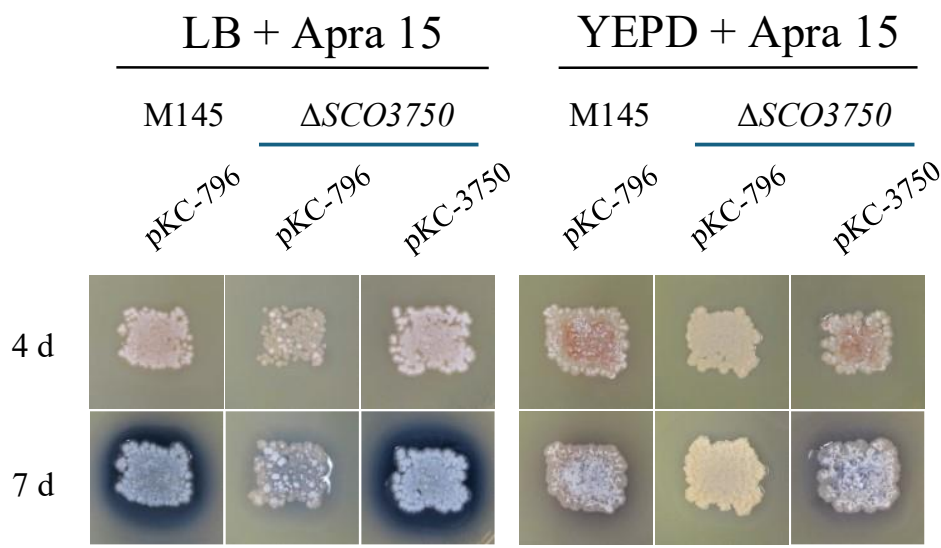


Figura R.2.7. Ensayo de complementación del mutante $\Delta SCO3750$. Fenotipo de parches de la cepa silvestre M145 con el plásmido vacío (pKC796) y de parches del mutante $\Delta SCO3750$ con el plásmido vacío y el plásmido de complementación (pKC3750) en medio LB e YEPD con apramicina.

Como *SCO3750* suscitó mayor interés, se estudió su sobreexpresión a partir del plásmido multicopia pN3750, derivado del vector pN702GEM3. Ambos plásmidos (el plásmido vacío como control) se transformaron en *S. coelicolor* M145 y $\Delta aor1$. Se comprobó el fenotipo de parches de los transformantes en medio LB e YEPD (Figura R.2.8). En la cepa silvestre, sobreexpresar *SCO3750* en LB no tuvo un efecto aparente, y en YEPD disminuyó la producción de RED (menor tonalidad roja) y la diferenciación y síntesis de ACT a tiempo final (día 7). En el mutante $\Delta aor1$, sobreexpresar *SCO3750* en LB aumentó la producción de ACT en detrimento de la diferenciación del micelio aéreo, mientras que en YEPD no hubo efecto alguno (Figura R.2.8).

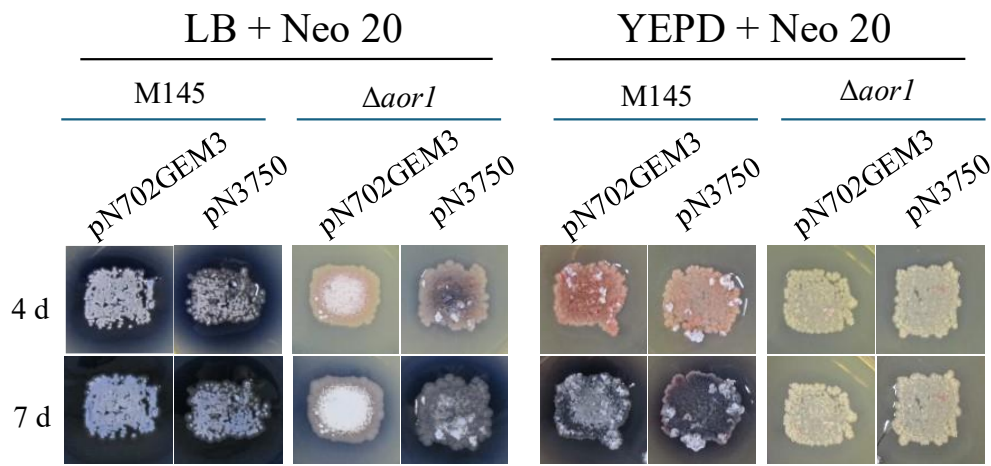


Figura R.2.8. Sobreexpresión de *SCO3750*. Fenotipo de la sobreexpresión de *SCO3750* mediante el plásmido pN3750 en las cepas M145 y $\Delta aor1$ en LB e YEPD con neomicina. En ambos casos se compara el fenotipo con las cepas que llevan el plásmido vacío (pN702GEM3).

Por lo tanto, de estos ensayos se puede concluir que la HK SCO3750 parecía ser la encargada de activar al RR Aor1 en el medio YEPD, mientras que, en otros medios como LB, podría interactuar con otras proteínas.

R.2.2.2 – Sistema *SCO2359/SCO2358*

El gen que codifica la HK *SCO2359* está acompañado en el genoma de un gen codificante de un RR, *SCO2358*. El estudio de estos genes se comenzó con un Trabajo Fin de Máster (Sampedro Cabezas, 2024) y se continuó y profundizó en esta tesis doctoral.

Se construyeron tres plásmidos derivados de pCRISPR-Cas9, cada uno para una delección: la delección del gen de la HK (pCRISPR-2359), del RR (pCRISPR-2358) y de ambos (pCRISPR-2359/58). La delección de estos genes en *S. coelicolor* se comprobó mediante PCR a partir de ADN genómico (Figura R.2.9 para *SCO2359*, Figura R.2.10 para *SCO2358* y Figura R.2.11 para *SCO2359/SCO2358*).

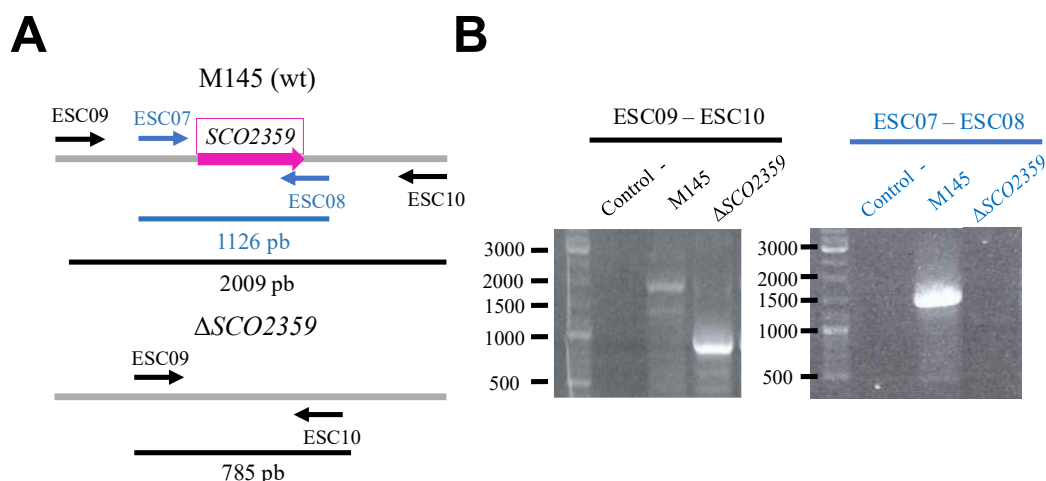


Figura R.2.9. Comprobación de la delección de *SCO2359*. A. Esquema de los oligonucleótidos empleados para comprobar la delección y sus productos de PCR. B. Resultado de la amplificación con distintos oligonucleótidos.

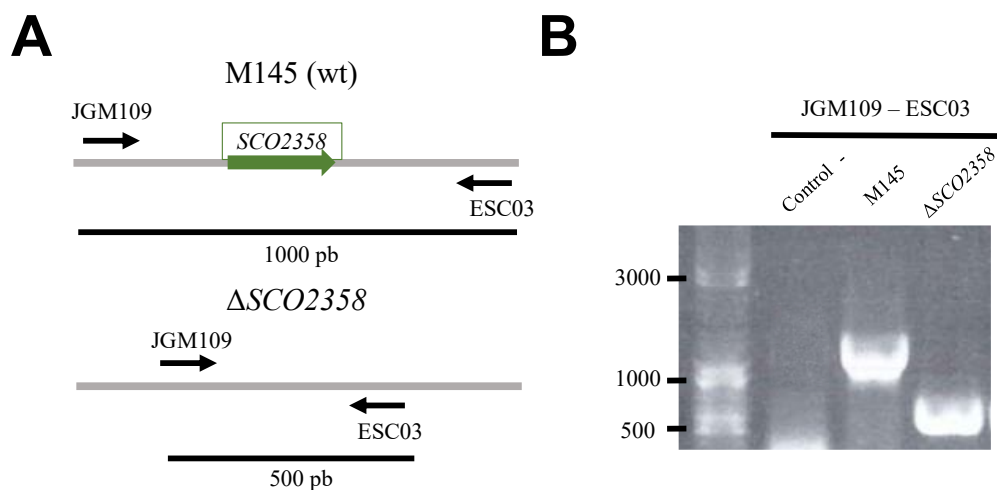


Figura R.2.10. Comprobación de la delección de *SCO2358*. A. Esquema de los oligonucleótidos empleados para comprobar la delección y sus productos de PCR. B. Resultado de la amplificación.

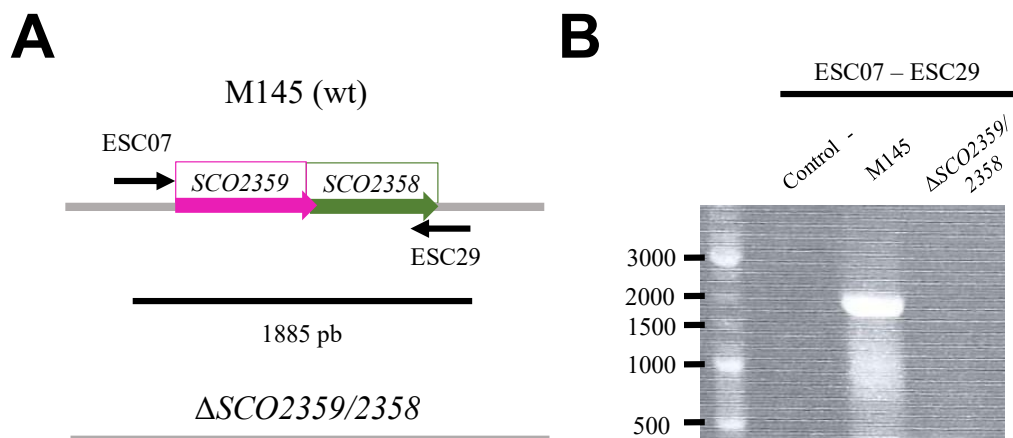


Figura R.2.11. Comprobación de la delección de *SCO2359/SCO2358*. A. Esquema de los oligonucleótidos empleados para comprobar la delección y sus productos de PCR. B. Resultado de la amplificación.

En la Figura R.2.12 se muestra el fenotipo de los mutantes $\Delta SCO2359$, $\Delta SCO2358$ y $\Delta SCO2359/58$, comparados con la cepa silvestre y $\Delta aor1$. Estas dos últimas cepas mencionadas, silvestre y mutante $\Delta aor1$, mostraron los mismos fenotipos que los mostrados en la Figura R.2.6.

En LB, los tres mutantes de interés diferenciaron el micelio aéreo blanco antes que la cepa silvestre. A tiempo final del estudio (7 días), el mutante en la HK, $\Delta SCO2359$, produjo menos ACT que la cepa silvestre; siguió en esta producción el mutante doble, $\Delta SCO2359/58$, con una producción de ACT mayor respecto al mutante en la HK (se observa tonalidad oscura leve alrededor del micelio), pero menor a la del silvestre; por último, el mutante en el RR, $\Delta SCO2358$, presentó una producción de ACT acelerada a los 4 días. En este medio, el fenotipo de $\Delta SCO2359$ se parece al de $\Delta aor1$ en la menor diferenciación, aunque en $\Delta aor1$ es más notable este defecto en formación de micelio blanco (Figura R.2.12 A).

En el medio R2YE, los mutantes $\Delta SCO2359$, $\Delta SCO2358$, $\Delta SCO2359/58$ y $\Delta aor1$ formaron gotas de micelio rojizas con un borde más claro, diferentes a las gotas de micelio aéreo teñido de azul que formó el silvestre. La coloración fue distinta en los mutantes, debido a la producción de ACT y RED que tiñen el micelio: el borde de $\Delta aor1$ es rojizo, el de $\Delta SCO2359$ es una mezcla entre azul y rojo, y el de $\Delta SCO2358$ y el mutante doble es más blanco (Figura R.2.12 B).

En YEPD, el mutante $\Delta SCO2359$ no sintetizó ACT visible como un halo y generó menos micelio aéreo que el silvestre. El mutante $\Delta SCO2358$ presentó diferenciación y producción de ACT menor al silvestre. El fenotipo del mutante doble, $\Delta SCO2359/58$, fue similar al del mutante $\Delta SCO2358$. En YEPD, la presencia de $SCO2358$ sin su HK parece ser perjudicial para el desarrollo (Figura R.2.12 C).

Por último, en NMMP, $\Delta aor1$ y $\Delta SCO2359$ mostraron fenotipos parecidos: gotas rojizas, sin micelio aéreo blanco. Mientras que $\Delta aor1$ produjo ACT visible (halo azul) a los 7 días, $\Delta SCO2359$ produjo muy poca ACT (halo tenue). El mutante $\Delta SCO2358$ tuvo un fenotipo similar, con micelio más oscuro (mayor producción de ACT y/o RED), mientras que el mutante doble $\Delta SCO2359/58$ restauró la diferenciación (micelio blanco y gris) (Figura R.2.12 D).

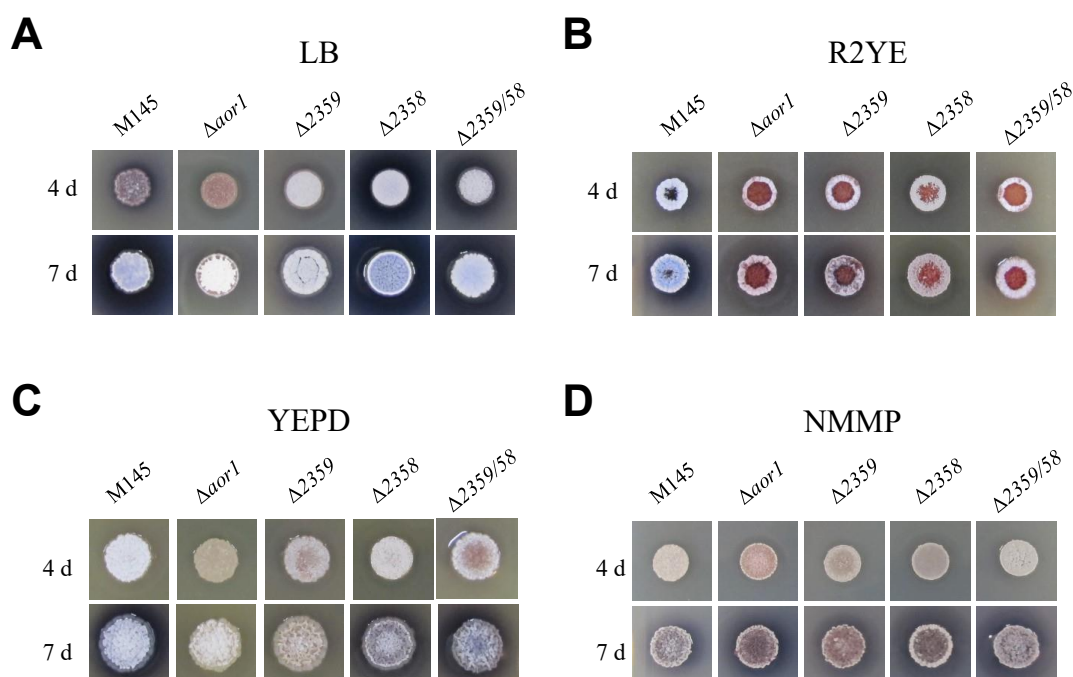


Figura R.2.12. Fenotipo de los mutantes $\Delta SCO2359$, $\Delta SCO2358$ y $\Delta SCO2359/58$. Comparación de los mutantes $\Delta SCO2359$, $\Delta SCO2358$ y $\Delta SCO2359/58$ (abreviados como $\Delta 2359$, $\Delta 2358$ y $\Delta 2359/58$) con la cepa silvestre M145 y el mutante $\Delta aor1$. **A.** Medio LB. **B.** Medio R2YE. **C.** Medio YEPD. **D.** Medio NMMP.

Durante el desarrollo de la tesis, los mutantes $\Delta SCO2359$ y $\Delta SCO2359/58$ fueron los primeros obtenidos de este apartado. Por ello, se construyeron primero los plásmidos integrativos de complementación para ambos, derivados de pKC796: pKC-2359 y pKC-2359/58 (véase el apartado “M.5.3.2”). La complementación se realizó en medio R2YE, por ser donde se mostraba el fenotipo

RESULTADOS: CAPÍTULO 2

más parecido al de $\Delta aor1$ en ambos mutantes. Al introducir el vector vacío (en silvestre y mutantes) y los plásmidos de complementación en las cepas correspondientes, no se observaron diferencias importantes en los fenotipos entre la cepa silvestre y los mutantes en este medio, R2YE. Aun así, los análisis fenotípicos de los mutantes, cuya delección fue comprobada por PCR, indican que el sistema *SCO2359/2358* está relacionado con *aor1* y la HK *SCO2359* podría activar a Aor1 en las condiciones nutricionales de R2YE y NMMP. Además, el RR *SCO2358* influye, en general, de forma negativa en el metabolismo secundario en ausencia de su HK.

R.2.2.3 – Sistema *SCO2215/SCO2216*

El otro TCS canónico estudiado por la posible relación entre su HK (*SCO2215*) y Aor1 es el formado por los genes *SCO2215/2216*. La aproximación para su estudio fue la misma seguida para *SCO2359/2358*: la construcción de plásmidos derivados de pCRISPR-Cas9 para generar mutantes de delección en cada uno de los genes o en ambos. Los plásmidos construidos para este caso fueron pCRISPR-2215, pCRISPR-2216 y pCRISPR-2215/16.

R.2.2.3.1 – Estudio de la inhibición de *SCO2215*

Si bien el principal interés era la obtención del mutante de delección en *SCO2215*, la conjugación con pCRISPR-2215 no generó colonias de *S. coelicolor* en ninguna de las múltiples conjugaciones realizadas. Sin embargo, la conjugación con pCRISPR-Cas9, el control vacío, generaba colonias de *S. coelicolor* conjugantes, y la conjugación con el plásmido que incluye solo el sgRNA guía, sin molde de delección, pCRISPR-sg2215, no generaba ninguna colonia. La conjugación funcionaba y el sgRNA era capaz de dirigir a la Cas9 a cortar en el genoma, pero el gen no se pudo deleccionar.

Ante esta situación de un posible gen esencial, se aprovechó la estancia internacional en el laboratorio del Prof. Dr. Gilles P. van Wezel, en Leiden, para utilizar su sistema de inhibición de interferencia utilizando CRISPRi, CUBIC (Bai & van Wezel, 2023). Se construyó el plásmido integrativo pCB-2215, que se transfirió a *S. coelicolor* mediante conjugación. Con este plásmido integrado, en presencia de cumato, el gen *SCO2215* era inhibido, simulando una delección. Se probaron dos concentraciones de cumato para inhibirlo, 20 y 100 μM , en los cuatro medios de cultivo principales de este trabajo: LB, R2YE, YEPD y NMMP.

En LB, se observó que en los primeros días existía un retraso en la diferenciación, pero a día 7, solo se observó una menor producción de ACT con 100 μM de cumato, sin defectos aparentes en diferenciación (Figura R.2.13 A). En R2YE, la inhibición de *SCO2215* no tuvo ningún efecto notable en el fenotipo (Figura R.2.13 B).

Los otros medios de cultivo mostraron fenotipos diferentes. En YEPD, las gotas de micelio control produjeron RED sin diferenciar micelio aéreo, y al exponerse a 20 μM de cumato, se indujo diferenciación a partir del día 5 (en la imagen se muestra el día 7). Una concentración de 100 μM de

cumato, con mayor inhibición del gen, impidió la diferenciación y redujo la RED dentro del micelio (color más claro que el control) (Figura R.2.13 C).

Por último, en NMMP, las gotas control produjeron micelio aéreo a los 3 días que se tornó de un color marrón-morado a los últimos días por la producción de RED y ACT, también visible por el halo alrededor. La inhibición con cumato en ambas concentraciones impidió la producción de antibióticos pigmentados (Figura R.2.13 D).

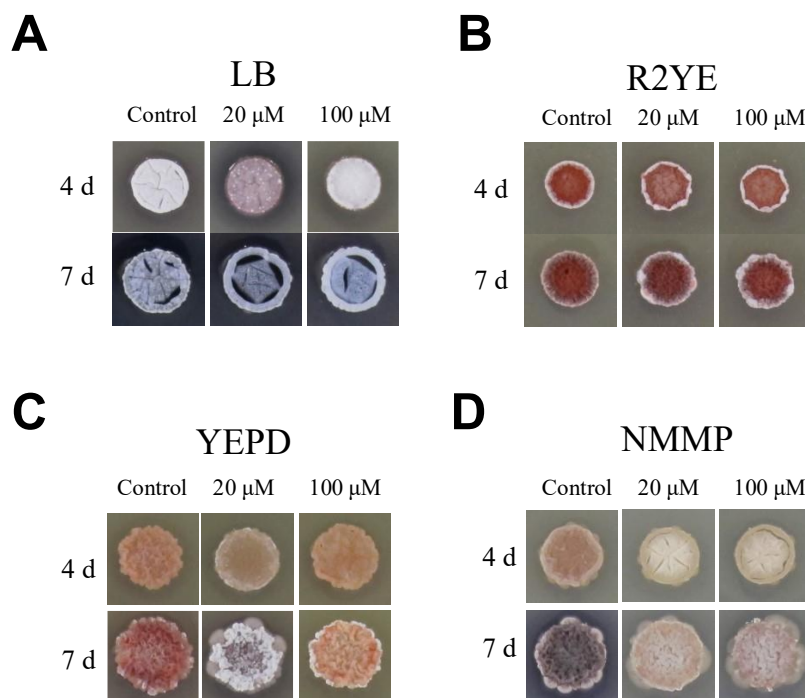


Figura R.2.13. Inhibición de *SCO2215* por CRISPRi. Fenotipo de *S. coelicolor* M145 con el plásmido pCB-2215 en ausencia o presencia de cumato (20 y 100 μM). **A.** Medio LB. **B.** Medio R2YE. **C.** Medio YEPD. **D.** Medio NMMP.

Si bien con este ensayo no se puede hacer una comparación directa con el mutante $\Delta aor1$, sí se observa que la HK *SCO2215* está implicada en la regulación del metabolismo secundario, al menos en LB, YEPD y NMMP.

R.2.2.3.2 – Estudio de la delección de *SCO2216* y *SCO2215/SCO2216*

A pesar de la imposibilidad de obtener, en las condiciones ensayadas, un mutante de delección para la HK codificada por *SCO2215*, se consiguió obtener los otros dos mutantes planteados para este sistema: el mutante en el gen del RR *SCO2216* mediante el plásmido pCRISPR-2216, y el mutante doble en *SCO2215* y *SCO2216* mediante el plásmido pCRISPR-2215/16. La delección de los genes de interés en los dos mutantes resultantes, $\Delta SCO2216$ y $\Delta SCO2215/16$, se comprobó mediante PCR a partir de ADN genómico (Figura R.2.14 para *SCO2216* y Figura R.2.15 para *SCO2215/2216*).

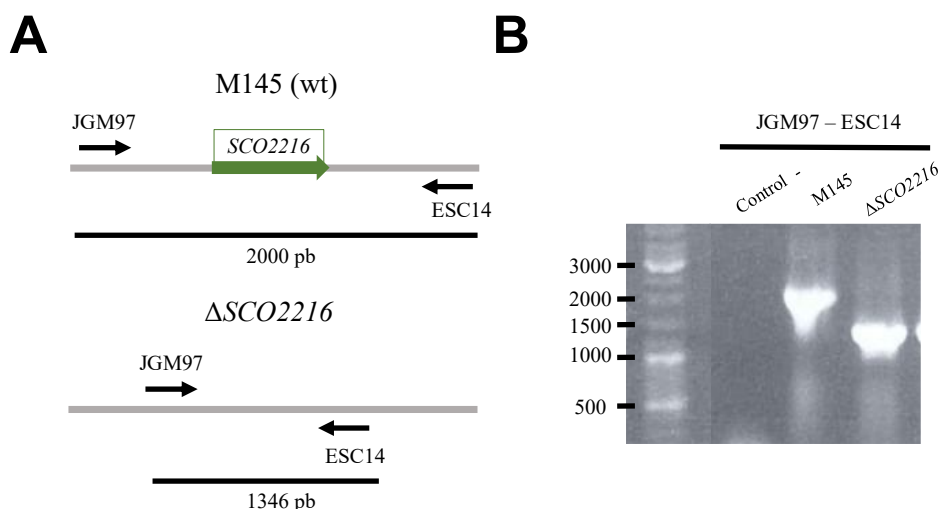


Figura R.2.14. Comprobación de la delección de *SCO2216*. A. Esquema de los oligonucleótidos empleados para comprobar la delección y sus productos de PCR. B. Resultado de la amplificación.

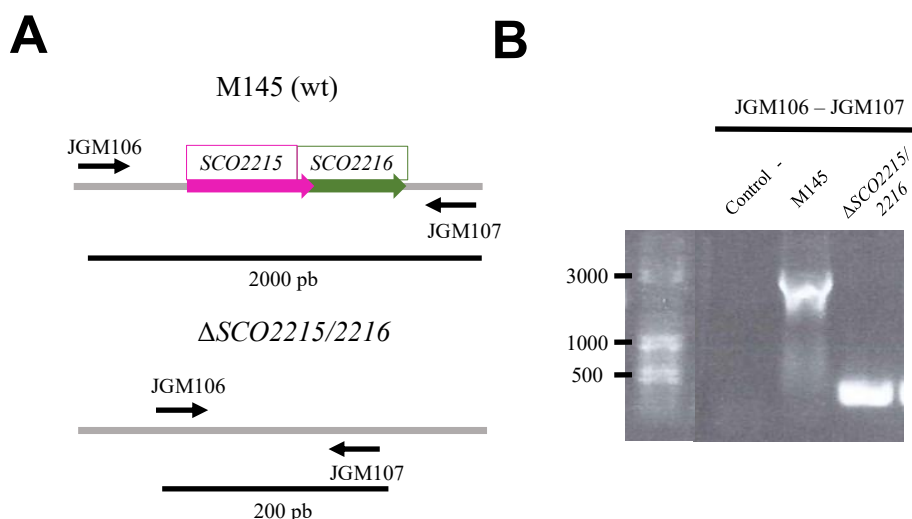


Figura R.2.15. Comprobación de la delección de *SCO2215* y *SCO2216*. A. Esquema de los oligonucleótidos empleados para comprobar la delección y sus productos de PCR. B. Resultado de la amplificación.

De nuevo, se realizó un ensayo fenotípico comparando estos mutantes con la cepa silvestre y el mutante $\Delta aor1$ en los medios LB, R2YE, YEPD y NMMP. Los resultados se muestran en la Figura R.2.16.

En medio LB, ambos mutantes diferenciaron y produjeron ACT con mayor intensidad respecto a la cepa silvestre. Además, se observó que la diferenciación en el borde del micelio del mutante $\Delta SCO2216$ está afectada: se forman bordes blancos gruesos y “parches” de micelio vegetativo amarillento en la parte exterior de la gota (Figura R.2.16 A).

En medio R2YE, también se observó una alteración en los bordes del micelio de $\Delta SCO2216$, que no diferenciaban y producían salientes irregulares. Las gotas de micelio de este mutante eran rojas en el centro y blancas en el borde, mientras que el mutante $\Delta aor1$, como ya se comentó en anteriores

apartados, produce micelio con esta morfología, pero de color rojo. El mutante doble $\Delta SCO2215/16$ también mostró coloración roja con micelio aéreo blanco, sin producir ACT (Figura R.2.16 B).

En YEPD, el mutante $\Delta SCO2216$ no diferenció y produjo algo de RED, visible como manchas rojizas y naranjas dentro del micelio. El mutante doble creció de forma indistinguible de un silvestre, con diferenciación de micelio aéreo y producción de ACT a los 7 días (Figura R.2.16 C).

Finalmente, en medio mínimo NMMP, el mutante $\Delta SCO2216$ presentó un desarrollo acelerado respecto al silvestre, con mayor esporulación (más oscuro) y mayor producción de ACT. El halo azul observado también era mayor que el producido por el mutante $\Delta aor1$. El mutante doble $\Delta SCO2215/2216$ también produjo más ACT que el silvestre (color más azulado), pero menos que el mutante simple (Figura R.2.16 D).

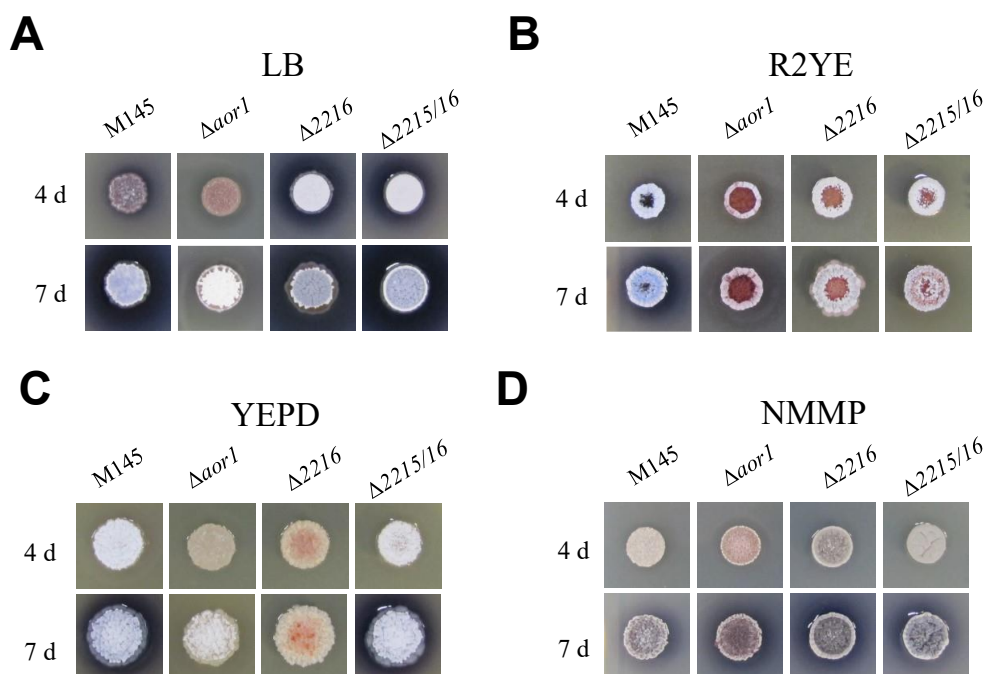


Figura R.2.16. Fenotipo de los mutantes $\Delta SCO2216$ y $\Delta SCO2215/2216$. Comparación de los mutantes $\Delta SCO2216$ y $\Delta SCO2215/2216$ (abreviados como $\Delta 2216$ y $\Delta 2215/16$) con la cepa silvestre M145 y el mutante $\Delta aor1$. **A.** Medio LB. **B.** Medio R2YE. **C.** Medio YEPD. **D.** Medio NMMP.

Los fenotipos observados indican que este sistema también está implicado en regular el metabolismo secundario. De forma general, el RR SCO2216 parece actuar como regulador positivo de la producción de antibióticos en los medios ricos ensayados (no en el medio mínimo).

R.2.3 – Fosforilación *in vitro* de Aor1 por SCO3750

Las herramientas bioinformáticas, tanto los recursos web como los alineamientos de secuencias realizados en el apartado “R.2.1”, apuntaban a que SCO3750 era la principal HK asociada a Aor1. Mediante los estudios experimentales presentados en los apartados anteriores, esto parecía corroborarse al menos en algunas condiciones nutricionales, como señalaba el fenotipo en YEPD (Figura R.2.6 C). Se planteó, entonces, comprobar si SCO3750 podía fosforilar a Aor1 *in vitro*. Se siguió la estrategia experimental detallada en el apartado “M.8” de “Materiales y métodos”.

Para la producción de la proteína SCO3750 en su versión completa (SCO3750E, de “entera”) y en su versión truncada, solo con dominio citoplasmático (cSCO3750), ambas con una etiqueta de 6xHis, se construyeron los plásmidos de expresión pET-3750E y pET-c3750 empleando como vector el plásmido pET-22b(+) (más detalles de este vector en el apartado “M.8.2” de “Materiales y métodos”).

Para la producción de las proteínas recombinantes, empleamos dos cepas de *E. coli*: BL21 (DE3) y Rosetta-gami B (DE3). Ambas cepas se transformaron con los plásmidos generados (y con el plásmido control). Primero se valoró la producción de las proteínas y si estas se quedaban en los restos celulares insolubles, generados durante la extracción de proteínas, o en la parte soluble de los extractos.

En primer lugar, como prueba inicial, se analizó la producción de las proteínas en *E. coli* BL21 (DE3) portadora de los 3 plásmidos ensayados (control negativo, proteína entera y proteína citoplasmática) en dos condiciones de cultivo utilizadas tras la inducción con IPTG 1 mM (37 °C, 4 h; 25 °C, 8 h). La Figura R.2.17 muestra las proteínas detectadas en una membrana de Western blot revelada con anticuerpo α -6xHis (Figura R.2.17 A) y todas aquellas obtenidas a partir de extractos de células de estos cultivos, hervidas directamente y corridas en un gel de acrilamida teñido con Coomassie (control de carga de proteína total) (Figura R.2.17 B). SCO3750 tiene un peso molecular de unos 43 kDa, y su versión truncada, de 24 kDa. En el Western blot se apreció una banda intensa en el extracto correspondiente a la proteína citoplasmática cSCO3750 a una altura de 25 kDa, mientras que SCO3750 entera se vio poco a 40 kDa, y se apreció más en extractos de un cultivo a 25 °C (Figura R.2.17 A). Los extractos provenientes de cultivos portadores del plásmido vacío mostraron ausencia de proteína recombinante. A partir de esta prueba inicial, las inducciones se realizaron a 25 °C.

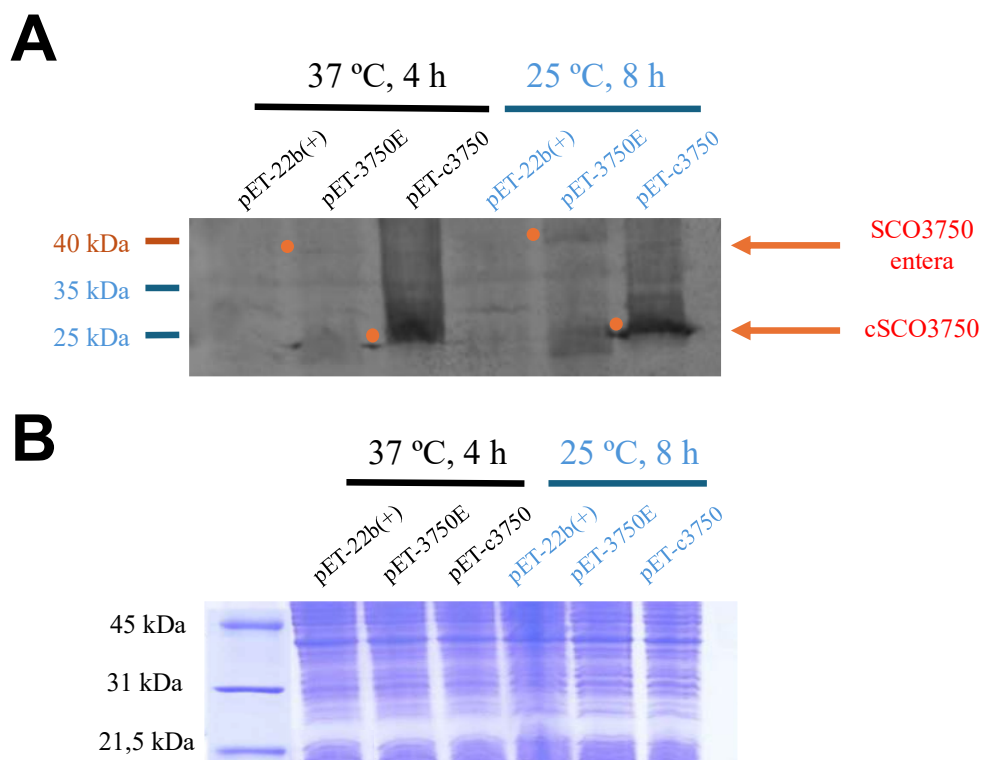


Figura R.2.17. Primera prueba de producción de SCO3750. Producción de SCO3750 en *E. coli* BL21 (DE3) con incubación de 4 h a 37 °C (negro) o de 8 h a 25 °C (azul) tras la inducción con IPTG 1 mM. Extractos de células hervidas directamente. Las flechas naranjas indican a qué altura están las proteínas de interés y los puntos a la izquierda de los carriles marcan las bandas de dichas proteínas. A. Western blot con anticuerpo α -6xHis. A. Extractos en SDS-PAGE teñidos con Coomassie (control de carga de cantidad de proteínas).

Una vez comprobada la producción de las proteínas de interés, se valoró en cuál de las dos cepas de *E. coli* utilizadas se producían más proteínas y si estas eran solubles o no mediante una extracción con CelLytic (Sigma-Aldrich). Para ello, se procesaron cultivos de las cepas BL21 (DE3) y Rosetta-gami (DE3) con inducción a DO 0,6 con IPTG 1 mM y 12 h a 25 °C (se alargó el tiempo de incubación para obtener más proteína). Los extractos obtenidos tras aplicar CelLytic (fracción soluble) y los restos celulares (fracción insoluble) se corrieron en SDS-PAGE y Western blot. En la Figura R.2.18 se muestra el Western blot de las fracciones solubles e insolubles de ambas cepas (apartado A de la Figura) y la proteína total (Coomasie) (apartado B). La versión entera de la HK se producía en mayor cantidad en la fracción soluble de BL21 (DE3), mientras que la versión citoplásmica estaba igual de representada en todos los extractos (Figura R.2.18 A). Se optó, entonces, por producir ambas proteínas en *E. coli* BL21 (DE3) y extraer la proteína desde las fracciones solubles.

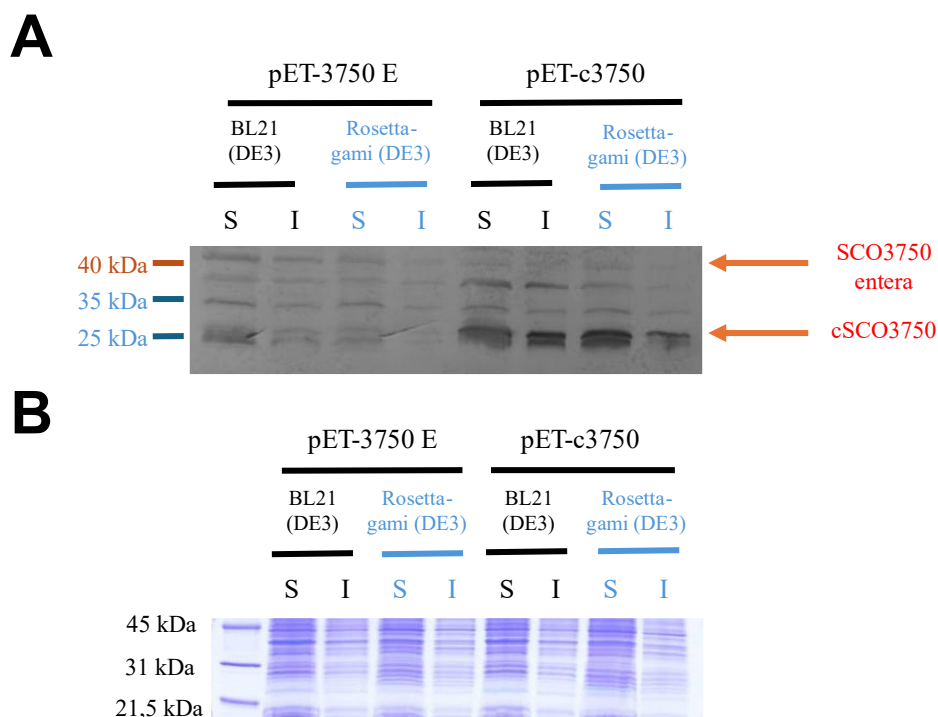


Figura R.2.18. Producción de SCO3750 en fracciones solubles. Comparación de la producción de SCO3750 en fracciones solubles (S) e insolubles (I) de *E. coli* BL21 (DE3) (en negro) y Rosetta-gami (DE3) (en azul). Las flechas naranjas indican a qué altura están las proteínas de interés. **A.** Western blot con anticuerpo α -6xHis. **B.** Extractos en SDS-PAGE teñidos con Coomassie (control de carga de cantidad de proteínas).

La producción de Aor1 6xHis recombinante desde *E. coli* se había optimizado anteriormente en el laboratorio utilizando *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) y, además, se habían obtenido anticuerpos α -Aor1 (Sánchez de la Nieta Moreno, 2022). Para comprobar que dichos anticuerpos detectaban Aor1 en las condiciones ensayadas, se creció esta cepa transformada con pET-Aor1 (plásmido para la producción de Aor1) y, cuando la DO alcanzó 0,6, se añadió IPTG 1 mM y se crecieron las células a 28 °C durante 12 h. En la Figura R.2.19 se muestra la detección de Aor1 tanto en la fracción insoluble de las células como en la fracción soluble. La banda intensa de Aor1 aparece en el Western blot en las fracciones de células con pET-Aor1, a la altura de 25 kDa (el peso molecular de Aor1 es de unos 24 kDa) (Figura R.2.19 A). Esta banda destacaba, incluso, en el gel de proteínas (Figura R.2.19 B), a la altura del marcador de 21,5 kDa.

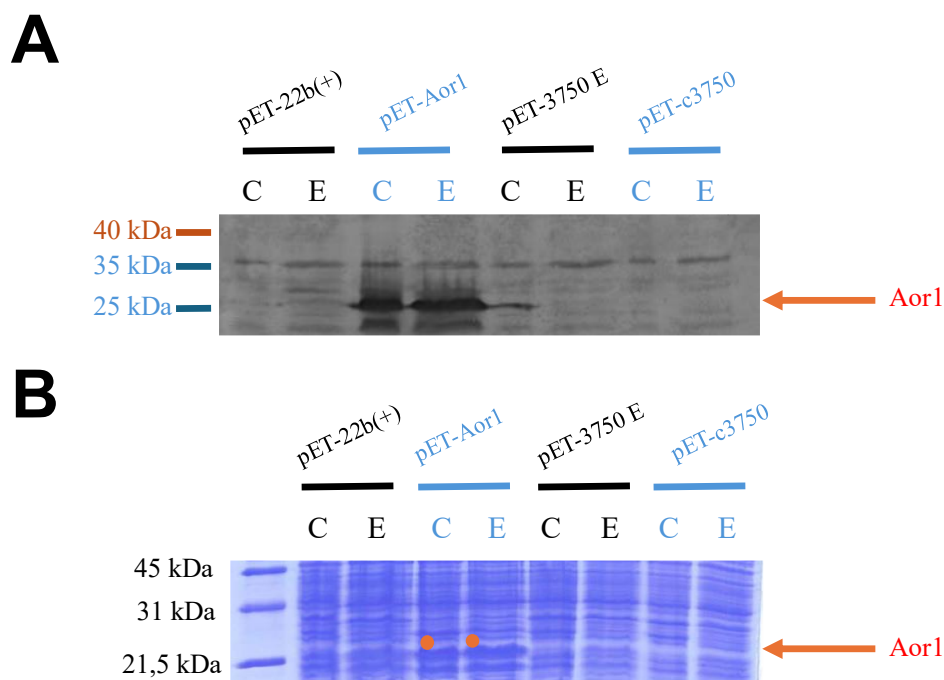


Figura R.2.19. Producción de Aor1. Comprobación de la detección de Aor1 desde células hervidas directamente (C) y extractos celulares (E). Las flechas naranjas indican a qué altura están las proteínas de interés y los puntos a la izquierda de los carriles marcan las bandas de dichas proteínas. **A.** Western blot con anticuerpo α -Aor1. **B.** Extractos en SDS-PAGE teñidos con Coomassie (control de carga de cantidad de proteínas).

Mientras que la producción de Aor1 ya estaba optimizada y cSCO3750 parecía producirse en buena cantidad según la intensidad de las bandas de Western blot, se intentó aumentar la cantidad de SCO3750 entera producida antes de escalar a volúmenes más grandes. Otros trabajos experimentales en proteínas de membrana usaron el medio TB para la producción de proteínas (Hofmann et al., 2020; Mathieu et al., 2019) y un sistema de autoinducción con glicerol 0,5 % p/v; glucosa 0,05 % p/v y lactosa de 0,02 a 0,2 % p/v en cultivos con DO de 0,2 y a 25 °C toda la noche (Mathieu et al., 2019; Robinson, 2011). Se compararon las inducciones con IPTG (en las mismas condiciones descritas en los párrafos anteriores) y la autoinducción con lactosa 0,1 % p/v (concentración intermedia de las descritas en bibliografía) en LB y TB. En la Figura R.2.20 A se muestra la mayor producción de proteína (banda más intensa en Western blot a 40 kDa) en medio TB con IPTG, por lo que este medio fue elegido para escalar los cultivos. En este Western blot se aprecia bien que la proteína parece procesarse a su versión citoplásmica al aparecer la banda correspondiente a 25 kDa.

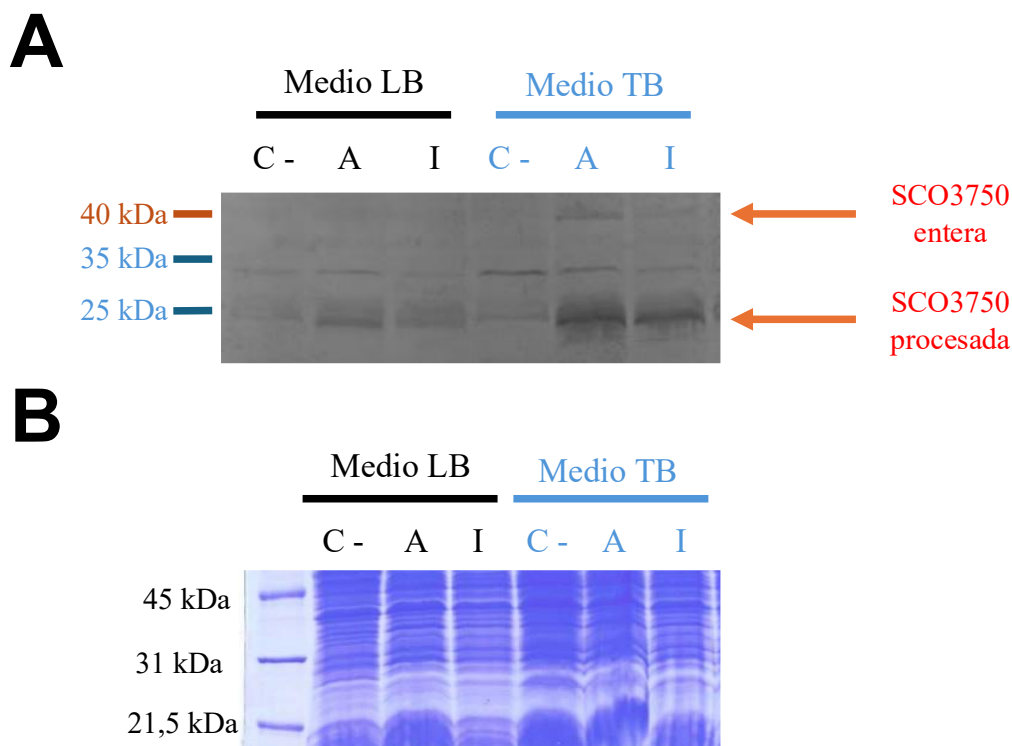


Figura R.2.20. Optimización de la producción de SCO3750 entera. Producción de la proteína en medio LB (negro) y TB (azul) con autoinducción o inducción estándar con IPTG 1 mM. C-: control negativo (células con pET-22b(+)), A: células con autoinducción, I: inducción con IPTG. Las flechas naranjas indican a qué altura están las proteínas de interés. **A.** Extractos en SDS-PAGE teñidos con Coomassie (control de carga de proteínas). **B.** Western blot con anticuerpo α -6xHis.

Finalmente, las proteínas se produjeron en mayor volumen de cultivo para obtener una mayor cantidad de proteína con la que realizar el ensayo de fosforilación. Se partió de preinóculos en 50 mL para, al día siguiente, inocular matraces con 250 mL de medio. De este modo, *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) con pET-Aor1 (producción de Aor1) se creció en LB; *E. coli* BL21 (DE3) con pET-3750E (SCO3750 entera) se creció en TB y *E. coli* BL21 (DE3) con pET-c3750 (SCO3750 citoplásmica) se creció también en LB. De nuevo, la inducción se realizó cuando estos cultivos de 250 mL alcanzaron una DO de 0,6, con IPTG 1 mM, y se cultivaron a 25 °C durante 12 h. Las células se procesaron con CellLytic y la purificación de proteínas se realizó con la resina HisPur (procedimiento más detallado en los apartados “M.8.3” y “M.8.4” de “Materiales y métodos”), a partir de las colas de histidinas.

En la Figura R.2.21 se muestran los geles de poliacrilamida con algunas fracciones de la purificación. Mientras que Aor1 se purifica en buena cantidad (Figura R.2.21 A), las dos versiones de SCO3750 poseen, visualmente, mucha menos intensidad (Figura R.2.21 B y C), y a pesar de la optimización previa, la versión completa de SCO3750 no se aprecia a la altura del marcador de 45 kDa (Figura R.2.21 B). En Western blot se aprecian las proteínas y se ve que la versión entera de SCO3750 se ha procesado (Figura R.2.21 D).

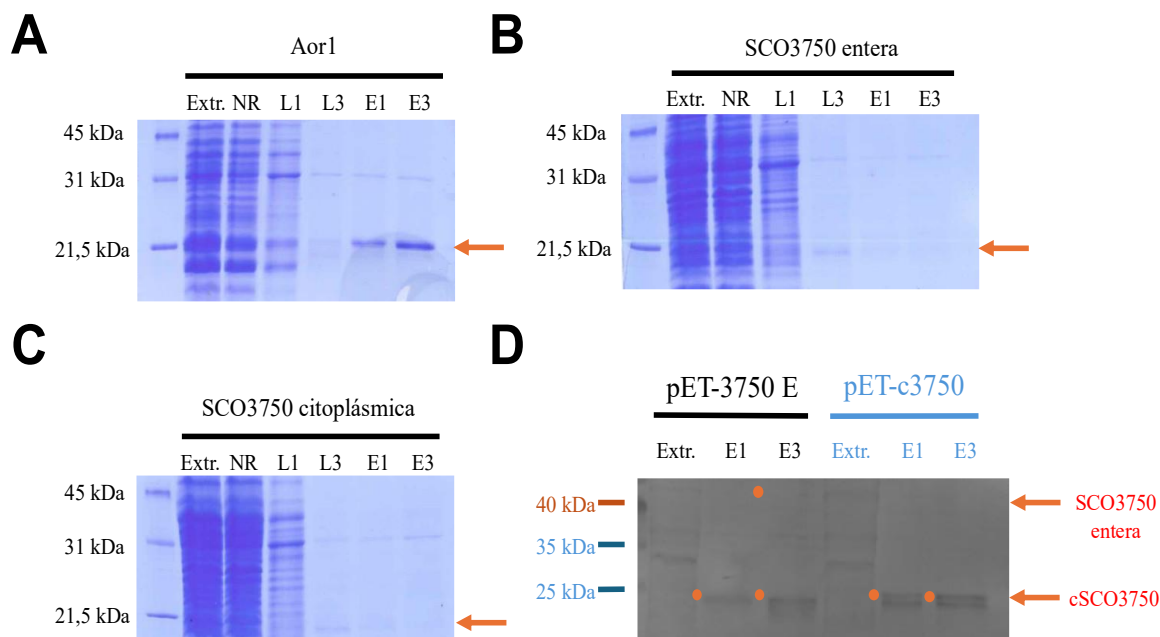


Figura R.2.21. Purificación de proteínas. En los geles SDS-PAGE (A, B y C) se muestran las proteínas teñidas con Coomassie del extracto original de células de *E. coli* (Extr.), de la fracción no retenida en la resina de purificación (NR), de dos lavados (el primero y el tercero, L1 y L3 respectivamente) y de dos eluciones con imidazol (la primera y la tercera, E1 y E3 respectivamente). Las flechas naranjas indican a qué altura están las proteínas de interés y los puntos a la izquierda de los carriles marcan las bandas de dichas proteínas. **A.** Purificación de Aor1. **B.** Purificación de SCO3750 entera. **C.** Purificación de SCO3750 citoplásmica. **D.** Western blot de los extractos de partida y las eluciones de SCO3750 entera (en negro) y cSCO3750 (azul) con anticuerpo α -6xHis.

Las distintas fracciones de elución con cada una de las proteínas purificadas se mezclaron y dializaron con los centricones Amicon 10 K, para eliminar el imidazol que pudiese interferir en los posteriores ensayos. Tras la diálisis, las proteínas quedaron en unos 400 μ L de Tris 50 mM, NaCl 100 mM y glicerol 10 % a pH 7,5, con concentraciones de 1 μ g/ μ L para Aor1; 0,4 μ g/ μ L para SCO3750 entera; y 0,6 μ g/ μ L para cSCO3750. Estas concentraciones eran suficientes para los ensayos de fosforilación, que requerían 2 μ g de proteína.

Una vez las proteínas estaban dializadas y cuantificadas, se realizó el ensayo de fosforilación como se describe en el apartado “M.8.9” de “Materiales y métodos”. Por un lado, se comprobó si se detectaba autofosforilación de las HK en geles de poliacrilamida con el colorante Pro-Q Diamond. Esta tinción no mostró ninguna banda de fosforilación en las muestras (Figura R.2.22 A y B). A pesar de ello, se probó a realizar una fosforilación *in vitro* de Aor1 y se comprobó el resultado mediante Western blot a partir de geles con Phos-tag (véase el apartado “M.8.6.1”). Como puede verse en la Figura R.2.22 C, no se observó ningún retraso en la movilidad en Aor1 debido a la fosforilación de la proteína.

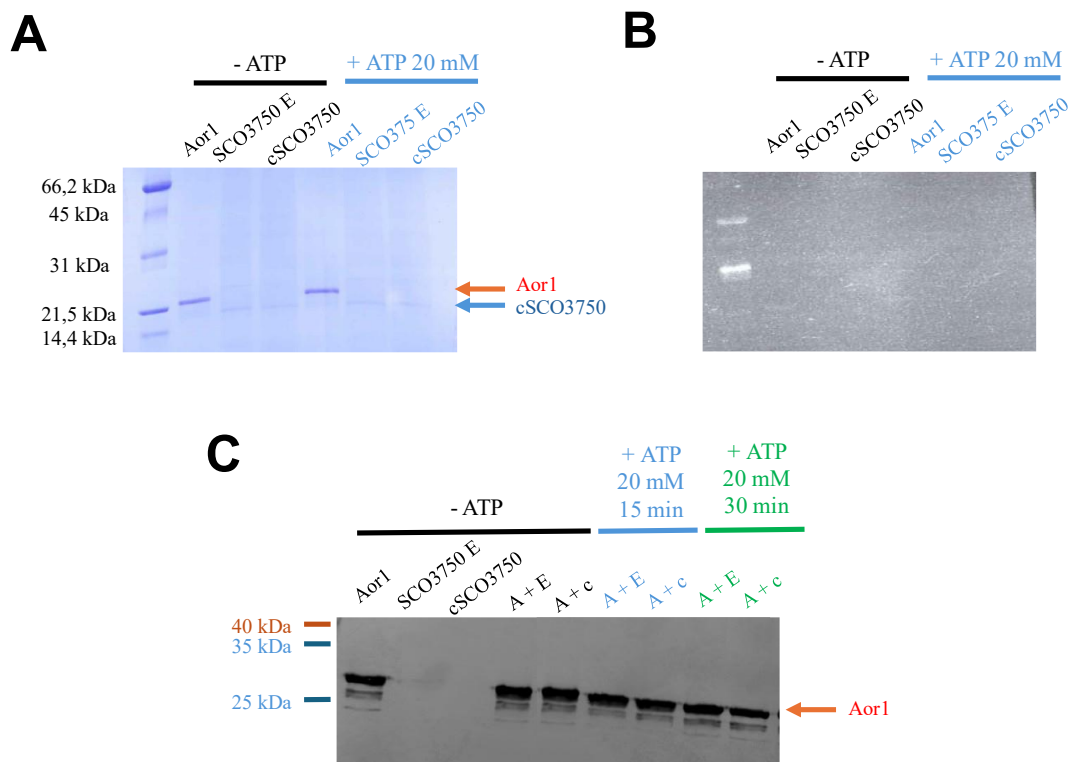


Figura R.2.22. Ensayo de fosforilación de Aor1 *in vitro*. A. Tinción con Coomassie del SDS-PAGE del ensayo de autofosforilación de las HK purificadas. La altura a la que se ve Aor1 se marca con la flecha naranja, y la altura a la que se ve SCO3750 (truncada), en azul. B. Tinción con Pro-Q Diamond del mismo gel SDS-PAGE (solo se observa tinción en las bandas del marcador). C. Western blot con anticuerpo α -Aor1 tras una electroforesis Phos-tag con 15 (azul) y 30 (verde) min de incubación de Aor1 y las HK en presencia de ATP. A + E: Aor1 con SCO3750 entera. A + c: Aor1 con cSCO3750.

Por lo tanto, aunque se consiguió producir las diferentes versiones de la HK SCO3750 y la proteína reguladora Aor1 en cantidad suficiente para el ensayo de fosforilación *in vitro*, no fue posible detectar una fosforilación en Aor1 por acción de SCO3750 mediante esta metodología.

R.2.4 – Interacción HK-Aor1 mediante ensayos de dos híbridos

Dados los problemas con los que nos encontramos para demostrar la fosforilación *in vitro* utilizando las proteínas purificadas de interés, que pueden ser debidos, entre otras razones, a la vida media de las fosforilaciones de estos TCS, se decidió abordar esta cuestión mediante otra aproximación. Un trabajo de Guosong Zeng y colaboradores en *S. coelicolor* estudió la interacción de una HK huérfana, OhkA/SCO1596, y su RR asociado, OrrA/SCO3008. Ante los mismos problemas con los que nos encontramos nosotros, demostraron la interacción entre estas dos proteínas mediante un ensayo de dos híbridos en bacteria (G. Zheng et al., 2021).

Se decidió, por lo tanto, emplear esta metodología para comprobar la existencia de posibles interacciones entre Aor1 y las HK estudiadas. Para ello, se utilizó el kit Bacterial Adenylate Cyclase

Two-Hybrid Assay (BACTH) de Euromedex. En la realización de este ensayo, se construyeron proteínas híbridas en las que Aor1 y las HK en estudio se fusionaban a los fragmentos T25 o T18 de la enzima adenilato ciclasa (AC), clonándolas en vectores pKT25/pKNT25 o pUT18/pUT18C, respectivamente. En caso de interacción Aor1-HK, los dos fragmentos T25 y T18 de la AC se aproximan, entonces la AC recupera su actividad y sintetiza AMPc, que, a su vez, activa la producción de β -galactosidasa. Esta enzima es capaz de degradar el X-gal que se añade al medio de cultivo, formándose entonces un compuesto de color azul insoluble, el 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo (Battesti & Bouveret, 2012; Mehla et al., 2017).

Para estos ensayos, si bien las HK poseen un dominio transmembrana, con un extremo en el exterior celular y otro intracelular en condiciones normales, se clonaron las proteínas enteras, para simular la interacción normal en *S. coelicolor* con la proteína entera. Además, las etiquetas de la AC (T25 y T18) podrían distorsionar la conformación de la proteína de fusión generada e impedir su anclaje a la membrana correctamente. Por esta razón, cada proteína se etiquetó con ambos fragmentos de la AC tanto en su extremo 5' y 3'. También hay que tener en cuenta que los vectores pKT25 y pKNT25 son de bajo número de copias, y los pUT18 y pUT18C, de alto número de copias. De este modo, cada una de las proteínas a analizar se clonó en las distintas versiones de los plásmidos del kit generándose una batería de plásmidos de expresión (8 plásmidos por cada interacción a estudiar, 4 con cada gen). Posteriormente, se analizó la reconstitución de la AC utilizando todas las combinaciones de plásmidos para evitar los efectos de la distinta cantidad de proteína sintetizada y la posición de la etiqueta en 5' o 3'.

Los plásmidos utilizados en este ensayo se listan en la Tabla A.1 de los Anexos y en la sección “M.5.3.5” de “Materiales y métodos” se describe la construcción de los vectores. En el apartado “M.9” se detalla el protocolo seguido para este tipo de ensayos.

En primer lugar, se comprobó si el BACTH detectaba señal con un TCS canónico, de HK y RR conocidos. Se eligió el TCS AbrA1/A2 (Rico, Yepes, et al., 2014). En la Figura R.2.23 se muestra cómo una de las combinaciones de plásmidos mostró la interacción entre AbrA1 y AbrA2. Además de este control positivo del ensayo BACTH, se realizó un control negativo con AbrA1, la HK del sistema AbrA, y Aor1. Si bien AbrA1 sale como posible HK asociada a Aor1 en STRING (apartado “R.2.1.1”), los estudios previos no muestran ninguna interacción entre estas HK. En la Figura R.2.24 se observa que no hubo interacción entre Aor1 y AbrA1.

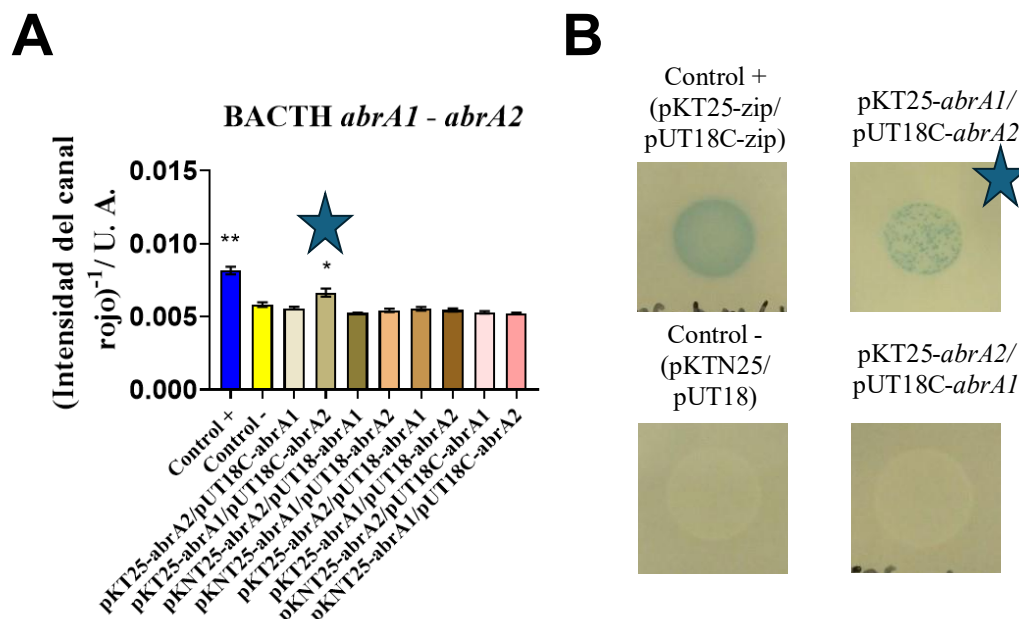


Figura R.2.23. BACTH *AbrA1*-*AbrA2*. Ensayos BACTH para comprobar la interacción entre los elementos del sistema *AbrA*, *AbrA1* (HK) y *AbrA2* (RR), como control positivo de la interacción en un TCS conocido. Un asterisco (*) indica un p-valor menor a 0,05; y dos asteriscos (**), menor a 0,01 (comparación respecto al control negativo). La interacción entre proteínas se marca con una estrella. **A.** Cuantificación del ensayo. **B.** Aspecto de las gotas de *E. coli*. Se muestran los controles del ensayo (positivo y negativo), la gota con la combinación de plásmidos que mostró interacción y un ejemplo de gota sin interacción.

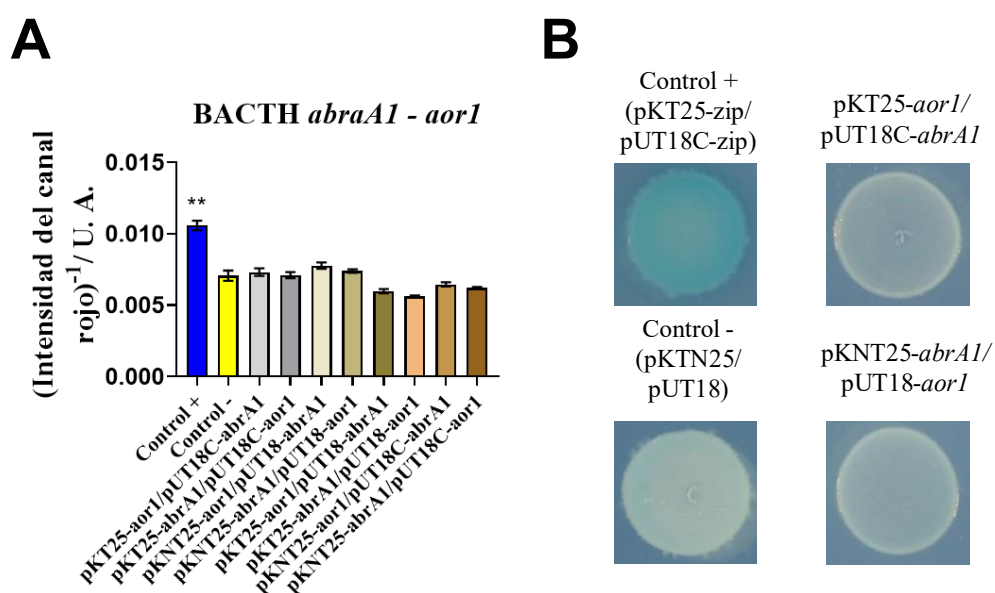


Figura R.2.24. BACTH *AbrA1*-*Aor1*. Ensayos BACTH para comprobar la falta de interacción entre dos elementos no relacionados: la HK *AbrA1* y el RR *Aor1*. Dos asteriscos (**) indican un p-valor menor a 0,01 (comparación respecto al control negativo). **A.** Cuantificación del ensayo. **B.** Aspecto de las gotas de *E. coli*. Se muestran los controles del ensayo (positivo y negativo), y dos ejemplos de gotas de *E. coli* (sin interacción entre proteínas en ambos casos).

Tras construir todos los plásmidos, se ensayaron las 3 HK de principal interés en este capítulo: SCO3750, SCO2215 y SCO2359. En los tres casos, el ensayo BACTH mostró interacción entre *Aor1* y las HK en alguna de las combinaciones de plásmidos utilizadas (el ensayo con SCO3750 se muestra

en la Figura R.2.25; el de SCO2215, en la Figura R.2.26; y el de SCO2359, en la Figura R.2.27). Es decir, estas tres HK son capaces de interactuar con Aor1 en las condiciones ensayadas.

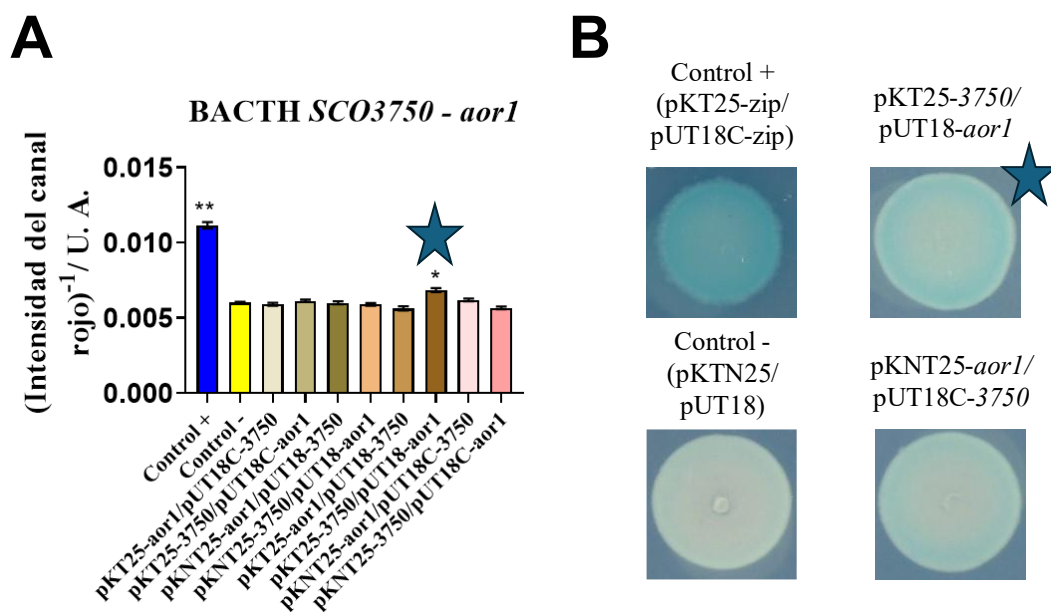


Figura R.2.25. BACTH *SCO3750*-*Aor1*. Ensayos BACTH para comprobar la interacción entre *Aor1* y *SCO3750*. Un asterisco (*) indica un p-valor menor a 0,05; y dos asteriscos (**), menor a 0,01 (comparación respecto al control negativo). La interacción entre proteínas se marca con una estrella. **A.** Cuantificación del ensayo. **B.** Aspecto de las gotas de *E. coli*. Se muestran los controles del ensayo (positivo y negativo), la gota con la combinación de plásmidos que mostró interacción y un ejemplo de gota sin interacción.

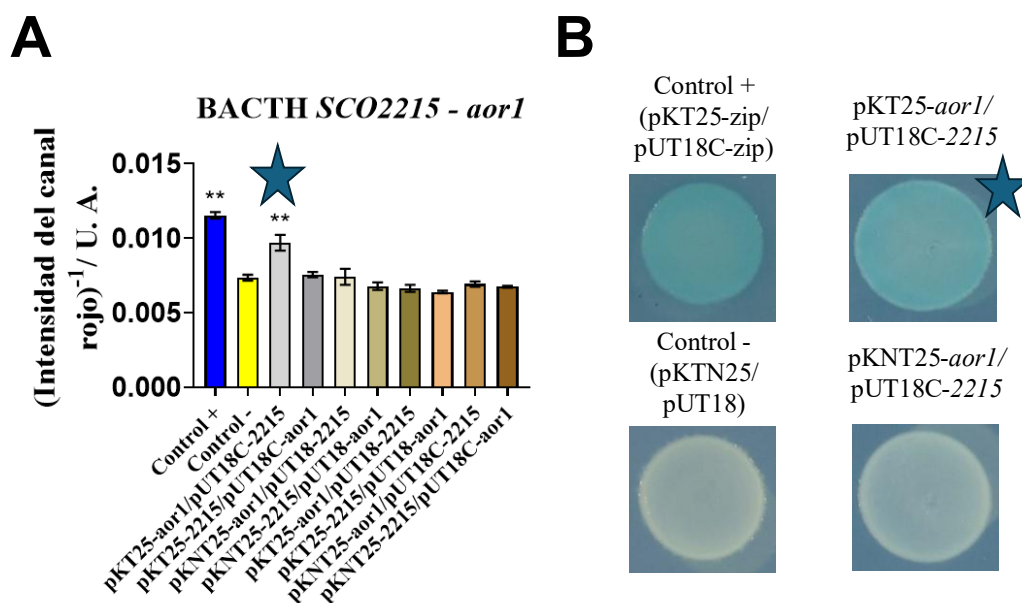


Figura R.2.26. BACTH *SCO2215*-*Aor1*. Ensayos BACTH para comprobar la interacción entre *Aor1* y *SCO2215*. Dos asteriscos (**) indican un p-valor menor a 0,01 (comparación respecto al control negativo). La interacción entre proteínas se marca con una estrella. **A.** Cuantificación del ensayo. **B.** Aspecto de las gotas de *E. coli*. Se muestran los controles del ensayo (positivo y negativo), la gota con la combinación de plásmidos que mostró interacción y un ejemplo de gota sin interacción.

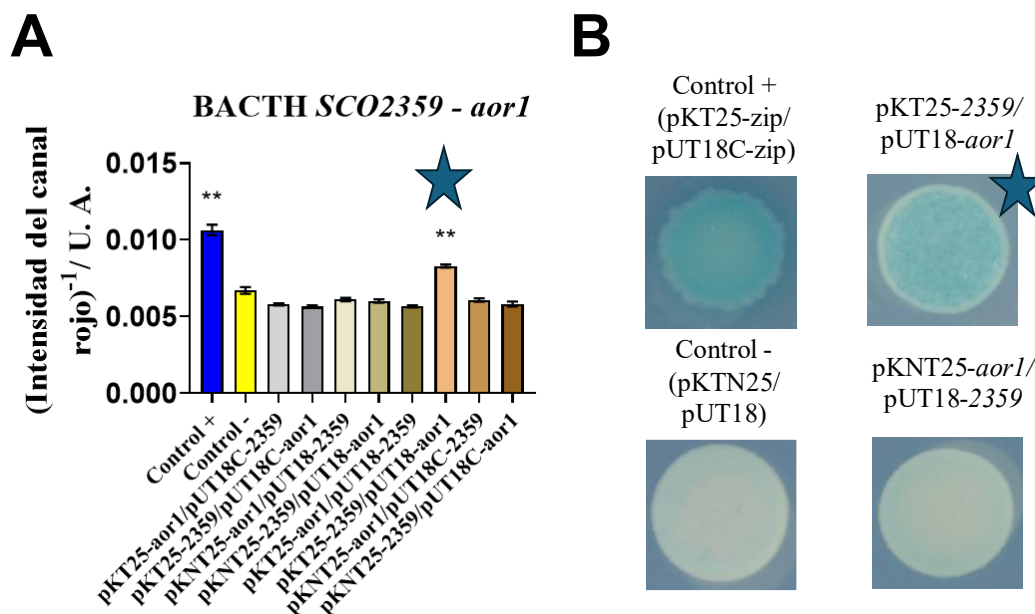


Figura R.2.27. BACTH SCO2359-Aor1. Ensayos BACTH para comprobar la interacción entre Aor1 y SCO2359. Dos asteriscos (**) indican un p-valor menor a 0,01 (comparación respecto al control negativo). La interacción entre proteínas se marca con una estrella. **A.** Cuantificación del ensayo. **B.** Aspecto de las gotas de *E. coli*. Se muestran los controles del ensayo (positivo y negativo), la gota con la combinación de plásmidos que mostró interacción y un ejemplo de gota sin interacción.

R.2.5 – Relación entre *aor1* y el sistema *abrC*

El RR Aor1 se comenzó a estudiar en el laboratorio por su similitud con el RR AbrC3 (Antoraz et al., 2017), y además, ambas HK del sistema *abrC* aparecían como candidatas asociadas a *aor1* en todas las estrategias seguidas para la búsqueda de HK, aunque no con mucha probabilidad (herramienta de predicción, STRING y comparaciones de ortólogos). De ahí el interés de analizar con más detalle si existía una relación funcional entre las quinasas del sistema AbrC y el el regulador huérfano Aor1.

Ya en trabajos previos del laboratorio se describieron los fenotipos correspondientes a los mutantes de delección de las dos HK del sistema *abrC*: una mayor producción de antibióticos respecto al silvestre en $\Delta abrC1$ y sin diferencias apreciables en $\Delta abrC2$ o $\Delta abrC1/C2$ (Rodríguez et al., 2015). Estos fenotipos no coinciden, en ninguno de los medios ensayados, con los de los mutantes $\Delta aor1$ y $\Delta SCO3750$, como uno esperaría si las HK AbrC1 y/o AbrC2 tuvieran un papel en la activación de Aor1. No obstante, se realizó de nuevo un ensayo fenotípico de las correspondientes cepas mutantes, $\Delta abrC1$, $\Delta abrC1$ y $\Delta abrC1/C2$, en los dos medios de cultivo donde los mutantes $\Delta aor1$ y $\Delta SCO3750$ mostraban un mayor fenotipo, LB e YEPD.

En la Figura R.2.28 se muestra que, de manera cualitativa, en medio LB, todos los mutantes de las HK del sistema *abrC* produjeron más ACT que el silvestre (mayor halo azul) a tiempos cortos; mientras que en YEPD, son $\Delta abrC1$ y $\Delta abrC1/C2$ los que producen más ACT a los 7 días de crecimiento. Los mutantes $\Delta aor1$ y $\Delta SCO3750$ mostraron los mismos fenotipos que en ensayos

anteriores: fenotipo muy parecido en YEPD (colonias amarillas o anaranjadas), $\Delta aor1$ retrasó la diferenciación y producción de antibióticos en LB y $\Delta SCO3750$ produjo más ACT y no diferenció como el silvestre. Por lo tanto, con estos estudios fenotípicos se descartaría una relación funcional de las quinasas del sistema AbrC con Aor1 en estos medios de cultivo.

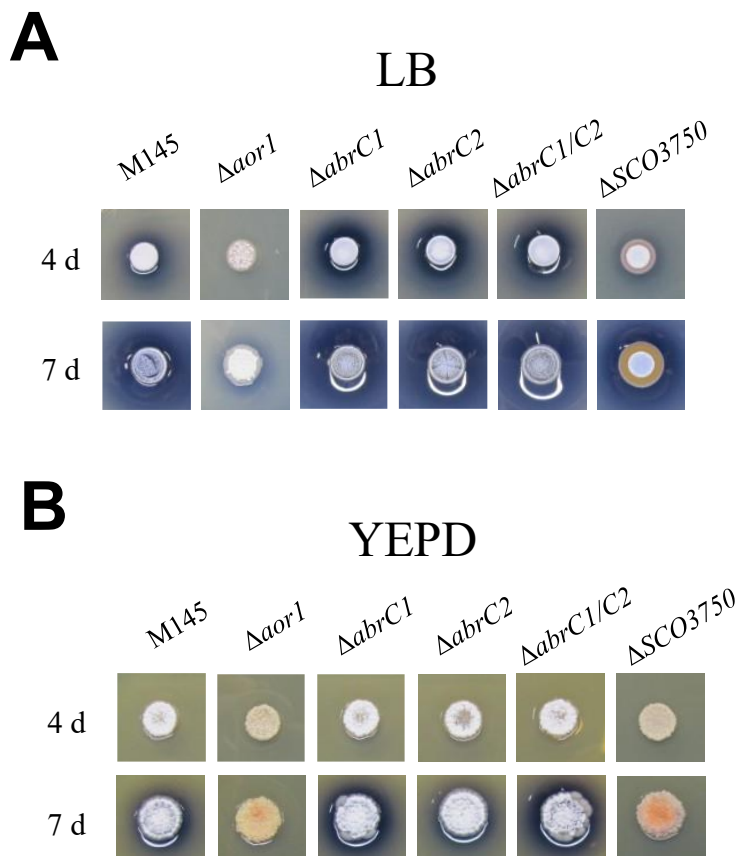


Figura R.2.28. Fenotipo de los mutantes en HK del sistema *abrC*. Fenotipo de los mutantes $\Delta aor1$, $\Delta abrC1$, $\Delta abrC2$, $\Delta abrC1/C2$ y $\Delta SCO3750$ comparados con la cepa silvestre M145. **A.** Medio LB. **B.** Medio YEPD.

Sin embargo, dado el interés del grupo en estos sistemas, para estudiar una posible relación, se abordó una estrategia diferente, que era analizar si la sobreexpresión de *aor1* tenía algún efecto de reversión de fenotipo de los mutantes en los distintos elementos del TCS AbrC.

Previamente en el laboratorio, se había construido el plásmido multicopia de sobreexpresión de *aor1* pNAor1, derivado de pN702GEM3 y con *aor1* bajo su propio promotor (Rico García, 2014). Este plásmido y el plásmido control, pN702GEM3, se introdujeron en las cepas M145, $\Delta aor1$ y en los distintos mutantes estudiados del sistema *abrC*: $\Delta abrC1$, $\Delta abrC2$, $\Delta abrC1/C2$, $\Delta abrC3$ y $\Delta abrC$ (delección en los tres genes del sistema). Así, en total, se generaron 14 cepas de las cuales se obtuvieron esporas.

Se realizó un ensayo fenotípico en gota en medio sólido utilizando $5 \cdot 10^5$ esporas/gota. Los medios ensayados en este caso fueron LB y R2YE.

RESULTADOS: CAPÍTULO 2

En la Figura R.2.29 se muestra el resultado a tiempo final, 7 días, en los dos medios empleados. Los resultados se van a ir comentando por cada fondo genético.

En primer lugar, la cepa silvestre M145 portadora de pNAor1 no mostró diferencias apreciables con su control con el plásmido vacío (primera columna de la Figura R.2.29), como ya se había descrito en trabajos previos del laboratorio (Antoraz et al., 2017).

En cuanto al mutante $\Delta aor1$, como ya habíamos comprobado con anterioridad, la sobreexpresión de *aor1* no complementaba el fenotipo a uno silvestre. Sí se pudo observar, no obstante, que, en los dos medios de cultivo ensayados, al sobreexpresar *aor1*, la densidad celular (tamaño de la gota) disminuía respecto al control. Es decir, en el mutante $\Delta aor1$, la sobreexpresión de *aor1* resultó levemente tóxica (segunda columna de la Figura R.2.29).

Respecto a la relación entre esta sobreexpresión de *aor1* y el sistema *abrC*, se observaron varios efectos. En los mutantes $\Delta abrC1$ y $\Delta abrC2$, la sobreexpresión de *aor1* también tuvo un efecto perjudicial: las gotas de esporas crecieron muy poco, como colonias dispersas. Este efecto se repitió, incluso más agravado, en el mutante $\Delta abrC1/C2$. Por otro lado, el mutante $\Delta abrC3$, que posee las dos HK, pero carece del RR, presentó menor crecimiento que los controles (plásmido vacío) al llevar el plásmido pNAor1, pero creció. Por último, el mutante en todos los genes del sistema *abrC*, $\Delta abrC$ (“ $\Delta abrC$ ent.” en la Figura, de “entero”), creció bien en todas las condiciones (Figura R.2.29).

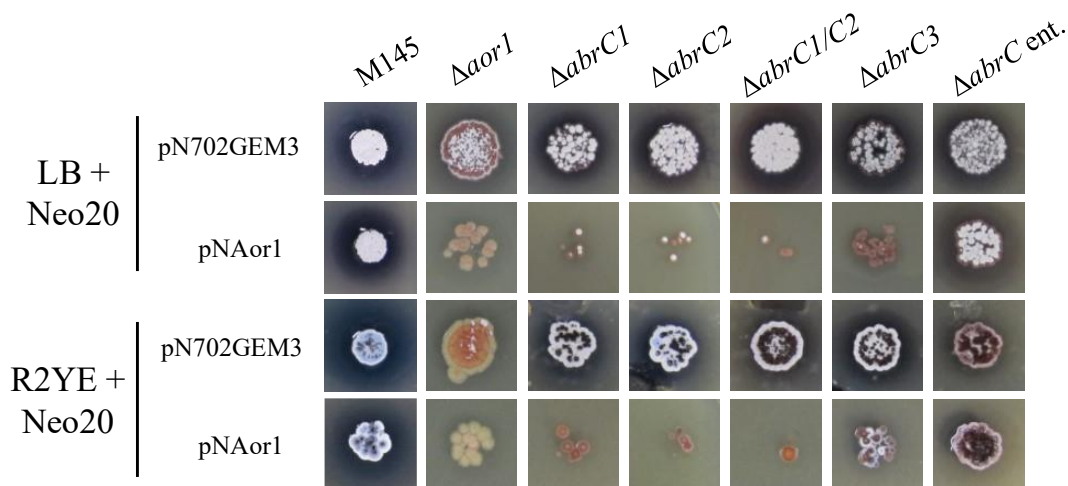


Figura R.2.29. Sobreexpresión de *aor1* en mutantes *abrC*. Fenotipo de la sobreexpresión de *aor1* en las cepas M145, $\Delta aor1$ y los mutantes del sistema *abrC* en R2YE y LB suplementados con neomicina. En todos los casos se compara el fenotipo con las cepas que llevan el plásmido vacío (pN702GEM3).

Este ensayo muestra que la sobreexpresión de *aor1* resulta más tóxica en ausencia de alguna o las dos HK del sistema *abrC*. Esto podría indicar un papel de estas quinasas en la inactivación de Aor1, probablemente actuando de fosfatasa en este caso.

Para comprobar que estos efectos se debían realmente a la mayor expresión de *aor1*, se valoró la cantidad de proteína Aor1 en los cultivos mediante Western blot. Se eligieron dos cepas cuyo

crecimiento no se veía inhibido por el plásmido pNAor1 en medio LB: $\Delta aor1$ y $\Delta abrC$. Ambos mutantes, con los dos plásmidos, se cultivaron en LB con neomicina durante 4 días, se extrajeron las proteínas del micelio y se realizó el Western blot con los anticuerpos α -Aor1. En la Figura R.2.30 se observa que hay proteína Aor1 en los extractos de micelio con plásmido pNAor1 a los 4 días (banda tenue a la altura de 25 kDa). Estos resultados corroboran que los efectos anteriores se debían a una mayor expresión de *aor1* cuya significación se aborda en el apartado de Discusión.

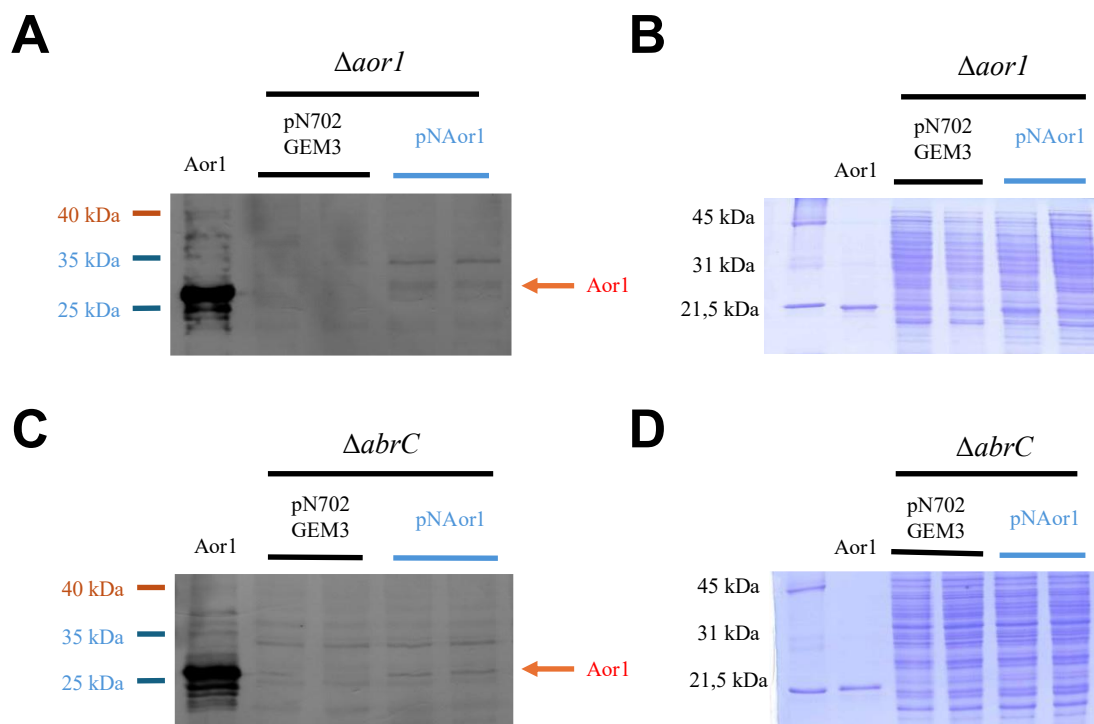


Figura R.2.30. Comprobación de la sobreexpresión de *aor1*. En todos los casos se incluyó una muestra de proteína Aor1 purificada como control positivo. La altura a la que se ve Aor1 está marcada con una flecha en los Western blot. La figura muestra los Western blot con anticuerpo α -Aor1 de los extractos de proteínas de los cultivos líquidos (A para $\Delta aor1$, C para $\Delta abrC$) y los geles de SDS-PAGE de dichos extractos (B para $\Delta aor1$, D para $\Delta abrC$) teñidos con Coomassie. Los extractos de las células con el pN702GEM3 se muestran en negro, y los extractos de células con pNAor1, en azul. Se muestran dos réplicas de cada condición.

R.2.6 – Conclusiones de este capítulo

Los fenotipos observados en los mutantes de delección de las HK identificadas mediante las diferentes herramientas utilizadas (de predicción y alineamientos de HK asociadas a ortólogos de Aor1), SCO3750, SCO2215 y SCO2359, muestran una relación funcional de estas HK con Aor1 en algunos de los medios de cultivo utilizados. Por otro lado, se ha demostrado que, efectivamente, son capaces de interactuar con Aor1 (con la metodología BACTH) en ciertas condiciones nutricionales (como se ve en los ensayos fenotípicos). Además, el sistema AbrC también presenta una relación funcional con Aor1 dada la toxicidad que genera la sobreexpresión de *aor1* en ausencia de alguno de los genes del sistema AbrC.

Capítulo 3: estudio metabolómico

De los sistemas de dos componentes abordados y mencionados en esta tesis, los mutantes de delección en el sistema *abrA* y en *aor1* fueron caracterizados por RNA-Seq (Antoraz Martín, 2018; Antoraz et al., 2017), mientras que el mutante en *bfr*, como se detalló en el capítulo 1, fue caracterizado por proteómica (García-Martín et al., 2024). Para profundizar en el estudio de estos elementos implicados en la producción de antibióticos y estudiar cómo la carencia de estos genes afecta a la fisiología y al metabolismo dentro de *S. coelicolor*, se decidió realizar un estudio de metabolómica de cada una de estas cepas mutantes para compararla con la cepa silvestre M145.

Como ya se ha mencionado en el transcurso de esta tesis doctoral, se realizó una estancia internacional de tres meses en el laboratorio del Prof. Dr. Gilles P. van Wezel, en el Instituto de Biología de la Universidad de Leiden (Países Bajos). Debido a la amplia experiencia de este grupo de investigación en *Streptomyces* y al equipamiento y personal especializados que disponen, la metabolómica fue el principal objetivo de la estancia.

Además de profundizar en estos sistemas ya estudiados previamente en el laboratorio, se aprovechó la oportunidad para caracterizar los mutantes de interés de las HK estudiados en el capítulo 2 de la tesis y que se disponían en el momento de realizar la estancia: Δ SCO3750, Δ SCO2359 y Δ SCO2359/2358.

Así, en este capítulo se va a describir el estudio metabolómico realizado en 7 cepas: M145 (cepa silvestre), Δ bfr, Δ abrA, Δ aor1, Δ SCO3750, Δ SCO2359 y Δ SCO2359/2358.

R.3.1 – Realización del ensayo metabolómico

R.3.1.1 – Selección de medio de cultivo

Algunos de los medios de cultivo complejos, en general, producen mucho ruido de fondo en el cromatógrafo acoplado a espectrometría de masas, si bien es en este tipo de medios donde se han encontrado los fenotipos más característicos de las cepas estudiadas. En las condiciones experimentales del laboratorio donde se realizó la estancia, tres medios de cultivo estaban optimizados para ensayos metabolómicos, siendo dos de ellos complejos y un medio mínimo. Estos eran R2YE, ISP2 (complejos) y StrepMM (mínimo). Antes de proceder con el estudio, se quiso ver en estos medios qué diferencias fenotípicas existían entre las cepas mutantes y la cepa silvestre.

Por lo tanto, las 7 cepas de estudio se sembraron en gotas de esporas ($5 \cdot 10^5$ esporas) sobre los 3 medios y se observó el fenotipo a día 7 (día de recolección de las muestras metabolómicas). Estos fenotipos se muestran en la Figura R.3.1.

El medio ideal para este tipo de ensayos es el medio mínimo, StrepMM; no obstante, en este medio, los mutantes no mostraron un fenotipo fuerte. Algunos mutantes, como Δbfr y $\Delta aor1$, mostraban menor diferenciación (micelio menos blanquecino), y otros, como $\Delta abrA$ y $\Delta SCO3750$, producían más ACT que el silvestre (halo o borde más oscuro) (primera fila de la Figura R.3.1).

En medio R2YE, también se observó una mayor producción de ACT por parte de $\Delta abrA$ y $\Delta SCO3750$. Al comparar la morfología de las gotas y su coloración, se veían diferencias entre todas las cepas estudiadas, pero no muy significativas (segunda fila de la Figura R.3.1).

Finalmente, en medio ISP2, se obtuvieron fenotipos interesantes y diferentes. El mutante Δbfr formó gotas rojas, sin micelio aéreo, similar a lo ocurrido en LB. El mutante $\Delta abrA$, igual que en los medios anteriores, produjo más ACT que el silvestre (leve halo oscuro alrededor), lo cual manifestaba, de nuevo, su papel como regulador negativo de la producción de antibióticos (Rico, Yepes, et al., 2014). Los sistemas relacionados con *aor1* mostraron fenotipos interesantes: $\Delta aor1$ no diferenció y formó micelio con poca RED y con bordes rugosos e irregulares; $\Delta SCO3750$ mostró un fenotipo intermedio entre la cepa silvestre y $\Delta aor1$, con diferenciación en el centro y bordes rugosos y amarillos; las gotas de $\Delta SCO2359$ eran similares a las de $\Delta aor1$, con bordes más pequeños y mayor coloración roja; y el mutante doble $\Delta SCO2359/2358$ recuperaba la diferenciación (tercera fila de la Figura R.3.1).

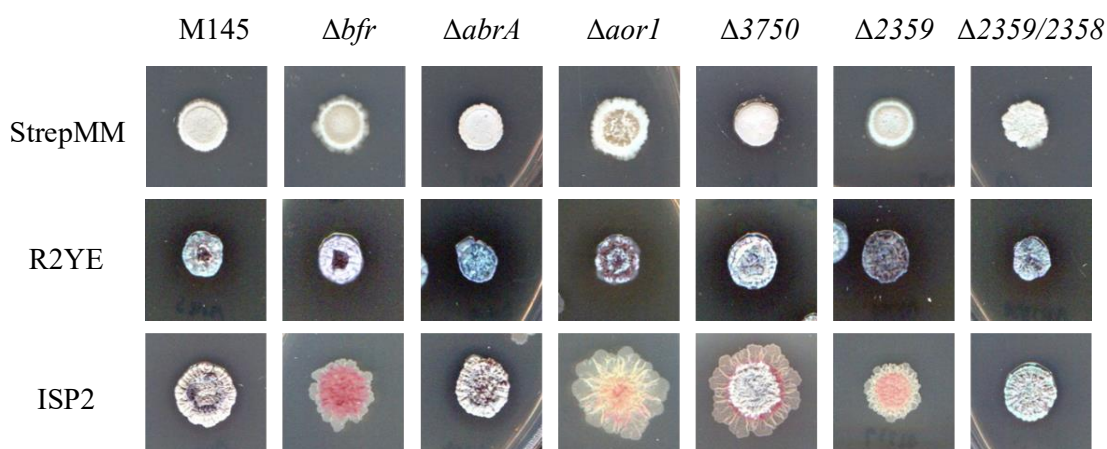


Figura R.3.1. Fenotipo de la cepa silvestre y los mutantes en los tres medios compatibles con el ensayo metabólico. Fenotipo tras 7 días de crecimiento.

Se eligió, entonces, el medio ISP2 porque era el medio en el que se manifestaban unas diferencias fenotípicas más reseñables de las cepas mutantes respecto a la silvestre.

Además, se realizó un antibiograma en este medio para comprobar si, además de diferencias fenotípicas, había distinta actividad antibiótica. Este antibiograma se realizó sobre gotas de las cepas estudiadas en ISP2, crecidas durante 7 días, y con una cobertera de *B. subtilis* en agar blando (apartado “M.10.2” de “Materiales y métodos”). En la Figura R.3.2 se muestran los resultados. El mutante Δbfr no mostró actividad antibiótica contra *B. subtilis* en estas condiciones. El mutante $\Delta abrA$, como era esperable al ser *AbrA* un regulador negativo de la producción de antibióticos,

RESULTADOS: CAPÍTULO 3

mostró mayor actividad antibiótica que el silvestre, aunque de manera leve, sin diferencias significativas. El mutante $\Delta aor1$ tampoco mostró actividad antibiótica. Los mutantes en las HK estudiadas, $\Delta SCO3750$ y $\Delta SCO2359$, mostraron menor actividad antibiótica que el silvestre. Finalmente, el mutante doble, $\Delta SCO2359/2358$, mostró mayor actividad que el silvestre, sin diferencia significativa debido a la variación de las medidas.

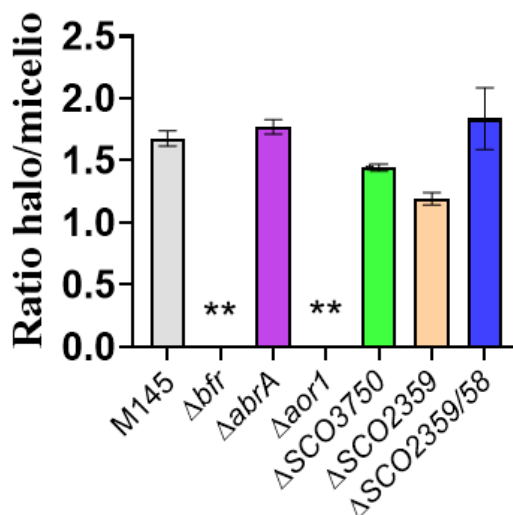


Figura R.3.2. Actividad antibiótica en ISP2. Antibiograma realizado contra *B. subtilis* con gotas de micelio ($5 \cdot 10^5$ esporas) crecidas en ISP2 durante 7 días. Dos asteriscos (**) indican un p-valor menor a 0,01 (comparación respecto a la cepa silvestre).

Por lo tanto, el medio ISP2 era un medio de cultivo donde las cepas estudiadas mostraban distinta actividad antibiótica y distintos fenotipos, lo cual hacía este medio idóneo para detectar diferencias en los metabolomas que nos ayudaran a explicar estas diferencias observadas y los procesos en los que estaban implicadas las distintas proteínas.

R.3.1.2 – Extracción de compuestos

Una vez seleccionado el medio, se sembraron en césped 4 placas de ISP2 por cada cepa y se incubaron durante 7 días. Además, 4 placas de ISP2 sin microorganismo se utilizaron como control.

Los metabolitos de los cultivos sólidos y de las placas control se extrajeron con acetato de etilo y las muestras se procesaron en el cromatógrafo acoplado a espectrometría de masas. Todo el proceso se describe detalladamente en el apartado “M.13.1” (“Materiales y métodos”).

Además de los extractos del medio control y de las cepas de estudio, se incluyeron unos controles de calidad en el cromatógrafo, que consistían en una mezcla de todos los extractos. Las muestras se inoculaban de manera aleatorizada, en lotes (un primer lote con una muestra de cada tipo, con orden aleatorio), y entre cada lote se procesó un control de calidad.

R.3.2 – Análisis inicial de los datos

En el apartado “M.13.2” se describen los parámetros empleados en los distintos programas y herramientas informáticas utilizadas.

Una vez procesados los datos crudos en MZMine, se realizaron análisis de componentes principales (PCA) en MetaboAnalyst. El objetivo del PCA es representar con cuántas dimensiones se puede explicar la varianza de, al menos, el 90 % de los datos, mediante regresiones lineales con las variables analizadas. Así, se generan unas variables, los PC, y se representan los dos primeros PC (gráfico bidimensional) o tres (tridimensional) y se observa si los grupos se solapan o se diferencian.

En primer lugar, se evaluó la calidad de los datos obtenidos mediante un PCA que incluye las muestras del blanco (medio ISP2) y los controles de calidad. En el apartado A de la Figura R.3.3 se observa el resultado de este PCA: los controles de calidad solapan con todas las muestras de cepas analizadas, y las muestras del medio se separaban de ellas. Este PCA indica que el aparato no sufrió ningún problema durante el procesamiento de datos (los controles de calidad corrieron bien y solapan con todas las muestras) y que los metabolitos extraídos de las cepas son distintos a los metabolitos del medio estéril.

Después, se realizó el PCA solo con los datos de los metabolomas de las distintas cepas de *S. coelicolor* estudiadas. Solo en el caso del mutante Δbfr , una réplica estaba bastante alejada del resto, en las otras 6 cepas las cuatro réplicas se agrupaban bastante bien. Los metabolomas más parecidos (más próximos en la representación del PCA) fueron los de la cepa silvestre, Δbfr , $\Delta abrA$ y $\Delta SCO2359$. El metaboloma de $\Delta aorI$ no solapó con los metabolomas de los mutantes en las HK estudiadas en este trabajo ($\Delta SCO3750$ y $\Delta SCO2359$) y el metaboloma del mutante doble $\Delta SCO2359/58$ también se alejó del resto (Figura R.3.3 B).

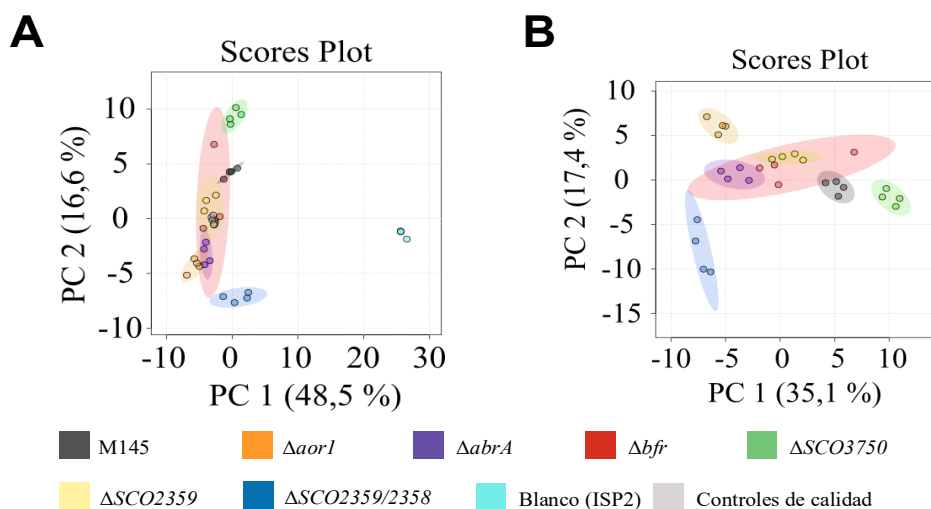


Figura R.3.3. PCA del ensayo metabolómico. A. PCA con controles de calidad y muestras blanco. **B.** PCA con las muestras de las cepas analizadas.

RESULTADOS: CAPÍTULO 3

La herramienta MetaboAnalyst también genera un mapa de calor con una normalización de las intensidades de los diferentes iones detectados en todas las muestras, comparando todas las muestras entre sí. A nivel visual, cada metaboloma (fila) posee distintas intensidades de los compuestos detectados. El mapa de calor agrupa, a modo de árbol filogenético, los metabolomas parecidos, y acorde a este gráfico, los metabolomas de los mutantes $\Delta SCO3750$ y $\Delta SCO2359$ (mutantes en las HK estudiadas) son más parecidos al de la cepa silvestre (Figura R.3.4). Este gráfico aporta una visión general de una comparación de todos los metabolomas, sin entrar en las comparaciones realizadas entre cada mutante y el silvestre, mostradas en el siguiente apartado y en los Anexos.

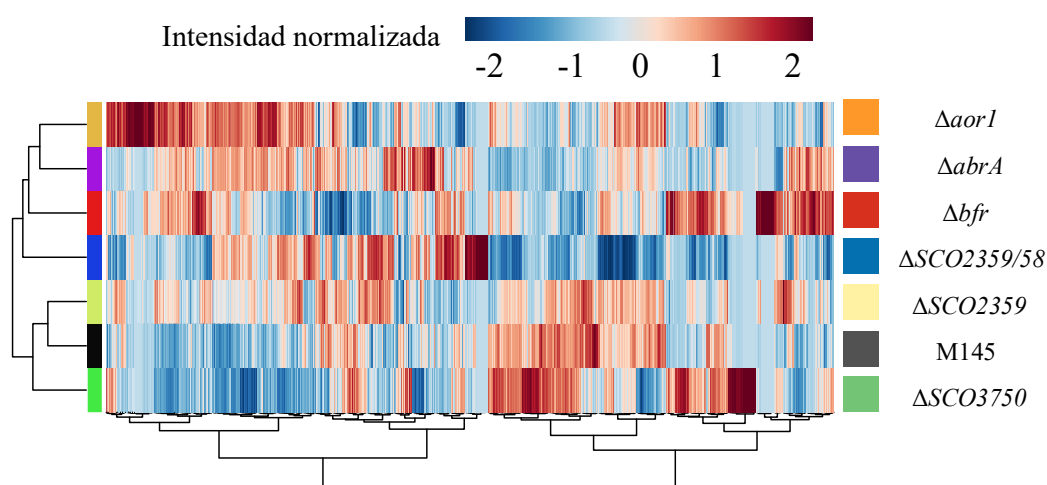


Figura R.3.4. Mapa de calor de los metabolomas.

Estos análisis con MetaboAnalyst mostraron que, a nivel técnico, los datos fueron bien procesados y, a nivel biológico, los metabolomas eran diferentes.

R.3.3 – Estudio descriptivo de los metabolomas

Las intensidades de los picos de los cromatogramas no reflejan exactamente la concentración real de las moléculas detectadas, si bien a mayor intensidad de pico, mayor cantidad de molécula se ha detectado.

Para comparar los metabolomas de los distintos mutantes respecto al metaboloma de la cepa M145 y tener una idea orientativa, aunque no absoluta, de la abundancia de los compuestos generados, se realizaron las comparaciones por parejas (al contrario que la comparación general del apartado anterior) y se han categorizado los compuestos mediante la representación visual que ofrece el software Cytoscape a partir de los datos de cuantificación de MZMine. Cytoscape representa las moléculas en forma de nodos con sectores de colores, y cada sector representa la intensidad de señal en una de las cepas analizadas. De esta forma, en las Tablas A.3-A.8 de los Anexos, que contienen los datos de metabolómica, las intensidades corresponden al sector mayoritario en el nodo de

Cytoscape, y en el caso de que uno de los sectores ocupase tres cuartos o más del nodo, se ha indicado con más intensidad de color.

Además, Cytoscape realiza redes moleculares que conectan compuestos con estructura similar según los datos de espectrometría de masas; no obstante, la mayoría de los compuestos analizados aparecen en Cytoscape como nodos aislados, y aquellos conectados, muy pocos, son compuestos que no se pudieron anotar. No hubo tendencia estructural o agrupaciones en redes moleculares de los metabolitos de interés analizados.

A continuación, se describen algunas de las predicciones realizadas por el programa SIRIUS y las anotaciones tentativas, mediante comparación con las bases de datos públicas, de los compuestos diferencialmente representados en las distintas comparaciones a partir de las masas exactas. Para ver con detalle todos los compuestos analizados, ver las Tablas A.3-A.8 de los Anexos al final de esta tesis doctoral.

Las masas/carga (m/z) de las moléculas detectadas corresponden a aductos (iones formados con carga positiva en las condiciones utilizadas). Así, como se describe en el apartado “M.13.2” de “Materiales y métodos”, se han calculado las masas reales de las moléculas con todos los posibles aductos formados ($[M + H]^+$, $[M - H_2O + H]^+$, $[M - 2H_2O + H]^+$, $[M + NH_4]^+$, $[M + Na]^+$ y $[M + K]^+$) para comparar estas con las bases de datos (Figura M.3 en “Materiales y métodos”).

En los siguientes apartados, se describen las anotaciones tentativas de los compuestos detectados en los metabolomas de los mutantes estudiados y comparados con el metaboloma de la cepa silvestre. Las características de los compuestos anotados se describen en tablas en cada apartado. Para mayor detalle de la información del programa SIRIUS y de los compuestos detectados y no anotados, consultar los Anexos al final de esta tesis (Tablas A.3-A.8).

R.3.3.1 – Metaboloma del mutante Δbfr

En general, en medios ricos, el mutante Δbfr se caracteriza por su menor producción de ACT, principalmente, respecto a la cepa silvestre, como ocurre en ISP2 (Figura R.3.1). En la comparación de sus metabolomas, solo se detecta un posible derivado de ACT que se pueda anotar: la molécula con $m/z = 631,1083$ podría ser un aducto $[M - 2H_2O + H]^+$ de ácido actinorródico o $[M + H]^+$ de γ -actinorrodina. Esta molécula se detectó con mayor intensidad en la cepa silvestre.

Entre otras moléculas con mayor intensidad también en la cepa silvestre, la molécula con $m/z = 394,1722$ podría ser un aducto $[M + NH_4]^+$ de riboflavina. El resto de las moléculas son descritas por SIRIUS como derivados de aminoácidos y péptidos, poliquétidos, flavonas y un nucleósido de pirimidina (Anexos: Tabla A.3).

RESULTADOS: CAPÍTULO 3

La mayoría de las moléculas detectadas poseen mayor intensidad en el mutante Δbfr . Entre ellas se encuentran ácidos grasos, que podrían derivar de un ácido hidroxidodecanedioico y de un monoacilglicerol 16:1, y amidas de ácidos grasos (aminoácidos unidos a un ácido graso). También se detectan mayores cantidades de lo que podría ser germicidina A o isogermicidina A (Aoki et al., 2011) en los extractos de este mutante (Tabla R.3.1). Las otras moléculas detectadas, sin caracterizar, son descritas por SIRIUS como derivados de benceno y fenoles, aminoácidos y algunos flavonoides (Anexos: Tabla A.3).

Tabla R.3.1. Compuestos anotados en la comparación del metaboloma de Δbfr y M145. Metabolitos diferencialmente más representados anotados en la comparación de los metabolomas de la cepa silvestre M145 y el mutante Δbfr . En gris se muestran los compuestos sobrerrepresentados en M145, y en rojo, en Δbfr .

CATEGORÍA	COMPUESTO	MASA	FÓRMULA
ACT	Ácido actinorrodínico	666,1221	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆
	γ -ACT	630,1009	C ₃₂ H ₂₂ O ₁₄
Reacciones redox	Riboflavina	376,1383	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆
Lípidos	Ácido hidroxidodecanedioico	246,1467	C ₁₂ H ₂₂ O ₅
	Monoacilglicerol 16:1	328,2614	C ₁₉ H ₃₆ O ₄
Germinación	Germicidina A Isogermicidina A	196,1099	C ₁₁ H ₁₆ O ₃

R.3.3.2 – Metaboloma del mutante $\Delta abrA$

En las condiciones estudiadas en el laboratorio, el sistema AbrA actúa como regulador negativo de la producción de antibióticos, y el mutante $\Delta abrA$ produce mayores cantidades de ACT, entre otros. Sin embargo, los posibles compuestos relacionados con ACT, que incluyen intermediarios e isoformas, están más representados en la cepa silvestre. En el metaboloma de $\Delta abrA$ solo se detecta en mayor intensidad la molécula con $m/z = 445,1132$, también detectada en la comparación entre metabolomas de M145 y $\Delta aorI$ (ver más adelante), cuya masa y fórmula, C₂₂H₂₀O₁₀, coinciden con la granaticina o litomicina, una molécula que no ha sido detectada en *S. coelicolor*, pero generada en procesos biosintéticos similares al de la ACT (Ichinose et al., 2001) (Tabla R.3.2). En ISP2 la sobreproducción de ACT vista en $\Delta abrA$ en otros medios podría estar reducida, aunque hay mayor actividad antibiótica (Figura R.3.2) y se producen otros metabolitos.

Posibles germicidinas vuelven a ser detectadas en esta comparación. Mientras que la germicidina D/surugapirona A o la germicidina H posee mayor intensidad en $\Delta abrA$, otra posible germicidina (B, C o isogermicidina B) tienen mayor intensidad en la cepa silvestre.

En la cepa silvestre, comparada con $\Delta abrA$, se detectan mayores cantidades de un deoxirribonucleósido de purina y, al igual que en la comparación con Δbfr , de una posible riboflavina.

Atendiendo a la masa, la molécula de $m/z = 164,1066$ podría ser una N-hexanoil-homoserina lactona (Salehi-Najafabadi et al., 2024). El resto de las moléculas detectadas no siguen un patrón definido e incluyen varios poliquétidos, fenilpropanoides y derivados de lípidos (Anexos: Tabla A.4).

En el metaboloma de $\Delta abrA$, al igual que en el de Δbfr , se detectan algunos lípidos que podrían corresponder a un monoacilglicerol 17:1, a aminoácidos unidos a un ácido graso y a un derivado de esfingolípidos unido a glucosa o galactosa de fórmula $C_{40}H_{79}NO_8$ (Tabla R.3.2). SIRIUS no pudo asignar una clase química a varios de los compuestos detectados, y muchos otros son descritos como derivados de aminoácidos (Anexos: Tabla A.4)

Tabla R.3.2. Compuestos anotados en la comparación del metaboloma de $\Delta abrA$ y M145. Metabolitos diferencialmente más representados anotados en la comparación de los metabolomas de la cepa silvestre M145 y el mutante $\Delta abrA$. En gris se muestran los compuestos sobrerrepresentados en M145, y en violeta en $\Delta abrA$.

CATEGORÍA	COMPUESTO	MASA	FÓRMULA
ACT	Dihidrokalafungina SEK34	302,0790	$C_{16}H_{14}O_6$
	THK-OH/DHKred-OH	320,0896	$C_{16}H_{16}O_7$
	Actinorrodina	634,1323	$C_{32}H_{26}O_{14}$
	ϵ' -ACT	648,1112	$C_{32}H_{26}O_{15}$
Germinación	Germicidina B Isogermicidina B Germicidina C	182,0943	$C_{10}H_{14}O_3$
Nucleótidos	Deoxirribonucleósido de purina	236,0909	$C_{10}H_{12}N_4O_3$
Reacciones redox	Riboflavina	376,1383	$C_{17}H_{20}N_4O_6$
Quorum sensing	N-hexanoil-homoserina lactona	199,1208	$C_{10}H_{17}NO_3$
ACT	Posible litomicina	444.1056	$C_{22}H_{20}O_{10}$
Germinación	Germicidina D Germicidina H	168,0786	$C_9H_{12}O_3$
Lípidos	Monoacilglicerol 17:1	342,277	$C_{20}H_{38}O_4$
	N-palmitoil fenilalanina	403,3086	$C_{25}H_{41}NO_3$
	N-estearoil prolina	381,3243	$C_{23}H_{43}NO_3$
	D-galactosil/glucosil-N- hexadecanoilesfingánina	701,5806	$C_{40}H_{79}NO_8$

El mapa de calor general de la metabolómica apuntaba a una similitud entre los metabolomas de $\Delta abrA$ y Δbfr (Figura R.3.4), y el análisis descriptivo realizado corrobora esta similitud, con una mayor cantidad de compuestos lipídicos y aminoácidos detectados en estos mutantes.

RESULTADOS: CAPÍTULO 3

R.3.3.3 – Metaboloma del mutante $\Delta aorI$

El mutante $\Delta aorI$ presenta un retraso considerable en la diferenciación y en la producción de antibióticos, como también manifiesta su fenotipo en ISP2 (Figura R.3.1).

Algunas moléculas detectadas en mayor intensidad en el silvestre respecto al mutante $\Delta aorI$ corroboran el defecto de este mutante en el metabolismo secundario de *S. coelicolor* observado fenotípicamente. Por ejemplo, la molécula con $m/z = 243,1588$ podría ser la hormona A-factor o 2S-isocaprilol-3S-hidroxitmetil- γ -butirolactona, involucrada en la esporulación y la regulación del metabolismo secundario, en general como activadora al aplicarse de manera exógena (Hara et al., 1983; Horinouchi & Beppu, 1992; Onaka et al., 1998).

Por otro lado, algunos intermediarios de la síntesis de ACT e isoformas de la propia ACT, cuyas fórmulas coinciden con las predicciones de SIRIUS, se encuentran en mayor cantidad en la cepa silvestre (Tabla R.3.3). También hay una molécula, con $m/z = 445,1132$, de naturaleza flavonoide, cuyas características coinciden con la granaticina o litomicina (Ichinose et al., 2001), como se comentó en el apartado anterior sobre $\Delta abrA$. Esta molécula podría ser un derivado de la ruta de síntesis de ACT.

Respecto a RED, aunque en general este antibiótico se sintetiza en menores cantidades en $\Delta aorI$ en los medios de cultivo empleados, se detectó en el metaboloma de este mutante una mayor intensidad de estreptorrubina o un posible derivado como metilciclododecilprodiginina o butilciclohexilprodigiosina (Marshall et al., 2020). Otra molécula de $m/z = 408,2644$ podría corresponder a otro derivado, la 23-cetoundecilprodiginina. En ISP2 este mutante parece producir mayores cantidades de estos compuestos que la cepa silvestre.

Algunos compuestos no anotados, del tipo poliquétido o fenilpropanoide, poseen mayor intensidad en la cepa silvestre (Anexos: Tabla A.5). Estos podrían ser intermediarios de alguna ruta biosintética, conocida o no.

Otra molécula con mayor intensidad en los extractos de M145 ($m/z = 261,0755$) podría corresponder a la dehipoxantina fualosina, un derivado de la fualosina, necesaria para la síntesis de menaquinona en *S. coelicolor*. La menaquinona (o vitamina K) interviene en el transporte de electrones (Joshi et al., 2018).

Varios compuestos detectados de forma diferencial entre ambos metabolomas tienen naturaleza lipídica, mas no hay un patrón identificable al comparar ambas cepas. Algunos lípidos poseen mayor intensidad en las muestras de M145, como los posibles ácido hidroxidodecanoico (Chun et al., 2007; Mo et al., 2008), ácido hidroximirístico (Chun et al., 2007), hexadecasfinganina (Balakrishnan et al., 2025) y fosfatidiletanolamina 16:0. Otros lípidos son más abundantes en el mutante $\Delta aorI$, anotados como palmitoil fosfato y derivados de fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina (Tabla R.3.3).

Por otro lado, muchos compuestos detectados con mayor intensidad en $\Delta aor1$ tienen naturaleza proteínica o derivada de aminoácidos (Anexos: Tabla A.5). Si bien de forma orientativa se pueden anotar como posibles combinaciones de algunos aminoácidos, lineales o cíclicos por pérdida de agua, no se puede asegurar con certeza la identidad de estas posibles moléculas, si bien parece que la delección de *aor1* altera de forma notable la producción de moléculas de esa naturaleza.

Tabla R.3.3. Compuestos anotados en la comparación del metaboloma de $\Delta aor1$ y M145. Metabolitos diferencialmente más representados anotados en la comparación de los metabolomas de la cepa silvestre M145 y el mutante $\Delta aor1$. En gris se muestran los compuestos sobrerepresentados en M145, y en naranja, en $\Delta aor1$.

CATEGORÍA	COMPUESTO	MASA	FÓRMULA
<i>Quorum sensing</i>	A-Factor	242,1518	C ₁₃ H ₂₂ O ₄
ACT	SEK4B	318,0739	C ₁₆ H ₁₄ O ₇
	DHKRED	304,0945	C ₁₆ H ₁₆ O ₆
	THK-OH/DHKred-OH	320,0896	C ₁₆ H ₁₆ O ₇
	γ' -ACT	632,1166	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₄
	ε -ACT	648,1112	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅
	ε' -ACT	648,1112	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₅
	Ácido actinorrodínico	666,1221	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆
	Posible litomicina	444.1056	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₀
Transporte de electrones	Dehipoxantina fualosina	296,0896	C ₁₄ H ₁₆ O ₇
Lípidos	Ácido hidroxidodecanoico	216,1725	C ₁₂ H ₂₄ O ₃
	Ácido hidroximirístico	244,2038	C ₁₄ H ₂₈ O ₃
	Hexadecasfinganina	273,2668	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂
	Fosfatidiletanolamina 16:0	467,2648	C ₂₁ H ₄₂ NO ₈ P
RED	Estreptorrubina B	391,2624	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O
	23-cetoundecilprodiginina	407,2573	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₂
Lípidos	Palmitoil fosfato	336,2066	C ₁₆ H ₃₃ O ₅ P
	Hexanoil-heptanoil-glicero-3-fosfocolina Fosfatidilcolina 13:0 Fosfatidiletanolamina (8:0/8:0)	467.2648	C ₂₁ H ₄₂ NO ₈ P
	Linoleoil-glicero-3-fosfoetanolamina Lisofosfatidilcolina 15:2 Lisofosfatidiletanolamina 18:2	477.28554	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P
	Lisofosfatidilcolina 16:2	491.30119	C ₂₄ H ₄₆ NO ₇ P

RESULTADOS: CAPÍTULO 3

	Lisofosfatidilcolina 20:4	543.33249	C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P
--	---------------------------	-----------	---

R.3.3.2 – Metaboloma del mutante Δ SCO3750

El mutante Δ SCO3750 mostró, en ISP2, un fenotipo intermedio entre la cepa silvestre (con micelio aéreo en el centro de la gota de esporas cultivada) y Δ aor1 (con bordes amarillos y rugosos) (Figura R.3.1).

Respecto a la producción de ACT, las posibles formas finales de ACT detectadas (molécula de m/z = 631,1082), que pueden ser el ácido actinorrodínico o la γ , ϵ' o ϵ -ACT, poseen mayor intensidad en el mutante Δ SCO3750 que en la cepa silvestre, así como un posible aducto $[M + NH_4]^+$ (m/z = 336,1078) de SEK4b, un intermediario de la síntesis de ACT. Por otra parte, en el metaboloma de la cepa silvestre se detecta con mayor intensidad GTRI-02, otro producto posible del clúster *act* (Wu et al., 2017) (Tabla R.3.4).

Entre los compuestos más abundantes en la cepa silvestre hay algunos lípidos, como posibles derivados de palmitoilglicerol o didecanoilglicerol, y algunos compuestos no anotados derivados de nucleósidos, aminoácidos, fenilpropanoides y alcaloides (Anexos: Tabla A.6).

Algunas moléculas con mayor intensidad en el mutante Δ SCO3750 pudieron asignarse a un compuesto determinado. Entre ellos están la germicidina D/surugapirona A o germicidina H, implicadas en la inhibición de la germinación (Aoki et al., 2011), o IMP, precursor de purinas, en su forma ácida o cíclica (Tabla R.3.4). Otros de los aductos detectados con mayor intensidad en el mutante podrían corresponder a un deoxirribonucleósido de purina genérico o a nucleósidos más específicos, derivados de hidroxietiladenosina o dimetilguanosina.

El resto de los compuestos detectados con mayor intensidad en Δ SCO3750 son compuestos derivados de glúcidos o aminoácidos y, en su mayoría, SIRIUS los caracteriza como fenilpropanoides (Anexos: Tabla A.6).

Tabla R.3.4. Compuestos anotados en la comparación del metaboloma de Δ SCO3750 y M145. Metabolitos diferencialmente más representados anotados en la comparación de los metabolomas de la cepa silvestre M145 y el mutante Δ SCO3750. En gris se muestran los compuestos sobrerepresentados en M145, y en verde, en Δ SCO3750.

CATEGORÍA	COMPUESTO	MASA	FÓRMULA
ACT	GTRI-02	234.0892	C ₁₃ H ₁₄ O ₄
Lípidos	Palmitoil glicerol	330,277	C ₁₉ H ₃₈ O ₄
	Didecanoilglicerol	400,3189	C ₂₃ H ₄₄ O ₅
ACT	γ -ACT	630,1009	C ₃₂ H ₂₂ O ₁₄
	ϵ -ACT	648,1112	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅

	ϵ' -ACT	648,1112	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₅
	SEK4b	318,0739	C ₁₆ H ₁₄ O ₇
	Ácido actinorrodínico	666,1221	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆
Germinación	Germicidina D Germicidina H	168,0786	C ₉ H ₁₂ O ₃
Nucleótidos	IMP	348,0471	C ₁₀ H ₁₃ N ₄ O ₈ P
	IMP cíclico	330,0365	C ₁₀ H ₁₁ N ₄ O ₇ P
	Deoxirribonucleósido de purina	236,0909	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₃
	N6-(2-hidroxietyl)adenosina N2,N2-dimetilguanosina	311,12297	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₅

R.3.3.1 – Metaboloma del mutante Δ SCO2359

El mutante Δ SCO2359 tiene un retraso en la producción de antibióticos y la diferenciación en ISP2 (Figura R.3.1).

La delección del gen *SCO2359* produce, teniendo en cuenta los compuestos analizados con diferencia estadística, una bajada de intensidad de la mayor parte de los metabolitos detectados.

Entre los compuestos relacionados con ACT, se encuentran de nuevo en este análisis el producto final GTRI-02, el intermediario DHKred y la molécula de $m/z = 631,1083$ que puede corresponder a ácido actinorrodínico (aducto $[M - 2H_2O + H]^+$) o a γ (aducto $[M + H]^+$) o ϵ -ACT (aducto $[M - H_2O + H]^+$). Estas moléculas se encuentran con mayor intensidad en la cepa M145. Una molécula detectada, con $m/z = 649,1188$, posee mayor intensidad en el mutante Δ SCO2359 y podría corresponder a ϵ -ACT (aducto $[M + H]^+$) o ácido actinorrodínico (aducto $[M - H_2O + H]^+$). Es decir, uno de los isómeros finales de ACT se encuentra en mayor proporción en el mutante (Tabla R.3.5).

Otro derivado de la fitalosina, en este caso la dehipoxantina fitalosina cíclica, se encuentra con mayor intensidad en la cepa M145. El resto de los compuestos con mayor intensidad en la cepa silvestre son descritos por SIRIUS, en su mayoría, como fenilpropanoides o poliquétidos (Anexos: Tabla A.7).

Aquellos con mayores intensidades en el metaboloma del mutante Δ SCO2359 pertenecen al grupo de los alcaloides y derivados de fenilpropanoides (Anexos: Tabla A.7). Uno de estos compuestos, acorde a su masa, podría corresponder a NADHX, la forma hidratada e inactiva del cofactor NADH (Becker-Kettern et al., 2018).

RESULTADOS: CAPÍTULO 3

Tabla R.3.5. Compuestos anotados en la comparación del metaboloma de Δ SCO2359 y M145. Metabolitos diferencialmente más representados anotados en la comparación de los metabolomas de la cepa silvestre M145 y el mutante Δ SCO2359. En gris se muestran los compuestos sobrerrepresentados en M145, y en amarillo, en Δ SCO2359.

CATEGORÍA	COMPUESTO	MASA	FÓRMULA
ACT	GTRI-02	234,0892	C ₁₃ H ₁₄ O ₄
	DHKred	304,0945	C ₁₆ H ₁₆ O ₆
	γ -ACT	630,1009	C ₃₂ H ₂₂ O ₁₄
	ϵ -ACT	648,1112	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅
	Ácido actinorrodínico	666,1221	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆
Transporte de electrones	Dehipoxantina fualosina cíclica	294,074	C ₁₄ H ₁₄ O ₇
ACT	ϵ -ACT	648,1112	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅
	Ácido actinorrodínico	666,1221	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆
Reacciones de óxido-reducción	NADHX	683,1353	C ₂₁ H ₃₁ N ₇ O ₁₅ P ₂

R.3.3.1 – Metaboloma del mutante Δ SCO2359/2358

En ISP2, la delección de los genes *SCO2359* y *SCO2358* simultáneamente restaura la diferenciación del micelio aéreo, afectada en el mutante Δ SCO2359 (Figura R.3.1).

La comparación entre los metabolomas de la cepa silvestre y el mutante doble Δ SCO2359/*SCO2358* resultó en la mayor cantidad de compuestos detectados con diferencia estadísticamente significativa.

Los compuestos relacionados con ACT varían su abundancia. En la cepa silvestre, se detecta con mayor intensidad el producto GTRI-02. Respecto a los otros posibles compuestos, no se puede determinar qué moléculas exactas son las que tienen mayor abundancia en la cepa silvestre y cuáles son más abundantes en el mutante.

- Una molécula con $m/z = 285,0756$ se detecta a tres tiempos de retención distintos, en dos ocasiones (3,36 y 3,72 min) con mayor abundancia en la cepa M145 y, en otra (3,89 min), en el mutante Δ SCO2359/*SCO2358*. Esta puede corresponder a aductos de distintos intermediarios de la síntesis de ACT, como aductos $[M - H_2O + H]^+$ de la dihidrokalafungina o SEK34, aductos $[M - 2H_2O + H]^+$ de THK-OH o DHKred-OH o al aducto $[M + H]^+$ de la dehidromutactina (Djinni et al., 2013). Según SIRIUS, es más probable que sean los compuestos con fórmula C₁₆H₁₄O₆ (dihidrokalafungina o SEK34).
- En el extracto de la cepa silvestre se detectan dos moléculas con $m/z = 336,1077$; una a los 2,64 min y otra a 3,03 min. Una de ellas podría ser un aducto $[M + NH_4]^+$ del intermediario SEK4b (cuya fórmula, C₁₆H₁₄O₇, es la predicha por SIRIUS para esta molécula).

- La molécula con $m/z = 615,1135$ se detecta a mayor intensidad en M145 y podría ser un aducto $[M - H_2O + H]^+$ de la γ' -ACT (cuya fórmula, $C_{32}H_{24}O_{14}$, es la predicha por SIRIUS) o un aducto $[M - 2H_2O + H]^+$ de ϵ' -ACT.
- Tres moléculas aparecen más intensas en el metaboloma de $\Delta SCO2359/SCO2358$. La molécula con $m/z = 631,1082$, de posible fórmula $C_{32}H_{24}O_{15}$ según SIRIUS, podría ser un aducto $[M - H_2O + H]^+$ de ϵ -ACT (misma fórmula), $[M - 2H_2O + H]^+$ de ácido actinorródico o $[M + H]^+$ de γ -ACT. La $m/z = 651,1337$ podría ser un aducto $[M + H]^+$ de ϵ' -ACT, mientras que la $m/z = 666,145$, un aducto de ϵ -ACT.

Otros compuestos con mayor intensidad en la cepa silvestre, anotados con mayor fiabilidad al coincidir sus fórmulas predichas por SIRIUS o ser muy similares, incluyen el ácido homogentísico, un producto del catabolismo de la tirosina (Y. Zhang et al., 2008); el ácido shikímico, intermediario en la síntesis de compuestos aromáticos (Lim et al., 2018); la germicidina A o isogermicidina A, que inhibe la germinación (Aoki et al., 2011); deoxirribonucleósidos de purina y la coenzima A. La coenzima A es una molécula crucial en el metabolismo (Barritt et al., 2024), por lo que sus menores niveles en el mutante podrían indicar una influencia importante del sistema $SCO2359/SCO2358$ incluso en el metabolismo primario. Otra posible molécula anotada es la forma reducida de la riboflavina (Tabla R.3.5). La riboflavina es esencial para sintetizar los cofactores FAD y FMN para el metabolismo oxidativo (García-Angulo, 2017).

Muchos otros compuestos no anotados y con mayor intensidad en la cepa silvestre son descritos como derivados de aminoácidos (Anexos: Tabla A.8).

Respecto a los compuestos con mayor intensidad en el mutante $\Delta SCO2359/SCO2358$, además de los ya mencionados, se encuentran un posible ácido graso octadienoico, la dehipoxantina fitalosina mencionada en las comparaciones anteriores, un ácido dihidroxioctadecanoico, una posible 23-cetoundecilprodiginina y mononucleótidos de purina, sin especificar o el precursor de estos, dIMP. Mientras que en la cepa silvestre se detectan intensamente mononucleósidos (mononucleótidos sin grupo fosfato), en el mutante se detectan compuestos cuya masa coincide con la de nucleótidos completos.

En varios *Streptomyces*, incluyendo *S. coelicolor*, se ha detectado la producción de derivados de homoserina lactonas, moléculas de *quorum sensing* normalmente asociadas a bacterias Gram-negativas (Salehi-Najafabadi et al., 2024). Dos moléculas con mayor intensidad en el mutante $\Delta SCO2359/SCO2358$ podrían ser derivados de estas moléculas: N-hexanoil-homoserina lactona y N-dodecanoil-homoserina lactona (Tabla R.3.5). Si bien en la bibliografía no se han detectado estas moléculas en *S. coelicolor*, el metabolismo de estas moléculas podría estar estimulado en este mutante, suponiendo que realmente se puedan generar estos derivados.

RESULTADOS: CAPÍTULO 3

En cuanto a los compuestos no anotados con mayor intensidad en el mutante, se encuentran, en general, moléculas derivadas de aminoácidos, flavonoides y algunos poliquétidos (Anexos: Tabla A.8).

Tabla R.3.6. Compuestos anotados en la comparación del metaboloma de Δ SCO2359/2358 y M145. Metabolitos diferencialmente más representados anotados en la comparación de los metabolomas de la cepa silvestre M145 y el mutante Δ SCO2359/2358. En gris se muestran los compuestos sobrerepresentados en M145, y en azul, en Δ SCO2359/2358.

CATEGORÍA	COMPUESTO	MASA	FÓRMULA
ACT	GTRI-02	234,0892	C ₁₃ H ₁₄ O ₄
	Dihidrokalafungina SEK34	302,0790	C ₁₆ H ₁₄ O ₆
	Dehidromutactina	284,0684	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
	THK-OH/DHKred-OH	320,0896	C ₁₆ H ₁₆ O ₇
	SEK4b	318,0739	C ₁₆ H ₁₄ O ₇
	γ' -ACT	632,1166	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₄
	ϵ' -ACT	648,1112	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₅
Síntesis de tirosina	Ácido homogentísico	168,0423	C ₈ H ₈ O ₄
Síntesis de compuestos aromáticos	Ácido shikímico	174,0528	C ₇ H ₁₀ O ₅
Germinación	Germicidina A Isogermicidina A	196,1099	C ₁₁ H ₁₆ O ₃
Metabolismo primario	Coenzima A	767,1152	C ₂₁ H ₃₆ N ₇ O ₁₆ P ₃ S
Reacciones redox	Riboflavina reducida	378,1539	C ₁₇ H ₂₂ N ₄ O ₆
ACT	Dihidrokalafungina SEK34	302,0790	C ₁₆ H ₁₄ O ₆
	Dehidromutactina	284,0684	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
	THK-OH/DHKred-OH	320,0896	C ₁₆ H ₁₆ O ₇
	ϵ -ACT	648,1112	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅
	Ácido actinorrodínico	666,1221	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆
	γ' -ACT	632,1166	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₄
	ϵ' -ACT	648,1112	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₅
Transporte de electrones	Dehipoxantina fualosina	296,0896	C ₁₄ H ₁₆ O ₇
Lípidos	Ácido dihidroxiocetadecanoico	316,2614	C ₁₈ H ₃₆ O ₄

	Ácido octadienoico	140,0837	C ₈ H ₁₂ O ₂
RED	23-cetoundecilprodiginina	407,2573	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₂
Nucleótidos	dIMP	332,0522	C ₁₀ H ₁₃ N ₄ O ₇ P
<i>Quorum sensing</i>	N-hexanoil-homoserina lactona	199,1208	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃
	N-dodecanoil-homoserina lactona	283,2147	C ₁₆ H ₂₉ NO ₃

R.3.4 - Conclusión general del capítulo

Los resultados presentados en este apartado son muy descriptivos y orientativos, pues serían necesarias pruebas más exhaustivas para una verdadera identificación de los compuestos más allá de análisis con SIRIUS y comparación con bases de datos a partir de la masa exacta, sin haber usado en las bases de datos los espectros MS/MS. No obstante, el análisis general de todos los metabolomas indica que los sistemas estudiados afectan la producción de metabolitos secundarios en *S. coelicolor*. Además de la ACT, moléculas relacionadas con metabolismo primario, reacciones de oxidación-reducción, *quorum sensing*, lípidos y germinación están afectadas.

Cabe destacar la presencia de muchos compuestos no anotados (ver Tablas A. de los Anexos), que son aquellos que, potencialmente, podrían dar mayores pistas sobre rutas metabólicas afectadas en los distintos mutantes y procesos de regulación alterados. Estos compuestos no se han mostrado en las tablas de este apartado (Tablas R.3) por no poderlos relacionar con compuestos conocidos.



DISCUSIÓN DE RESULTADOS

“Un verdadero caballero nunca deja un puzle sin resolver”.

- Profesor Hershel Layton (de la saga de videojuegos *El profesor Layton*) (2007-actualidad).

D.1 – El papel del gen *bfr* en *S. coelicolor*

Uno de los focos de trabajo de esta tesis era ampliar el conocimiento sobre la red de elementos que controlan el metabolismo secundario en *Streptomyces* utilizando *S. coelicolor* como modelo (van der Heul et al., 2018). Durante los últimos años, este ha sido uno de los objetivos principales del grupo de trabajo en el que se ha realizado esta tesis. Los resultados previos del estudio de varios TCS implicados en regular la producción de antibióticos en *S. coelicolor* coincidían en relacionar estas redes de regulación con el gen *bfr* que codifica una bacterioferritina (Rico, Santamaría, et al., 2014; Rico, Yepes, et al., 2014; Rodríguez et al., 2015; Sánchez de la Nieta et al., 2020). De estos resultados surge el interés del estudio de este gen y su papel en estas cascadas regulatorias.

También se ha descrito en otros actinomicetos que las bacterioferritinas y el hierro influyen en el metabolismo secundario. Por ejemplo, en *S. avermitilis*, el regulador IdeR activa la expresión de genes para la producción de avermectinas y el gen *bfrA* (Cheng et al., 2018). En *S. pogona*, la bacterioferritina es necesaria para almacenar hierro, tolerar estrés oxidativo y producir butenil-espinosina (Tang et al., 2021). Estos datos apuntaban a que, en *S. coelicolor*, Bfr podría tener un papel similar, si bien, como se describe a continuación, los resultados de este trabajo apuntan a una implicación diferente de Bfr en la fisiología del organismo de estudio.

D.1.1 – Almacenamiento de hierro

En otros microorganismos, hay varias proteínas encargadas de almacenar hierro. Bacterias como *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *P. aeruginosa* y *M. tuberculosis* poseen ferritina y bacterioferritina. En el caso concreto de *M. tuberculosis*, también perteneciente al filo *Actinomycetota*, la ferritina, Ftn (antes llamada “BrfB”), tiene mayor capacidad de almacenamiento de hierro y funciona principalmente en condiciones de alta concentración de este elemento, mientras que la bacterioferritina, BfrA, actúa en bajas concentraciones de hierro. En este caso, solo Ftn es inducida por hierro mediante el regulador IdeR, el homólogo a DmdR1 de *S. coelicolor* (Khare et al., 2017).

Otro ejemplo muy bien caracterizado es *P. aeruginosa*. La bacterioferritina, BfrB, es la encargada de acumular hierro y necesita interaccionar con Bfd (ferredoxina asociada a bacterioferritina) para la liberación de este elemento, mientras que la ferritina, FtnA (antes llamada “BfrA”), proporciona hierro a la catalasa KatA (Eshelman et al., 2017). La interacción entre Bfr y Bfd también ocurre en otros microorganismos, como *Erwinia chrysanthemi* (Expert et al., 2008).

Se ha descrito que eliminar la proteína principal de almacenamiento de hierro, sea ferritina o bacterioferritina, afecta a la homeostasis del hierro y, como consecuencia, hay un desequilibrio en las concentraciones de hierro dentro de las células (Bradley et al., 2020). Siguiendo con el ejemplo de *P. aeruginosa*, eliminar el principal almacén de hierro, BfrB, reduce el hierro total de la célula,

mientras que inhibir la interacción BfrB-Bfd impide que el hierro se libere de BfrB y disminuyen, entonces, los niveles de hierro lábil (disponible) en el citoplasma (Eshelman et al., 2017).

En el organismo modelo de este trabajo, *S. coelicolor*, no hay ferritinas. Eliminar la única Bfr existente en este organismo no resultó en diferencias en las concentraciones de hierro, ni lábil ni total, al comparar la cepa Δbfr y la cepa silvestre. Si bien Bfr puede almacenar hierro (Jobichen et al., 2023), su función en el mutante Δbfr podría ser compensada por las proteínas Dps (DpsA, DpsB y DpsC), que también pueden almacenar hierro (Hitchings et al., 2014), como ocurre en otros organismos (Expert et al., 2008).

Las proteínas que sirven como almacén principal de hierro suelen estar reguladas por la presencia de este elemento mediante proteínas reguladoras. Este es el caso de la ya mencionada Ftn de *M. tuberculosis*, regulada por IdeR (Khare et al., 2017), y de la bacterioferritina de *S. avermitilis*, cuyo gen, *bfrA*, posee una secuencia *iron box* (GCAGGACACGGATCGTCATA) en su promotor, que permite la regulación por IdeR (Cheng et al., 2018). El gen *bfr* de *S. coelicolor* no posee *iron boxes* en su promotor (Flores & Martín, 2004) y no parece estar regulada directamente por DmdR1, al contrario que, por ejemplo, DpsA (Flores et al., 2005).

Si bien no se descarta que Bfr pueda actuar, en *S. coelicolor*, como almacén de hierro en condiciones normales, esta no parece ser una función esencial, puesto que en su ausencia la homeostasis de hierro no se ve alterada.

Por otro lado, volviendo al ejemplo de *P. aeruginosa* y la interacción entre BfrB y Bfd, en *S. coelicolor* también hay un gen que codifica una ferredoxina asociada a bacterioferritina, adyacente al gen *bfr*, cuya proteína, Bfd, podría ayudar, como en otros organismos, a la liberación de hierro contenido en Bfr. En este trabajo, se ha abordado el estudio de este gen, *bfd/SCO2114*, con CRISPRi ante las dificultades para realizar una delección total. La inhibición de la expresión del gen *bfd* en *S. coelicolor* M145 afecta a la diferenciación y la producción de antibióticos en los medios complejos ensayados. En medio mínimo NMMP, la proteína Bfd tiene un papel mayor en producción de antibióticos y diferenciación. No obstante, el fenotipo de Δbfr predomina respecto a la inhibición de *bfd* y no hubo efectos aditivos ni tóxicos en el mutante Δbfr al inhibir la expresión de *bfd*, solo se vio un efecto aditivo en diferenciación en medio mínimo NMMP. Por ello, Bfd en *S. coelicolor* podría ser una proteína auxiliar, no esencial, para liberar el hierro de Bfr, o incluso podría colaborar con otras proteínas en la reducción o movilización de hierro, especialmente en medios mínimos.

D.1.2 – Entrada de hierro y señalización por sideróforos

Los sideróforos, y en concreto la deferoxamina, son elementos clave en el desarrollo de *S. coelicolor*, necesarios para su correcto desarrollo y metabolismo (Tierrafría et al., 2011) y para una expresión espacio-temporal apropiada de los genes que codifican proteínas reguladoras (Zacharia et al., 2021).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los sideróforos son parte de las señales nutricionales del medio que condicionan el metabolismo de *Streptomyces* (Zacharia et al., 2021), y aunque se conoce su conexión con varios genes del desarrollo (Craig et al., 2012; Lambert et al., 2014), no se ha establecido todavía una vía de señalización clara. En este trabajo se ha estudiado la relación entre la producción de sideróforos, el gen *bfr* y los TCS que condujeron al estudio del gen *bfr* para comprobar si estas moléculas intervienen también en la señalización mediada por estos genes y en la producción de antibióticos.

El mutante $\Delta abrA$, como indicaba el análisis transcriptómico (Antoraz Martín, 2018), produce más sideróforos en medio mínimo NMMP estándar (4 μ M de hierro) que la cepa silvestre, mientras que el mutante Δbfr produce menos. La expresión de *bfr* se reduce en el mutante $\Delta abrA$ (Antoraz Martín, 2018), por lo que la acción de AbrA sobre la captación de hierro no va mediada por el gen *bfr*.

El mutante $\Delta abrC$ tiene menor expresión del gen *bfr* en medio AN (Rico, Santamaría, et al., 2014), y los mutantes de delección $\Delta abrC$ y Δbfr producen más sideróforos que la cepa silvestre en este medio. En este caso, una regulación negativa de los sideróforos que podría ejercer el sistema AbrC, que activa *bfr* en este medio, podría estar mediada, en parte, por Bfr. La acción sobre los sideróforos del regulador huérfano Aor1 también podría estar parcialmente controlada por Bfr: el mutante $\Delta aor1$ posee mayores niveles de expresión de *bfr* en medio LB (Antoraz et al., 2017), y mientras que el mutante $\Delta aor1$ produce más sideróforos que el silvestre, el mutante Δbfr produce menos. En este caso, la acción de Bfr sobre los sideróforos es positiva, mientras que Aor1 inhibe la expresión de Bfr (Figura D.1).

Al igual que los genes *bld* y *whi*, entre otros, están relacionados con la señalización mediada por sideróforos (Lambert et al., 2014), los TCS implicados en producción de antibióticos, así como el gen *bfr*, también están conectados en una red de señalización donde los sideróforos actúan como moléculas efectoras, junto a otras moléculas desconocidas (Zacharia et al., 2021) y variables en cada medio. Estas diferencias no parecen ser debidas a una falta o exceso de entrada de hierro, pues los niveles de hierro en Δbfr en los dos medios ensayados (NMMP y LB) no varían (Figura R.1.12). Dada la capacidad que tienen las deferoxaminas en *Streptomyces* para interactuar con proteínas, además de su papel como donadores de hierro (Ni et al., 2023), sería interesante caracterizar en mayor profundidad la influencia que tienen los sideróforos en la fisiología de *S. coelicolor* y su relación con los genes que controlan el metabolismo secundario.

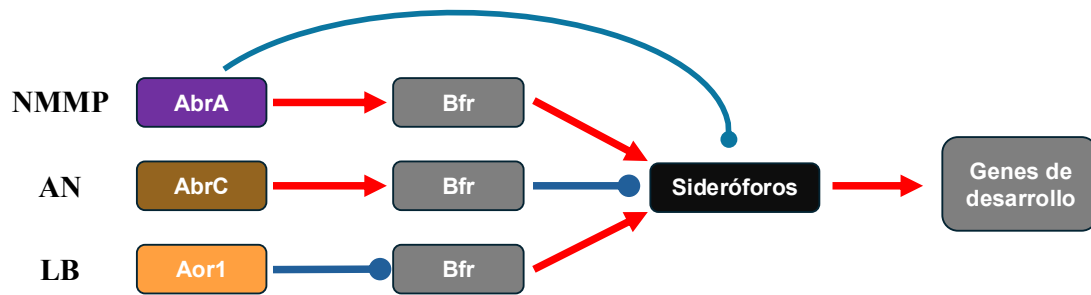


Figura D.1. Esquema de la influencia de los TCS y de Bfr en la señalización por sideróforos.

D.1.3 – Bfr en estrés oxidativo y como donadora de hierro

El mutante Δbfr posee, en varios de los medios de cultivo ensayados, defectos en diferenciación y producción de antibióticos pigmentados, como ACT y RED. La producción de estos antibióticos responde a la concentración de hierro cuando los experimentos se realizan en NMMP. Con este estudio se pudo observar que la producción de antibióticos no solo se alteraba en función del hierro del medio de cultivo, sino que también existían variaciones en la producción obtenida en medio sólido y líquido. Namil Lee y colaboradores describieron que, en medio CYE, una bajada de hierro induce la producción de ACT (N. Lee et al., 2020), mientras que en las condiciones de este estudio, en NMMP, el bajo hierro promueve la producción de ACT en medio sólido, mientras que en medio líquido es el aumento del hierro el que favorece la síntesis de este antibiótico y de RED. Estas diferencias entre sólido y líquido pueden deberse a la expresión diferencial de genes ocurrida en medio líquido, entre los que se incluyen genes de estrés oxidativo (Yagüe et al., 2014) y, posiblemente, genes de regulación.

Se ha observado que la ausencia de la proteína encargada de almacenar hierro aumenta la sensibilidad al estrés oxidativo en algunos organismos, debido a las ROS originadas por la reacción de Fenton (Tang et al., 2021; J. Yang et al., 2020). En *S. coelicolor* Δbfr , por el contrario, aumenta la tolerancia al estrés oxidativo, a pesar de que sí se observa una mayor concentración de ROS tanto en NMMP como en LB. En este caso, Bfr podría actuar como moduladora del estrés oxidativo para controlar los niveles de ROS como se ha descrito en algunos organismos, como en *Desulfovibrio vulgaris*. En *D. vulgaris*, mientras que la ferritina Ftn no participa en la protección frente al estrés oxidativo, la bacterioferritina sí, y es activada por el regulador PerR (Figueiredo et al., 2012).

Por otro lado, se sabe que el estrés oxidativo regula la producción de los antibióticos de *S. coelicolor* y que, además de su actividad antibiótica, estos compuestos poseen un papel en la PCD (RED, CDA) y como antioxidantes (ACT) (Lejeune et al., 2022; Virolle, 2020). La producción acelerada de ACT en NMMP con 4 μ M de hierro del mutante Δbfr respecto al silvestre a día 6 de cultivo podría deberse a la mayor producción de ROS. La ACT contrarrestaría las ROS en estas condiciones, pero a día 8, al estar Bfr ausente, las ROS siguen aumentando. En NMMP con 2 mM de hierro sólido, el hierro podría producir un exceso de ROS que bloquea la diferenciación y el metabolismo secundario,

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

mientras que en NMMP líquido, este hierro podría estar menos disponible o las células ser más resistentes al estrés producido, dada la mayor expresión de genes de estrés oxidativo (Yagüe et al., 2014), de manera que la cepa silvestre produce más ACT y el mutante no, por un exceso de estrés oxidativo.

La hipótesis que planteamos en este trabajo a partir de los resultados obtenidos es que el papel principal a nivel regulatorio que podría desempeñar Bfr en *S. coelicolor* es actuar como un reservorio que permite donar hierro a otras proteínas que necesitan hierro para su funcionamiento. En otros organismos, las ferritinas y bacterioferritinas tienen un papel similar: la ya mencionada Ftn de *P. aeruginosa* proporciona hierro a KatA (Eshelman et al., 2017; Ma et al., 1999); FtnA en *E. coli* puede almacenar hierro de clústeres Fe-S dañados y este hierro es transferido a la proteína IscA, con un sistema tiorredoxina reductasa, para transportarlo después a la proteína IscU del sistema Isc, encargado de la biosíntesis de clúster Fe-S (Bitoun et al., 2008); en *E. chrysanthemi*, el sistema Suf captura hierro de los sideróforos y lo incorpora a Bfr (Expert et al., 2008); y en *Salmonella enterica* sv. *typhimurium*, la proteína FtnB utiliza hierro almacenado para reparar clústeres Fe-S dañados (Velayudhan et al., 2007). Muchas proteínas de regulación contienen clústeres Fe-S o poseen hierro, como la familia Wbl, implicada en diferenciación (Stewart et al., 2020), o CatR, implicada en estrés oxidativo y metabolismo del hierro (K.-L. Lee et al., 2017). En el caso de proteínas con clúster Fe-S, no se conoce el origen del hierro incorporado (Aubert et al., 2023; C. Zheng & Dos Santos, 2018), por lo que Bfr podría ser la fuente de dicho hierro en *S. coelicolor*.

Por lo tanto, en el modelo propuesto en este trabajo, Bfr sería capaz de transferir hierro a proteínas que participan en diferenciación y regulación de antibióticos, entre otros procesos (Figura D.2 A). En el mutante Δbfr estas proteínas que contienen hierro estarían en un estado inactivo y, entonces, las proteínas que a su vez son reguladas por estas (proteínas de conservones, de regulación...) cambiarían su abundancia y producirían el fenotipo del mutante (Figura D.2 B).

Un secuestro de hierro por acción de quelantes no afecta especialmente al fenotipo del mutante Δbfr . Los ensayos con los quelantes de hierro demostraron que tanto el hierro intracelular como el extracelular afectan al desarrollo de *S. coelicolor* M145, mientras que en la cepa Δbfr ambos niveles de hierro no generan cambios importantes respecto a la cepa silvestre. Esto podría confirmar que no hay un cambio sustancial en la homeostasis del hierro, pudiendo estar siendo almacenado en proteínas tipo Dps como un efecto compensatorio. Por otro lado, el hierro así almacenado no podría pasar a las proteínas que necesitan a Bfr para ejercer su función y estarían inactivas (Figura D.2 B).

Este modelo de trabajo se ve avalado en parte por los resultados del estudio proteómico realizado en medio LB. Se encontraron una serie de elementos relacionados con un mayor estrés oxidativo más abundantes en Δbfr . Estas proteínas con mayor abundancia en el mutante respecto al silvestre incluyen proteínas de hipoxia (Urem, van Rossum, et al., 2016), proteínas activadas en estrés

oxidativo (Daigle et al., 2015), proteínas de respiración y de síntesis de CDA, relacionado con PCD (Virolle, 2020). Estos mecanismos podrían formar parte de una respuesta a la mayor concentración de ROS: el mutante Δbfr podría consumir más oxígeno, lo que se relaciona con su mayor tasa de crecimiento, y a la vez activa respuestas de dormición y estrés. Estas respuestas no reducirían los niveles de ROS de forma suficiente, y estos niveles altos y/o la falta de actividad de clústeres de hierro en las proteínas reguladoras bloquearían algunos procesos como la diferenciación y parte del metabolismo (algunos metabolitos secundarios, síntesis de ácidos grasos...) (Figura D.2 B). Así, a pesar de la alteración de varios procesos fisiológicos como la diferenciación, *S. coelicolor* Δbfr puede sobrevivir en condiciones de alto estrés oxidativo y sin cambios en los niveles de hierro.

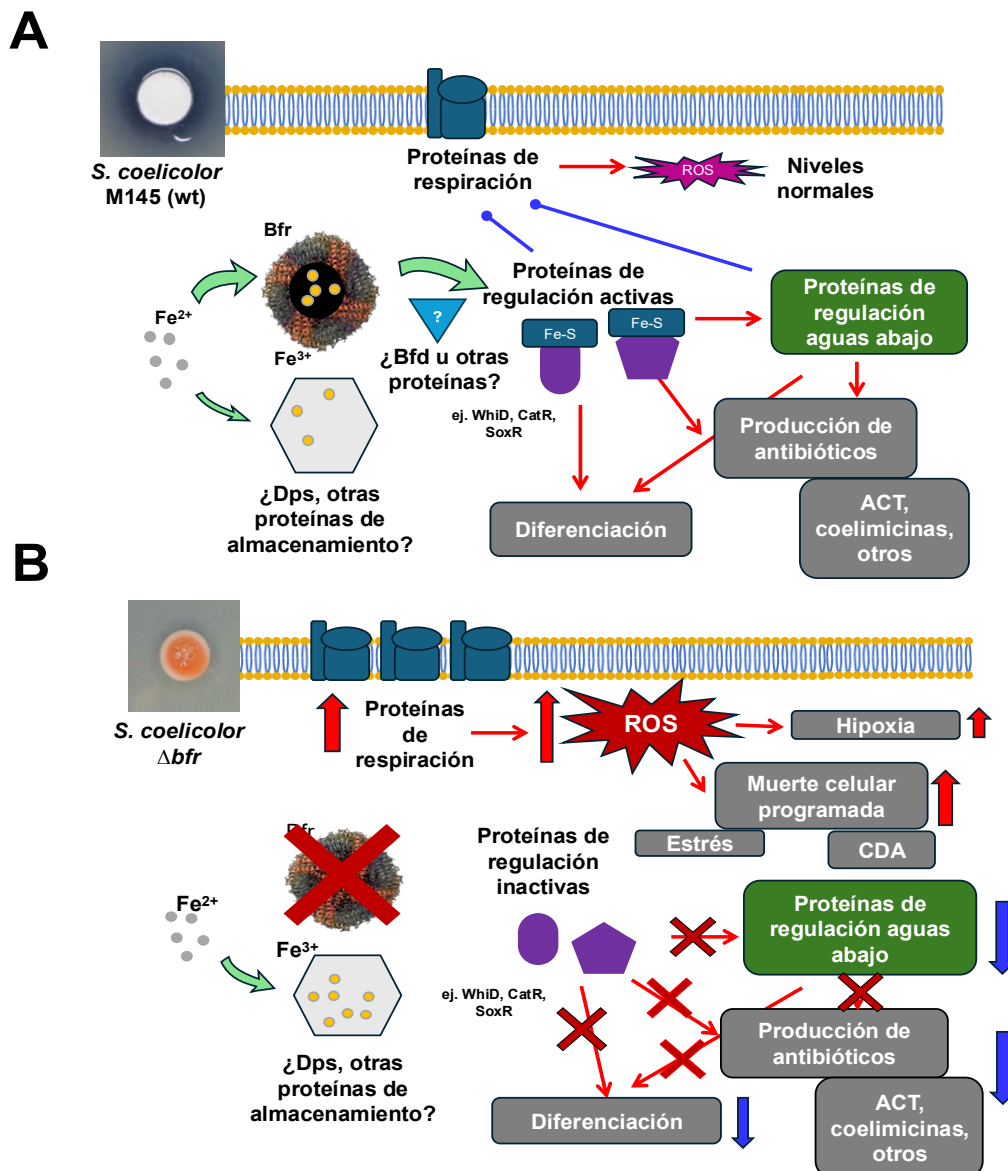


Figura D.2. Modelo del funcionamiento de Bfr en *S. coelicolor*. **A.** Modelo de funcionamiento de Bfr en la cepa silvestre. Bfr actúa como donadora de hierro para proteínas reguladoras que median los niveles de proteínas de respiración, producción de antibióticos y diferenciación. **B.** Modelo del mutante Δbfr . Ante la ausencia de Bfr, las proteínas de regulación están inactivas por falta de hierro, por lo que se altera la diferenciación y la producción de antibióticos. Al aumentar la respiración, se activan respuestas de estrés, hipoxia y de PCD.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el ensayo con antioxidantes, el mutante Δbfr era más sensible al ácido ascórbico del medio. Esta respuesta de altas ROS comentada en el párrafo anterior (mayor respiración, crecimiento, respuesta a ROS...), al neutralizar las ROS con el ácido ascórbico, inhibiría el crecimiento de esta cepa, es decir, que las ROS podrían ser un elemento fundamental en su supervivencia, a pesar del desarrollo alterado respecto al silvestre.

Por otro lado, la menor producción de ACT podría deberse, en parte, a que el regulador SoxR, una proteína [2Fe-2S] (Singh et al., 2013), estaría menos activo, y así, las proteínas que activa para detoxificación de ACT (Dela Cruz et al., 2010; Shin et al., 2011) poseen menor abundancia en Δbfr :

Este modelo de trabajo hace bastantes asunciones que no se han comprobado experimentalmente. Para ello, se podría comprobar la interacción de Bfr con proteínas que contengan clústeres Fe-S. También se podrían complementar los datos de proteómica en medio LB con proteómicas en otros medios, como el NMMP, en sólido y líquido y con las distintas concentraciones de hierro. Los detalles moleculares del mecanismo de actuación de Bfr necesitan mayor investigación.

A pesar de estas limitaciones, los datos experimentales de este trabajo apuntan a un mecanismo de Bfr como el descrito en esta discusión y reflejan que es un elemento importante en la regulación del metabolismo secundario de *S. coelicolor*.

D.2 – HK asociadas a Aor1

Como ya se ha comentado en este trabajo, el RR huérfano Aor1 es un elemento con gran influencia en la expresión de los genes de metabolismo secundario en *S. coelicolor* (Figura I.8) (Antoraz et al., 2017). Para una aplicación futura a manipular este regulador u homólogos suyos en *Streptomyces*, es importante saber qué HK lo activa y, sobre todo, a qué señal responde dicha HK. Al ser un RR huérfano en *S. coelicolor*, Aor1 puede estar asociado a varias HK, cada una específica de un tipo o varios tipos de señales.

Las dos estrategias principales seguidas en esta tesis para la búsqueda de candidatos, las herramientas web de interacción como STRING y la búsqueda de proteínas de *S. coelicolor* homólogas a HK asociadas a su vez a ortólogos de Aor1 en otros *Streptomyces*, han sido consistentes y complementarias. Las HK identificadas, SCO3750, SCO2215 y SCO2359, interaccionan con Aor1 en el ensayo BACTH en *E. coli*, lo cual refleja la interacción cruzada entre varios TCS, más frecuente con elementos huérfanos (Sánchez de la Nieta et al., 2022).

Dentro de los *Streptomyces* comparados durante la búsqueda de HK asociadas a Aor1, algunos cuyo ortólogo de *aor1* es también huérfano conservan el contexto genómico, con un gen de regulador TetR aguas abajo y un transportador ABC aguas arriba (Figura R.2.3). Un análisis taxonómico más preciso, realizado con todo el genoma o mayor número de genes y no solo con las secuencias de ADN 16 S

del NCBI, que no son un buen punto de partida para análisis taxonómicos en *Streptomyces* (Kiepas et al., 2024), ofrecería un resultado más esclarecedor. Los alineamientos realizados en esta tesis dan una idea inicial de que, en varios *Streptomyces* con *aor1* huérfano, el contexto genómico se conserva, lo que podría indicar una asociación funcional e importante entre *aor1* y el gen aguas abajo, codificante para otra proteína reguladora. De hecho, en *S. coelicolor*, *aor1* y sus genes adyacentes se transcriben como un operón (Antoraz et al., 2017). Por otro lado, los *Streptomyces* con ortólogo de *aor1* que forma parte de un TCS canónico (con gen de HK al lado) podrían ser útiles para estudiar las señales que activan esas HK y trasladar ese conocimiento a *S. coelicolor* o cualquier *Streptomyces* de interés con un RR de este tipo.

Centrando la atención en *S. coelicolor*, la primera HK estudiada, SCO3750, es una HK huérfana y es la candidata más parecida a las HK asociadas a ortólogos de Aor1 en otros *Streptomyces* (Figura R.2.3). El hecho de ser una HK huérfana la hace más probable para interaccionar con un RR huérfano (G. Zheng et al., 2021). Los estudios fenotípicos indican que, en medios ricos, de forma general, el gen *SCO3750* es necesario para una correcta diferenciación y actúa como regulador negativo de la producción de ACT en la cepa silvestre, aunque en otros contextos, como en el mutante $\Delta aor1$, SCO3750 podría interactuar con otras proteínas para activar la producción de ACT, como ocurre al sobreexpresar *SCO3750* (Figura R.2.8). En medio mínimo NMMP, en la cepa silvestre, el papel de SCO3750 en cuanto a la inhibición de la producción de ACT es el mismo, pero en la diferenciación actuaría como un regulador negativo. La excepción a estos fenotipos es el medio YEPD, donde esta HK podría ser la encargada de activar a Aor1 dada la similitud de los fenotipos de los mutantes (Figura D.3). El medio YEPD es rico en extracto de levadura, que posee multitud de micronutrientes en proporción variable y, en cuanto a aminoácidos, mayor proporción de alanina, ácido aspártico y lisina (Tomé, 2021). Alguno de estos aminoácidos (libres o como oligopéptidos) o de las vitaminas presentes podrían actuar como señal en las condiciones nutricionales del YEPD para activar a Aor1.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

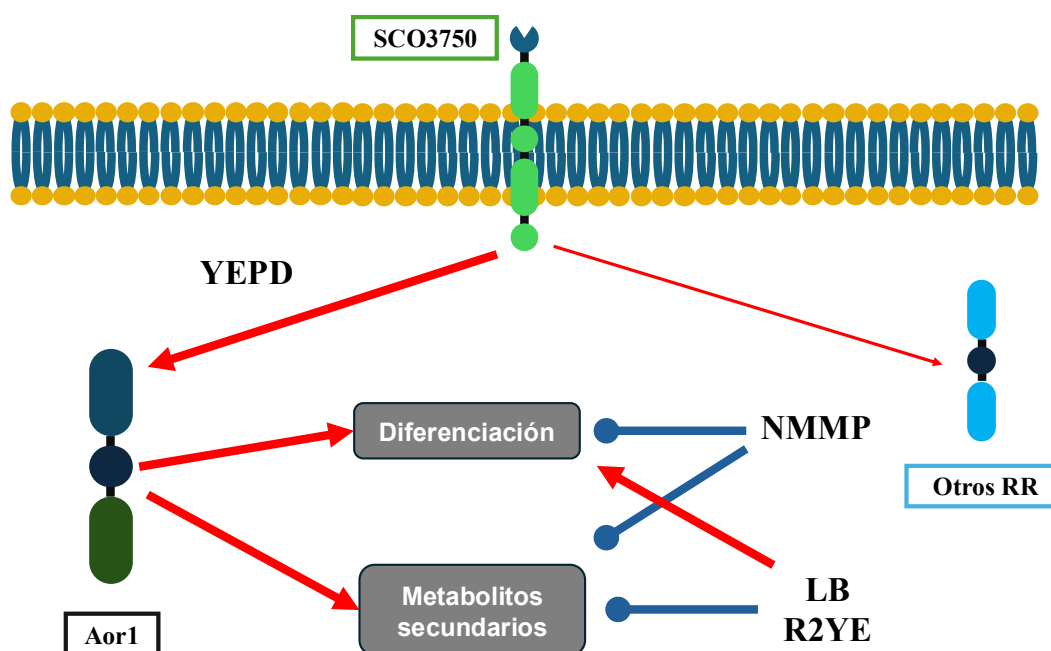


Figura D.3. Modelo del funcionamiento de SCO3750. Modelo propuesto según los ensayos fenotípicos realizados. Las flechas rojas indican activación, y las líneas azules con extremo redondeado, inhibición. Las líneas de menor grosor indican interacciones asumidas.

No se continuó el estudio de la otra HK huérfana, codificada por el gen *SCO6424*, debido a la ausencia de fenotipos similares entre los mutantes $\Delta aor1$ y $\Delta SCO6424$ en los medios estudiados. A pesar de ello, este gen también está involucrado en la regulación del metabolismo secundario, como regulador negativo de la producción de antibióticos en las condiciones ensayadas. Esta HK podría estar involucrada en el control del metabolismo secundario por fuente de carbono (Romero-Rodríguez et al., 2016), pues predicciones bioinformáticas la asocian con el TCS GarR/GarS, que interviene en reprimir la producción de ACT y RED en presencia de glucosa (Cruz-Bautista et al., 2024).

Como ya se ha comentado, el gen *SCO2215*, codificante de una HK estudiada en esta tesis, parece ser esencial al no haberse obtenido el mutante correspondiente tras varios intentos. Su inhibición por CRISPRi tiene un efecto general de disminución de la producción de antibióticos y de la diferenciación, si bien en YEPA, este efecto fue al contrario con una inhibición leve (cumato 20 μ M) (Figura R.2.13). Esta HK podría tener diversos efectos según sus niveles de expresión, que condicionarían con qué RR interaccionaría. Los efectos letales de la ausencia de *SCO2215* se deberían a la desregulación de su RR asociado, pues los mutantes en el RR ($\Delta SCO2216$) y de todo el sistema ($\Delta SCO2215/16$) sí pudieron obtenerse. Estos dos mutantes tuvieron un fenotipo similar al de $\Delta aor1$ en medio R2YE. Sin embargo, la inhibición de la HK *SCO2215* por cumato en este medio no tuvo efecto. Mientras que la inhibición de *SCO2215* afecta negativamente al desarrollo en NMMP y a la producción de ACT, el mutante $\Delta SCO2216$ produce más antibiótico azul tanto en NMMP como en LB. En YEPA, la función de este sistema podría ser sustituida por otro, al no observarse diferencia con un fenotipo silvestre (Figura R.2.16). Igual que SCO3750, el sistema SCO2215/16 tiene

diferentes funciones en medio mínimo y en algunos medios complejos, mientras que en YEPD (aunque el ensayo de CRISPRi tiene resultados contradictorios) y R2YE actúa como promotor de la producción de antibióticos y el desarrollo (Figura D.4).

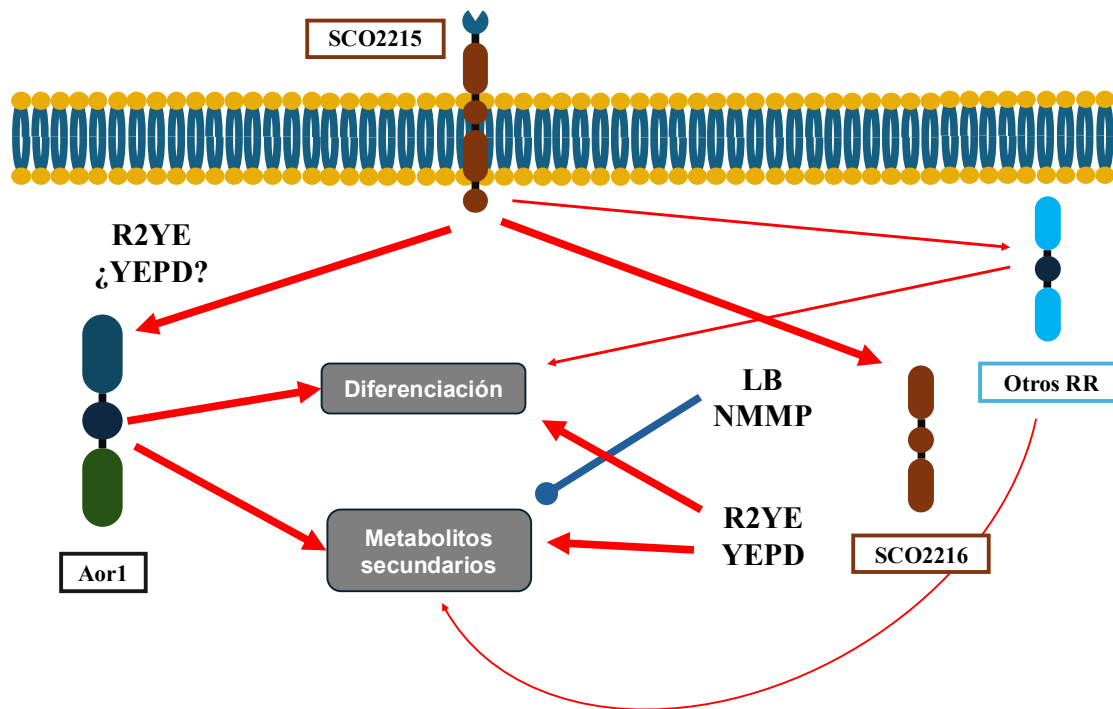


Figura D.4. Modelo del funcionamiento de SCO2215 (HK) y SCO2216 (RR). Modelo propuesto según los ensayos fenotípicos realizados. Las flechas rojas indican activación, y las líneas azules con extremo redondeado, inhibición. Las líneas de menor grosor indican interacciones asumidas.

Respecto al TCS *SCO2359/2358*, la HK, *SCO2359*, podría activar a *Aor1* en las condiciones nutricionales de los medios NMMP y R2YE. En R2YE los tres mutantes derivados de este sistema tienen un fenotipo similar al de $\Delta aor1$, lo que indica una implicación en el desarrollo en este medio. El medio LB vuelve a ser una excepción en la que el mutante en el RR, $\Delta SCO2358$, adelanta el desarrollo y la producción de ACT (Figura R.2.12). En general, este TCS actúa, en las condiciones ensayadas, como promotor de la producción de antibióticos (Figura D.5).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

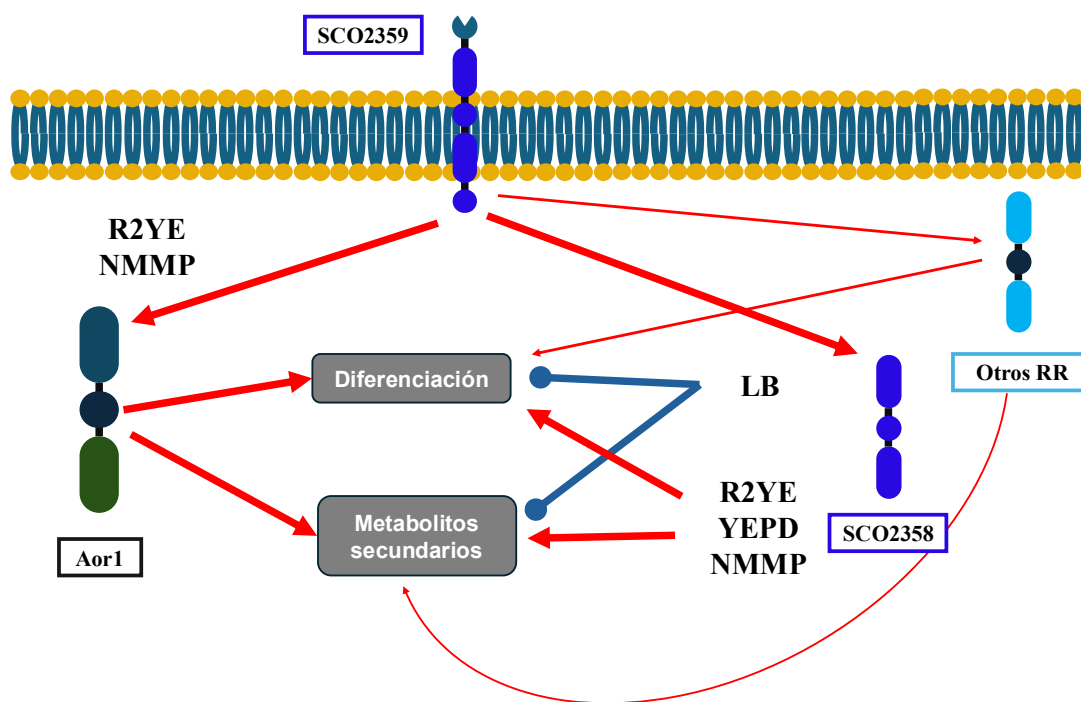


Figura D.5. Modelo del funcionamiento de SCO2359 (HK) y SCO2358 (RR). Modelo propuesto según los ensayos fenotípicos realizados. Las flechas rojas indican activación, y las líneas azules con extremo redondeado, inhibición. Las líneas de menor grosor indican interacciones asumidas.

Además de los efectos diferentes debidos al medio de cultivo y las señales que puedan estar presentes en dichos medios, que activan o inhiben diferentes elementos de regulación (Rigali et al., 2018), no siempre el fenotipo de un mutante en HK es igual al fenotipo en su RR correspondiente (en el caso de los TCS canónicos estudiados, SCO2215/2216 y SCO2359/2358). En general los TCS canónicos interaccionan con su elemento adyacente para mantener la especificidad de las señales, pero existen casos de regulación cruzada, sobre todo en respuestas adaptativas (Wadach et al., 2025). La diferencia de fenotipos de los mutantes en la HK y en el RR refleja que hay más factores implicados en la activación de estos elementos y que no forman parte de una cascada exclusiva: los RR podrían ser fosforilados y activados por otras HK, y las HK podrían activar otras proteínas. Esto complica más la red de regulación que rodea a Aor1. Comprender esta red implicaría controlar todos estos elementos, conocer qué interacciones tienen entre sí y, sobre todo, a qué señales del medio responden (Rigali et al., 2018) (Figura D.6).

Este trabajo se ha limitado, en este aspecto, al estudio de fenotipos y a la interacción de las proteínas mediante ensayo BACTH. Otra aproximación para estudiar los TCS *SCO2215/2216* y *SCO2359/2358* podría ser un ensayo de sobreexpresión desde plásmidos multicopia de los genes codificantes de HK, RR y de los TCS completos. Un ensayo de este estilo, análogo al realizado con *SCO3750* (Figura R.2.8), permitiría estudiar, en las cepas silvestre y $\Delta aor1$, posibles interacciones de estos elementos estudiados con otros sistemas. Además, igual que con los mutantes del sistema *abrC*, sería interesante sobreexpresar *aor1* en los mutantes obtenidos en esta tesis, para comprobar

si también hay un efecto tóxico de Aor1 y por si estos ensayos ofreciesen pistas sobre otras interacciones entre Aor1 y otros elementos.

Para completar más a fondo el estudio de estos sistemas, se podrían también hacer estudios de predicción estructural, como en otros trabajos en TCS (Cruz-Bautista et al., 2024; Sánchez de la Nieta et al., 2020), con el fin de comprobar los dominios de las proteínas y los aminoácidos conservados en señalización. De mayor prioridad sería realizar experimentos transcriptómicos y/o proteómicos de los diferentes sistemas, que aportarían mejores pistas sobre su funcionamiento, combinado con técnicas genómicas de alto rendimiento para profundizar en los regulones de las HK, sus RR y Aor1 (Augustijn et al., 2024). Comprender bien toda la red de regulación de estos elementos implicaría hacer estudios más exhaustivos en los diferentes medios de cultivo con los distintos mutantes, lo cual es un trabajo extenso. También sería interesante construir combinaciones de los mutantes (dobles mutantes en *aor1* y las HK) para estos futuros estudios.

El RR Aor1 fue estudiado, inicialmente, dada su similitud con el regulador AbrC3 (Antoraz et al., 2017), y la relación entre el sistema *abrC* y *aor1* se empezó a estudiar en trabajos previos del laboratorio (Franco Echevarría, 2013; Rico García, 2014; Yepes García, 2010). En este trabajo, se ha corroborado que la expresión desde plásmido multicopia de *aor1* en el mutante $\Delta aor1$ no restaura el fenotipo silvestre, como ya se había visto en trabajos previos (Antoraz et al., 2017). Sin embargo, esta sobreexpresión resulta tóxica en presencia del RR AbrC3, activado por sus HK canónicas, AbrC1 y AbrC2, o por otras HK (dado el fenotipo tóxico también en ausencia de estas dos HK). Como también apuntan los análisis bioinformáticos realizados, el sistema AbrC, lo cual incluye al RR AbrC3, interacciona con Aor1 (Figura D.6). AbrC3 parece tener un efecto conjunto con Aor1, en altas cantidades, que lleva a toxicidad celular. Se necesitan más estudios, de interacción de proteínas y regulación de expresión génica, para caracterizar esta función conjunta.

En definitiva, la red de regulación del RR Aor1 es compleja (Figura D.6). Si bien los sistemas relacionados se estudian de manera individual, comprender las interacciones que controlan la expresión génica derivada de Aor1 y de los elementos relacionados requiere integrar conocimientos de todos los sistemas y profundizar en sus mecanismos de acción (mediante transcriptómica, proteómica...), individuales y conjuntos, en distintas condiciones nutricionales.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

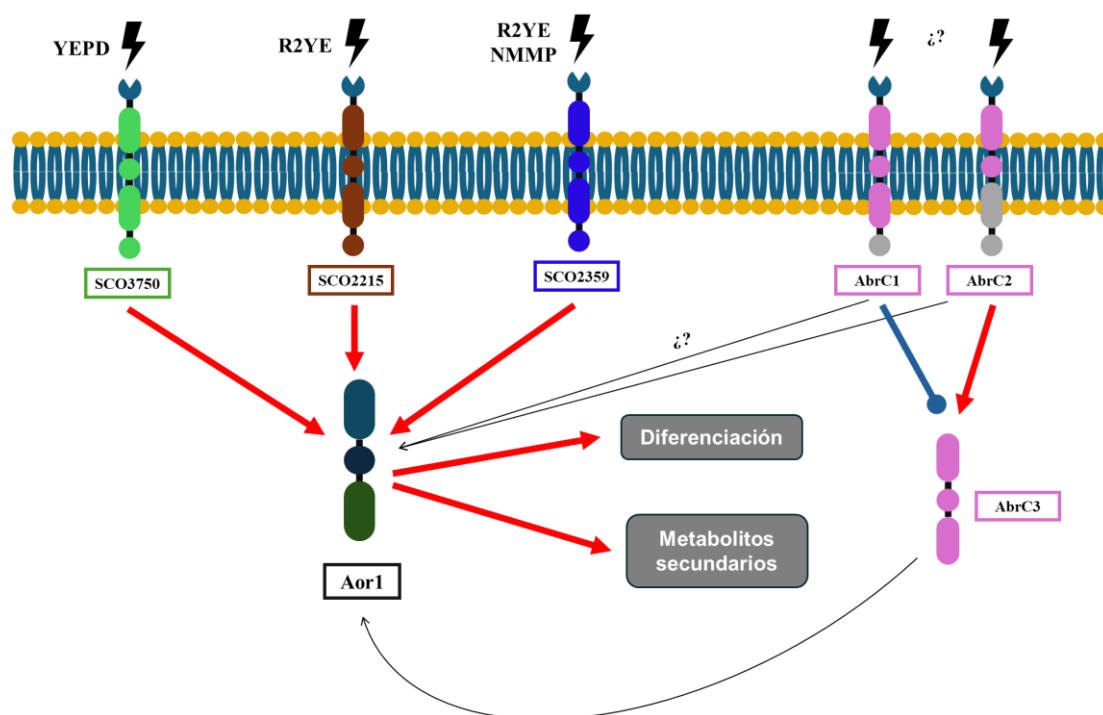


Figura D.6. Modelo de las HK relacionadas con Aor1 y los medios de cultivo en los que responden. Las flechas rojas indican activación; las líneas azules con extremo redondeado, inhibición; y las flechas negras de menor grosor, interacciones no claras.

D.3 – Implicación en el metaboloma de los sistemas estudiados

La metabolómica es una técnica muy útil para el estudio del metabolismo secundario, ya que los metabolitos dentro de una célula reflejan muy bien su estado funcional (Dwivedi et al., 2019).

En esta parte del trabajo de esta tesis, se empleó el medio, ISP2, debido a su compatibilidad con la técnica utilizada y a los distintos fenotipos observados en los mutantes. En estas condiciones, los genes estudiados afectan al metaboloma de *S. coelicolor*.

El enfoque de este trabajo, como ya se ha descrito, ha sido muy descriptivo y, en gran parte, orientativo. Gran parte de los metabolitos detectados no han sido anotados debido a la ausencia de información en las bases de datos públicas y por la ausencia de bases de datos universales (N. Lee et al., 2021). Debido a la gran cantidad de equipos distintos usados en HPLC-MS y a la complejidad de los datos de una metabolómica no dirigida, que requiere un análisis químico complementario, no hay referencias universales para la identificación de compuestos (Aretz & Meierhofer, 2016). Esto lleva a la anotación de solo un 5 % del metaboloma analizado y, en algunos casos, las anotaciones se basan solo en la masa. Para una anotación más precisa, y posterior identificación inequívoca, sería conveniente usar los espectros MS/MS, que dan información estructural de las moléculas, y emplear bases de datos que tengan espectros de referencia en las condiciones experimentales empleadas. Esta

gran dificultad limita la información que se puede extraer sobre el funcionamiento de los sistemas estudiados en *S. coelicolor*, pero a la vez abre la oportunidad a estudiar, con técnicas más sofisticadas y dirigidas como la resonancia magnética nuclear, y con bases de datos de mayor calidad, como se ha comentado anteriormente, todas las moléculas no conocidas que varían entre los metabolomas. Este pequeño estudio es otra evidencia de lo que queda por estudiar de *S. coelicolor* a nivel metabolómico (Traxler et al., 2013).

En cuanto a los datos que se han podido analizar y volviendo al estudio de Aor1 y sus HK relacionadas, se esperaba una similitud, al menos parcial, entre los metabolomas del mutante $\Delta aor1$ y los mutantes de las HK. En este sentido, los metabolomas de $\Delta aor1$ y $\Delta SCO2359$ comparten una menor cantidad de algunos isómeros de ACT y menos derivados de fualosina, que podría indicar menor metabolismo oxidativo (Joshi et al., 2018). Sin embargo, en el metaboloma del mutante $\Delta SCO3750$, carente de la HK más probablemente asociada con Aor1, no se detectó nada que ofrezca pistas sobre su mecanismo de acción y su relación directa con Aor1. En el mapa de calor general del estudio metabolómico (Figura R.3.4) no observan compuestos que sigan un mismo patrón en mayor o menor representación en el mutante $\Delta aor1$ y en los mutantes en las HK. Sería interesante, además de los análisis por parejas (cada mutante y el silvestre), analizar los metabolomas de $\Delta aor1$ y los mutantes en las HK en otros análisis para comprobar si existen estos patrones y, así, tener más análisis que refuercen la conexión funcional entre estos sistemas.

Cabe destacar que el metaboloma de $\Delta aor1$ presenta muchos compuestos en mayor cantidad respecto a la cepa silvestre, muchos derivados de aminoácidos según SIRIUS, lo que parece indicar la activación, en ISP2, de rutas biosintéticas que podrían estar relacionadas con los BGC de *S. coelicolor*, como el BGC *SCO0753-0756* para una bacteriocina (Nett et al., 2009), sobreexpresado en el mutante $\Delta aor1$ (Figura I.8) (Antoraz et al., 2017).

Destaca en este estudio los grandes cambios que genera la delección del sistema *SCO2359/2358* respecto a la cepa silvestre. En este caso, la dehipoxantina fualosina está en mayor cantidad en el mutante respecto al silvestre, pero la coenzima A, esencial para el metabolismo (Barritt et al., 2024), está disminuida. El metabolismo de tirosina podría estar también afectado, según la mayor cantidad de ácido homogentísico en la cepa silvestre (Y. Zhang et al., 2008). En ISP2, este sistema podría ser crucial en el metabolismo primario o en el uso de coenzima A para la síntesis de precursores de metabolitos secundarios. Además, el mutante de delección $\Delta SCO2359/2358$ restaura la diferenciación alterada en el mutante $\Delta SCO2359$ (mutante solo en la HK) (Figura R.3.1), lo que indica un papel deletéreo del RR *SCO2358* en diferenciación cuando no está su HK correspondiente. Sería interesante seguir estudiando este sistema en cuanto a su función en el metabolismo general.

Por último, en los sistemas estudiados relacionados con el hierro, AbrA y Bfr, no se detectaron metabolitos que nos permitan profundizar en la descripción de su mecanismo de acción. Tanto en los

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

metabolomas de $\Delta abrA$ como de Δbfr se detecta menos riboflavina hipotética (asignación realizada por la masa de la molécula) que en el silvestre, lo cual podría relacionarse con alteraciones en reacciones enzimáticas que usen cofactores FAD o FMN (García-Angulo, 2017). Las moléculas con potencial interés son, de nuevo, aquellas no anotadas (Anexos: Tablas A.3 y A.4).

En varios de los metabolomas analizados se detectan moléculas de la familia de las germicidinas. Estas no siguen un patrón determinado: germicidinas de varios tipos están aumentadas o disminuidas en varios mutantes. Si bien están estudiadas como inhibidores de la germinación y la elongación de hifas en *S. coelicolor*, podrían tener un papel regulatorio todavía no caracterizado, al igual que otros compuestos similares en organismos procariotas y eucariotas (Aoki et al., 2011).

Este estudio metabolómico representa un primer paso para profundizar en la comprensión de los genes estudiados en el metabolismo de *S. coelicolor*. Para ahondar de forma más precisa, como se comentó al inicio de este apartado, habría que emplear técnicas más sofisticadas que permitan identificar las moléculas desconocidas en los metabolomas de cada mutante y complementar esos datos con nuevos estudios de biología de sistemas, transcriptómicos y proteómicos, por ejemplo (N. Lee et al., 2021).



CONCLUSIONES
CONCLUSIONS

“Al fin lo estás entendiendo, tienes esperanza”.

- Sabine Wren (de la serie *Star Wars Rebels*) (2014-2018).

Conclusiones/Conclusions

Para optar a la mención internacional, las conclusiones de esta tesis están escritas en inglés. / To obtain the international mention, the conclusions of this thesis are written in English.

The conclusions of this doctoral thesis are the following:

1. The *bfr* gene in *S. coelicolor* is crucial in rich media for proper development and antibiotic production. The lack of *bfr* lowers the levels of the pigmented antibiotics ACT, RED and coelimycins, although it increases CDA production on LB.
2. Iron is involved in the secondary metabolism of *S. coelicolor* on the minimal medium NMMP. The *bfr* gene affects the levels of ACT and RED produced in liquid and solid NMMP and its absence accelerates the production of ACT on NMMP with standard iron concentrations (4 μ M).
3. The Δbfr mutant is more tolerant to oxidative stress and has more ROS. Also, the mutant is more sensitive to ascorbic acid, so ROS have an important role in the growth of this strain.
4. The lack of the *bfr* gene changes the proteome on solid LB. In general, while CDA, respiration, oxidative stress, some conserved and DNA processing proteins rise their levels, proteins from BGC, development, antibiotic regulation and ribosomes lower them.
5. The Bfr protein in *S. coelicolor* could act as an iron donor to other regulatory proteins. The Bfd protein could assist Bfr in this role.
6. Siderophores production changes in the Δbfr mutant and in the deletion mutants of the TCS involved in antibiotic production. These changes can be mediated by Bfr and indicate a signaling role of siderophores.
7. The orphan regulator Aor1 can interact with the HK SCO3750, SCO2359 and SCO2215 *in vivo*. The AbrC system is also functionally related to Aor1 by the RR AbrC3.
8. The orphan HK SCO3750 could control Aor1 on YEPD, whereas SCO2359 and SCO2215 could be regulating Aor1 on R2YE and NMMP. These three HK, and the RR associated with SCO2359 and SCO2215, affect the development and antibiotic production in the culture media tested (LB, R2YE, YEPD and NMMP). More studies are needed to determine which signals and what other factors and interactions take place in this regulatory network.
9. The genes *bfr*, *aor1*, *SCO3750*, *SCO2359* and the systems *abrA* and *SCO2359/2358* affect the metabolome of *S. coelicolor* on ISP2. Further characterization of the up and down-regulated metabolites in the mutants in these genes could unveil new details from their molecular mechanism of action.



The background features a grayscale electron micrograph of a cell, showing a large nucleus with a prominent nucleolus and numerous small, dark granules (ribosomes) in the cytoplasm. Above the cell, there are seven dark blue circular dots of varying sizes. A thick, black, wavy line runs horizontally across the lower half of the image, partially obscuring the bottom of the cell.

MATERIALES Y MÉTODOS

“A veces el mejor método para hacer algo es lanzarse”.

- Motoko Kusanagi (de la película *Ghost in the Shell*) (1995).

M.1 - Microorganismos empleados

En la Tabla M.1 se listan los microorganismos utilizados en esta tesis doctoral. Las bacterias utilizadas en los ensayos de antibiosis proceden de las colecciones de cultivos tipo ATCC y CECT.

Tabla M.1. Microorganismos empleados en la tesis doctoral.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ , φ80d _{lacZ} ΔM15, Δ(lacZYAargF)U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ . mk ⁺), <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> ET12567	<i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>hsdS</i> , <i>cat</i> , <i>tet</i>	(MacNeil et al., 1992)
<i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002	<i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>hsdS</i> , <i>cat</i> , <i>tet</i>	(Flett et al., 1997)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , λDE3	Ref.:69450; Sigma-Aldrich
<i>E. coli</i> Rosetta-gami B (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lacY1</i> , <i>aphC</i> , <i>trxB</i> , λDE3, <i>gor522::Tn10</i> , pRARE2	Ref.:71136; Sigma-Aldrich
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F <i>proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tet^r)</i>]	Ref: 200249; Agilent
<i>E. coli</i> BTH101	F ⁻ , <i>cya-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL1</i> (<i>Str^r</i>), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> , <i>mcrB1</i>	Ref: EUB001
<i>S. coelicolor</i> M145	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻	(Hopwood et al., 1985)
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>bfr</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO2113</i>	(García Abad, 2019; García-Martín et al., 2024)
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>aor1</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO2281::aac3-IV</i>	(Antoraz et al., 2017)
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>abrA</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO1744/45</i>	(Rico, Yepes, et al., 2014; Yepes et al., 2011)
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>abrC1</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO4598</i>	(Franco Echevarría, 2013; Rodríguez et al., 2015)
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>abrC2</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO4597</i>	(Franco Echevarría, 2013; Rodríguez et al., 2015)
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>abrC1/C2</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO4597/4598</i>	(Franco Echevarría, 2013; Rodríguez et al., 2015)
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>abrC3</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO4596</i>	(Rico, Santamaría, et al., 2014)
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>abrC</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO4596/4597/4598</i>	(Yepes et al., 2011)
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>SCO3750</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO3750</i>	Este trabajo.
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>SCO6424</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO6424</i>	Este trabajo.
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>SCO2359</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO2359</i>	(Sampedro Cabezas, 2024)
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>SCO2358</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO2358</i>	Este trabajo.
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>SCO2359/58</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO2359/2358</i>	(Sampedro Cabezas, 2024)
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>SCO2216</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO2216</i>	Este trabajo.
<i>S. coelicolor</i> M145 Δ <i>SCO2215/16</i>	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ Δ <i>SCO2215/2216</i>	Este trabajo.
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	Cepa silvestre	ATCC
<i>M. luteus</i> CECT 245	Cepa silvestre	CECT
<i>B. subtilis</i> CECT 4522	Cepa silvestre	CECT

E. coli DH5 α se ha empleado para construir y aislar los vectores, excepto aquellos del sistema de dos híbridos, para los cuales se utilizó *E. coli* XL1-Blue. *E. coli* ET12567 se ha utilizado para aislar los vectores previamente contruidos en un estado desmetilado, para transformar posteriormente protoplastos de *S. coelicolor*. La conjugación *E. coli*–*Streptomyces* se ha realizado mediante la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002. *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) se han empleado para la producción de proteínas. Por último, *E. coli* BTH101 se ha usado para los ensayos BACTH.

Los microorganismos fueron manipulados en una cabina de bioseguridad de clase II Tipo A BIO-II-A/M (Telstar). Su observación a nivel microscópico se realizó en un microscopio Axiophot (Zeiss).

M.1.1 - Conservación de microorganismos

El micelio de *S. coelicolor* (previamente a la obtención de esporas) y el resto de los microorganismos se conservaron en glicerol 20 % a -80 °C desde suspensiones celulares. Las cepas de *S. coelicolor* se conservaron mediante suspensiones de esporas en glicerol 20 % a -20 °C. Estas esporas se obtuvieron mediante el método descrito por David A. Hopwood y colaboradores (Hopwood et al., 1985) con Tween-80 al 0,1 %.

M.2 - Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron esterilizados en un autoclave (121 °C, presión de 1 atm, 20 min) antes de su uso. Los medios se utilizaron en formato líquido (caldo), sin agar, o en formato sólido con agar al 2 % (Ref: 1800.00; Condalab). Las coberteras de los antibiogramas utilizaron medios con agar blando (0,5 % de agar).

Los compuestos añadidos a los medios tras su esterilización fueron también esterilizados, bien por autoclave o bien por filtración mediante filtros de 0,2 μ m (Ref: CH2225-PV; Thermo Fisher Scientific) en el caso de compuestos termolábiles (como los antibióticos) o susceptibles de oxidación (como el hierro).

A continuación, se listan los medios de cultivo empleados, así como su composición y su uso:

- **2 X YT:** extracto de levadura 10 g/L; triptona 16 g/L; NaCl 5 g/L; pH 7. Utilizado para cultivar esporas de *S. coelicolor* durante las conjugaciones.
- **BHI:** peptona de gelatina 10 g/L; infusión de corazón de cerdo 10 g/L; infusión de cerebro de cerdo 7,5 g/L; glucosa 2 g/L; NaCl 5 g/L; Na₂HPO₄ 2,5 g/L; pH 7,4. Utilizado en los ensayos de antibiosis con la bacteria *S. epidermidis* y para ensayos fenotípicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Caldo/Agar nutritivo Conda (Ref: 1216.00; Conda):** extracto de carne 3 g/L; peptona de gelatina 5 g/L; pH 6,8. Utilizado para detectar producción de coelimicinas en *S. coelicolor*.
- **Caldo/Agar nutritivo Scharlau (Ref: 02-140-500; Scharlab):** extracto de carne 1 g/L; extracto de levadura 2 g/L; peptona 5 g/L; NaCl 5 g/L; pH 7,4. Utilizado para el ensayo de producción de CDA contra *B. subtilis* y para ensayos fenotípicos de *S. coelicolor*.
- **CAS.** Este medio se prepara en forma de cuatro soluciones independientes. La solución 1 (indicadora hierro-CAS, 100 mL de volumen final) contiene 10 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 1 mM disuelto en HCl 10 mM; 50 mL de solución de Chrome Azurol S (CAS) 1,21 mg/mL y 40 mL de solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 1,82 mg/mL. La solución 2 (tampón, 800 mL de volumen final) contiene 0,3 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de NaCl; 1 g de NH_4Cl ; 30,24 g de PIPES y 15 g de agar; pH 6,8. La solución 3 (solución de nutrientes, 70 mL de volumen final) contiene 2 g de glucosa; 2 g de manitol; 493 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 11 mg de CaCl_2 ; 1,17 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 1,4 mg de H_3BO_3 ; 0,04 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; y 1 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. La solución 4 consiste en casaminoácidos 10 % p/v. Para preparar el medio CAS, todas las soluciones esterilizadas se mezclan en el siguiente orden: con agitación constante, se añaden 100 mL de solución 1, lentamente, a 800 mL de solución 2, después se añaden 70 mL de solución 3 y 30 mL de solución 4. Utilizado para estudiar la producción de sideróforos.
- **ISP2:** extracto de levadura 4 g/L; extracto de malta 10 g/L; glucosa 4 g/L; pH 7,2. Utilizado para ensayos fenotípicos y para el experimento de metabolómica.
- **Medio de germinación:** CaCl_2 11 g/L, casaminoácidos 10 g/L, extracto de levadura 10 g/L. Utilizado para los ensayos de tolerancia a estrés oxidativo.
- **LB:** extracto de levadura 5 g/L; triptona 10 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,5. Utilizado para el cultivo de *E. coli* y para ensayos fenotípicos en *S. coelicolor*.
- **NMMP:** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L; casaminoácidos 5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g/L; elementos traza sin hierro 1 mL/L ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, CaCl_2 1 g/L); pH 7,2. Tras autoclavar se añaden glucosa 0,5%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 4,5 mM y el hierro desde una solución 100 mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 10 mM HCl, para que quede a una concentración final de 10 nM, 4 μM o 2 mM. Utilizado para ensayos fenotípicos.
- **PDA:** almidón de patata 4 g/L; dextrosa 20 g/L; pH 5,6. Utilizado para ensayos fenotípicos.
- **R2YE:** extracto de levadura 5 g/L; casaminoácidos 0,1 g/L, glucosa 10 g/L; sacarosa 103 g/L; TES 5,73 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; elementos traza 2 mL/L (ZnCl_2 40

mg/L; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mg/L; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L; pH 7,2. Tras autoclavar se añaden L-prolina 0,3 %; KH_2PO_4 0,005 %; y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,3 %. Utilizado como medio general para *S. coelicolor* y para ensayos fenotípicos.

- **SFM:** harina de soja 20 g/L; manitol 20 g/L; pH 6,7. Este medio se prepara con agua del grifo y se autoclava dos veces. Utilizado para la obtención de esporas de *S. coelicolor* y para el proceso de conjugación *E. coli*–*Streptomyces* (en este caso se suplementa el medio con MgCl_2 10 mM).
- **StrepMM:** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L; K_2HPO_4 0,5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L; pH 7,2. Después de autoclavar, se añade la fuente de carbono deseada (de forma general, se añade manitol al 0,5 % y glicerol al 1 %). Utilizado para ensayos fenotípicos.
- **TB:** extracto de levadura 24 g/L; peptona 12 g/L; glicerol 0,4 %; pH 7,2. Después de autoclavar, se añaden, por cada 900 mL de medio, 100 mL de solución de KH_2PO_4 170 mM y K_2HPO_4 720 mM. Utilizado para la producción de proteínas.
- **TSB/TSA:** peptona de caseína 17 g/L; peptona de soja 3 g/L; glucosa 2,5 g/L; NaCl 5 g/L; KH_2PO_4 2,5 g/L; pH 7,3. Utilizado para aislar ADN genómico de *S. coelicolor* y para ensayos fenotípicos, con esta receta y diluido 10 veces.
- **YEG + MgCl_2 :** extracto de levadura 10 g/L; glucosa 10 g/L; sacarosa 103 g/L; glicina 0,5%; MgCl_2 5 mM; pH 6. Utilizado para el crecimiento de *S. coelicolor* para la obtención de protoplastos.
- **YEPD:** extracto de levadura 10 g/L; peptona 20 g/L; glucosa 10 g/L; pH 6,5. Utilizado en los ensayos de antibiosis con la bacteria *M. luteus* y para ensayos fenotípicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

M.2.1 - Antibióticos empleados

En la Tabla M.2 se detallan los antibióticos empleados en esta tesis doctoral. Todos los antibióticos fueron manipulados en condiciones de esterilidad y filtrados antes de su uso.

Tabla M.2. Antibióticos empleados. Todos se disolvieron en agua excepto el ácido nalidíxico, marcado con un asterisco (*), que se disuelve en NaOH 0,1 M, y el cloranfenicol, marcado con una almohadilla (#), que se disuelve en etanol.

ANTIBIÓTICO	REFERENCIA	CONCENTRACIÓN EMPLEADA	
		<i>E. coli</i>	<i>S. coelicolor</i>
Ácido nalidíxico*	N4382 (Sigma-Aldrich)	25 µg/mL	-
Ampicilina	BP1760 (Thermo Fisher Scientific)	100 µg/mL	-
Apramicina	A2024 (Sigma-Aldrich)	50 µg/mL	15 µg/mL
Cloranfenicol#	190321 (MP Biomedicals)	25 µg/mL (34 µg/mL para Rosetta-gami (DE3))	-
Higromicina	HYG5000 (Formedium)	50 µg/mL	100 µg/mL
Kanamicina	BP906 (Thermo Fisher Scientific)	50 µg/mL (15 µg/mL para Rosetta-gami (DE3))	-
Neomicina	N1876 (Sigma-Aldrich)	-	50 µg/mL
Tetraciclina	T7660 (Sigma-Aldrich)	12,5 µg/mL (Rosetta-gami (DE3))	-

M.3 - Condiciones de cultivo

Los cultivos líquidos se realizaron en matraces con 1/5 de su volumen total lleno con el medio de cultivo correspondiente. Los matraces se incubaron en agitadores orbitales ISF-1-W (Kühner) o MaxQ™ 4000 (Thermo Fisher Scientific) con agitación de 200 rpm. En el caso de *S. coelicolor*, se utilizaron matraces indentados con 10 mL de medio y con $5 \cdot 10^5$ esporas/mL.

Para los cultivos en medio sólido, las placas Petri correspondientes se incubaron en estufas INE-800 (Mettler).

E. coli fue cultivada a una temperatura de 37 °C para su uso general en la construcción de vectores y como bacteria para ensayos de antibiosis. Para la producción de proteínas, se usó una temperatura de 25 °C. Para los ensayos BACTH, las cepas utilizadas crecieron a 30 °C.

S. coelicolor fue cultivada a 28 °C para su crecimiento general y los ensayos fenotípicos, y a 37 °C durante el proceso de obtención de mutantes para inducir la pérdida de los plásmidos pCRISPR-Cas9.

Las otras bacterias utilizadas para ensayos de antibiosis (*M. luteus*, *S. epidermidis* y *B. subtilis*) crecieron también a 28 °C.

Las fotografías de los cultivos en placa se obtuvieron con una cámara PowerShot G12 (Canon). Todos los ensayos se realizaron con cuatro réplicas.

M.3.1 – Ensayos fenotípicos

De forma general, para los análisis fenotípicos de las cepas obtenidas de *S. coelicolor* en medio sólido se sembraron gotas de 5 µL que contenían $5 \cdot 10^5$ esporas (a partir de una suspensión de 10^8 esporas/mL).

Los ensayos con el mutante Δbfr y M145 en distintos medios se realizaron sembrando 100 µL de suspensiones de 10^2 y 10^3 esporas/mL, de forma que creciesen colonias aisladas. Los ensayos realizados con quelantes de hierro y moléculas relacionadas con estrés oxidativo se realizaron con LB líquido en placas Falcon® 24-well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate (Ref.: 353047; Corning), con una concentración de 10^5 esporas/mL, o en LB sólido en placas de 26 pocillos de Sterilin®, de forma análoga a los ensayos de gotas descritos en el párrafo anterior.

M.4 – Manipulación de ácidos nucleicos

M.4.1 - Extracción de vectores en *Escherichia coli*

La extracción de plásmidos desde cepas de *E. coli* se realizó mediante el kit NucleoSpin® Plasmid (Ref.: 740588; Macherey-Nagel) siguiendo las recomendaciones e indicaciones del fabricante. Los plásmidos purificados se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa y se cuantificaron con un espectrofotómetro NanoPhotometer® N60 (IMPLEN).

M.4.2 - Extracción de ADN genómico de *Streptomyces coelicolor*

El ADN genómico de las cepas de interés de *S. coelicolor* se extrajo a partir de cultivos líquidos en 10 mL de TSB incubados a 28 °C durante 48 h, siguiendo una modificación del método con CTAB (Cafaro et al., 2011). Todas las centrifugaciones se realizaron con una velocidad de 13000 rpm.

Se recogió una cantidad aproximada de 300 µL de micelio, se lavó con una solución de sacarosa 10,3% y se resuspendió en 500 µL de solución de lisis (Tris-HCl 25 mM; sacarosa 0,3 M; EDTA 25 mM; lisozima 2 mg/L; RNasa 50 µg/L; pH 8). Tras una incubación a 37 °C durante 1,5 h, se añadieron 250 µL de SDS 2 % y las muestras se agitaron en vórtex hasta reducir su viscosidad. Las muestras se centrifugaron 2 min y el sobrenadante se trasladó a un nuevo tubo donde se mezcló con tampón CTAB (Tris 0,1 M; EDTA 25 mM; NaCl 1,4 M; CTAB 2 %; pH 8). Las muestras se homogeneizaron

MATERIALES Y MÉTODOS

y centrifugaron 30 s para después añadir 500 µL de mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) equilibrado con Tris-HCl 1 M (pH 8), y se recuperó la fase superior tras centrifugar 15 min. Se añadió 1 volumen de isopropanol y se incubaron las muestras 30 min a -80 °C para precipitar el ADN genómico. Tras la eliminación del sobrenadante, el precipitado se lavó con 500 µL de etanol 70 % y se dejó secar. Una vez evaporado todo el etanol, el precipitado se resuspendió en solución TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8).

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

M.4.3 – Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los oligonucleótidos empleados como cebadores se diseñaron mediante el programa SnapGene (Dotmatics) y fueron sintetizados por Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) o Sigma-Aldrich (Merck). El listado de cebadores se incluye en la Tabla A.2 de los Anexos.

Todas las PCRs se llevaron a cabo en un termociclador C1000 Touch™ Thermal Cyclers (Bio-Rad).

Las PCRs de alta fidelidad realizadas para amplificar fragmentos utilizados en la construcción de plásmidos se realizaron con el kit Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Ref.: F534S; Thermo Fisher Scientific) o KAPA Hi-Fi Hot Start (Ref.: 07958889001; Roche), siguiendo el protocolo y condiciones recomendadas por el fabricante. El programa empleado para ambas polimerasas se detalla en la Tabla M.3.

Tabla M.3. Programas de PCR generales. Programa empleado en el termociclador para las polimerasas Phusion y KAPA. “T_m” hace referencia a la temperatura de anillamiento teórica de los cebadores.

ETAPA	TEMPERATURA		TIEMPO		CICLOS	
	Phusion	KAPA	Phusion	KAPA	Phusion	KAPA
Desnaturalización inicial	98 °C	95 °C	3 min	5 min	1	1
Desnaturalización	98 °C	98 °C	30 s	30 s	35	35
Anillamiento de cebadores	T _m + 3 °C	T _m – 5 °C	15 s	15 s	35	35
Extensión	72 °C	72 °C	30 s/kb	30 s/kb	35	35
Extensión final	72 °C	72 °C	5 min	1 min/kb	1	1
Enfriamiento	4 °C	4 °C	∞	∞	1	1

Las PCRs realizadas en procesos de comprobación (p.ej. en la comprobación de la delección de genes durante la edición genética con el sistema CRISPR-Cas9) se realizaron con el kit Biotools DNA Polymerase (Ref.: 10002-4100; Biotools B&M Labs) siguiendo el protocolo y condiciones recomendadas por el fabricante. El programa empleado se detalla en la Tabla M.4.

Tabla M.4. Programa de PCR empleado para la polimerasa Biotools. "T_m" hace referencia a la temperatura de anillamiento teórica de los cebadores.

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 s	35
Anillamiento de cebadores	T _m – 5 °C	30 s	35
Extensión	72 °C	60 s/kb	35
Extensión final	72 °C	1 min/kb	1
Enfriamiento	4 °C	∞	1

M.4.4 - Electroforesis en gel de agarosa

Para separar y purificar fragmentos de ADN, se utilizaron geles con una concentración de agarosa de 0,8 % (de forma rutinaria) o de 1,2 % (para fragmentos pequeños). Dichos geles llevaban bromuro de etidio (0,25 µg/mL) para visualizar el ADN posteriormente. Además de las muestras, se añadió a cada gel el marcador de tamaños de banda GeneRuler DNA Ladder Mix (Ref.: SM0333; Thermo Fisher Scientific). Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 120 V en solución tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM y EDTA 2 mM). Las bandas de ADN se visualizaron mediante un transiluminador de luz UV GelDoc 2000 (Bio-Rad) y el programa informático Quantity One (Bio-Rad).

M.4.5 – Purificación de ADN desde gel de agarosa o digestión enzimática

Para purificar los fragmentos de ADN procedentes de PCR o digestiones enzimáticas, se utilizó el kit comercial NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up (Ref.: 740609; Macherey-Nagel) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración y calidad del ADN aislado se determinó en un espectrofotómetro NanoPhotometer® N60 (IMPLEN).

M.5 – Vectores

M.5.1 – Consideraciones generales en el manejo y construcción de vectores

En la Tabla M.5 se detallan las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo. Todas fueron empleadas siguiendo las instrucciones de la casa comercial correspondiente.

Para la clonación de fragmentos amplificados por PCR en los vectores, una vez digeridos inserto y vector, se usó la enzima T4 DNA Ligase (Ref.: EL0011; Thermo Fisher Scientific). Para evitar la religación de los vectores, estos se trataron con la fosfatasa FastAP™ Thermosensitive Alkaline

MATERIALES Y MÉTODOS

Phosphatase (Ref.: EF0654; Thermo Fisher Scientific), que desfosforila los extremos. En ambos casos se siguieron las instrucciones de la casa comercial.

Como se mencionó en el apartado “M.4.5”, los kits NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up (Ref.: 740609) y NucleoSpin® Plasmid (Ref.: 740588), ambos de Macherey-Nagel, se emplearon para la purificación de fragmentos de ADN y vectores.

La secuenciación de los fragmentos amplificados y clonados en plásmidos se realizó en el Servicio de Secuenciación de ADN de la Universidad de Salamanca, mediante el envío de los plásmidos con un oligonucleótido específico. Se utilizó el método Sanger en un secuenciador automático capilar 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Tabla M.5. Enzimas de restricción empleadas. El carácter “||” representa los puntos donde se producen los cortes.

ENZIMA DE RESTRICCIÓN	SITIO DE RESTRICCIÓN	REFERENCIA
BamHI	5' ... G GATCC ... 3' 3' ... CCTAG G ... 5'	ER0051 (Thermo Fisher Scientific)
BglII	5' ... A GATCT ... 3' 3' ... CCTAG A ... 5'	ER0081 (Thermo Fisher Scientific)
BsaI	5' ... GGTCTCN ... 3' 3' ... CCAGAGN(N) ₄ ... 5'	R3733 (New England Biolabs)
KpnI	5' ... GGTAC C ... 3' 3' ... C CATGG ... 5'	R0142 (New England Biolabs)
NcoI	5' ... C CATGG... 3' 3' ... GGTAC C ... 5'	ER0571 (Thermo Fisher Scientific)
NdeI	5' ... CA TATG ... 3' 3' ... GTAT AC ... 5'	ER0581 (Thermo Fisher Scientific)
PstI	5' ... CTGCA G ... 3' 3' ... G ACGTC ... 5'	ER0611 (Thermo Fisher Scientific)
SnaBI	5' ... TAC GTA ... 3' 3' ... ATG CAT ... 5'	R0130 (New England Biolabs)
StuI	5' ... AGG CCT ... 3' 3' ... TCC GGA ... 5'	R0187 (New England Biolabs)
XbaI	5' ... T CTAGA ... 3' 3' ... AGATC T ... 5'	R0145 (New England Biolabs)
XhoI	5' ... C TCGAG ... 3' 3' ... GAGCT C ... 5'	ER069 (Thermo Fisher Scientific)

M.5.2 – Vectores utilizados

La Tabla A.1, en la sección de Anexos, contiene todos los vectores empleados en la tesis doctoral. El siguiente apartado, “M.5.3.”, describe el proceso de construcción de los vectores generados en este trabajo.

M.5.3 - Construcción de los vectores generados

En este apartado se detalla la construcción de los vectores generados en la tesis doctoral. Estos vectores se han agrupado según el vector original y el tipo de ensayo realizado con ellos.

Todos los vectores se diseñaron con el programa SnapGene (Dotmatics). Para la construcción se siguieron las consideraciones descritas en el apartado “M.5.1”. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla A.2 de los Anexos.

M.5.3.1 - Vectores para la construcción de mutantes (derivados de pCRISPR-Cas9)

Las secuencias guía se diseñaron con la herramienta web Benchling (Benchling, <https://www.benchling.com/>) y se comprobó su utilidad y la ausencia de cortes inespecíficos (*off-targets*) en otras partes del genoma de *S. coelicolor* con Cas-OFFinder (Bae et al., 2014a). Para construir los plásmidos pCRISPR-Cas9-sg, que contienen el sgRNA dirigido al gen en el que corta la enzima Cas9, se realizó una PCR usando como molde el plásmido pCRISPR-Cas9 y como parejas de oligonucleótidos SAM-051 y otro específico para el gen a deletar (consultar la Tabla A.2). El protocolo específico de PCR para este proceso se detalla en la Tabla M.6. El sgRNA, una vez purificado, se clonó en pCRISPR-Cas9 utilizando los sitios NcoI y SnaBI.

Tabla M.6. Programa de PCR para CRISPR/Cas9. Protocolo de PCR para la construcción de los sgRNA con la polimerasa Phusion (Thermo Fisher Scientific).

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	98 °C	30 s	1
Desnaturalización (1ª etapa)	98 °C	10 s	10
Anillamiento de cebadores (1ª etapa)	48 °C	30 s	10
Extensión (1ª etapa)	72 °C	15 s	10
Desnaturalización (2ª etapa)	98 °C	10 s	15
Anillamiento de cebadores (2ª etapa)	55 °C	30 s	15
Extensión (2ª etapa)	72 °C	15 s	15
Extensión final	72 °C	10 min	1
Enfriamiento	4 °C	∞	1

Para construir los plásmidos completos, a partir de ADN genómico de *S. coelicolor* se amplificaron 1000 pb de cada uno de los brazos *upstream* y *downstream* del gen o genes a deletar. Los oligonucleótidos de las regiones adyacentes al gen o genes objetivo se diseñaron con, al menos, 20 nt solapantes de la región opuesta, de manera que los amplicones *upstream* y *downstream* generados solapan y se puede realizar una PCR solapante para construir un único fragmento de 2000 pb que corresponde a las regiones adyacentes al gen o genes a deletar, pero con este o estos genes ausentes (Figura M.1). Estos moldes de delección se clonaron en los vectores pCRISPR-Cas9 con los sgRNA correspondientes en los sitios XbaI y StuI.

MATERIALES Y MÉTODOS

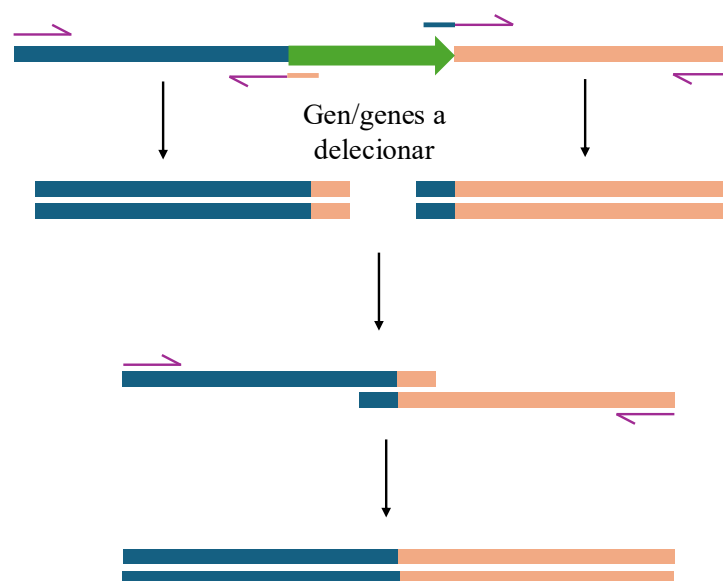


Figura M.1. Esquema de la construcción de los moldes de delección mediante PCR solapante.

En la Tabla A.2 de los Anexos se especifican los oligonucleótidos usados para cada gen estudiado. En todos los casos, el cebador SAM-051 fue el *reverse* empleado para construir los sgRNAs guías.

M.5.3.2 - Vectores para complementación de mutantes (derivados de pKC796)

Para la complementación del mutante Δbfr , el gen *bfr* se amplificó junto a su promotor empleando los oligonucleótidos LGA001 y LGA002, y se clonó el amplicón en el vector integrativo pKC796 en su sitio BamHI.

Para complementar los otros mutantes generados, los genes deletados se clonaron, junto a sus promotores correspondientes, en el plásmido pKC796 en los sitios BglII y XbaI. *SCO3750* se amplificó con los oligonucleótidos JGM62 y JGM63; *SCO2359*, con ESC07 y ESC08; y *SCO2359/SCO2358*, con ESC07 y ESC29.

M.5.3.3 - Vectores para sobreexpresión (derivados de pN702GEM3)

El gen *bfr* se clonó en el plásmido multicopia pN702GEM3, junto a su promotor, mediante amplificación con los oligonucleótidos LGA001 y LGA002, en el sitio BamHI.

El gen *SCO3750* se amplificó con los oligonucleótidos JGM27 y JGM28 y se clonó, junto a su promotor, en el plásmido pN702GEM3 en los sitios BglII y XbaI.

M.5.3.4 - Vectores para producción de proteínas (derivados de pET22b[+])

El gen *SCO3750* se amplificó utilizando los oligonucleótidos JGM66 y JGM67. Este amplicón excluye el codón de parada de la secuencia codificante del gen y permite su clonación en fase con la

etiqueta 6xHis, empleando los sitios de restricción NdeI y XhoI. Se siguió la misma estrategia para clonar la versión citoplásmica de *SCO3750* (c*SCO3750*), con los oligonucleótidos JGM68 y JGM67.

M.5.3.5 - Vectores para ensayo BACTH

Las secuencias codificantes de los genes de interés se amplificaron con una pareja de oligonucleótidos determinada y se clonaron con los mismos sitios de restricción para los 4 plásmidos empleados. En todos los casos, los genes se amplificaron con uno o dos nt añadidos, posteriores al sitio de restricción inicial y anteriores al codón de inicio, para que queden en fase con los fragmentos de adenilato ciclase T25 o T18 de los plásmidos. En el caso de utilizar el sitio PstI, la clonación en el plásmido pKT25 utiliza un oligonucleótido *forward* distinto a los otros plásmidos, ya que en esta situación la enzima corta en medio de un codón (en los otros plásmidos corta fuera del codón).

Los genes del sistema *abrA* se clonaron en los sitios XbaI y KpnI de los vectores. Se emplearon los oligonucleótidos JGM73 y JGM74 para el gen *abrA1*, y JGM75 y JGM76, para *abrA2*.

El gen *aorI* se amplificó con los oligonucleótidos JGM71 (JGM71-pKT para el plásmido pKT25) y JGM72, y se clonó con los sitios PstI y BamHI.

El gen *SCO3750* se amplificó con los oligonucleótidos JGM69 y JGM70, y se clonó con los sitios XbaI y KpnI.

Por último, los genes de las otras HK estudiadas se clonaron con los sitios XbaI y PstI. *SCO2215* se amplificó usando los oligonucleótidos JGM84 (JGM84-pKT para el plásmido pKT25) y JGM85, y *SCO2359*, mediante JGM86 (JGM86-pKT para pKT25) y JGM87.

M.5.3.6 - Vectores para inhibición de la expresión génica mediante CRISPRi (derivados de pCB-1)

Estos vectores fueron construidos durante la estancia internacional en el laboratorio del Prof. Dr. Gilles van Wezel. Para ello, los espaciadores específicos para los genes de interés fueron diseñados con la herramienta CRISPy-web (<https://crispy.secondarymetabolites.org/#/input>) (Blin et al., 2016). Se diseñaron dos oligonucleótidos para formar el espaciador por Golden Gate, uno *forward* (con la secuencia 5'–3' del espaciador y la secuencia “GCCA” en el extremo 5', para generar un extremo compatible con el corte de la enzima BsaI) y uno *reverse* (con la secuencia complementaria y la secuencia “AAAC” en el extremo 5').

Para realizar el ensamblaje por Golden Gate, primero se anillaron los espaciadores: se añadieron 5 µL de un stock 100 µM de cada oligonucleótido en 90 µL de HEPES 30 mM, pH 7.8. Esta mezcla se calentó a 95 °C durante 5 min y se enfrió hasta 4 °C con un gradiente de 0,1 °C/s. La mezcla para la reacción de Golden Gate consistió en 100 ng del vector pCB-1; 0,3 µL de una dilución 1:10 de los

MATERIALES Y MÉTODOS

oligonucleótidos anillados; 2 µL de tampón de la T4 ligasa; 1 µL de la enzima ligasa T4 DNA Ligase (Ref.: EL0011; Thermo Fisher Scientific); 1 µL de la enzima BsaI (Ref.: R3733; New England Biolabs) y agua hasta completar 20 µL. El protocolo del termociclador para este ensamblaje se detalla en la Tabla M.7.

Tabla M.7. Protocolo de Golden Gate.

TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
37 °C	10 min	9
16 °C	10 min	9
50 °C	5 min	1
65 °C	20 min	1
4 °C	∞	1

M.6 - Introducción de vectores en microorganismos

M.6.1 - Transformación de *Escherichia coli*

En primer lugar, se obtuvieron células competentes mediante un método químico con iones Mg^{2+} (Nishimura et al., 1990), con modificaciones. La cepa de *E. coli* de interés se cultivó a 37 °C *overnight* y 0,5 mL de este preinóculo se incubaron en 50 mL medio A (glucosa 0,2 % y $MgSO_4$ 10 mM en medio LB) hasta alcanzar una DO de 0,6. Tras este punto, las células se mantuvieron a 4 °C durante 10 min, se centrifugaron a 4 °C durante 10 min y se resuspendieron en 250 µL de medio A mezclado con 1250 µL de medio B (glicerol 40 %, PEG-6000 15 % y $MgSO_4$ 10 mM en medio LB). Las células se conservaron en alícuotas a -80 °C.

Estas células competentes se transformaron mediante un método de choque térmico (Hanahan, 1983). Cincuenta µL de *E. coli* se mezclaron con el plásmido de interés y se sometieron a diversas incubaciones: 30 min a 4 °C, 2 min a 42 °C y 2 min a 4 °C. A cada transformación, después, se añadió 500 µL de LB y las células se incubaron a 37 °C durante 1-1,5 h. Por último, estas muestras se sembraron en medio LB sólido con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37 °C hasta el día siguiente.

M.6.2 - Transformación de *Streptomyces coelicolor*

Para la preparación, transformación y conservación de protoplastos, se utiliza un tampón denominado **medio P**: 5,73 g/L TES; 103 g/L sacarosa; 2,03 g/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,25 g/L K_2SO_4 ; 3,68 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 50 mg/L KH_2PO_4 ; 2 mL/L elementos traza (40 mg/L $ZnCl_2$; 200 mg/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 10 mg/L $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 10 mg/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 10 mg/L $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$; 10 mg/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$); pH 7,2. Este tampón se prepara como **solución P**, sin KH_2PO_4 , y

posteriormente se añade este compuesto desde una solución al 1 % para formar medio P (se añaden 5 μL de KH_2PO_4 1 % por cada mL de solución P).

En primer lugar, se obtuvieron protoplastos de la cepa de interés de *S. coelicolor* con el método de Bibb y colaboradores (Bibb et al., 1978). Se incubaron 250 mL de YEG + MgCl_2 con $5 \cdot 10^5$ esporas/mL durante 36 h a 28 °C. El aspecto del micelio se comprobó en el microscopio óptico para descartar la presencia de contaminaciones y, después, se lavó dos veces con sacarosa 10,3 % (centrifugaciones a 4500 rpm de 10 min), y a una cantidad de 5 mL del micelio resuspendido en sacarosa, una vez centrifugado y sin líquido, se le añadieron 5 mL de medio P con 1,5 mg/mL de lisozima. Tras incubarlo 1-1,5 h a 37 °C, revisando al microscopio óptico la formación de protoplastos, estos protoplastos obtenidos se lavaron dos veces con medio P y, tras resuspenderlos en este tampón, se almacenaron a -80 °C.

Estos protoplastos se transformaron empleando plásmidos desmetilados, obtenidos desde *E. coli* ET12567, y se empleó un método descrito en el mismo trabajo de Bibb y colaboradores (Bibb et al., 1978), con modificaciones. Cincuenta μL de protoplastos se mezclaron con el plásmido de interés y con 125 μL de PEG-6000 (Ref.: 443915V, BDH) 25 % en solución P. Estas mezclas se incubaron 2 min a temperatura ambiente y se les añadieron 400 μL de medio P. Los protoplastos transformados se sembraron en medio R2YE sólido y se incubaron a 28 °C durante 24 h. Finalmente, a cada placa se añadió una cobertera de 300 μL con el antibiótico correspondiente, a partir de una solución del antibiótico en agua, de forma que en las placas el antibiótico quedase a la concentración requerida (Tabla M.2), asumiendo un volumen de medio de cultivo en las placas de 25 mL. Posteriormente, se continuó la incubación.

M.6.3 - Conjugación *Escherichia coli*-*Streptomyces coelicolor*

Para transferir los vectores derivados de pCRISPR-Cas9 y pCB-1 se adaptó un método de conjugación *E. coli*-*Streptomyces* (Flett et al., 1997). Se sometieron 500 μL de medio 2 X YT con 10^8 esporas de *S. coelicolor* a un choque térmico de 10 min a 50 °C y se dejaron germinar las esporas a 30 °C durante 1-2 h. En paralelo, se cultivaron matraces de 10 mL con *E. coli* ET12567/pUZ8002 con el plásmido de interés en LB con los antibióticos correspondientes hasta alcanzar una DO de 0,6. Estas células se lavaron dos veces con LB sin antibiótico para quitar todos los restos de antibióticos posibles, y 500 μL de estos cultivos resuspendidos en 1 mL de LB se mezclaron con las esporas de *S. coelicolor*. La mezcla se sembró en SFM + MgCl_2 10 mM y, tras 24 h de incubación a 30 °C, se añadió una cobertera de 300 μL de ácido nalidíxico (para eliminar a *E. coli*) y del antibiótico correspondiente (para seleccionar las colonias de *S. coelicolor* con el plásmido de interés), a partir de una solución intermedia de los antibióticos en agua y asumiendo un volumen de medio de cultivo de 25 mL en cada placa.

M.7 – Obtención de mutantes con CRISPR-Cas9

En este apartado se detalla el procedimiento general de obtención de mutantes de *S. coelicolor*. Este método es una modificación del trabajo original con pCRISPR-Cas9 (Tong et al., 2015).

Los plásmidos derivados de pCRISPR-Cas9 se construyeron como se indica en el apartado “M.5.3.1” y se transformaron en *E. coli* ET12567/pUZ8002. Las conjugaciones *E. coli*–*S. coelicolor* se realizaron como se describe en el apartado “M.6.3.”. Para cada deleción deseada se emplearon tres plásmidos: el plásmido pCRISPR-Cas9 original como control de conjugación (se obtienen colonias de *S. coelicolor* que incorporan el plásmido), el plásmido con el sgRNA guía sin molde de deleción (pCRISPR-sg) como control de corte (no se obtienen colonias de *S. coelicolor*, la Cas9 corta con el sgRNA, pero no repara dicho corte al no haber molde de deleción) y el plásmido completo (sgRNA y molde de deleción).

Una vez realizadas las conjugaciones con buenos resultados en los controles y con colonias obtenidas en el plásmido completo, se seleccionaron varias colonias y se realizaron dos pases en SFM con apramicina (marcador de selección del plásmido) y ácido nalidíxico (para eliminar cualquier *E. coli* que quedase). Para inducir la pérdida del plásmido, se cultivaron las cepas en TSB líquido a 37 °C durante 48 h (los plásmidos derivados de pCRISPR-Cas9 son termosensibles). El micelio resultante se sembró en R2YE y R2YE con apramicina, y se seleccionaron los clones sensibles al antibiótico.

Para comprobar la deleción de los genes, se extrajo ADN genómico (apartado “M.4.2”) de *S. coelicolor* M145 (silvestre) y de las cepas resultantes de la conjugación. Mediante oligonucleótidos externos y/o internos a la zona delecionada, se comprobó la amplificación de fragmentos de menor tamaño (PCR de comprobación externa) y la ausencia de amplificación (PCR de comprobación interna) en las nuevas cepas generadas. Los oligonucleótidos diseñados para estas comprobaciones se detallan en la Tabla A.2 de los Anexos.

Una vez comprobados los mutantes, se obtuvieron esporas para su manejo y cuantificación. Además, en algunos casos se realizaron ensayos de complementación de los mutantes mediante la obtención de protoplastos y su transformación (ver apartado “M.6.2.”) con los plásmidos pKC796 con los genes delecionados y sus promotores clonados. Con ello, se comprobaba si, al reintroducir en el genoma la zona delecionada, se recuperaba el fenotipo silvestre (comparando con la cepa M145 que lleva el plásmido vacío pKC796 y con la cepa mutante con el mismo plásmido control).

M.7.1 – Inhibición de genes por CRISPRi

Para inhibir la expresión de *SCO2215* y *bfd/SCO2114*, se realizó una conjugación con los plásmidos correspondientes, pCB-2215 (conjugación con *S. coelicolor* M145) y pCB-bfd (conjugación con las

cepas M145 y Δbfr). Una vez obtenidas las esporas de las cepas con los plásmidos, la expresión de los genes de interés se inhibió utilizando cumato en los medios de cultivo, a las concentraciones 20 y 100 μM (Bai & van Wezel, 2023) .

M.8 - Manipulación de proteínas

M.8.1 - Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el kit Quick Start™ Bradford Protein Assay (Ref.: 500-0201; Bio-Rad) y un espectrofotómetro U-2000 Spectrophotometer (Hitachi) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) (Ref.:608-274-4330; Promega Biotec) para elaborar la curva estándar.

M.8.2 – Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*

Para analizar la producción de las dos versiones de la proteína SCO3750 (entera y parte citoplásmica) estudiadas en este trabajo, se utilizó como base el vector pET-22b(+). Al clonar los genes de las proteínas de interés en este vector, las proteínas resultantes quedan etiquetadas con una cola de histidinas (etiqueta 6xHis). En el apartado “M.5.3.4” se detalla la construcción de los plásmidos pET-3750E y pET-c3750. En estos plásmidos, el gen de la proteína que se quiere sintetizar se clona bajo una región con el promotor de la polimerasa T7 y con una región operadora del operón *lac*, a la que se une el represor LacI. En una cepa de *E. coli* que posea un virus bacteriófago lisogénico con la polimerasa T7, y en presencia de IPTG (se une a LacI e inhibe la represión ejercida), se induce la transcripción del gen y su traducción posterior.

Se analizó la producción de estas proteínas desde *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* Rosetta-gami B (DE) transformadas con los plásmidos pET-3750E y pET-c3750. Para estos ensayos de optimización, a pequeña escala, primero se cultivaba un preinóculo de estas células a 37 °C en matraces con 10 mL que se crecían toda la noche, y a partir de este preinóculo, se crecían matraces con 50 mL de medio.

La producción de proteínas se indujo al añadir IPTG. Se utilizó una concentración 1 mM de IPTG aplicada a dos DO (0,6 y 2) de cultivo y con dos condiciones de crecimiento: incubación a 37 °C durante 4 h o incubación a 25 °C durante 8 h. Se valoró la producción de proteínas en LB y TB.

Para la producción final, una vez optimizado el proceso, la proteína SCO3750 entera se produjo desde *E. coli* BL21 (DE3) en medio TB, utilizando preinóculos de 50 mL y cultivos de 250 mL, en los cuales la síntesis de la proteína de interés se indujo con IPTG 1 mM cuando la OD fue de 0,6 y con una incubación a 25 °C durante 12 h. La versión citoplásmica se produjo en LB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Por otro lado, la producción de proteína Aor1 ya estaba optimizada desde *E. coli* Rosetta-gami B (DE3), con el plásmido pET-Aor1, en medio LB (Sánchez de la Nieta Moreno, 2022), y se adaptó esta producción. Se utilizaron cultivos con 100 mL de LB, y se utilizó IPTG 1 mM cuando la DO alcanzó el valor 0,6. El cultivo se dejó también 12 h a 25 °C.

M.8.3 – Extracción de proteínas de *Escherichia coli*

Para la rotura de las células de *E. coli* se utilizó el detergente CelLytic™ B Cell Lysis (Ref.:C8740; Sigma-Aldrich), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La extracción se realizó en Tris 10 mM pH 7,5, y el detergente se suplementó con lisozima 0,2 mg/mL, DNasa 50 U/mL e inhibidor de proteasas cOmplete sin EDTA (Ref.: 11 873 580 001; Roche).

M.8.4 – Purificación de proteínas etiquetadas con cola de histidinas

A partir de las fracciones solubles de los extractos celulares de *E. coli*, se purificaron las proteínas de interés, gracias a la etiqueta 6xHis fusionada a ellas, con la resina HisPur™ Cobalt Resin (Ref.: 89964; Thermo Fisher Scientific), utilizando columnas Econo-Pac® Disposable Chromatography Columns (Ref.: 7321010, Bio-Rad). Se siguieron las indicaciones del fabricante en cuanto a las soluciones de equilibrado y las condiciones empleadas. Una vez las proteínas se unieron a la resina, esta se lavó con solución de equilibrado con 20 y 30 mM de imidazol, y las eluciones de las proteínas se realizaron con 250 mM y 1 M de imidazol.

Para eliminar el imidazol de las muestras con proteínas, estas se dializaron utilizando los tubos Amicon® Ultra – 15 Centrifugal Filters con filtros de 10 kDa (Ref.: UFC901024; Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante. El tampón de diálisis utilizado se compone de Tris 50 mM, NaCl 100 mM y glicerol 10 %, pH 7,5.

M.8.5 – Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)

Como TCA 100 % se utilizó una solución de 100 g de TCA (Ref.: 20742.180; VWR Chemicals) en 45,5 mL de agua milliQ. Para precipitar proteínas, se añadió, a cada muestra, 1/10 del volumen total de las muestras de TCA 100 %. Las muestras se incubaron a 4 °C durante 30 min, se eliminó el sobrenadante tras centrifugar (13000 rpm, 5 min), se lavaron los precipitados con 600 µL de TCA 0.2 % frío y se repitió la eliminación del sobrenadante. Los precipitados finales se resuspendieron en tampón de carga de electroforesis (preparado 4 veces concentrado respecto a su uso: Tris-HCl 0,25 M; glicerol 40 %; SDS 8 %; azul de bromofenol 0,05 %; DTT 50 mM; pH 6,8).

M.8.6 – Electroforesis de proteínas

Las electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizaron con las cubetas de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell incluidas en el equipo 2-Gel Tetra and Blotting Module (Ref.: 1660827EDU; Bio-Rad).

Para la separación de proteínas, se prepararon geles de poliacrilamida (relación acrilamida/bisacrilamida de 37,5/1, Ref.: 1610158; Bio-Rad) con dos partes: gel separador (15 % de acrilamida, parte inferior de los geles) y gel de empaquetamiento (4 % de acrilamida, parte superior de los geles). Una vez preparados estos geles en los cristales del equipo y colocados en los soportes, las muestras de proteínas se prepararon en el tampón de carga de electroforesis y se hirvieron a 100 °C durante 5 min. El proceso se realizó en tampón de electroforesis (Tris-HCl 30 g/L; glicina 14,4 %; SDS 0,5 %) a un amperaje constante de 30 mA/gel.

Como marcador de peso molecular, se utilizaron dos tipos de marcador: Unstained Low Range SDS-PAGE Standards (Ref.: 1610304; Bio-Rad), también hervido, para las electroforesis generales, y Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Ref.: 26634; Thermo Fisher Scientific), sin hervir, para las electroforesis seguidas de western blot.

M.8.6.1 - Phos-tag

Para la electroforesis con Phos-tag, se modificó la electroforesis siguiendo las recomendaciones de Nagy y colaboradores (Nagy et al., 2018). Los geles de poliacrilamida se prepararon sin SDS y se añadió, al gel de separación, 25 µM de Phos-tag (Ref.: AAL-107M; NARD Institute) y 50 µM de ZnCl₂. Tras la electroforesis, los geles se lavaron con CAPS 10 % y 1 mM EDTA, 2 veces y durante 10 min, para eliminar los iones Zn²⁺ y evitar problemas en la transferencia. Además, se hizo un último lavado sin EDTA antes de transferir las proteínas.

M.8.7 – Tinción de geles de poliacrilamida con proteínas

Para visualizar las proteínas separadas por SDS-PAGE, los geles se sumergieron en una solución de metanol:ácido acético:agua (50:10:40) con azul de Coomassie 0,5 % y se mantuvieron en agitación durante 30 min. Tras varios lavados con agua, los geles se lavaron en metanol:ácido acético:agua (25:10:65) tres veces durante 15 min en agitación, para quitar el exceso de colorante. Finalmente, los geles se fijaron con etanol 25 % durante 30 min.

Para comprobar la fosforilación de proteínas en gel, se utilizó el compuesto Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Ref.: P33301; Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

MATERIALES Y MÉTODOS

M.8.8 – Western blot

Para la detección de proteínas, las proteínas de las muestras sometidas a SDS-PAGE se transfirieron a membranas Inmobilon-P PVDF Membrane (Ref.: IPVH00010; Millipore), activadas previamente con metanol, mediante el sistema Tetra Blotting Module (Bio-Rad) a un amperaje constante de 250 mA durante 40 min, utilizando como tampón de transferencia CAPS 10 mM y metanol 10 %, pH 11. Las membranas se lavaron en agua y TBST (Tris-HCl 10 mM; Tween-20 0,05 %; NaCl 0,15 M; pH 8) y se incubaron con una solución de BSA 1 % durante 30 min a temperatura ambiente para bloquearlas.

Posteriormente las membranas se incubaron con una solución del anticuerpo primario en TBST. Los anticuerpos primarios utilizados fueron His-probe rabbit policlonal IgG (Ref.: sc-803; Santa Cruz Biotechnology), en una dilución 1/40000, para proteínas etiquetadas con cola de histidinas, y anticuerpos purificados α -Aor1 (Sánchez de la Nieta Moreno, 2022), en una dilución 1/1000, para la detección de Aor1. Ambos anticuerpos se diluyeron en TBST y se incubaron con las membranas durante 30 min a temperatura ambiente.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron tres veces con TBST y se incubaron con una solución del anticuerpo secundario Anti-Rabbit IgG (Fc) AP Conjugated (Ref.: S3738; Promega), en una dilución 1/7500 en TBST, durante 30 min a temperatura ambiente. Este anticuerpo está dirigido a IgG de conejo y está conjugado con fosfatasa alcalina.

Para el revelado, las membranas se lavaron tres veces con TBST y se incubaron con 5 mL de tampón de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM; NaCl 100 mM; $MgCl_2$ 5 mM; pH 9,5) con 33 μ L de stock de nitrotetrazolio azul (NBT) (50 mg/mL de NBT en 70 % de dimetilformamida) y 41 μ L de stock de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) (20 mg/mL en agua). Cuando aparecieron las bandas a la intensidad deseada, se detuvo la reacción con agua miliQ.

M.8.9 – Ensayos de fosforilación *in vitro*

En volúmenes finales de 20 μ L, se incubaron 2 μ g de HK purificada en tampón de fosforilación (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) con $MgCl_2$ 10 mM y ATP 20 mM. Para valorar la fosforilación de Aor1, se incubaron muestras de las proteínas Aor1 (también con 2 μ g de esta proteína) y las dos HK purificadas en solitario, como control de la visualización de las proteínas, y muestras con Aor1 y una HK (SCO3750E y cSCO3750), sin ATP (como control sin fosforilación) y con ATP. Estas muestras se incubaron a 30 °C durante 15 y 30 min. Después, se cargaron en SDS-PAGE para teñir los geles resultantes con Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain.

M.8.10 – Extracción de proteínas general de *Streptomyces coelicolor*

Se recogió el micelio de cultivos líquidos de *S. coelicolor*, de la cepa requerida en las condiciones determinadas, y se lavó el micelio con sacarosa 10,3 %. Las muestras lavadas se resuspendieron en Tris-HCl 1 M pH 7 con inhibidor de proteasas cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Ref.: 11697498001; Roche). Después, el micelio se rompió mediante adición de esferas de vidrio Glasperlen 0,4-0,6 mm Φ (Ref.: BBI-8541701; B. Braun Biotech International) en un disruptor celular FastPrep FP120 (Savant), con 4 ciclos de 15 s a máxima intensidad. El proceso se realizó a 4 °C. Los sobrenadantes resultantes se utilizaron como extractos de proteínas.

M.8.11 – Proteómica

M.8.11.1 - Extracción de proteínas

Para el ensayo de proteómica, se partió de micelio de las cepas M145 y Δbfr cultivado sobre membranas de celofán (cedidas por el John Innes Centre) en placas de LB. El micelio se recogió con una espátula estéril y se lavó dos veces con sacarosa 10,3 %. Todo el proceso se realizó a 4 °C. Las muestras se resuspendieron en tampón de extracción (Tris-HCl 0,1 M; DTT 5 mM; urea 6 M; tiourea 2 M; CHAPS 1 %; pH 7) suplementado con inhibidor de proteasas cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Ref.: 11697498001; Roche). Las proteínas se extrajeron con 4 ciclos de sonicación (10 min 30 s ON y 30 s OFF, intensidad alta) en un sonicador Bioruptor Standard (Diagenode). Como control visual de la extracción, se cargó una pequeña parte de las muestras en SDS-PAGE. Además, se cuantificó la cantidad de proteínas por el método de Bradford.

M.8.11.2 - Proteómica cuantitativa

Para el análisis de Proteómica, se enviaron 500 μ g de proteínas congeladas a -80 °C al Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) (<https://proteo.cnb.csic.es/proteomica/>).

En el CNB se siguió el siguiente procedimiento: las muestras se precipitaron mediante un método basado en metanol/cloroformo para eliminar posibles elementos interferentes. Tras la precipitación, las muestras se cuantificaron y el equivalente a 80 μ g de cada muestra se apartó para los pasos de reducción-alkilación (con TCEP y CAA, respectivamente) y posterior digestión con tripsina. Cada digerido se secó, desaló y limpió mediante Stage-Tips. El equivalente a 25 μ g de cada muestra se utilizó para un marcaje aleatorizado de las muestras (para evitar sesgos de marcaje) con TMTpro18, con un control interno formado por una mezcla (*pool*) de todas las muestras con una cantidad análoga a las muestras individuales.

Una vez marcadas, las muestras se cuantificaron con QUBIT, se secaron y se resuspendieron en TFA 0,1 % para su posterior prefraccionamiento con el Kit Pierce High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation según las especificaciones para el tratamiento de muestras marcadas. Las fracciones

MATERIALES Y MÉTODOS

limpias se resuspendieron en 12 μL de tampón (acetonitrilo 2 % y ácido fórmico 0,1 %) para su cuantificación por QUBIT.

El equivalente a 1 μg total de cada fracción se analizó en un equipo de cromatografía líquida ThermoUltimate 3000 acoplado a un espectrómetro de masas Thermo Orbitrap Exploris OE240, trabajando en modo DDA (*data dependent acquisition*). La separación de los péptidos tripticos marcados se realizó en una columna de fase reversa C18 de 75 μm de diámetro interno y 50 cm de longitud, utilizando un flujo de 250 nL/min y un gradiente de 90 min. Los espectros MS1 y MS2 recogidos se utilizaron para lanzar una serie de búsquedas frente a la base de datos específica de *S. coelicolor* descargada de UniprotKB, utilizando cuatro motores de búsqueda combinados (Mascot, Sequest, Amanda y MSFragger) y combinando el resultado de la identificación en un único archivo de salida. La extracción de las señales (*reporter ions*) de cada versión del reactivo TMT y su utilización para la cuantificación se realizó mediante el software Proteome Discoverer v2.5. La significación estadística se calculó mediante un t-test.

M.9 – Ensayos de dos híbridos BACTH

Los ensayos de interacción de proteínas se realizaron mediante el kit Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid (BACTH) System de Euromedex (Ref.: EUK001), basado en el ensayo de adenilato ciclasa (Battesti & Bouveret, 2012; Mehla et al., 2017). Los plásmidos de este kit están listados en la Tabla A.1 de los Anexos, mientras que la construcción de los vectores se detalla en el apartado “M.5.3.5”.

Los vectores se construyeron siguiendo los métodos descritos en el apartado “M.5.1”. Se empleó la cepa *E. coli* XL1-Blue para la transformación de las reacciones de ligación, siguiendo el protocolo de Euromedex.

Una vez contruidos y secuenciados, los vectores se transformaron en pareja, con todas las combinaciones posibles de interacción entre proteínas (8 posibles combinaciones de plásmidos por cada pareja de proteínas a estudiar) en *E. coli* BTH101, mediante selección en LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De forma general, siendo “X” una proteína e “Y” otra, se generaron los siguientes transformantes: pKT25-X/pUT18C-Y, pKT25-X/pUT18-Y, pKNT25-X/pUT18C-Y, pKNT25-X/pUT18-Y, pKT25-Y/pUT18C-X, pKT25-Y/pUT18-X, pKNT25-Y/pUT18C-X y pKNT25-Y/pUT18-X.

Estas cepas de *E. coli* se cultivaron en LB líquido + ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + IPTG 0,5 mM a 37 °C durante una noche y, tras igualar las DO, se inocularon gotas de 8 μL en placas de LB + ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + IPTG 0,5 mM + X-gal 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Además de los transformantes de interés, se incluyó el control positivo incluido en el kit (*E. coli*

BTH101 con los plásmidos pKT25-zip y pUT18C-zip) y dos controles negativos, que consisten en *E. coli* BTH101 con dos parejas de plásmidos vacíos (pKT25/pUT18C y pKNT25/pUT18).

La interacción entre las proteínas estudiadas se observa como una coloración azul verdosa de las colonias, debido a la hidrólisis del X-gal por la β -galactosidasa activada por la producción de AMP cíclico, que ocurre si los fragmentos de la AC se unen al interaccionar las proteínas de estudio (Battesti & Bouveret, 2012; Mehla et al., 2017).

El crecimiento y color de las colonias se siguió durante 3 días. Se realizaron fotos de las colonias y, con el software Fiji, se separó la señal RGB de las imágenes y se cuantificó la señal roja (el color azul-verdoso producido por la hidrólisis del X-gal tiene señal verde y azul del canal RGB, por lo que cuanta más señal roja tenga la colonia, más amarilla es la colonia y menos señal azul-verdosa hay) (Figura M.2). Se representó en el análisis el inverso de esta señal (a mayor medida, mayor interacción).

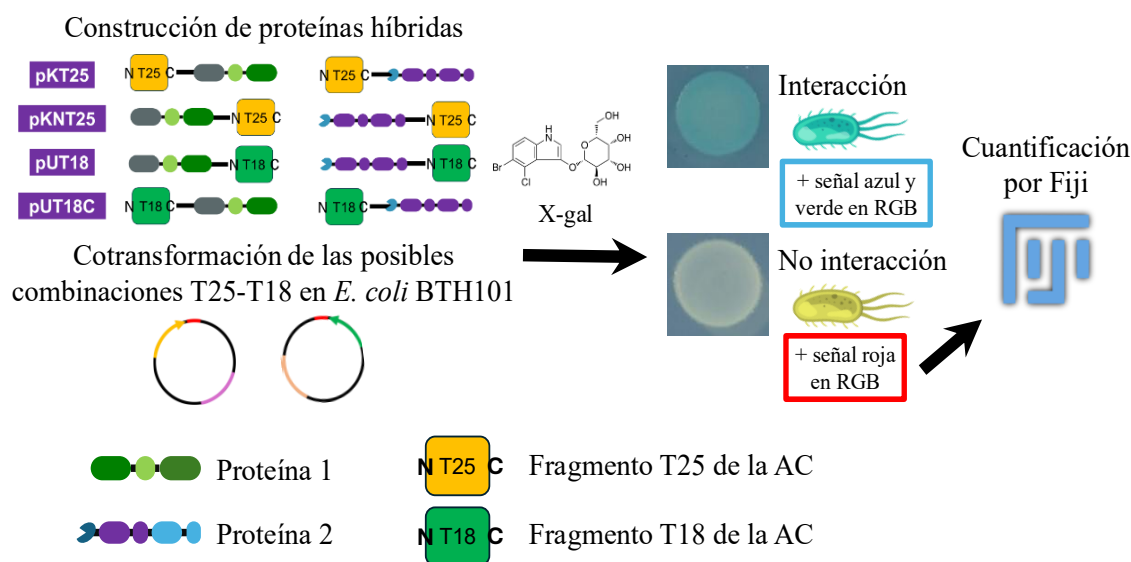


Figura M.2. Flujo de trabajo resumido para el ensayo BACTH.

M.10 - Análisis de la producción de antibióticos

Todos los experimentos descritos se realizaron con cuatro réplicas.

M.10.1 – Producción de undecilprodigiosina (RED) y actinorrodina (ACT)

De forma cualitativa, durante los ensayos fenotípicos (descritos en el apartado “M.3.1”), la RED se observó como una coloración roja dentro del micelio, anterior a la aparición del micelio aéreo blanco en medio sólido. La ACT se observó, en medio sólido, como un halo azul oscuro secretado al medio alrededor de las colonias y también dentro de ellas en forma de gotas o coloración azul, mientras que en medio líquido se observó por la tinción del sobrenadante de color azul.

MATERIALES Y MÉTODOS

De forma cuantitativa, estos dos antibióticos se midieron con una modificación de un método colorimétrico descrito por Kieser (Kieser et al., 2000). Las cepas de interés se cultivaron en medio líquido a 28 °C y se tomaron muestras de micelio y sobrenadante a tiempos definidos. Dichas muestras se trataron primero con KOH 0,5 M durante 12 h a 4 °C. Mediante la Ley de Lambert-Beer, se determinó la concentración de ACT al medir la absorbancia del sobrenadante a 640 nm ($\epsilon_{\text{ACT } 640 \text{ nm}} = 25320 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Después, el micelio resultante (precipitado) se lavó con HCl 0,5 M y se incubó 2 h a temperatura ambiente en metanol acidificado con HCl 0,5 M. De nuevo con la Ley de Lambert-Beer, se determinó la concentración de RED al medir la absorbancia del sobrenadante, esta vez con una longitud de onda de 530 nm ($\epsilon_{\text{RED } 530 \text{ nm}} = 100500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Las medidas se normalizaron mediante el peso seco de la biomasa recolectada.

M.10.2 – Antibiógramas y antibiótico dependiente de calcio (CDA)

Para los ensayos de actividad antibiótica desde gotas de esporas, estas se cultivaron en medio sólido, LB (3 y 4 días) o NMMP con distinta concentración de hierro (8 días) y con un sacabocados de 0,7 cm de diámetro se extrajeron tacos del micelio.

Los microorganismos testigos (*S. epidermidis*, *M. luteus* y *E. coli*) se sembraron en 10 mL de agar blando inoculados con 400 μL de una suspensión con una DO de 0,2 sobre placas Petri cuadradas de 120 mm. Tras la siembra de los microorganismos testigos, se colocaron los tacos con micelio de *S. coelicolor*. Las placas se incubaron durante 5 h a una temperatura de 4 °C para permitir la difusión de los compuestos producidos por *S. coelicolor*. Después, las placas se incubaron a una temperatura de 30 °C durante 48 h para el crecimiento de los microorganismos testigos.

El antibiógrama realizado durante la estancia internacional se realizó con una cobertera de *B. subtilis*, vertida directamente sobre una placa con gotas de micelio de *S. coelicolor* previamente crecidas 7 días en ISP2. Se utilizó una cobertera de 10 mL de agar blando con el microorganismo testigo a una DO de 0,2. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

Finalmente, se midió el diámetro de los halos y se tomaron fotografías de los resultados. Estos diámetros se normalizaron con el diámetro de las gotas en el antibiógrama de la estancia internacional.

M.10.2.1 - Antibiótico dependiente de calcio (CDA)

La producción de CDA en M145 y Δbfr se evaluó mediante un ensayo de antibiosis frente a *B. subtilis* (Antoraz et al., 2017). Los ensayos se realizaron en medio AN Scharlau, donde se crecieron las gotas de micelio de *S. coelicolor* durante 3 días a 28 °C. Se incluyó después una cobertera (medio AN con 0,5 % de agar) de 5 mL con *B. subtilis* (0,2 mL de cultivo a OD 0,25) y con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 70 mM. En

ambas cepas se incluyó un control negativo (cobertera sin nitrato de calcio). Las placas se incubaron un día más y se midió el diámetro de los halos, normalizado por el tamaño de la gota.

M.10.2 – Producción de coelimicinas

La producción de coelimicinas se valoró de forma cualitativa mediante el cultivo de *S. coelicolor* en medio AN Conda suplementado con glutamato 300 mM (Gottelt et al., 2010). Estas moléculas se observaron como una coloración amarilla dentro y fuera del micelio.

M.11 – Ensayos con hierro y sideróforos

Todos los experimentos aquí descritos se realizaron con cuatro réplicas.

M.11.1 – Cuantificación del hierro lábil y total de *Streptomyces coelicolor*

Para medir el hierro intracelular de *S. coelicolor* se utilizó un ensayo colorimétrico con ferene-S (Ref.: 82940, Sigma-Aldrich) mediante la adaptación de diversos protocolos (Abbasi et al., 2021; Fish, 1988).

Se extrajeron muestras de 300 μ L de micelio de *S. coelicolor* M145 y Δbfr desde LB y NMMP con 10 nM, 4 μ M y 2 mM de hierro a distintos puntos temporales. Este micelio se lavó con sacarosa 10,3 % y se conservó congelado a -20 °C.

Para medir el hierro lábil (disponible en la célula), los precipitados celulares se resuspendieron en 500 μ L de tampón de lisis (lisozima 3 mg/mL, sacarosa 10,3 % y Tris 25 mM, pH 8) y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Se añadieron después 500 μ L de reactivo de detección de hierro lábil recién preparado (ferene-S 5 mM y ácido ascórbico 10 mM en acetato de amonio 2,5 M, pH 4,5). Tras una incubación a 25 °C durante 30 min, se centrifugaron las muestras durante 15 min a 1500 g y se midió la absorbancia del complejo ferene-Fe²⁺ a 564 nm.

Por otro lado, para medir el hierro total de la célula (lábil y unido a biomoléculas) las muestras se mezclaron con 500 μ L de reactivo de digestión recién preparado (KMnO₄ 2,25 % p/v y HCl 5 % v/v) y se incubaron a 65 °C durante 4 h (Punchi Hewage et al., 2020). Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente durante 30 min y se trataron con 500 μ L de reactivo de detección de hierro total recién preparado (ferene-S 5 mM y ácido ascórbico 1 M en acetato de amonio 2,5 M, pH 4,5). Tras una incubación a 25 °C durante 30 min, se centrifugaron las muestras durante 15 min a 1500 g y se midió la absorbancia del complejo ferene-Fe²⁺ a 564 nm.

Para ambos métodos, la cantidad de hierro se calculó mediante curvas de calibración con patrones de FeCl₃ recién preparados (0,5-50 nmol) y tratados de la misma forma que las muestras.

MATERIALES Y MÉTODOS

M.11.2 – Ensayos con quelantes de hierro

El efecto de los quelantes de hierro sobre colonias de *S. coelicolor* M145 y Δbfr se evaluó en placas de 25 pocillos Sterillin™ (Bibby Sterilin Ltd, Stone, Staffs, Reino Unido) con medio LB con concentraciones crecientes (0, 50, 100, 200 y 300 μM) de 2,2'-bipiridilo (BIP) (Ref.: D216305, Sigma-Aldrich) o ácido bazofenantrilsulfónico (BPS) (Ref.: 146617, Sigma-Aldrich). Las colonias crecieron durante 7 días a 30 °C.

M.11.3 – Cuantificación indirecta de sideróforos

La producción de sideróforos se estudió de forma indirecta mediante la visualización de halos en medio CAS (Alexander & Zuberer, 1991; Ortúzar et al., 2020). Las cepas de *S. coelicolor* de interés se inocularon en otro medio de cultivo (LB, NMMP, AN Scharlau) sobre membranas de celofán, a modo de gotas con $5 \cdot 10^5$ esporas. Las membranas, después de 3 días, se transfirieron a la superficie de placas con medio CAS y se observó la producción de halos durante los días siguientes. Estos halos se midieron y normalizaron respecto al tamaño de las gotas de micelio.

También se ensayó el método de medio CAS en cobertera (Pérez-Miranda et al., 2007). Se utilizó agar al 0,5 % p/v para generar CAS en cobertera. Se vertieron 10 mL de esta cobertera sobre placas Petri con cultivos en sólido (de los medios indicados en el párrafo anterior) de gotas de esporas de *S. coelicolor* y, tras 15 min, se observó la producción de halos.

M.12 – Ensayos relacionados con especies reactivas de oxígeno

Todos los experimentos aquí descritos se realizaron con cuatro réplicas.

M.12.1 - Ensayo de tolerancia a estrés oxidativo

Se adaptaron ensayos previos (Tang et al., 2021; J. Yang et al., 2020). Se añadió H_2O_2 a una concentración de 0, 4, 8 y 20 mM a tubos eppendorfs con 1 mL de suspensiones de esporas (10^6 esporas) en medio de germinación y se incubaron durante 30 min a 30 °C. Se lavaron las células dos veces con sacarosa 10,3 %, se resuspendieron en nuevo medio de germinación y se incubaron durante 3 h a 30 °C. El recuento de colonias se realizó sembrando diluciones 1:1000 de las suspensiones anteriores en LB e YEPD.

M.12.2 – Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las ROS de las cepas M145 y Δbfr se estudiaron desde cultivos líquidos de NMMP con distintas concentraciones de hierro y LB utilizando DCFH₂-DA (Ref.: D6883, Sigma-Aldrich). En los tiempos

de estudio seleccionados, se añadió DCFH₂-DA a una concentración final de 10 μ M a los matraces y estos se incubaron en oscuridad durante 3 h. A partir de este punto, todo se realizó en condiciones de oscuridad. El micelio se lavó con sacarosa 10,3 % dos veces y se resuspendió en 500 μ L de esta solución. Después, se rompió mecánicamente con bolas de vidrio de 0,4-0,6 mm Φ en un disruptor celular FastPrep FP120, con 4 ciclos de 15 s a máxima intensidad. Las ROS se midieron, a partir de 100 μ L de sobrenadante, en una placa de 96 pocillos con fondo oscuro mediante fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 485$ nm, $\lambda_{\text{emisión}} = 530$ nm) en un fluorímetro Varioskan® Flash (Thermo Fisher Scientific). Las medidas se normalizaron con la cantidad de proteína cuantificada mediante el método de Bradford.

M.12.3 – Ensayos con *scavengers* de ROS

Se probó el efecto de diversas moléculas que contrarrestan las ROS en M145 y Δbfr . Las moléculas probadas fueron: manitol, tiourea, ácido ascórbico y triptófano. Se probó el efecto en medio LB líquido, con placas de 24 pocillos, y en medio sólido, con placas de 25 pocillos. Se prepararon soluciones de las moléculas ensayadas a una concentración 250 mM y se probó el efecto de estas moléculas a 0, 1, 5, 10 y 20 mM (excepto el manitol, que solo se probó a 10 mM). Todas las disoluciones de las moléculas se prepararon en agua, mientras que el triptófano se preparó en agua con NaOH a una concentración final de 200 mM (L. Liu et al., 2023), y en ese caso, al medio LB usado en la condición control (sin triptófano) se le añadió la misma cantidad de NaOH para comprobar que no había efectos debidos a este compuesto. El efecto se siguió durante varios días en incubación a 28 °C.

M.13 – Metabolómica

M.13.1 – Extracción de metabolitos y análisis HPLC-MS

El ensayo de metabolómica realizado durante la estancia en el laboratorio del Prof. Dr. Gilles P. van Wezel se realizó con las cepas M145, Δbfr , $\Delta abrA$, $\Delta aorI$, $\Delta SCO3750$, $\Delta SCO2359$ y $\Delta SCO2359/SCO2358$ a partir de cultivos de 7 días confluentes en placas de ISP2. Se incluyeron cuatro réplicas de cada cepa y cuatro placas de ISP2 vacías como control. Los metabolitos producidos se extrajeron tres veces con acetato de etilo. Los extractos se evaporaron y se resuspendieron en acetato de etilo hasta una concentración de 4 mg/mL.

La cromatografía líquida se realizó en un sistema Shimadzu Nexera X2 UHPLC con un detector de matriz de fotodiodos acoplado a un espectrómetro de masas 9030 QTOF equipado con una unidad de ionización por electrospray (ESI) estándar y con un sistema de introducción de calibrante (CDS) instalado. Se inyectaron 2 μ L de las muestras en una columna Waters Acquity HSS C18 (1,8 μ m, 100

MATERIALES Y MÉTODOS

Å, $2,1 \times 100$ mm) a 30 °C. El flujo de fase móvil en la cromatografía fue de 0,5 mL/min con ácido fórmico 0,1 % en agua como solvente A y ácido fórmico 0,1 % en acetonitrilo como solvente B.

Para la separación cromatográfica, se empleó un gradiente: fase móvil con 5 % de solvente B durante 0,5 min; 5-85 % de B durante 4,5 min; 85-100 % de B durante 0,5 min; y 100 % de B durante 3 min. La columna fue re-equilibrada con 5 % de B durante 3 min antes de cada carrera en la columna. El flujo de la cromatografía se cambió al flujo para desechos tras 8 min al final de la carrera. Se adquirieron los datos del detector en el rango 200-600 nm a 4,2 Hz con un ancho de rendija de 1,2 nm. El flujo de la célula se mantuvo a 40 °C.

El sistema de espectrometría de masas se calibró con una solución estándar de NaI (Shimadzu). Entre el minuto 8 y 8,5 de cada carrera, se introdujo por el CDS una solución comercial de calibración (Sigma-Aldrich), y las masas detectadas se usaron para corrección de masas en los archivos generados, de forma que se asegura una medida de masas fiable.

Todas las muestras se analizaron en polaridad positiva, en modo DDA. Se registraron relaciones masa/carga (m/z) del rango 100-1700 con una frecuencia de escáner de 20 Hz. Cada espectro de masas adquirido fue seguido de dos espectros de fragmentación (MS/MS) realizados en los dos iones más intensos por cada escaneo. Los iones fueron seleccionados si alcanzaban un umbral de intensidad de 1500, se aislaron en el primer cuadrupolo del aparato, se fragmentaron con disociación inducida por colisión (CID) a una energía de colisión fija (20 eV) y se excluyeron durante 1 s antes de poder ser seleccionados de nuevo para fragmentación.

Para el ESI, los parámetros fueron: voltaje de interfaz 4 kV, temperatura de interfaz 300 °C, flujo de gas nebulizador 3 L/min y flujo de gas secador 10 L/min. Para el CDS, los parámetros fueron: voltaje de interfaz 4,5 kV (polaridad positiva) y flujo de gas nebulizador 10 L/min.

M.13.2 – Análisis informático de los datos

Los datos obtenidos de HPLC-MS se procesaron con MZmine (mzio) con el flujo de trabajo descrito en este párrafo. El ruido (*Mass detection–Noise level*) se fijó en 800 para los espectros MS1 y 8 para MS2. La herramienta *Chromatogram builder* utilizó unos parámetros de *minimum consecutive scans* = 10, *minimum intensity* = 2400 (3 veces el ruido), *minimum absolute height* = 8000 (10 veces el ruido) y *m/z tolerance* = 0,002. Se aplicó el algoritmo *local minimum resolving* con una relación *top/edge* de 1,7 para separar compuestos con la misma masa, y el filtro *¹³C isotope filtering* identificó los patrones isotópicos con los siguientes parámetros: *RT tolerance* = 0,1 min; *m/z tolerance* = 0,002; *maximum charge* = 3. Después, se aplicaron los algoritmos *isotope finder* para asociar los isótopos con los metadatos y *join aligner* con una tolerancia al tiempo de retención (RT) de 0,1 min y un peso 4 veces mayor a la ratio m/z que al RT para generar una matriz de compuestos. En esta matriz se aplicó el algoritmo *feature finder* de la opción *Gap filling* y un filtro para quitar duplicados (*duplicate*

peak filter). Después de este filtro de duplicados, se añadió un nuevo filtro con *old average*, tolerancia de $RT = 0,1$ min y $m/z = 1$, que toma la media del filtro anterior con las tolerancias indicadas y agrupa masas muy similares para evitar duplicados producidos por iones muy intensos que han saturado el detector y se interpretan como varios compuestos (*detector ringing*).

Los compuestos resultantes se filtraron con *filtering lists rows* para eliminar aquellos que no estuviesen en, al menos, 2 muestras y para mantener picos analizados por MS2. Por último, se utilizó una correlación de Pearson en *correlation grouping* para agrupar compuestos con mismo RT y misma tendencia y se asociaron posibles aductos con *ion identity networking*. Los resultados se exportaron como archivos para red molecular y como un archivo para el software SIRIUS.

Para el análisis estadístico de los datos, se utilizó la herramienta MetaboAnalyst. Se utilizó el archivo de cuantificación (una hoja de cálculo) de intensidades de picos generado por el análisis de MZmine. Mediante la herramienta Microsoft Excel, se eliminaron de este archivo los iones solamente presentes en el blanco (medio ISP2 sin *Streptomyces*), aplicando un filtro de señales blanco/señal del 30 % (se eliminaron aquellos compuestos cuya ratio blanco/señal era mayor a 0,3). Se utilizó un análisis estadístico de un factor con transformación logarítmica y escala de Pareto. Este procesamiento se realizó para los análisis enfocados en comparar los metabolomas de dos cepas y con todos los metabolomas obtenidos como control de calidad y comprobación de la diferencia general de metabolomas mediante un PCA.

Las redes moleculares se obtuvieron con GNPS. Se utilizó la opción *Advanced Analysis Tools-Feature Networking* para generar la red molecular. Se utilizaron los archivos de MZMine y unos metadatos creados en un archivo .txt con los nombres de las muestras (“filename”) y las categorías/cepas a las que pertenecen (señaladas como “ATTRIBUTE_” para su reconocimiento por GNPS). Se utilizó una tolerancia de 0,01 Da.

Los resultados de la red se visualizaron con Cytoscape. En este programa se importaron los datos estadísticos para seleccionar aquellos compuestos con un p-valor $< 0,05$.

Por último, el archivo generado por MZMine se procesó en SIRIUS (Bright Giant) para predecir posibles fórmulas y estructuras. Estos datos químicos, junto a las masas experimentales, se compararon con diversas bases de datos: StreptomeDB, KEGG Compound, PubChem, ChEBI, NPAtlas y COCONUT (las direcciones web se indican en el apartado “M.14.4”), para tratar de anotar los compuestos detectados, y con la bibliografía disponible.

Para comparar con las bases de datos, se compararon las masas de los compuestos para todos los aductos posibles formados (teniendo en cuenta el incremento en la masa exacta respecto a la molécula original, no ionizada), con carga positiva, en las condiciones estudiadas. Estos fueron los siguientes, donde “M” representa la masa exacta de la molécula: $[M + H]^+$ ($M + 1,007276$), $[M + Na]^+$ ($M +$

MATERIALES Y MÉTODOS

22,989218), $[M + K]^+$ ($M + 38,963158$), $[M + NH_4]^+$ ($M + 18,033823$), $[M - H_2O + H]^+$ ($M - 17,002725$) y $[M - 2H_2O + H]^+$ ($M - 35,013853$). Para todos los casos (aductos), la masa “M” es la que se compara con las bases de datos para asignar un posible compuesto (Figura M.3).

La anotación de compuestos se automatizó usando Python, versión 3.13.5, junto a las bibliotecas de datos *pandas* (para manipulación de datos tabulares), *numpy* (para computación de operaciones matemáticas) y *openpyxl* (para trabajar con hojas de cálculo de Excel). Para StreptomeDB, se elaboró una lista manual de compuestos asignados a *S. coelicolor*, sus masas se extrajeron de PubChem aplicando la librería *pubchempy*, y posteriormente estas se asignaron a las masas experimentales con alineamientos locales en Excel. En el caso de KEGG, la asignación de compuestos se realizó mediante consultas directas a la base de datos, utilizando su interfaz de programación de aplicaciones REST (KEGG API REST). Por último, para el resto de las bases de datos, se descargaron los últimos archivos tabulados disponibles públicamente con la información de estas bases (descargados en noviembre de 2025) y se procesaron en Excel para hacer alineamientos locales.

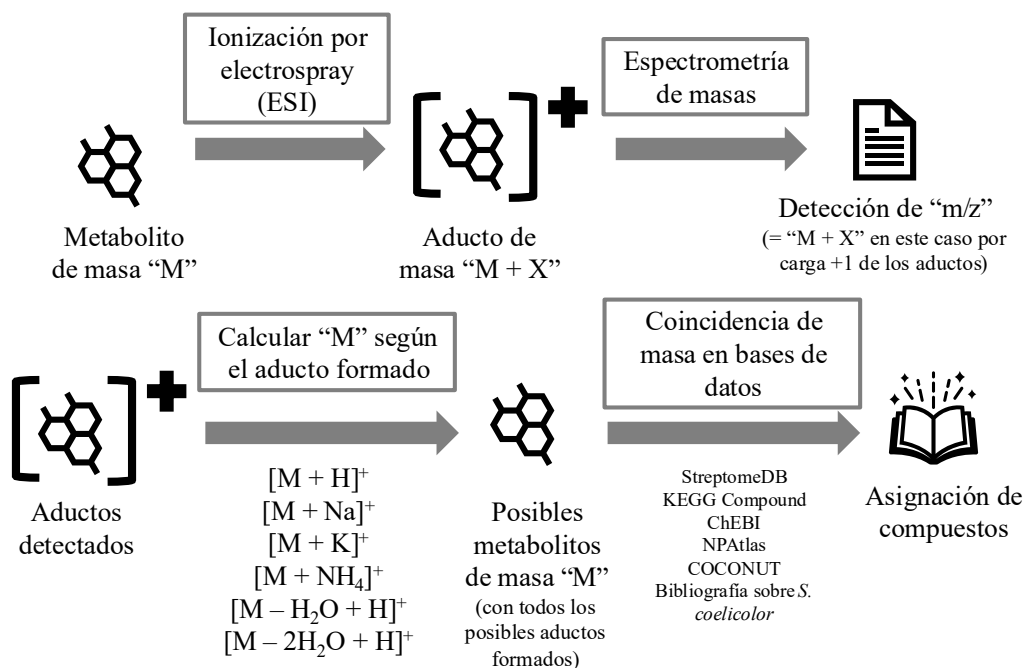


Figura M.3. Flujo de trabajo de metabolómica. Esquema de la asignación de compuestos mediante el cálculo de las posibles masas reales de las moléculas detectadas y su comparación en bases de datos.

M.14 – Bioinformática, programas informáticos y bases de datos utilizados

En este apartado se incluyen todas las herramientas informáticas y bioinformáticas web, así como todas las páginas web y bases de datos, empleadas en esta tesis doctoral.

M.14.1 – Ácidos nucleicos y construcción de vectores

La base de datos StrepDB (<https://strepdb.streptomyces.org.uk/>) se utilizó para consultar los genes de *S. coelicolor* en la construcción de vectores con el software SnapGene (Dotmatics, www.snapgene.com). Para la construcción de vectores derivados de pCRISPR-Cas9, como ya se mencionó en el apartado “M.5.3.1”, también se utilizaron las herramientas web Benchling (Benchling, <https://www.benchling.com/>), para el diseño de guías específicas, y Cass-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offfinder/>) (Bae et al., 2014b), para el análisis de *off-targets*. Otra herramienta adicional, específica para el diseño de espaciadores para CRISPRi, fue CRISPy web (<https://crispy.secondarymetabolites.org/#/input>) (Blin et al., 2016).

El software Quantity One (Bio-Rad) fue empleado para visualizar fragmentos de ADN en geles de agarosa.

M.14.2 – Alineamientos de secuencias y árboles filogenéticos entre HK asociadas a ortólogos de AorI

Las secuencias de proteínas ortólogas a AorI y de las HK adyacentes a estos ortólogos en diversas especies de *Streptomyces* se obtuvieron en la web NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, acceso en noviembre de 2023). La herramienta web BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se utilizó, de forma general, para alinear secuencias de interés de los genes y proteínas estudiados contra la base de datos de esta página. Para comparaciones específicas de proteínas contra las proteínas de *S. coelicolor*, se utilizó la herramienta BLAST específica “BLAST Web Interface for *Actinomycetales* genome data” de la web Genome Project of *Streptomyces avermitilis* (http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/blast_local/index.html, acceso en abril de 2026). Los organismos de procedencia de las proteínas comparadas se detallan en la Tabla R.2.2.

Para realizar el análisis filogenético, se obtuvieron las secuencias de ADN ribosómico 16 S del NCBI y de Silva (<https://www.arb-silva.de/search/>) (Quast et al., 2012), accedidas ambas en noviembre de 2023. Se usó como control externo (*outgroup*) el ADNr 16 S de *Amycolatopsis acidiphila* (también perteneciente a los actinomicetos). Con todas las secuencias, se realizó un alineamiento de múltiples secuencias con el programa MEGA (<https://www.megasoftware.net/>) (Kumar et al., 2024), utilizando el algoritmo *MUSCLE*. Con los alineamientos en formato Nexus desde MEGA, se construyeron árboles filogenéticos con la herramienta web IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>, acceso en diciembre de 2023) (Trifinopoulos et al., 2016), empleando el algoritmo *Maximum Likelihood* con 1000 comprobaciones (*bootstraps*), y se visualizaron con la web iTOL (*Interactive Tree of Life*, <https://itol.embl.de/login.cgi>, acceso en enero de 2024) (Letunic & Bork, 2024).

MATERIALES Y MÉTODOS

M.14.3 – Análisis de proteínas y proteómica

Para predecir posibles HK asociadas a Aor1, además de los alineamientos de homólogos descritos en el apartado anterior, se utilizó la herramienta Prediction of Interaction Specificity in Two-component Systems (<https://www.swissregulon.unibas.ch/cgi-bin/TCS.pl>, último acceso en diciembre de 2025) (Burger & Van Nimwegen, 2008) y la web STRING (<https://string-db.org/>, acceso en septiembre de 2023) (Szkarczyk et al., 2023), que recopila datos experimentales e interacciones funcionales para asociar proteínas.

Para el diseño de la proteína SCO3750 citoplasmática, las regiones transmembrana de la proteína original SCO3750 se analizaron con las herramientas web DeepTMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepTMHMM-1.0/>, acceso en enero de 2024) (Hallgren et al., 2022) y Phobius (<https://phobius.sbc.su.se/>, acceso en enero de 2024).

Para el análisis de Proteómica y el estudio de proteínas en detalle, se utilizaron las webs UniProt (<https://www.uniprot.org/>, acceso en mayo de 2024) (The UniProt Consortium et al., 2025) y la base de datos de dominios conservados del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, acceso en mayo de 2024) accedida desde los enlaces de StrepDB.

M.14.4 – Metabolómica

Como se ha detallado en el apartado “M.13.2”, los programas y recursos web utilizados fueron los siguientes: MZmine (mzio GmbH, <https://mzio.io/mzmine-news/>) para procesar los datos crudos de HPLC-MS, MetaboAnalyst (<https://dev.metaboanalyst.ca/ModuleView.xhtml>, acceso en abril de 2026) (Pang et al., 2024) para realizar la estadística de los datos y el PCA, GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>, acceso en octubre de 2025) (M. Wang et al., 2016) para obtener las redes moleculares, Cytoscape (<https://cytoscape.org/>) (Shannon et al., 2003) para visualizar estas redes y SIRIUS (Bright Giant, <https://bright-giant.com/sirius-features/>) para la predicción de clases y fórmulas químicas de los compuestos.

Para asignar compuestos a las masas experimentales obtenidas, se consultaron las bases de datos StreptomeDB (<https://streptomedb.vm.uni-freiburg.de/streptomedb/>, datos de la web en enero de 2026) (Feng et al., 2025), ChEBI (<https://www.ebi.ac.uk/chebi/>, datos de noviembre de 2025) (Hastings et al., 2016), la sección de compuestos y rutas metabólicas de KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/compound/>, comparación realizada en diciembre de 2025) (Kanehisa et al., 2025), NPAtlas (<https://www.npatlas.org/>, datos de noviembre de 2025) (Poynton et al., 2025), COCONUT (<https://coconut.naturalproducts.net/>, datos de noviembre de 2025) (Chandrasekhar et al., 2025) y PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, acceso en diciembre de 2025) (S. Kim et al., 2025). Como se ha comentado, esta asignación se automatizó mediante algoritmos con

lenguaje Python, v.3.13.5 (<https://www.python.org/downloads/>, descargado en noviembre de 2025), con las librerías *pandas*, *numpy* y *openpyxl*.

M.14.5 – Análisis de imágenes

Las fotografías obtenidas como resultado de los experimentos, de forma general, se procesaron con el editor de imágenes de la aplicación Fotos de Windows (Microsoft). El software Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/downloads>) (Schindelin et al., 2012) se utilizó para medir intensidades de los ensayos BACTH, como se describe al final del apartado “M.9”.

M.14.6 – Estadística

El software GraphPad (Dotmatics, <https://www.graphpad.com/>), versión 8, se utilizó para los análisis estadísticos y la representación de los datos. La normalidad de los datos se comprobó con las pruebas automáticas que realiza el software (Anderson-Darling, D’Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov). Se realizaron t-test cuando se compararon solo dos grupos de datos (por ejemplo, producción de CDA entre M145 y Δbfr), y análisis de la varianza (ANOVA) de una (un único factor, como la combinación de plásmidos en BACTH) o dos vías (dos factores, como el tiempo y la concentración de hierro en los ensayos de producción de antibióticos) cuando había más de dos grupos de medidas. Se consideró significación estadística cuando las pruebas otorgaban un p-valor menor a 0,05, representado con un asterisco en los gráficos (*). Además, se representó la significación estadística menor a 0,01 con dos asteriscos (**).

M.14.7 – Bibliografía

Con carácter general, la bibliografía para el análisis de datos y la redacción de esta tesis doctoral se consultó en PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Google Académico (<https://scholar.google.es/>). Esta bibliografía se ordenó y clasificó con el gestor Zotero (<https://www.zotero.org/>). En este documento, la bibliografía sigue el estilo APA 7ª Edición.

M.14.8 – Ofimática

El paquete Office de Microsoft (<https://www.microsoft.com/es-es/microsoft-365/products-apps-services>) se utilizó para la redacción de textos (Office), la creación de figuras y esquemas (Power Point) y el análisis de datos en hojas de cálculo (Excel). Además, el programa Inksape (<https://inkscape.app/es/>) se utilizó también para la creación y edición de figuras.



BIBLIOGRAFÍA

“Sí, el pasado puede doler. Pero tal como yo lo veo, puedes huir de él o aprender”.

- Rafiki (de la película *El rey león*) (1994).

Bibliografía

- Abbasi, U., Abbina, S., Gill, A., Bhagat, V., & Kizhakkedathu, J. N. (2021). A facile colorimetric method for the quantification of labile iron pool and total iron in cells and tissue specimens. *Scientific Reports*, 11(1), 6008. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85387-z>
- Abreu, S., Lejeune, C., David, M., Chaminade, P., & Virolle, M.-J. (2024). Impact of the deletion of genes of the nitrogen metabolism on triacylglycerol, cardiolipin and actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Microorganisms*, 12(8), 1560. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081560>
- Alam, K., Mazumder, A., Sikdar, S., Zhao, Y.-M., Hao, J., Song, C., Wang, Y., Sarkar, R., Islam, S., Zhang, Y., & Li, A. (2022). *Streptomyces*: The biofactory of secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 13, 968053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.968053>
- Aldridge, M., Facey, P., Francis, L., Bayliss, S., Del Sol, R., & Dyson, P. (2013). A novel bifunctional histone protein in *Streptomyces*: A candidate for structural coupling between DNA conformation and transcription during development and stress? *Nucleic Acids Research*, 41(9), 4813-4824. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt180>
- Alexander, D. B., & Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12(1), 39-45. <https://doi.org/10.1007/BF00369386>
- Alonso-Fernández, S., Arribas-Díez, I., Fernández-García, G., González-Quiñónez, N., Jensen, O. N., & Manteca, A. (2022). Quantitative phosphoproteome analysis of *Streptomyces coelicolor* by immobilized zirconium (IV) affinity chromatography and mass spectrometry reveals novel regulated protein phosphorylation sites and sequence motifs. *Journal of Proteomics*, 269, 104719. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104719>
- Antoraz Martín, S. (2018). *Mejora genética de cepas de Streptomyces coelicolor para la producción de metabolitos secundarios mediante el estudio de su regulación por sistemas de dos componentes* [Tesis doctoral, Universidad de Salamanca]. <https://aplicaciones.ciencia.gob.es/teseo/#/tesis/O572116/detalle>
- Antoraz, S., Rico, S., Rodríguez, H., Sevillano, L., Alzate, J. F., Santamaría, R. I., & Díaz, M. (2017). The orphan response regulator Aor1 is a new relevant piece in the complex puzzle of *Streptomyces*

- coelicolor* antibiotic regulatory network. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2444. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02444>
- Aoki, Y., Matsumoto, D., Kawaide, H., & Natsume, M. (2011). Physiological role of germicidins in spore germination and hyphal elongation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *The Journal of Antibiotics*, 64(9), 607-611. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.59>
- Aretz, I., & Meierhofer, D. (2016). Advantages and pitfalls of mass spectrometry based metabolome profiling in systems biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), 632. <https://doi.org/10.3390/ijms17050632>
- Aubert, C., Mandin, P., & Py, B. (2023). Mrp and SufT, two bacterial homologs of eukaryotic CIA factors involved in Fe-S clusters biogenesis. *Inorganics*, 11(11), 431. <https://doi.org/10.3390/inorganics11110431>
- Augustijn, H. E., Roseboom, A. M., Medema, M. H., & van Wezel, G. P. (2024). Harnessing regulatory networks in Actinobacteria for natural product discovery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 51, kuac011. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuac011>
- Bae, S., Park, J., & Kim, J.-S. (2014a). Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 30(10), 1473-1475. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu048>
- Bae, S., Park, J., & Kim, J.-S. (2014b). Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 30(10), 1473-1475. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu048>
- Bagchi, S., Tomenius, H., Belova, L. M., & Ausmees, N. (2008). Intermediate filament-like proteins in bacteria and a cytoskeletal function in *Streptomyces*. *Molecular Microbiology*, 70(4), 1037-1050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06473.x>
- Bai, C., & van Wezel, G. P. (2023). CUBIC: A versatile cumate-based inducible CRISPRi system in *Streptomyces*. *ACS Synthetic Biology*, 12(10), 3143-3147. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.3c00464>
- Balakrishnan, A., Nevin, K. G., Gangadharan, A., & Limnamol, V. P. (2025). Integrative *in vitro* and *in silico* analysis of marine Actinobacterium, *Streptomyces rubrogriseus*-derived metabolites as quorum sensing inhibitors against *Chromobacterium violaceum*. *Toxicology Research*, 14(5), tfaf142. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaf142>

BIBLIOGRAFÍA

- Baquero, F. (2021). Threats of antibiotic resistance: An obliged reappraisal. *International Microbiology*, 24(4), 499-506. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00184-y>
- Barbuto Ferraiuolo, S., Cammarota, M., Schiraldi, C., & Restaino, O. F. (2021). Streptomycetes as platform for biotechnological production processes of drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(2), 551-568. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11064-2>
- Barritt, S. A., DuBois-Coyne, S. E., & Dibble, C. C. (2024). Coenzyme A biosynthesis: Mechanisms of regulation, function and disease. *Nature Metabolism*, 6(6), 1008-1023. <https://doi.org/10.1038/s42255-024-01059-y>
- Battesti, A., & Bouveret, E. (2012). The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods*, 58(4), 325-334. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.07.018>
- Becker-Kettern, J., Paczia, N., Conrotte, J., Zhu, C., Fiehn, O., Jung, P. P., Steinmetz, L. M., & Linster, C. L. (2018). NAD(P)HX repair deficiency causes central metabolic perturbations in yeast and human cells. *The FEBS Journal*, 285(18), 3376-3401. <https://doi.org/10.1111/febs.14631>
- Bednarz, B., Kotowska, M., & Pawlik, K. J. (2019). Multi-level regulation of coelimycin synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6423-6434. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09975-w>
- Bednarz, B., Millan-Oropeza, A., Kotowska, M., Świat, M., Quispe Haro, J. J., Henry, C., & Pawlik, K. (2021). Coelimycin synthesis activatory proteins are key regulators of specialized metabolism and precursor flux in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Frontiers in Microbiology*, 12, 616050. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.616050>
- Behm, A. M., Yao, H., Eze, E. C., Alli, S. A., Baugh, S. D. P., Ametsetor, E., Powell, K. M., Battaile, K. P., Seibold, S., Lovell, S., Bunce, R. A., Reitz, A. B., & Rivera, M. (2025). Inhibitors of the bacterioferritin ferredoxin complex dysregulate iron homeostasis and kill *Acinetobacter baumannii* and biofilm-embedded *Pseudomonas aeruginosa* cells. *ACS Infectious Diseases*, 11(7), 1983-1993. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5c00209>
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., ... Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417.

- Biarnes-Carrera, M., Lee, C.-K., Nihira, T., Breitling, R., & Takano, E. (2018). Orthogonal regulatory circuits for *Escherichia coli* based on the γ -butyrolactone system of *Streptomyces coelicolor*. *ACS Synthetic Biology*, 7(4), 1043-1055. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00425>
- Bibb, M. J., Domonkos, Á., Chandra, G., & Buttner, M. J. (2012). Expression of the chaplin and rodlin hydrophobic sheath proteins in *Streptomyces venezuelae* is controlled by σ^{BldN} and a cognate anti-sigma factor, RsbN. *Molecular Microbiology*, 84(6), 1033-1049. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08070.x>
- Bibb, M. J., Ward, J. M., & Hopwood, D. A. (1978). Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature*, 274(5669), 398-400. <https://doi.org/10.1038/274398a0>
- Bitoun, J. P., Wu, G., & Ding, H. (2008). *Escherichia coli* FtnA acts as an iron buffer for re-assembly of iron-sulfur clusters in response to hydrogen peroxide stress. *BioMetals*, 21(6), 693-703. <https://doi.org/10.1007/s10534-008-9154-7>
- Blin, K., Pedersen, L. E., Weber, T., & Lee, S. Y. (2016). CRISPy-web: An online resource to design sgRNAs for CRISPR applications. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 1(2), 118-121. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2016.01.003>
- Bonet, B., Ra, Y., Cantu Morin, L. M., Soto Bustos, J., Livny, J., & Traxler, M. F. (2021). The *cvn8* conserved system is a global regulator of specialized metabolism in *Streptomyces coelicolor* during interspecies interactions. *mSystems*, 6(5), 10.1128/msystems.00281-21. <https://doi.org/10.1128/msystems.00281-21>
- Bradley, J. M., Svistunenko, D. A., Wilson, M. T., Hemmings, A. M., Moore, G. R., & Le Brun, N. E. (2020). Bacterial iron detoxification at the molecular level. *Journal of Biological Chemistry*, 295(51), 17602-17623. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.007746>
- Brinkman, C. L., Schmidt-Malan, S. M., Karau, M. J., Greenwood-Quaintance, K., Hassett, D. J., Mandrekar, J. N., & Patel, R. (2016). Exposure of bacterial biofilms to electrical current leads to cell death mediated in part by reactive oxygen species. *PLOS ONE*, 11(12), e0168595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168595>
- Brzostek, A., Rumijowska-Galewicz, A., Dziadek, B., Wojcik, E. A., & Dziadek, J. (2013). ChoD and HsdD can be dispensable for cholesterol degradation in mycobacteria. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 134, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.09.028>

BIBLIOGRAFÍA

- Burger, L., & Van Nimwegen, E. (2008). Accurate prediction of protein–protein interactions from sequence alignments using a Bayesian method. *Molecular Systems Biology*, 4(1), 165. <https://doi.org/10.1038/msb4100203>
- Busche, T., Winkler, A., Wedderhoff, I., Rückert, C., Kalinowski, J., & Ortiz De Orué Lucana, D. (2016). Deciphering the transcriptional response mediated by the redox-sensing system HbpS-SenS-SenR from streptomycetes. *PLOS ONE*, 11(8), e0159873. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159873>
- Cafaro, M. J., Poulsen, M., Little, A. E. F., Price, S. L., Gerardo, N. M., Wong, B., Stuart, A. E., Larget, B., Abbot, P., & Currie, C. R. (2011). Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1713), 1814-1822. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2118>
- Castro-Melchor, M., Charaniya, S., Karypis, G., Takano, E., & Hu, W.-S. (2010). Genome-wide inference of regulatory networks in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Genomics*, 11(1), 578. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-578>
- Cerdeño, A. M., Bibb, M. J., & Challis, G. L. (2001). Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): New mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chemistry & Biology*, 8(8), 817-829. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00054-0)
- 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 and Biotechnology*, 41(2), 219-232. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1383-2>
- Chandrasekhar, V., Rajan, K., Kanakam, S. R. S., Sharma, N., Weißenborn, V., Schaub, J., & Steinbeck, C. (2025). COCONUT 2.0: A comprehensive overhaul and curation of the collection of open natural products database. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D634-D643. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1063>
- Chen, S., Zheng, G., Zhu, H., He, H., Chen, L., Zhang, W., Jiang, W., & Lu, Y. (2016). Roles of two-component system AfsQ1/Q2 in regulating biosynthesis of the yellow-pigmented coelimycin P2 in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiology Letters*, 363(15), fnw160. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw160>
- Cheng, Y., Yang, R., Lyu, M., Wang, S., Liu, X., Wen, Y., Song, Y., Li, J., & Chen, Z. (2018). IdeR, a DtxR family iron response regulator, controls iron homeostasis, morphological differentiation, secondary metabolism, and the oxidative stress response in *Streptomyces avermitilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(22), e01503-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01503-18>

- Cho, Y., Lee, E., Ahn, B., & Roe, J. (2001). SigB, an RNA polymerase sigma factor required for osmoprotection and proper differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 42(1), 205-214. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02622.x>
- Chun, Y.-J., Shimada, T., Sanchez-Ponce, R., Martin, M. V., Lei, L., Zhao, B., Kelly, S. L., Waterman, M. R., Lamb, D. C., & Guengerich, F. P. (2007). Electron transport pathway for a *Streptomyces* cytochrome P450. *Journal of Biological Chemistry*, 282(24), 17486-17500. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700863200>
- Craig, M., Lambert, S., Jourdan, S., Tenconi, E., Colson, S., Maciejewska, M., Ongena, M., Martin, J. F., van Wezel, G., & Rigali, S. (2012). Unsuspected control of siderophore production by *N* - acetylglucosamine in streptomycetes. *Environmental Microbiology Reports*, 4(5), 512-521. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00354.x>
- Cruz-Bautista, R., Ruiz-Villafán, B., Romero-Rodríguez, A., Rodríguez-Sanoja, R., & Sánchez, S. (2023). Trends in the two-component system's role in the synthesis of antibiotics by *Streptomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(15), 4727-4743. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12623-z>
- Cruz-Bautista, R., Zelarayan-Agüero, A., Ruiz-Villafán, B., Escalante-Lozada, A., Rodríguez-Sanoja, R., & Sánchez, S. (2024). An overview of the two-component system GarR/GarS role on antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 306. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13136-z>
- Daigle, F., Lerat, S., Bucca, G., Sanssouci, É., Smith, C. P., Malouin, F., & Beaulieu, C. (2015). A *terD* domain-encoding gene (*SCO2368*) is involved in calcium homeostasis and participates in calcium regulation of a DosR-like regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 197(5), 913-923. <https://doi.org/10.1128/JB.02278-14>
- Dela Cruz, R., Gao, Y., Penumetcha, S., Sheplock, R., Weng, K., & Chander, M. (2010). Expression of the *Streptomyces coelicolor* SoxR regulon is intimately linked with actinorhodin production. *Journal of Bacteriology*, 192(24), 6428-6438. <https://doi.org/10.1128/JB.00916-10>
- Den Hengst, C. D., Tran, N. T., Bibb, M. J., Chandra, G., Leskiw, B. K., & Buttner, M. J. (2010). Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Molecular Microbiology*, 78(2), 361-379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07338.x>

BIBLIOGRAFÍA

- Dewachter, L., Herpels, P., Verstraeten, N., Fauvart, M., & Michiels, J. (2016). Reactive oxygen species do not contribute to ObgE*-mediated programmed cell death. *Scientific Reports*, 6(1), 33723. <https://doi.org/10.1038/srep33723>
- Diacovich, L., Peirú, S., Kurth, D., Rodríguez, E., Podestá, F., Khosla, C., & Gramajo, H. (2002). Kinetic and structural analysis of a new group of acyl-CoA carboxylases found in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 31228-31236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203263200>
- Djinni, I., Defant, A., Kecha, M., & Mancini, I. (2013). Antibacterial polyketides from the marine alga-derived endophytic *Streptomyces sundarbansensis*: A study on hydroxypyron tautomerism. *Marine Drugs*, 11(1), 124-135. <https://doi.org/10.3390/md11010124>
- Donald, L., Pipite, A., Subramani, R., Owen, J., Keyzers, R. A., & Taufa, T. (2022). *Streptomyces*: Still the biggest producer of new natural secondary metabolites, a current perspective. *Microbiology Research*, 13(3), 418-465. <https://doi.org/10.3390/microbiolres13030031>
- Dulermo, T., Lejeune, C., Aybeke, E., Abreu, S., Bleton, J., David, M., Deniset-Besseau, A., Chaminade, P., Thibessard, A., Leblond, P., & Virolle, M.-J. (2023). Genome analysis of a variant of *Streptomyces coelicolor* M145 with high lipid content and poor ability to synthesize antibiotics. *Microorganisms*, 11(6), 1470. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061470>
- Dwivedi, G. R., Sisodia, B. S., & Shikha. (2019). Secondary metabolites: Metabolomics for secondary metabolites. En *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 333-344). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00022-0>
- Eccleston, M., Willems, A., Beveridge, A., & Nodwell, J. R. (2006). Critical residues and novel effects of overexpression of the *Streptomyces coelicolor* developmental protein BldB: Evidence for a critical interacting partner. *Journal of Bacteriology*, 188(23), 8189-8195. <https://doi.org/10.1128/JB.01119-06>
- Elliot, M. A., Bibb, M. J., Buttner, M. J., & Leskiw, B. K. (2001). BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, 40(1), 257-269. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02387.x>
- Eshelman, K., Yao, H., Punchi Hewage, A. N. D., Deay, J. J., Chandler, J. R., & Rivera, M. (2017). Inhibiting the BfrB:Bfd interaction in *Pseudomonas aeruginosa* causes irreversible iron accumulation in bacterioferritin and iron deficiency in the bacterial cytosol. *Metallomics*, 9(6), 646-659. <https://doi.org/10.1039/C7MT00042A>

- Esnault, C., Dulermo, T., Smirnov, A., Askora, A., David, M., Deniset-Besseau, A., Holland, I.-B., & Virolle, M.-J. (2017). Strong antibiotic production is correlated with highly active oxidative metabolism in *Streptomyces coelicolor* M145. *Scientific Reports*, 7(1), 200. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00259-9>
- Expert, D., Boughammoura, A., & Franza, T. (2008). Siderophore-controlled iron assimilation in the enterobacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36564-36572. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807749200>
- Facey, P. D., Hitchings, M. D., Saavedra-Garcia, P., Fernandez-Martinez, L., Dyson, P. J., & 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. *Molecular Microbiology*, 73(6), 1186-1202. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06848.x>
- Facey, P. D., Sevcikova, B., Novakova, R., Hitchings, M. D., Crack, J. C., Kormanec, J., Dyson, P. J., & 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(9), e25593. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025593>
- Feng, Y., Qaseem, A., Moumbock, A. F. A., Pan, S., Kirchner, P. A., Simoben, C. V., Malange, Y. I., Babiaka, S. B., Gao, M., & Günther, S. (2025). StreptomeDB 4.0: A comprehensive database of streptomycetes natural products enriched with protein interactions and interactive spectral visualization. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D724-D729. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1030>
- Fernández-Abalos, J. M., Reviejo, V., Díaz, M., Rodríguez, S., Leal, F., & Santamaría, R. I. (2003). Posttranslational processing of the xylanase Xys1L from *Streptomyces halstedii* JM8 is carried out by secreted serine proteases. *Microbiology*, 149(7), 1623-1632. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26113-0>
- Figueiredo, M. C. O., Lobo, S. A. L., Carita, J. N., Nobre, L. S., & Saraiva, L. M. (2012). Bacterioferritin protects the anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough against oxygen. *Anaerobe*, 18(4), 454-458. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.06.001>
- Finn, D., Catton, K., Heenan, M., Kopittke, P. M., Ouwerkerk, D., Klieve, A. V., & Dalal, R. C. (2018). Differential gene expression in the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) supports nitrogen mining dependent on the plant carbon to nitrogen ratio. *Agriculture*, 8(12), 192. <https://doi.org/10.3390/agriculture8120192>

BIBLIOGRAFÍA

- Fischer, M., Falke, D., Rönitz, J., Haase, A., Damelang, T., Pawlik, T., & Sawers, R. G. (2019). Hypoxia-induced synthesis of respiratory nitrate reductase 2 of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on the histidine kinase OsdK in mycelium but not in spores. *Microbiology*, 165(8), 905-916. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000829>
- Fish, W. W. (1988). [27] Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. En *Methods in Enzymology* (Vol. 158, pp. 357-364). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)58067-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)58067-9)
- Flett, F., Mersinias, V., & Smith, C. P. (1997). High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, 155(2), 223-229. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb13882.x>
- Flores, F. J., Barreiro, C., Coque, J. J. R., & Martín, 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(3), 725-735. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2004.04509.x>
- Flores, F. J., & Martín, J. F. (2004). Iron-regulatory proteins DmdR1 and DmdR2 of *Streptomyces coelicolor* form two different DNA-protein complexes with iron boxes. *Biochemical Journal*, 380(2), 497-503. <https://doi.org/10.1042/bj20031945>
- Fornelos, N., Browning, D. F., & Butala, M. (2016). The use and abuse of LexA by mobile genetic elements. *Trends in Microbiology*, 24(5), 391-401. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.009>
- Franco Echevarría, E. (2013). *Efecto fenotípico de la delección de los genes codificantes de las quinasas AbrC1 y AbrC2 en Streptomyces coelicolor* [Trabajo Fin de Grado]. Universidad de Salamanca.
- Gao, C., Hindra, Mulder, D., Yin, C., & Elliot, M. A. (2012). Crp is a global regulator of antibiotic production in *Streptomyces*. *mBio*, 3(6), e00407-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00407-12>
- García Abad, L. (2019). *Caracterización del mutante del gen de la bacterioferritina SCO2113 en Streptomyces coelicolor* [Trabajo Fin de Máster]. Universidad de Salamanca.
- García-Angulo, V. A. (2017). Overlapping riboflavin supply pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(2), 196-209. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1192578>
- García-Martín, J., García-Abad, L., Santamaría, R. I., & Díaz, M. (2024). Functional connexion of bacterioferritin in antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 234. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02510-1>

- Gil-Serna, J., Antunes, P., Campoy, S., Cid, Á., Cobo-Molinos, A., Durão, P., Fajardo, C., Fouz, B., Freitas, A. R., Grosso, F., De Groot, P. W. J., De Miguel, T., Zorn, B. G., Hinojosa, B., Leão, M. J., Llagostera, M., De Llanos, R., Lucía, A., Maicas, S., ... all members of MicroMundo Teams in Spain and Portugal. (2025). Citizen science to raise antimicrobial resistance awareness in the community: The MicroMundo project in Spain and Portugal. *Microbial Biotechnology*, 18(3), e70123. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70123>
- Gongerowska-Jac, M., Szafran, M. J., Mikołajczyk, J., Szymczak, J., Bartyńska, M., Gierlikowska, A., Biały, S., Elliot, M. A., & Jakimowicz, D. (2021). Global chromosome topology and the two-component systems in concerted manner regulate transcription in *Streptomyces*. *mSystems*, 6(6).
- Goodyear, J., Diamandas, M., Moreira, R., & Taylor, S. D. (2025). The calcium-dependent antibiotics: Structure–activity relationships and determination of their lipid target. *ACS Infectious Diseases*, 11(1), 226-237. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00810>
- Goswami, M., Mangoli, S. H., & Jawali, N. (2007). Effects of glutathione and ascorbic acid on streptomycin sensitivity of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(3), 1119-1122. <https://doi.org/10.1128/AAC.00779-06>
- Gottelt, M., Kol, S., Gomez-Escribano, J. P., Bibb, M., & Takano, E. (2010). Deletion of a regulatory gene within the *cpk* gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 156(8), 2343-2353. <https://doi.org/10.1099/mic.0.038281-0>
- Gubbens, J., Janus, M., Florea, B. I., Overkleeft, H. S., & van Wezel, G. P. (2012). Identification of glucose kinase-dependent and -independent pathways for carbon control of primary metabolism, development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by quantitative proteomics. *Molecular Microbiology*, 86(6), 1490-1507. <https://doi.org/10.1111/mmi.12072>
- Guo, M., Gao, M., Liu, J., Xu, N., & Wang, H. (2022). Bacterioferritin nanocage: Structure, biological function, catalytic mechanism, self-assembly and potential applications. *Biotechnology Advances*, 61, 108057. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108057>
- Hahn, J.-S., Oh, S.-Y., & Roe, J.-H. (2002). Role of OxyR as a peroxide-sensing positive regulator in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 184(19), 5214-5222. <https://doi.org/10.1128/JB.184.19.5214-5222.2002>

BIBLIOGRAFÍA

- Haiser, H. J., Yousef, M. R., & Elliot, M. A. (2009). Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 191(21), 6501-6512. <https://doi.org/10.1128/JB.00767-09>
- Hallgren, J., Tsirigos, K. D., Pedersen, M. D., Almagro Armenteros, J. J., Marcatili, P., Nielsen, H., Krogh, A., & Winther, O. (2022). DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hao, Y., Liu, W., Li, X., & Wen, Y. (2023). *Streptomyces* global regulators AfsR and AfsS interact to co-regulate antibiotic production and morphological development. *Microbial Biotechnology*, 17(1), e14319. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14319>
- Hara, O., Horinouchi, S., Uozumi, T., & Beppu, T. (1983). Genetic analysis of A-factor synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces griseus*. *Microbiology*, 129(9), 2939-2944. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-9-2939>
- Hassett, R. F., Romeo, A. M., & Kosman, D. J. (1998). Regulation of high affinity iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7628-7636. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7628>
- Hastings, J., Owen, G., Dekker, A., Ennis, M., Kale, N., Muthukrishnan, V., Turner, S., Swainston, N., Mendes, P., & Steinbeck, C. (2016). ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1214-D1219. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1031>
- Hesketh, A., Hill, C., Mokhtar, J., Novotna, G., Tran, N., Bibb, M., & Hong, H.-J. (2011). Genome-wide dynamics of a bacterial response to antibiotics that target the cell envelope. *BMC Genomics*, 12(1), 226. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-226>
- Hetta, H. F., Khalaf, F. R., Kotb, A. A., Alatawi, M. N., Albalawi, A. S., Alharbi, A. A., Aljohani, M. K., Aljohani, S. S., Alatawi, M. S., Abd Allah, N. H., Battah, B., Donadu, M. G., & Mazzarello, V. (2025). Taming superbugs: Current progress and challenges in combating ESKAPE pathogens. *Pathogens*, 15(1), 28. <https://doi.org/10.3390/pathogens15010028>
- Hindra, Pak, P., & Elliot, M. A. (2010). Regulation of a novel gene cluster involved in secondary metabolite production in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 4973-4982. <https://doi.org/10.1128/JB.00681-10>

- Hitchings, M. D., Townsend, P., Pohl, E., Facey, P. D., Jones, D. H., Dyson, P. J., & Del Sol, R. (2014). A tale of tails: Deciphering the contribution of terminal tails to the biochemical properties of two Dps proteins from *Streptomyces coelicolor*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(24), 4911-4926. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1658-4>
- Hofmann, A., Müller, S., Drechsler, T., Berleth, M., Caesar, K., Rohr, L., Harter, K., & Groth, G. (2020). High-level expression, purification and initial characterization of recombinant *Arabidopsis* histidine kinase AHK1. *Plants*, 9(3), 304. <https://doi.org/10.3390/plants9030304>
- Hojati, Z., Milne, C., Harvey, B., Gordon, L., Borg, M., Flett, F., Wilkinson, B., Sidebottom, P. J., Rudd, B. A. M., Hayes, M. A., Smith, C. P., & Micklefield, J. (2002). Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*. *Chemistry & Biology*, 9(11), 1175-1187. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00252-1](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00252-1)
- Honma, S., Ito, S., Yajima, S., & Sasaki, Y. (2021). Nitric oxide signaling for actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) via the DevS/R two-component system. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(14), e00480-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00480-21>
- Honma, S., Ito, S., Yajima, S., & Sasaki, Y. (2022). Nitric oxide signaling for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(23), e01222-22. <https://doi.org/10.1128/aem.01222-22>
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M., & Schrepf, H. (1985). *Genetic manipulation of Streptomyces: A laboratory manual*. The John Innes Foundation.
- Horinouchi, S., & Beppu, T. (1992). Regulation of secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces*: A-factor as a microbial hormone and the AfsR protein as a component of a two-component regulatory system. *Gene*, 115(1-2), 167-172. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90555-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90555-4)
- Hoskisson, P. A., & Fernández-Martínez, L. T. (2018). Regulation of specialised metabolites in Actinobacteria – expanding the paradigms. *Environmental Microbiology Reports*, 10(3), 231-238. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12629>
- Hoskisson, P. A., & Hutchings, M. I. (2006). MtrAB–LpqB: A conserved three-component system in actinobacteria? *Trends in Microbiology*, 14(10), 444-449. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.08.005>

BIBLIOGRAFÍA

- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Ichinose, K., Taguchi, T., Bedford, D. J., Ebizuka, Y., & Hopwood, D. A. (2001). Functional complementation of pyran ring formation in actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) by ketoreductase genes for granaticin biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 183(10), 3247-3250. <https://doi.org/10.1128/JB.183.10.3247-3250.2001>
- Irfan, M., Almotiri, A., & AlZeyadi, Z. A. (2022). Antimicrobial resistance and its drivers—A review. *Antibiotics*, 11(10), 1362. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101362>
- Iskandar, K., Murugaiyan, J., Hammoudi Halat, D., Hage, S. E., Chibabhai, V., Adukkadukkam, S., Roques, C., Molinier, L., Salameh, P., & Van Dongen, M. (2022). Antibiotic discovery and resistance: The chase and the race. *Antibiotics*, 11(2), 182. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020182>
- Jiang, J., He, X., & Cane, D. E. (2007). Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nature Chemical Biology*, 3(11), 711-715. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.29>
- Jin, S., Hui, M., Lu, Y., & Zhao, Y. (2023). An overview on the two-component systems of *Streptomyces coelicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(3), 78. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03522-6>
- Jobichen, C., Ying Chong, T., Rattinam, R., Basak, S., Srinivasan, M., Choong, Y. K., Pandey, K. P., Ngoc, T. B., Shi, J., Angayarkanni, J., & Sivaraman, J. (2023). Bacterioferritin nanocage structures uncover the biomineralization process in ferritins. *PNAS Nexus*, 2(7), pgad235. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad235>
- Jones, S. E., & Elliot, M. A. (2017). *Streptomyces* exploration: Competition, volatile communication and new bacterial behaviours. *Trends in Microbiology*, 25(7), 522-531. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.001>
- Jones, S. E., & Elliot, M. A. (2018). ‘Exploring’ the regulation of *Streptomyces* growth and development. *Current Opinion in Microbiology*, 42, 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.09.009>
- Joshi, S., Fedoseyenko, D., Mahanta, N., Manion, H., Naseem, S., Dairi, T., & Begley, T. P. (2018). Novel enzymology in futasine-dependent menaquinone biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 47, 134-141. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.09.015>

- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Matsuura, Y., & Ishiguro-Watanabe, M. (2025). KEGG: Biological systems database as a model of the real world. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D672-D677. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae909>
- Keren, I., Wu, Y., Inocencio, J., Mulcahy, L. R., & Lewis, K. (2013). Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science*, 339(6124), 1213-1216. <https://doi.org/10.1126/science.1232688>
- Khan, R. T., Sharma, V., Khan, S. S., & Rasool, S. (2024). Prevention and potential remedies for antibiotic resistance: Current research and future prospects. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1455759. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1455759>
- Khare, G., Nangpal, P., & Tyagi, A. K. (2017). Differential roles of iron storage proteins in maintaining the iron homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS ONE*, 12(1), e0169545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169545>
- Kiepas, A. B., Hoskisson, P. A., & Pritchard, L. (2024). 16S rRNA phylogeny and clustering is not a reliable proxy for genome-based taxonomy in *Streptomyces*. *Microbial Genomics*, 10(9). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001287>
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (Eds.). (2000). *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation.
- Kim, D.-W., Chater, K. F., Lee, K.-J., & Hesketh, A. (2005). Effects of growth phase and the developmentally significant *bldA*-specified tRNA on the membrane-associated proteome of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*, 151(8), 2707-2720. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28000-0>
- Kim, E. S., Song, J. Y., Kim, D. W., Chater, K. F., & Lee, K. J. (2008). A possible extended family of regulators of sigma factor activity in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 190(22), 7559-7566. <https://doi.org/10.1128/JB.00470-08>
- Kim, H.-S., Lee, E.-J., Cho, Y.-H., & Roe, J.-H. (2013). Post-translational regulation of a developmental catalase, CatB, involves a metalloprotease, SmpA and contributes to proper differentiation and osmoprotection of *Streptomyces coelicolor*. *Research in Microbiology*, 164(4), 327-334. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.12.009>
- Kim, M., Dufour, Y. S., Yoo, J. S., Cho, Y., Park, J., Nam, G., Kim, H. M., Lee, K., Donohue, T. J., & Roe, J. (2012). Conservation of thiol-oxidative stress responses regulated by SigR orthologues in

BIBLIOGRAFÍA

- actinomycetes. *Molecular Microbiology*, 85(2), 326-344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08115.x>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2025). PubChem 2025 update. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D1516-D1525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1059>
- Kim, Y., Roe, J.-H., Park, J.-H., Cho, Y.-J., & Lee, K.-L. (2021). Regulation of iron homeostasis by peroxide-sensitive CatR, a Fur-family regulator in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Microbiology*, 59(12), 1083-1091. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-1457-1>
- Kol, S., Merlo, M. E., Scheltema, R. A., De Vries, M., Vonk, R. J., Kikkert, N. A., Dijkhuizen, L., Breitling, R., & Takano, E. (2010). Metabolomic characterization of the salt stress response in *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(8), 2574-2581. <https://doi.org/10.1128/AEM.01992-09>
- Komatsu, M., Takano, H., Hiratsuka, T., Ishigaki, Y., Shimada, K., Beppu, T., & Ueda, K. (2006). Proteins encoded by the conserved of *Streptomyces coelicolor* A3(2) comprise a membrane-associated heterocomplex that resembles eukaryotic G protein-coupled regulatory system. *Molecular Microbiology*, 62(6), 1534-1546. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05461.x>
- Kormanec, J., Sevcikova, B., Novakova, R., Homerova, D., Rezuchova, B., & Mingyar, E. (2016). The complex roles and regulation of stress response σ factors in *Streptomyces coelicolor*. En F. J. De Bruijn (Ed.), *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria* (1.^a ed., pp. 328-343). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119004813.ch29>
- Kuhstoss, S., Richardson, M. A., & Rao, R. N. (1991). Plasmid cloning vectors that integrate site-specifically in *Streptomyces* spp. *Gene*, 97(1), 143-146. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90022-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90022-4)
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., & Tamura, K. (2024). MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis version 12 for adaptive and green computing. *Molecular Biology and Evolution*, 41(12), msae263. <https://doi.org/10.1093/molbev/msae263>
- Lambert, S., Traxler, M. F., Craig, M., Maciejewska, M., Ongena, M., van Wezel, G. P., Kolter, R., & Rigali, S. (2014). Altered desferrioxamine-mediated iron utilization is a common trait of bald mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Metallomics*, 6(8), 1390-1399. <https://doi.org/10.1039/C4MT00068D>

- Larcombe, D. E., Braes, R. E., Corxford, J. T., Wilson, J. W., Figurski, D. H., Hoskisson, P. A. (2024). Sequence and origin of the *Streptomyces* intergenetic-conjugation helper plasmid pUZ8002. *Access Microbiology*, 6(6), . <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000808.v3>
- Lee, K.-L., Yoo, J.-S., Oh, G.-S., Singh, A. K., & Roe, J.-H. (2017). Simultaneous activation of iron- and thiol-based sensor-regulator systems by redox-active compounds. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00139>
- Lee, N., Hwang, S., Kim, W., Lee, Y., Kim, J. H., Cho, S., Kim, H. U., Yoon, Y. J., Oh, M.-K., Palsson, B. O., & Cho, B.-K. (2021). Systems and synthetic biology to elucidate secondary metabolite biosynthetic gene clusters encoded in *Streptomyces* genomes. *Natural Product Reports*, 38(7), 1330-1361. <https://doi.org/10.1039/D0NP00071J>
- Lee, N., Kim, W., Chung, J., Lee, Y., Cho, S., Jang, K.-S., Kim, S. C., Palsson, B., & Cho, B.-K. (2020). Iron competition triggers antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* during coculture with *Myxococcus xanthus*. *The ISME Journal*, 14(5), 1111-1124. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0594-6>
- Lejeune, C., Sago, L., Cornu, D., Redeker, V., & Virolle, M.-J. (2022). A proteomic analysis indicates that oxidative stress is the common feature triggering antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* and in the *pptA* mutant of *Streptomyces lividans*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 813993. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.813993>
- Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: Recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W78-W82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>
- Li, C., Li, L., Huang, L., & Li, A. (2021). Pleiotropic effects of ActVI-ORFA as an unusual regulatory factor identified in the biosynthetic pathway of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiological Research*, 250, 126792. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126792>
- Li, F., Liang, J., Wang, W., Zhou, X., Deng, Z., & Wang, Z. (2014). Analysis of *Streptomyces coelicolor* membrane proteome using two-dimensional native/native and native/sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 465, 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.08.009>
- Li, L., Jiang, W., & Lu, Y. (2017). A novel two-component system, GluR-GluK, involved in glutamate sensing and uptake in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 199(18). <https://doi.org/10.1128/JB.00097-17>

BIBLIOGRAFÍA

- Li, P., He, S., Zhang, X., Gao, Q., Liu, Y., & Liu, L. (2022). Structures, biosynthesis, and bioactivities of prodiginine natural products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(23), 7721-7735. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12245-x>
- Li, Z., Li, W., Zhao, C., Keith F., C., & Tao, M. (2007). NsdB, a TRP-like-domain-containing protein negatively affecting production of antibiotics in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Acta Microbiologica Sinica*, 47(5), 849-854.
- Lim, Y., Jung, E. S., Lee, J. H., Kim, E. J., Hong, S. J., Lee, Y. H., & Lee, C. H. (2018). Non-targeted metabolomics unravels a media-dependent prodiginines production pathway in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *PLOS ONE*, 13(11), e0207541. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207541>
- Linardi, D., She, W., Zhang, Q., Yu, Y., Qian, P.-Y., & Lam, H. (2022). Proteomining-based elucidation of natural product biosynthetic pathways in *Streptomyces*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 913756. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.913756>
- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G., & Tan, H. (2013). Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 112-143. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00054-12>
- Liu, L., Jia, L., Yang, W., Xiao, Y., Dai, J., Cui, P., Zhou, L., & Yin, Q. (2023). Measurement and correlation of solubility of L-tryptophan in aqueous solutions with a wide range of pH and different monovalent counterions from 283.15 to 323.15 K. *Journal of Solution Chemistry*, 52(2), 228-250. <https://doi.org/10.1007/s10953-022-01229-0>
- Łyżeń, R., Maitra, A., Milewska, K., Kochanowska-Łyżeń, M., Hernandez, V. J., & Szalewska-Pałasz, A. (2016). The dual role of DksA protein in the regulation of *Escherichia coli* pArgX promoter. *Nucleic Acids Research*, gkw912. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw912>
- Ma, J.-F., Ochsner, U. A., Klotz, M. G., Nanayakkara, V. K., Howell, M. L., Johnson, Z., Posey, J. E., Vasil, M. L., Monaco, J. J., & Hassett, D. J. (1999). Bacterioferritin A modulates catalase A (KatA) activity and resistance to hydrogen peroxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 181(12), 3730-3742. <https://doi.org/10.1128/JB.181.12.3730-3742.1999>
- Maclean, M., MacGregor, S. J., Anderson, J. G., & Woolsey, G. A. (2008). The role of oxygen in the visible-light inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 92(3), 180-184. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.06.006>

- MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H., & MacNeil, T. (1992). Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 111(1), 61-68. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90603-M](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90603-M)
- Manteca, A., Jung, H. R., Schwämmle, V., Jensen, O. N., & Sanchez, J. (2010). Quantitative proteome analysis of *Streptomyces coelicolor* nonsporulating liquid cultures demonstrates a complex differentiation process comparable to that occurring in sporulating solid cultures. *Journal of Proteome Research*, 9(9), 4801-4811. <https://doi.org/10.1021/pr100513p>
- Manteca, A., Mäder, U., Connolly, B. A., & Sanchez, J. (2006). A proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* programmed cell death. *PROTEOMICS*, 6(22), 6008-6022. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600147>
- Manteca, A., Sanchez, J., Jung, H. R., Schwämmle, V., & Jensen, O. N. (2010). Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(7), 1423-1436. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900449-MCP200>
- Marshall, A. P., Johnson, A. R., Vega, M. M., Thomson, R. J., & Carlson, E. E. (2020). Ion mobility mass spectrometry as an efficient tool for identification of streptorubin B in *Streptomyces coelicolor* M145. *Journal of Natural Products*, 83(1), 159-163. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00828>
- Martín, J. F., Rodríguez-García, A., & 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*. *The Journal of Antibiotics*, 70(5), 534-541. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.19>
- Mathieu, K., Javed, W., Vallet, S., Lesterlin, C., Candusso, M.-P., Ding, F., Xu, X. N., Ebel, C., Jault, J.-M., & Orelle, C. (2019). Functionality of membrane proteins overexpressed and purified from *E. coli* is highly dependent upon the strain. *Scientific Reports*, 9(1), 2654. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39382-0>
- Mehla, J., Caufield, J. H., Sakhawalkar, N., & Uetz, P. (2017). A comparison of two-hybrid approaches for detecting protein–protein interactions. En *Methods in Enzymology* (Vol. 586, pp. 333-358). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.10.020>
- Miethke, M., Pieroni, M., Weber, T., Brönstrup, M., Hammann, P., Halby, L., Arimondo, P. B., Glaser, P., Aigle, B., Bode, H. B., Moreira, R., Li, Y., Luzhetskyy, A., Medema, M. H., Pernodet, J.-L., Stadler, M., Tormo, J. R., Genilloud, O., Truman, A. W., ... Müller, R. (2021). Towards the sustainable discovery

BIBLIOGRAFÍA

- and development of new antibiotics. *Nature Reviews Chemistry*, 5(10), 726-749. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1>
- Mingyar, E., Sevcikova, B., Rezuchova, B., Homerova, D., Novakova, R., & Kormanec, J. (2014). The σ^F -specific anti-sigma factor RsfA is one of the protein kinases that phosphorylates the pleiotropic anti-anti-sigma factor BldG in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene*, 538(2), 280-287. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.01.041>
- Mo, S., Sydor, P. K., Corre, C., Alhamadsheh, M. M., Stanley, A. E., Haynes, S. W., Song, L., Reynolds, K. A., & Challis, G. L. (2008). Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 2-undecylpyrrole, a key intermediate in undecylprodiginine and streptorubin B biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 15(2), 137-148. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.11.015>
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Naghavi, M., Vollset, S. E., Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Gray, A. P., Wool, E. E., Robles Aguilar, G., Mestrovic, T., Smith, G., Han, C., Hsu, R. L., Chalek, J., Araki, D. T., Chung, E., Raggi, C., Gershberg Hayoon, A., Davis Weaver, N., Lindstedt, P. A., Smith, A. E., ... Murray, C. J. L. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: A systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, 404(10459), 1199-1226. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1)
- Nagy, Z., Comer, S., & Smolenski, A. (2018). Analysis of protein phosphorylation using Phos-tag gels. *Current Protocols in Protein Science*, 93(1), e64. <https://doi.org/10.1002/cpps.64>
- Nai, C., & Meyer, V. (2018). From axenic to mixed cultures: Technological advances accelerating a paradigm shift in microbiology. *Trends in Microbiology*, 26(6), 538-554. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.004>
- Nakajima, S., Satoh, Y., Yanashima, K., Matsui, T., & Dairi, T. (2015). Ergothioneine protects *Streptomyces coelicolor* A3(2) from oxidative stresses. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(3), 294-298. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.01.013>
- Nett, M., Ikeda, H., & Moore, B. S. (2009). Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural Product Reports*, 26(11), 1362. <https://doi.org/10.1039/b817069j>

- Netzker, T., Fischer, J., Weber, J., Mattern, D. J., König, C. C., Valiante, V., Schroeckh, V., & Brakhage, A. A. (2015). Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00299>
- Ni, J., Wood, J. L., White, M. Y., Lihi, N., Markham, T. E., Wang, J., Chivers, P. T., & Codd, R. (2023). Reduction-cleavable desferrioxamine B pulldown system enriches Ni(II)-superoxide dismutase from a *Streptomyces* proteome. *RSC Chemical Biology*, 4(12), 1064-1072. <https://doi.org/10.1039/D3CB00097D>
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., & Sugino, Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research*, 18(20), 6169-6169. <https://doi.org/10.1093/nar/18.20.6169>
- Nitta, K., Carratore, F. D., Breitling, R., Takano, E., Putri, S. P., & Fukusaki, E. (2020). Multi-omics analysis of the effect of cAMP on actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 595552. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.595552>
- Nodwell, J. R. (2019). Microbe Profile: *Streptomyces coelicolor*: a burlesque of pigments and phenotypes. *Microbiology*, 165(9), 953-955. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000821>
- Onaka, H., Nakagawa, T., & Horinouchi, S. (1998). Involvement of two A-factor receptor homologues in *Streptomyces coelicolor* A3(2) in the regulation of secondary metabolism and morphogenesis. *Molecular Microbiology*, 28(4), 743-753. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00832.x>
- Orban, K., & Finkel, S. E. (2022). Dps is a universally conserved dual-action DNA-binding and ferritin protein. *Journal of Bacteriology*, 204(5), e00036-22. <https://doi.org/10.1128/jb.00036-22>
- Ortúzar, M., Trujillo, M. E., Román-Ponce, B., & Carro, L. (2020). *Micromonospora* metallophores: A plant growth promotion trait useful for bacterial-assisted phytoremediation? *Science of The Total Environment*, 739, 139850. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139850>
- Paget, M. S. B., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S. J., & Buttner, M. J. (1999). Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor ζ^E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 181(1), 204-211. <https://doi.org/10.1128/JB.181.1.204-211.1999>
- Palazzotto, E., Renzone, G., Fontana, P., Botta, L., Scaloni, A., Puglia, A. M., & Gallo, G. (2015). Tryptophan promotes morphological and physiological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(23), 10177-10189. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7012-4>

BIBLIOGRAFÍA

- Pang, Z., Lu, Y., Zhou, G., Hui, F., Xu, L., Viau, C., Spigelman, A. F., MacDonald, P. E., Wishart, D. S., Li, S., & Xia, J. (2024). MetaboAnalyst 6.0: Towards a unified platform for metabolomics data processing, analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W398-W406. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae253>
- Paun, V. I., Iteus, C., Lavin, P., Chifiriuc, M. C., & Purcarea, C. (2026). First genome sequence and functional profiling of *Psychrobacter* SC65A.3 preserved in 5,000-year-old cave ice: Insights into ancient resistome, antimicrobial potential, and enzymatic activities. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1713017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1713017>
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., & Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 127-131. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.023>
- Pérez-Redondo, R., Rodríguez-García, A., Botas, A., Santamarta, I., Martín, J. F., & Liras, P. (2012). ArgR of *Streptomyces coelicolor* is a versatile regulator. *PLoS ONE*, 7(3), e32697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032697>
- Persson, J., Chater, K. F., & Flärdh, K. (2013). Molecular and cytological analysis of the expression of *Streptomyces* sporulation regulatory gene *whiH*. *FEMS Microbiology Letters*, 341(2), 96-105. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12099>
- Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN). (2025). *Informe anual del PRAN 2024*. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).
- Poynton, E. F., van Santen, J. A., Pin, M., Contreras, M. M., McMann, E., Parra, J., Showalter, B., Zaroubi, L., Duncan, K. R., & Linington, R. G. (2025). The Natural Products Atlas 3.0: Extending the database of microbially derived natural products. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D691-D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1093>
- Punchi Hewage, A. N. D., Fontenot, L., Guidry, J., Weldegiorghis, T., Mehta, A. K., Donnarumma, F., & Rivera, M. (2020). Mobilization of iron stored in bacterioferritin is required for metabolic homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogens*, 9(12), 980. <https://doi.org/10.3390/pathogens9120980>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

- Revill, W. P., Bibb, M. J., Scheu, A.-K., Kieser, H. J., & Hopwood, D. A. (2001). β -ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for fatty acid biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 183(11), 3526-3530. <https://doi.org/10.1128/JB.183.11.3526-3530.2001>
- Riascos, C., Martínez-Carrasco, A., Díaz, M., & Santamaría, R. I. (2023). Role of fourteen XRE-DUF397 pairs from *Streptomyces coelicolor* as regulators of antibiotic production and differentiation. New players in a complex regulatory network. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1217350. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1217350>
- Rico García, S. (2014). *Caracterización de AbrC3, un regulador de respuesta positivo de la producción de antibióticos en Streptomyces coelicolor* [Tesis doctoral, Universidad de Salamanca]. <https://aplicaciones.ciencia.gob.es/teseo/#/tesis/O364553/detalle>
- Rico, S., Santamaría, R. I., Yepes, A., Rodríguez, H., Laing, E., Bucca, G., Smith, C. P., & Díaz, M. (2014). Deciphering the regulon of *Streptomyces coelicolor* AbrC3, a positive response regulator of antibiotic production. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2417-2428. <https://doi.org/10.1128/AEM.03378-13>
- Rico, S., Yepes, A., Rodríguez, H., Santamaría, J., Antoraz, S., Krause, E. M., Diaz, M., & Santamaría, R. I. (2014). Regulation of the AbrA1/A2 two-component system in *Streptomyces coelicolor* and the potential of its deletion strain as a heterologous host for antibiotic production. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0109844>
- Rigali, S., Anderssen, S., Naômé, A., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.007>
- Rigali, S., Nothaft, H., Noens, E. E. E., Schlicht, M., Colson, S., Müller, M., Joris, B., Koerten, H. K., Hopwood, D. A., Titgemeyer, F., & Van Wezel, G. P. (2006). The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links *N*-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Molecular Microbiology*, 61(5), 1237-1251. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05319.x>
- Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A., & van Wezel, G. P. (2008). Feast or famine: The global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Reports*, 9(7), 670-675. <https://doi.org/10.1038/embo.2008.83>
- Robinson, A. S. (2011). *Production of membrane proteins. Strategies for expression and isolation*. Wiley-VCH.

BIBLIOGRAFÍA

- Rodríguez, H., Rico, S., Yepes, A., Franco-Echevarría, E., Antoraz, S., Ramón I., S., & Díaz, M. (2015). The two kinases, AbrC1 and AbrC2, of the atypical two-component system AbrC are needed to regulate antibiotic production and differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 6(450).
- Romero-Rodríguez, A., Ruiz-Villafán, B., Tierrafría, V. H., Rodríguez-Sanoja, R., & Sánchez, S. (2016). Carbon catabolite regulation of secondary metabolite formation and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(6), 1152-1166. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2158-9>
- Rütten, A., Kirchner, T., & Musiol-Kroll, E. M. (2022). Overview on strategies and assays for antibiotic discovery. *Pharmaceuticals*, 15(10), 1302. <https://doi.org/10.3390/ph15101302>
- Ryding, N. J., Anderson, T. B., & Champness, W. C. (2002). Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by *absA*, encoding a cluster-linked two-component system. *Journal of Bacteriology*, 184(3), 794-805. <https://doi.org/10.1128/JB.184.3.794-805.2002>
- Sabbahi, S., Alouini, Z., Jemli, M., & Boudabbous, A. (2008). The role of reactive oxygen species in *Staphylococcus aureus* photoinactivation by methylene blue. *Water Science and Technology*, 58(5), 1047-1054. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.471>
- Sabbahi, S., Ben Ayed, L., & Jemli, M. (2018). *Staphylococcus aureus* photodynamic inactivation mechanisms by rose bengal: Use of antioxidants and spectroscopic study. *Applied Water Science*, 8(2), 56. <https://doi.org/10.1007/s13201-018-0693-y>
- Saito, A., Fujii, T., Shinya, T., Shibuya, N., Ando, A., & Miyashita, K. (2008). The *msiK* gene, encoding the ATP-hydrolysing component of N,N'-diacetylchitobiose ABC transporters, is essential for induction of chitinase production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 154(11), 3358-3365. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/019612-0>
- Saito, N., Xu, J., Hosaka, T., Okamoto, S., Aoki, H., Bibb, M. J., & Ochi, K. (2006). EshA accentuates ppGpp accumulation and is conditionally required for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 188(13), 4952-4961. <https://doi.org/10.1128/JB.00343-06>
- Salehi-Najafabadi, A., Tehrani Fateh, S., Amoabediny, G., & Hamed, J. (2024). Insights into additional lactone-based signaling circuits in *Streptomyces*: Existence of acyl-homoserine lactones and LuxI/LuxR homologs in six *Streptomyces* species. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1342637. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1342637>

- Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiological Research*, 231, 126374. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374>
- Sampedro Cabezas, E. (2024). *Implicación de las histidina quinasas SCO2215 y SCO2359 en la producción de antibióticos y en la diferenciación celular en Streptomyces coelicolor* [Trabajo Fin de Máster]. Universidad de Salamanca.
- Sánchez de la Nieta Moreno, R. (2022). *Sistemas de Dos Componentes de Streptomyces coelicolor, pilares en la producción de antibióticos* [Tesis doctoral, Universidad de Salamanca]. <https://aplicaciones.ciencia.gob.es/teseo/#/tesis/O746674/detalle>
- Sánchez de la Nieta, R., Antoraz, S., Alzate, J. F., Santamaría, R. I., & Díaz, M. (2020). Antibiotic production and antibiotic resistance: The two sides of AbrB1/B2, a two-component system of *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 587750. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.587750>
- Sánchez de la Nieta, R., Santamaría, R. I., & Díaz, M. (2022). Two-component systems of *Streptomyces coelicolor*: An intricate network to be unraveled. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 15085. <https://doi.org/10.3390/ijms232315085>
- Santos-Aberturas, J., & Vior, N. (2022). Beyond soil-dwelling Actinobacteria: Fantastic antibiotics and where to find them. *Antibiotics*, 11(2), 195. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020195>
- Sasaki, Y., Oguchi, H., Kobayashi, T., Kusama, S., Sugiura, R., Moriya, K., Hirata, T., Yukioka, Y., Takaya, N., Yajima, S., Ito, S., Okada, K., Ohsawa, K., Ikeda, H., Takano, H., Ueda, K., & Shoun, H. (2016). Nitrogen oxide cycle regulates nitric oxide levels and bacterial cell signaling. *Scientific Reports*, 6(1), 22038. <https://doi.org/10.1038/srep22038>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schlimpert, S., & Elliot, M. A. (2023). The best of both worlds—*Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces venezuelae* as model species for studying antibiotic production and bacterial multicellular development. *Journal of Bacteriology*, 205(7), e00153-23. <https://doi.org/10.1128/jb.00153-23>
- Schniete, J. K., Reumerman, R., Kerr, L., Tucker, N. P., Hunter, I. S., Herron, P. R., & Hoskisson, P. A. (2020). Differential transcription of expanded gene families in central carbon metabolism of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Access Microbiology*, 2(6). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000122>

BIBLIOGRAFÍA

- Senges, C. H. R., Al-Dilaimi, A., Marchbank, D. H., Wibberg, D., Winkler, A., Haltli, B., Nowrousian, M., Kalinowski, J., Kerr, R. G., & Bandow, J. E. (2018). The secreted metabolome of *Streptomyces chartreusis* and implications for bacterial chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(10), 2490-2495. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715713115>
- Sevcikova, B., Rezuchova, B., Mazurakova, V., Homerova, D., Novakova, R., Feckova, L., & Kormanec, J. (2021). Cross-recognition of promoters by the nine SigB homologues present in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 7849. <https://doi.org/10.3390/ijms22157849>
- Sexton, D. L., St-Onge, R. J., Haiser, H. J., Yousef, M. R., Brady, L., Gao, C., Leonard, J., & Elliot, M. A. (2015). Resuscitation-promoting factors are cell wall-lytic enzymes with important roles in the germination and growth of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 197(5), 848-860. <https://doi.org/10.1128/JB.02464-14>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498-2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Shepherdson, E. M., Baglio, C. R., & Elliot, M. A. (2023). *Streptomyces* behavior and competition in the natural environment. *Current Opinion in Microbiology*, 71, 102257. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102257>
- Shin, J.-H., Singh, A. K., Cheon, D.-J., & Roe, J.-H. (2011). Activation of the SoxR regulon in *Streptomyces coelicolor* by the extracellular form of the pigmented antibiotic actinorhodin. *Journal of Bacteriology*, 193(1), 75-81. <https://doi.org/10.1128/JB.00965-10>
- Singh, A. K., Shin, J., Lee, K., Imlay, J. A., & Roe, J. (2013). Comparative study of SoxR activation by redox-active compounds. *Molecular Microbiology*, 90(5), 983-996. <https://doi.org/10.1111/mmi.12410>
- Som, N. F., Heine, D., Holmes, N., Knowles, F., Chandra, G., Seipke, R. F., Hoskisson, P. A., Wilkinson, B., & Hutchings, M. I. (2017). The MtrAB two-component system controls antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 163(10), 1415-1419. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000524>
- Stewart, M. Y. Y., Bush, M. J., Crack, J. C., Buttner, M. J., & Le Brun, N. E. (2020). Interaction of the *Streptomyces* Wbl protein WhiD with the principal sigma factor σ^{HrdB} depends on the WhiD [4Fe-

- 4S] cluster. *Journal of Biological Chemistry*, 295(28), 9752-9765.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012708>
- Swiatek, M. A., Gubbens, J., Bucca, G., Song, E., Yang, Y.-H., Laing, E., Kim, B.-G., Smith, C. P., & Van Wezel, G. P. (2013). The ROK family regulator Rok7B7 pleiotropically affects xylose utilization, carbon catabolite repression, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 195(6), 1236-1248. <https://doi.org/10.1128/JB.02191-12>
- Świątek-Połatynska, M. A., Bucca, G., Laing, E., Gubbens, J., Titgemeyer, F., Smith, C. P., Rigali, S., & van Wezel, G. P. (2015). Genome-wide analysis of *in vivo* binding of the master regulator DasR in *Streptomyces coelicolor* identifies novel non-canonical targets. *PLOS ONE*, 10(4), e0122479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122479>
- Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A. L., Fang, T., Doncheva, N. T., Pyysalo, S., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2023). The STRING database in 2023: Protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D638-D646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>
- Takano, H., Hashimoto, K., Yamamoto, Y., Beppu, T., & Ueda, K. (2011). Pleiotropic effect of a null mutation in the *cvn1* conservon of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene*, 477(1-2), 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.01.005>
- Tang, J., Zhu, Z., He, H., Liu, Z., Xia, Z., Chen, J., Hu, J., Cao, L., Rang, J., Shuai, L., Liu, Y., Sun, Y., Ding, X., Hu, S., & Xia, L. (2021). Bacterioferritin: A key iron storage modulator that affects strain growth and butenyl-spinosyn biosynthesis in *Saccharopolyspora pogona*. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 157. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01651-x>
- Temuujin, U., Chi, W.-J., Chang, Y.-K., & Hong, S.-K. (2012). Identification and biochemical characterization of Sco3487 from *Streptomyces coelicolor* A3(2), an exo- and endo-type β -agarase-producing neoagarobiose. *Journal of Bacteriology*, 194(1), 142-149. <https://doi.org/10.1128/JB.05978-11>
- Tenconi, E., Traxler, M. F., Hoebreck, C., van Wezel, G. P., & Rigali, S. (2018). Production of prodiginines is part of a programmed cell death process in *Streptomyces coelicolor*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1742. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01742>
- The UniProt Consortium, Bateman, A., Martin, M.-J., Orchard, S., Magrane, M., Adesina, A., Ahmad, S., Bowler-Barnett, E. H., Bye-A-Jee, H., Carpentier, D., Denny, P., Fan, J., Garmiri, P., Gonzales, L. J.

BIBLIOGRAFÍA

- D. C., Hussein, A., Ignatchenko, A., Insana, G., Ishtiaq, R., Joshi, V., ... Zhang, J. (2025). UniProt: The Universal Protein knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D609-D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1010>
- Tian, Y., Fowler, K., Findlay, K., Tan, H., & Chater, K. F. (2007). An unusual response regulator influences sporulation at early and late stages in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 189(7), 2873-2885. <https://doi.org/10.1128/JB.01615-06>
- Tierney, A. R., & Rather, P. N. (2019). Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 14(6), 533-552. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0002>
- Tierrafría, V. H., Ramos-Aboites, H. E., Gosset, G., & Barona-Gómez, F. (2011). Disruption of the siderophore-binding *desE* receptor gene in *Streptomyces coelicolor* A3(2) results in impaired growth in spite of multiple iron-siderophore transport systems. *Microbial Biotechnology*, 4(2), 275-285. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00240.x>
- Tiffert, Y., Franz-Wachtel, M., Fladerer, C., Nordheim, A., Reuther, J., Wohlleben, W., & Mast, Y. (2011). Proteomic analysis of the GlnR-mediated response to nitrogen limitation in *Streptomyces coelicolor* M145. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 1149-1159. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3086-9>
- Tomé, D. (2021). Yeast extracts: Nutritional and flavoring food ingredients. *ACS Food Science & Technology*, 1(4), 487-494. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.0c00131>
- Tong, Y., Charusanti, P., Zhang, L., Weber, T., & Lee, S. Y. (2015). CRISPR-Cas9 based engineering of actinomycetal genomes. *ACS Synthetic Biology*, 4(9), 1020-1029. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.5b00038>
- Tran, N. T., Huang, X., Hong, H., Bush, M. J., Chandra, G., Pinto, D., Bibb, M. J., Hutchings, M. I., Mascher, T., & Buttner, M. J. (2019). Defining the regulon of genes controlled by σ^E , a key regulator of the cell envelope stress response in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 112(2), 461-481. <https://doi.org/10.1111/mmi.14250>
- Travis, B. A., & Schumacher, M. A. (2022). Diverse molecular mechanisms of transcription regulation by the bacterial alarmone ppGpp. *Molecular Microbiology*, 117(2), 252-260. <https://doi.org/10.1111/mmi.14860>

- Traxler, M. F., Seyedsayamdost, M. R., Clardy, J., & Kolter, R. (2012). Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy. *Molecular Microbiology*, 86(3), 628-644. <https://doi.org/10.1111/mmi.12008>
- Traxler, M. F., Watrous, J. D., Alexandrov, T., Dorrestein, P. C., & Kolter, R. (2013). Interspecies interactions stimulate diversification of the *Streptomyces coelicolor* secreted metabolome. *mBio*, 4(4), e00459-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00459-13>
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L.-T., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016). W-IQ-TREE: A fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W232-W235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>
- Tunca, S., Barreiro, C., Coque, J. R., & Martín, J. F. (2009). Two overlapping antiparallel genes encoding the iron regulator DmdR1 and the Adm proteins control siderophore and antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *The FEBS Journal*, 276(17), 4814-4827. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07182.x>
- Tunca, S., Barreiro, C., Sola-Landa, A., Coque, J. J. R., & Martín, J. F. (2007). Transcriptional regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* is mediated by binding of DmdR1 to an iron box in the promoter of the *desA* gene. *The FEBS Journal*, 274(4), 1110-1122. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05662.x>
- Ulanova, D., Kitani, S., Fukusaki, E., & Nihira, T. (2013). SdrA, a new DeoR family regulator involved in *Streptomyces avermitilis* morphological development and antibiotic production. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7916-7921. <https://doi.org/10.1128/AEM.02843-13>
- Urem, M., Świątek-Połatyńska, M. A., Rigali, S., & van Wezel, G. P. (2016). Intertwining nutrient-sensory networks and the control of antibiotic production in *Streptomyces*. *Molecular Microbiology*, 102(2), 183-195. <https://doi.org/10.1111/mmi.13464>
- Urem, M., van Rossum, T., Bucca, G., Moolenaar, G. F., Laing, E., Świątek-Połatyńska, M. A., Willemse, J., Tenconi, E., Rigali, S., Goosen, N., Smith, C. P., & van Wezel, G. P. (2016). OsdR of *Streptomyces coelicolor* and the dormancy regulator DevR of *Mycobacterium tuberculosis* control overlapping regulons. *mSystems*, 1(3), e00014-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00014-16>
- van Bergeijk, D. A., Terlouw, B. R., Medema, M. H., & van Wezel, G. P. (2020). Ecology and genomics of Actinobacteria: New concepts for natural product discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 546-558. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>

BIBLIOGRAFÍA

- van der Heul, H. U., Bilyk, B. L., McDowall, K. J., Seipke, R. F., & van Wezel, G. P. (2018). Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: New perspectives from the post-genomic era. *Natural Product Reports*, 35(6), 575-604. <https://doi.org/10.1039/C8NP00012C>
- Velayudhan, J., Castor, M., Richardson, A., Main-Hester, K. L., & Fang, F. C. (2007). The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: A unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. *Molecular Microbiology*, 63(5), 1495-1507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05600.x>
- Viens, P., Dubeau, M.-P., Kimura, A., Desaki, Y., Shinya, T., Shibuya, N., Saito, A., & Brzezinski, R. (2015). Uptake of chitosan-derived D-glucosamine oligosaccharides in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiology Letters*, 362(9). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv048>
- Virolle, M.-J. (2020). A challenging view: Antibiotics play a role in the regulation of the energetic metabolism of the producing bacteria. *Antibiotics*, 9(2), 83. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020083>
- Vladimirov, M., Zhang, R. X., Mak, S., Nodwell, J. R., & Davidson, A. R. (2023). A contractile injection system is required for developmentally regulated cell death in *Streptomyces coelicolor*. *Nature Communications*, 14(1), 1469. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37087-7>
- Wadach, P., Jakimowicz, D., & Gongerowska-Jac, M. (2025). Untangling the complexity of two-component signal transduction in bacteria. *Microorganisms*, 13(9), 2013. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13092013>
- Wang, C., Ge, H., Dong, H., Zhu, C., Li, Y., Zheng, J., & Cen, P. (2007). A novel pair of two-component signal transduction system *ecrE1/ecrE2* regulating antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Biologia*, 62(5), 511-516. <https://doi.org/10.2478/s11756-007-0101-9>
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D. D., Watrous, J., Kapono, C. A., Luzzatto-Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A. V., Meehan, M. J., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P. D., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., ... Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34(8), 828-837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- Wang, R., Mast, Y., Wang, J., Zhang, W., Zhao, G., Wohlleben, W., Lu, Y., & Jiang, W. (2013). Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 87(1), 30-48. <https://doi.org/10.1111/mmi.12080>

- Wang, S.-L., Fan, K.-Q., Yang, X., Lin, Z.-X., Xu, X.-P., & Yang, K.-Q. (2008). CabC, an EF-hand calcium-binding protein, is involved in Ca^{2+} -mediated regulation of spore germination and aerial hypha formation in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 4061-4068. <https://doi.org/10.1128/JB.01954-07>
- Wang, W., Shu, D., Chen, L., Jiang, W., & Lu, Y. (2009). Cross-talk between an orphan response regulator and a noncognate histidine kinase in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiology Letters*, 294(2), 150-156. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01563.x>
- Wedderhoff, I., Kursula, I., Groves, M. R., & Ortiz De Oru  Lucana, D. (2013). Iron binding at specific sites within the octameric HbpS protects Streptomycetes from iron-mediated oxidative stress. *PLoS ONE*, 8(8), e71579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071579>
- Williams, S. M., & Chatterji, D. (2023). Dps functions as a key player in bacterial iron homeostasis. *ACS Omega*, 8(38), 34299-34309. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03277>
- World Health Organization. (2024). *WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. World Health Organization.
- World Health Organization. (2025). *Global antibiotic resistance surveillance report 2025: WHO Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS)*. World Health Organization.
- Wu, C., Ichinose, K., Choi, Y. H., & 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(14), 1428-1434. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700107>
- Yag e, P., Rodríguez-García, A., López-García, M. T., Martín, J. F., Rioseras, B., Sánchez, J., & Manteca, A. (2013). Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: First compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PLoS ONE*, 8(3), e60665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060665>
- Yag e, P., Rodríguez-García, A., López-García, M. T., Rioseras, B., Martín, J. F., Sánchez, J., & Manteca, A. (2014). Transcriptomic analysis of liquid non-sporulating *Streptomyces coelicolor* cultures demonstrates the existence of a complex differentiation comparable to that occurring in solid sporulating cultures. *PLoS ONE*, 9(1), e86296. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086296>
- Yamanaka, K., Oikawa, H., Ogawa, H., Hosono, K., Shinmachi, F., Takano, H., Sakuda, S., Beppu, T., & Ueda, K. (2005). Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development

BIBLIOGRAFÍA

- of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology*, 151(9), 2899-2905.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.28139-0>
- Yang, D., Du, X., Yang, Z., Liang, Z., Guo, Z., & Liu, Y. (2014). Transcriptomics, proteomics, and metabolomics to reveal mechanisms underlying plant secondary metabolism. *Engineering in Life Sciences*, 14(5), 456-466. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300075>
- Yang, J., Pan, X., Xu, Y., Li, Y., Xu, N., Huang, Z., Ye, J., Gao, D., & Guo, M. (2020). *Agrobacterium tumefaciens* ferritins play an important role in full virulence through regulating iron homeostasis and oxidative stress survival. *Molecular Plant Pathology*, 21(9), 1167-1178.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12969>
- Yepes, A., Rico, S., Rodríguez-García, A., Santamaría, R. I., & Díaz, M. (2011). Novel two-component systems implied in antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS ONE*, 6(5), e19980.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019980>
- Yepes García, A. (2010). *Sistemas de dos componentes y regulación de la producción de antibióticos en Streptomyces coelicolor* [Tesis doctoral, Universidad de Salamanca].
<https://aplicaciones.ciencia.gob.es/teseo/#/tesis/O294033/detalle>
- Yoshizumi, T., Shibui, Y., Kogo, M., Honma, S., Ito, S., Yajima, S., & Sasaki, Y. (2023). Mycothiol maintains the homeostasis and signalling of nitric oxide in *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145. *BMC Microbiology*, 23(1), 285. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03036-z>
- Zacharia, V. M., Ra, Y., Sue, C., Alcala, E., Reaso, J. N., Ruzin, S. E., & Traxler, M. F. (2021). Genetic network architecture and environmental cues drive spatial organization of phenotypic division of labor in *Streptomyces coelicolor*. *mBio*, 12(3), e00794-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.00794-21>
- Zhang, L., Nguyen, H. C., Chipot, L., Piotrowski, E., Bertrand, C., Thibessard, A., & Leblond, P. (2014). The *adnAB* locus, encoding a putative helicase-nuclease activity, is essential in *Streptomyces*. *Journal of Bacteriology*, 196(14), 2701-2708. <https://doi.org/10.1128/JB.01513-14>
- Zhang, P., Wu, L., Zhu, Y., Liu, M., Wang, Y., Cao, G., Chen, X.-L., Tao, M., & Pang, X. (2017). Deletion of MtrA inhibits cellular development of *Streptomyces coelicolor* and alters expression of developmental regulatory genes. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2013. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02013>
- Zhang, Y., Wang, L., Zhang, S., Yang, H., & Tan, H. (2008). *hmgA*, transcriptionally activated by HpdA, influences the biosynthesis of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiology Letters*, 280(2), 219-225. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01070.x>

- Zheng, C., & Dos Santos, P. C. (2018). Metallocluster transactions: Dynamic protein interactions guide the biosynthesis of Fe–S clusters in bacteria. *Biochemical Society Transactions*, 46(6), 1593-1603. <https://doi.org/10.1042/BST20180365>
- Zheng, G., Liu, P., He, W., Tao, H., Yang, Z., Sun, C., Wang, W., Lu, Y., & Jiang, W. (2021). Identification of the cognate response regulator of the orphan histidine kinase OhkA involved in both secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(14-15), 5905-5914. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11442-4>
- Zhu, Y., Zhang, P., Lu, T., Wang, X., Li, A., Lu, Y., Tao, M., & Pang, X. (2021). Impact of MtrA on phosphate metabolism genes and the response to altered phosphate conditions in *Streptomyces*. *Environmental Microbiology*, 23(11), 6907-6923. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15719>
- Zhu, Y., Zhang, P., Zhang, J., Wang, J., Lu, Y., & Pang, X. (2020). Impact on multiple antibiotic pathways reveals MtrA as a master regulator of antibiotic production in *Streptomyces* spp. and potentially in other Actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(20), e01201-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01201-20>
- Zhu, Y., Zhang, P., Zhang, J., Xu, W., Wang, X., Wu, L., Sheng, D., Ma, W., Cao, G., Chen, X., Lu, Y., Zhang, Y., & Pang, X. (2019). The developmental regulator MtrA binds GlnR boxes and represses nitrogen metabolism genes in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 112(1), 29-46. <https://doi.org/10.1111/mmi.14252>



ANEXOS

“El futuro no te lo dan, es algo que tienes que tomar por ti mismo”.

- Pod 042 (del videojuego *NieR: Automata*) (2017).

Tabla A.1. Vectores utilizados y construidos en esta tesis doctoral.

VECTOR	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pCB-1	Vector bifuncional <i>E. coli</i> – <i>Streptomyces</i> . Contiene el gen <i>cymR</i> bajo el promotor <i>sp11</i> , el gen de la integrasa <i>tg1</i> y el gen <i>dCas9</i> (Cas9 sin actividad catalítica) bajo el promotor <i>sp30</i> y precedido por la región operadora <i>cuO</i> . El casete del sgRNA, también bajo el promotor <i>sp30</i> y con una región operadora <i>cuO</i> , está precedido por el gen <i>rfp</i> . Resistencia a higromicina.	(Bai & van Wezel, 2023)
pCB-2215	Derivado de pCB-1. Contiene un espaciador específico para el gen <i>SCO2215</i> para inhibir su expresión.	Este trabajo
pCB-bfd	Derivado de pCB-1. Contiene un espaciador específico para el gen <i>bfd/SCO2114</i> para inhibir su expresión.	Este trabajo
pCRISPR-Cas9	Vector termosensible y bifuncional <i>E. coli</i> – <i>Streptomyces</i> . Contiene el gen <i>cas9</i> de <i>Streptococcus pyogenes</i> bajo el promotor <i>tipAp</i> , y el casete sgRNA bajo el promotor <i>ermEp</i> . Posee una región con un transposón (IS1) para la clonación de los moldes de delección. Resistencia a apramicina.	(Tong et al., 2015)
pCRISPR-Cas9-sg2215	Derivado de pCRISPR-Cas9. Posee un sgRNA específico para el gen <i>SCO2215</i> .	(Sampedro Cabezos, 2024)
pCRISPR-Cas9-2215 completo	Derivado de pCRISPR-Cas9-sg2215. Contiene el molde de delección (regiones adyacentes a <i>SCO2215</i>) para reparar el corte producido por la Cas9 en <i>SCO2215</i> mediante recombinación homóloga y deleccionar dicho gen.	(Sampedro Cabezos, 2024)
pCRISPR-Cas9-sg2216	Derivado de pCRISPR-Cas9. Posee un sgRNA específico para el gen <i>SCO2216</i> .	Este trabajo
pCRISPR-Cas9-2216 completo	Derivado de pCRISPR-Cas9-sg2216. Contiene un molde de delección (regiones adyacentes a <i>SCO2216</i>) para reparar el corte producido por la Cas9 en <i>SCO2216</i> mediante recombinación homóloga y deleccionar dicho gen.	Este trabajo
pCRISPR-Cas9-2215/2216 completo	Derivado de pCRISPR-Cas9-sg2215. Contiene un molde de delección (regiones adyacentes a <i>SCO2215</i> y <i>SCO2216</i>) para reparar el corte producido por la Cas9 en <i>SCO2215</i> mediante recombinación homóloga y deleccionar los genes <i>SCO2215</i> y <i>SCO2216</i> .	(Sampedro Cabezos, 2024)
pCRISPR-Cas9-sg2359	Derivado de pCRISPR-Cas9. Posee un sgRNA específico para el gen <i>SCO2359</i> .	(Sampedro Cabezos, 2024)
pCRISPR-Cas9-2359 completo	Derivado de pCRISPR-Cas9-sg2359. Contiene el molde de delección (regiones adyacentes a <i>SCO2359</i>) para reparar el corte producido por la Cas9 en <i>SCO2359</i> mediante recombinación homóloga y deleccionar dicho gen.	(Sampedro Cabezos, 2024)
pCRISPR-Cas9-sg2358	Derivado de pCRISPR-Cas9. Posee un sgRNA específico para el gen <i>SCO2358</i> .	Este trabajo
pCRISPR-Cas9-2358 completo	Derivado de pCRISPR-Cas9-sg2358. Contiene un molde de delección (regiones adyacentes a <i>SCO2358</i>) para reparar el corte producido por la Cas9 en <i>SCO2358</i> mediante recombinación homóloga y deleccionar dicho gen.	Este trabajo
pCRISPR-Cas9-2359/2358 completo	Derivado de pCRISPR-Cas9-sg2359. Contiene un molde de delección (regiones adyacentes a <i>SCO2359</i> y <i>SCO2358</i>) para reparar el corte producido por la Cas9 en <i>SCO2359</i> mediante recombinación homóloga y deleccionar los genes <i>SCO2359</i> y <i>SCO2358</i> .	(Sampedro Cabezos, 2024)
pCRISPR-Cas9-sg3750	Derivado de pCRISPR-Cas9. Posee un sgRNA específico para el gen <i>SCO3750</i> .	Este trabajo

VECTOR	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pCRISPR-Cas9-3750 completo	Derivado de pCRISPR-Cas9-sg3750. Contiene el molde de delección (regiones adyacentes a <i>SCO3750</i>) para reparar el corte producido por la Cas9 en <i>SCO3750</i> mediante recombinación homóloga y delecionar dicho gen.	Este trabajo
pCRISPR-Cas9-sg6424	Derivado de pCRISPR-Cas9. Posee un sgRNA específico para el gen <i>SCO6424</i> .	Este trabajo
pCRISPR-Cas9-6424 completo	Derivado de pCRISPR-Cas9-sg6424. Contiene el molde de delección (regiones adyacentes a <i>SCO6424</i>) para reparar el corte producido por la Cas9 en <i>SCO6424</i> mediante recombinación homóloga y delecionar dicho gen.	Este trabajo
pET22b[+]	Vector de <i>E. coli</i> para producción de proteínas recombinantes. Contiene el promotor T7 con el sistema de inducción <i>lacO-lacI</i> , una secuencia señal <i>pelB</i> y una secuencia 6xHis. Bajo número de copias. Resistencia a ampicilina.	Ref.: 69744; <i>Novagen</i>
pET-Aor1	Derivado de pET22b[+]. Contiene el gen <i>aor1/SCO2281</i> marcado con 6xHis en Ct bajo el promotor T7 con el sistema de inducción <i>lacO-lacI</i> .	(Yepes García, 2010)
pET-3750E	Derivado de pET22b[+]. Contiene el gen <i>SCO3750</i> entero marcado con 6xHis en Ct bajo el promotor T7 con el sistema de inducción <i>lacO-lacI</i> .	Este trabajo
pET-c3750	Derivado de pET22b[+]. Contiene el gen <i>SCO3750</i> truncado (solo la parte citoplasmática de la proteína) marcado con 6xHis en Ct bajo el promotor T7 con el sistema de inducción <i>lacO-lacI</i> .	Este trabajo
pKC796	Vector bifuncional <i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> para complementar mutantes de delección. Contiene la integrasa del fago ϕ C31. Resistencia a apramicina.	(Kuhstoss et al., 1991)
pKC-2359	Derivado de pKC796. Contiene el gen <i>SCO2359</i> bajo su propio promotor.	Este trabajo
pKC-2359/58	Derivado de pKC796. Contiene los genes <i>SCO2359</i> y <i>SCO2358</i> bajo su propio promotor.	Este trabajo
pKC-3750	Derivado de pKC796. Contiene el gen <i>SCO370</i> bajo su propio promotor.	Este trabajo
pKC-Bfr	Derivado de pKC796. Contiene el gen <i>bfr/SCO2113</i> bajo su propio promotor.	(García Abad, 2019; García-Martín et al., 2024)
pKNT25	Vector del ensayo BACTH. Contiene el gen del fragmento T25 de la AC bajo el promotor <i>lac</i> . El gen está precedido por un sitio de clonación (se genera una proteína de fusión con el Nt del fragmento T25). Bajo número de copias. Resistencia a kanamicina.	Ref: EUK001; Euromedex
pKNT25-abrA1	Derivado de pKNT25. Contiene el gen <i>abrA1/SCO1744</i> en fase con el fragmento T25.	Este trabajo
pKNT25-abrA2	Derivado de pKNT25. Contiene el gen <i>abrA2/SCO1745</i> en fase con el fragmento T25.	Este trabajo
pKNT25-aor1	Derivado de pKNT25. Contiene el gen <i>aor1/SCO2281</i> en fase con el fragmento T25.	Este trabajo
pKNT25-2215	Derivado de pKNT25. Contiene el gen <i>SCO2215</i> en fase con el fragmento T25.	Este trabajo
pKNT25-2359	Derivado de pKNT25. Contiene el gen <i>SCO2359</i> en fase con el fragmento T25.	Este trabajo
pKNT25-3750	Derivado de pKNT25. Contiene el gen <i>SCO3750</i> en fase con el fragmento T25.	Este trabajo

VECTOR	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pKT25	Vector del ensayo BACTH. Contiene el gen del fragmento T25 de la AC bajo el promotor <i>lac</i> . El gen está antes de un sitio de clonación (se genera una proteína de fusión con el Ct del fragmento T25). Bajo número de copias. Resistencia a kanamicina.	Ref: EUK001; Euromedex
pKT25-abrA1	Derivado de pKT25. Contiene el gen <i>abrA1/SCO1744</i> en fase con el fragmento T25.	Este trabajo
pKT25-abrA2	Derivado de pKT25. Contiene el gen <i>abrA2/SCO1745</i> en fase con el fragmento T25.	Este trabajo
pKT25-aor1	Derivado de pKT25. Contiene el gen <i>aor1/SCO2281</i> en fase con el fragmento T25.	Este trabajo
pKT25-2215	Derivado de pKT25. Contiene el gen <i>SCO2215</i> en fase con el fragmento T25.	Este trabajo
pKT25-2359	Derivado de pKT25. Contiene el gen <i>SCO2359</i> en fase con el fragmento T25.	Este trabajo
pKT25-3750	Derivado de pKT25. Contiene el gen <i>SCO3750</i> en fase con el fragmento T25.	Este trabajo
pKT25-zip	Derivado de pKT25. Contiene la cremallera de leucina de GCN4 en fase con el fragmento T25.	Ref: EUK001; Euromedex
pN702GEM3	Vector bifuncional <i>E. coli-Streptomyces</i> de alto número de copias. Resistencia a kanamicina/neomicina.	(Fernández-Abalos et al., 2003)
pN3750	Derivado de pN702GEM3. Contiene el gen <i>SCO3750</i> bajo su propio promotor.	Este trabajo
pNAor1	Derivado de pN702GEM3. Contiene el gen <i>aor1/SCO2281</i> bajo su propio promotor.	(Rico García, 2014)
pNBfr	Derivado de pN702GEM3. Contiene el gen <i>bfr/SCO2113</i> bajo su propio promotor.	(García Abad, 2019; García-Martín et al., 2024)
pUT18	Vector del ensayo BACTH. Contiene el gen del fragmento T18 de la AC bajo el promotor <i>lac</i> . El gen está precedido por un sitio de clonación (se genera una proteína de fusión con el Nt del fragmento T18). Alto número de copias. Resistencia a ampicilina.	Ref: EUK001; Euromedex
pUT18-abrA1	Derivado de pUT18. Contiene el gen <i>abrA1/SCO1744</i> en fase con el fragmento T18.	Este trabajo
pUT18-abrA2	Derivado de pUT18. Contiene el gen <i>abrA2/SCO1745</i> en fase con el fragmento T18.	Este trabajo
pUT18-aor1	Derivado de pUT18. Contiene el gen <i>aor1/SCO2281</i> en fase con el fragmento T18.	Este trabajo
pUT18-2215	Derivado de pUT18. Contiene el gen <i>SCO2215</i> en fase con el fragmento T18.	Este trabajo
pUT18-2359	Derivado de pUT18. Contiene el gen <i>SCO2359</i> en fase con el fragmento T18.	Este trabajo
pUT18-3750	Derivado de pUT18. Contiene el gen <i>SCO3750</i> en fase con el fragmento T18.	Este trabajo
pUT18C	Vector del ensayo BACTH. Contiene el gen del fragmento T18 de la AC bajo el promotor <i>lac</i> . El gen está antes de un sitio de clonación (se genera una proteína de fusión con el Ct del fragmento T18). Alto número de copias. Resistencia a ampicilina.	Ref: EUK001; Euromedex
pUT18C-abrA1	Derivado de pUT18C. Contiene el gen <i>abrA1/SCO1744</i> en fase con el fragmento T18.	Este trabajo
pUT18C-abrA2	Derivado de pUT18C. Contiene el gen <i>abrA2/SCO1745</i> en fase con el fragmento T18.	Este trabajo
pUT18C-aor1	Derivado de pUT18C. Contiene el gen <i>aor1/SCO2281</i> en fase con el fragmento T18.	Este trabajo
pUT18C-2215	Derivado de pUT18C. Contiene el gen <i>SCO2215</i> en fase con el fragmento T18.	Este trabajo

VECTOR	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pUT18C-2359	Derivado de pUT18C. Contiene el gen <i>SCO2359</i> en fase con el fragmento T18.	Este trabajo
pUT18C-3750	Derivado de pUT18C. Contiene el gen <i>SCO3750</i> en fase con el fragmento T18.	Este trabajo
pUT18C-zip	Derivado de pUT18C. Contiene la cremallera de leucina de GCN4 en fase con el fragmento T18.	Ref: EUK001; Euromedex
pUZ8002	Vector dentro de <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002 para conjugación <i>E. coli</i> – <i>Streptomyces</i> (operón <i>tra</i>). Resistencia a kanamicina.	(Larcombe et al., 2024; Paget et al., 1999)

Tabla A.2. Oligonucleótidos empleados en esta tesis doctoral. Los sitios de restricción están subrayados.

NOMBRE	SECUENCIA	USO Y DESCRIPCIÓN
JGM21	CATGCCATGGCGTGCAGGGACCGT TCGATCGTTTTAGAGCTAGAAATAG C	Construcción del sgRNA dirigido a <i>SCO3750</i> (secuencia específica de <i>SCO3750</i> en negrita). Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción NcoI.
JGM22	CGTGCAGGGACCGTTCGATCCGG	Comprobación por PCR de la ligación del sgRNA de <i>SCO3750</i> en el vector. Posee la secuencia del sgRNA de <i>SCO3750</i> .
JGM29	CACCCTGGGTTTCCTGCTGGGCCTG	Secuenciación. Hibrida en <i>SCO3750</i> .
JGM30	CGAAGCCCGGACGCCGTACGTCGGC	Secuenciación del molde de delección de <i>SCO3750</i> . Hibrida en <i>SCO3749</i> .
JGM31	CATGCCATGGAGCGAGATTCTCCA GAACAGGTTTTAGAGCTAGAAATA GC	Construcción del sgRNA dirigido a <i>SCO6424</i> (secuencia específica de <i>SCO6424</i> en negrita). Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción NcoI.
JGM32	AGCGAGATTCTCCAGAACAG	Comprobación por PCR de la ligación del sgRNA de <i>SCO6424</i> en el vector. Posee la secuencia del sgRNA de <i>SCO6424</i> .
JGM33	TTTTAGGCCTAGCCTTCTCGACAGC GGTTGTAGCGATCG	Amplificación del brazo <i>upstream</i> del molde de delección de <i>SCO6424</i> y comprobación externa de la delección de <i>SCO6424</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción StuI.
JGM34	CCCCGTCCGGGCGGTCACGCGGGCG TCCATCGGTTTCGCAC	Amplificación del brazo <i>upstream</i> del molde de delección de <i>SCO6424</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con 20 nt solapantes con el brazo <i>downstream</i> .
JGM35	TTTTTCTAGACGCAGCGGGTCCACC CGCTTCTTC	Amplificación del brazo <i>downstream</i> del molde de delección de <i>SCO6424</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción XbaI.
JGM36	GTGCGAACCGATGGACGCCGCGTG ACCGCCCGGACGGGG	Amplificación del brazo <i>downstream</i> del molde de delección de <i>SCO6424</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con 20 nt solapantes con el brazo <i>upstream</i> .
JGM37	AGTCCGTGGCGTGCGCCAGCGCG	Secuenciación del molde de delección de <i>SCO6424</i> y comprobación externa de la delección de <i>SCO6424</i> . Hibrida en <i>SCO6423</i> .
JGM38	TTTTTCTAGAACCTCCGCGTACGCCT TGATCACGAACG	Amplificación de <i>SCO6424</i> y su promotor para comprobación interna de la delección de <i>SCO6424</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción XbaI.
JGM39	TTTTAGATCTCGGCGACAACAGCGC GCCCCGACCG	Amplificación de <i>SCO6424</i> y su promotor para comprobación interna de la delección de <i>SCO6424</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción BglII.
JGM40	CGAAGATGCGTCTGTGCTATCCGTAA GGCAGTG	Secuenciación en pKC796. Hibrida antes del sitio de restricción KpnI.
JGM48	TTTTAGGCCTCGCAGGGCGAGGTGC AGCATGCCTAC	Amplificación del brazo <i>upstream</i> del molde de delección de <i>SCO3750</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción StuI.

NOMBRE	SECUENCIA	USO Y DESCRIPCIÓN
JGM50	GGGAGTCCAGTCCGGCCGCGC	Secuenciación del molde de delección de <i>SCO3750</i> . Hibrida en <i>SCO3752</i> .
JGM51	CGGAGACCAGGAAGAGCCGGCCCCG	Secuenciación del molde de delección de <i>SCO3750</i> . Hibrida en <i>SCO3749</i> .
JGM52	TTTTTCTAGATGGCGACCGGCTGGT GAATACACGC	Amplificación del brazo <i>downstream</i> del molde de delección de <i>SCO3750</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción XbaI.
JGM53	CTCCCGGCCCGGCCCGTCCCGG TGGGCCGTCTGCCTCCCTCCGGGCC GTACGCAC	Amplificación del brazo <i>upstream</i> del molde de delección de <i>SCO3750</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con 29 nt solapantes con el brazo <i>downstream</i> .
JGM54	GTGCGTACGGCCCGGAGGGAGGCA GACGGCCACCGGGACGGGGCCGG GGGCCGGGAG	Amplificación del brazo <i>downstream</i> del molde de delección de <i>SCO3750</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con 29 nt solapantes con el brazo <i>upstream</i> .
JGM55	ACAACGCTGCGGCGAAGATGCGTCG TG	Secuenciación en pKC796. Hibrida antes de los sitios de restricción BglII, KpnI y DraI.
JGM58	GGGTAGGTCCGGGCGACCCGGTCCA GC	Comprobación externa por PCR de la delección de <i>SCO3750</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> que hibrida en <i>SCO3752</i> .
JGM59	CCTGGAGGCGGCGGGCGAGGTTCCA G	Comprobación externa por PCR de la delección de <i>SCO3750</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> que hibrida en <i>SCO3749</i> .
JGM62	TTTTTCTAGAACAGCAGCGCGCGCA CGACGTCCCC	Amplificación de <i>SCO3750</i> y su promotor y comprobación interna por PCR de la delección de <i>SCO3750</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción XbaI.
JGM63	TTTTAGATCTCCCGGTGTCGTCGATC GCCGGGAGCG	Amplificación de <i>SCO3750</i> y su promotor y comprobación interna por PCR de la delección de <i>SCO3750</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción BglII.
JGM66	TTTTCATATGACGGTCCCGGTCGCG TCCGTG	Amplificación de <i>SCO3750</i> sin su promotor y sin su primer codón de metionina, que aporta el sitio NdeI. Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción NdeI.
JGM67	TTTTCTCGAGCCCGCCGAGGGCAG GTCCACG	Amplificación de <i>SCO3750</i> sin su codón de parada. Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción XhoI.
JGM68	TTTTCATATGCCGGGCATGGCACGG CTCCAGG	Amplificación de la parte citoplásmica de <i>SCO3750</i> (c <i>SCO3750</i>). Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción NdeI.
JGM69	TTTTTTCTAGAGATGACGGTCCCGG TCGCGTCCG	Amplificación de <i>SCO3750</i> para BACTH. Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción XbaI.
JGM70	TTTTTCGGTACCCGCCGCCGCAGG GCAGGTCCACG	Amplificación de <i>SCO3750</i> para BACTH. Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción KpnI.
JGM71	TTTTTCTGCAGGATGGAACGTGACG TGCGGCCCGCCCTG	Amplificación de <i>aor1</i> para los vectores pKNT25, pUT18 y pUT18C. Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción PstI.

ANEXOS

NOMBRE	SECUENCIA	USO Y DESCRIPCIÓN
JGM71-pKT	TTTTTCTGCAGGGATGGAACGTGAC GTGCGGCCCGCCCTG	Amplificación de <i>aor1</i> para el vector pKT25. Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción PstI.
JGM72	TTTTTGGATCCTCGAGGTGGCGTGG CGCCCGCGCG	Amplificación de <i>aor1</i> para BACTH. Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción BamHI.
JGM73	TTTTTCTCTAGAGATGAACGACCTCT TCGGGCGGGCC	Amplificación de <i>abrA1</i> para BACTH. Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción XbaI.
JGM74	TTTTTGGTACCCGTGCCCGTCCCCG GCGTCCTCG	Amplificación de <i>abrA1</i> para BACTH. Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción KpnI.
JGM75	TTTTTCTCTAGAGATGACCATCCGCCT GCTGATCGTCGACG	Amplificación de <i>abrA2</i> para BACTH. Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción XbaI.
JGM76	TTTTTGGTACCCGGCCCGTGCCGCC GGGGAGG	Amplificación de <i>abrA2</i> para BACTH. Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción KpnI.
JGM77	GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGA ATTGTGAG	Secuenciación en pKNT25 y pUT18. Hibrida antes del sitio de clonación.
JGM78	GGGATGCCAGACTCCCGGTGCGCGG CG	Secuenciación en pKNT25. Hibrida después del sitio de clonación, en la zona Nt del fragmento T25.
JGM79	CGACTCGGCGCGCAGTTCGGTGACC AGCG	Secuenciación en pKT25. Hibrida antes del sitio de clonación, en la zona Ct del fragmento T25.
JGM80	TGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGG TAACGCCAG	Secuenciación en pKT25. Hibrida después del sitio de clonación, después del fragmento T25.
JGM81	GGCGCGAGCGATTTTCCACAACAAG TCGATGCG	Secuenciación en pUT18. Hibrida después del sitio de clonación, en la zona Nt del fragmento T18.
JGM82	CGGATGTACTGGAACGGTGCCGGC GTCAC	Secuenciación en pUT18C. Hibrida antes del sitio de clonación, en la zona Ct del fragmento T18.
JGM83	GGGTGTCGGGGCTGGCTTAACATG CGGC	Secuenciación en pUT18C. Hibrida después del sitio de clonación, tras el fragmento T18.
JGM84	TTTTTCTGCAGGATGAGCATCGAGA CGCAGAGCAGC	Amplificación de <i>SCO2215</i> para los vectores pKNT25, pUT18 y pUT18C. Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción PstI.
JGM84-pKT	TTTTTCTGCAGGGATGAGCATCGAG ACGCAGAGCAGC	Amplificación de <i>SCO2215</i> para el vector pKT25. Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción PstI.
JGM85	TTTTTCTAGAGTGGACAACACGCA AGGGATCTCCATGG	Amplificación de <i>SCO2215</i> para BACTH. Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción XbaI.
JGM86	TTTTTCTGCAGGGTGCGGTGCGGGG CGGGCCTC	Amplificación de <i>SCO2359</i> para los vectores pKNT25, pUT18 y pUT18C. Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción PstI.
JGM86-pKT	TTTTTCTGCAGGGTGCGGTGCGGG GCGGGCCTC	Amplificación de <i>SCO2359</i> para el vector pKT25. Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción PstI.

NOMBRE	SECUENCIA	USO Y DESCRIPCIÓN
JGM87	TTTTT <u>CTAGAG</u> TCCCGCATGGCAG CTCCGCGGCCAC	Amplificación de <i>SCO2215</i> para BACTH. Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción XbaI.
JGM94	TTTTT <u>CTAGAG</u> TGCCGTACTGCGCC CGGTC	Amplificación del brazo <i>upstream</i> del molde de delección de <i>SCO2358</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción XbaI.
JGM95	CGGGTCCCCCTCGGCTCCCGTCACC CGCATGGCAGCTCCG	Amplificación del brazo <i>upstream</i> del molde de delección de <i>SCO2358</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con 20 nt solapantes con el brazo <i>downstream</i> .
JGM96	CGGAGCTGCCATGCGGGTGACGGG AGCCGAGGGGGACCCG	Amplificación del brazo <i>downstream</i> del molde de delección de <i>SCO2358</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con 20 nt solapantes con el brazo <i>upstream</i> .
JGM97	TTTTT <u>CTAGAT</u> TCCCGCGGGCGTACC GG	Amplificación del brazo <i>upstream</i> del molde de delección de <i>SCO2216</i> y comprobación externa de la delección de este gen. Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción XbaI.
JGM98	GGGGCCCCCGGGACGCGTCACAGG GCTAGGACAACACGCAAGGGATCTC C	Amplificación del brazo <i>upstream</i> del molde de delección de <i>SCO2216</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con 25 nt solapantes con el brazo <i>downstream</i> .
JGM99	GGAGATCCCTTGCGTGTTGTCCTAG CCCTGTGACGCGTCCCGGGGGCCCC	Amplificación del brazo <i>downstream</i> del molde de delección de <i>SCO2216</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con 25 nt solapantes con el brazo <i>upstream</i> .
JGM100	CATGCCATGGT <u>GCTGGGAGAGGAC</u> CAGCACG TTTTAGAGCTAGAAATA GC	Construcción del sgRNA dirigido a <i>SCO2216</i> (secuencia específica de <i>SCO2216</i> en negrita). Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción NcoI.
JGM101	TGCTGGGAGAGGACCAGCAC	Comprobación por PCR de la ligación del sgRNA de <i>SCO2216</i> en el vector. Posee la secuencia del sgRNA de <i>SCO2216</i> .
JGM102	CATGCCATGGT <u>TCTCGCAGTACGTC</u> GAGAAGG TTTTAGAGCTAGAAATA GC	Construcción del sgRNA dirigido a <i>SCO2358</i> (secuencia específica de <i>SCO2358</i> en negrita). Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción NcoI.
JGM103	TCTCGCAGTACGTCGAGAAG	Comprobación por PCR de la ligación del sgRNA de <i>SCO2358</i> en el vector. Posee la secuencia del sgRNA de <i>SCO2358</i> .
JGM106	GGTCGGCCTGGACCCGGAGACGGA GGCGAAGG	Comprobación por PCR de la delección del sistema <i>SCO2215/2216</i> . Hibrida en <i>SCO2214</i> .
JGM107	GGGCATCGCTTGCGGGGCATCGAGG GCGCCCG	Comprobación por PCR de la delección del sistema <i>SCO2215/2216</i> . Hibrida después de <i>SCO2216</i> .
JGM109	TTTTT <u>CTAGAT</u> GTACGTGAGCGTGC GGGACGACGG	Amplificación de <i>SCO2358</i> y su promotor para comprobación de la delección de este gen. Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción XbaI.
LGA001	TTTTTTGGATCCGCCTCCATCCTGAC AGACCCGGACCG	Amplificación de <i>bfr</i> y su promotor. Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción BamHI.

ANEXOS

NOMBRE	SECUENCIA	USO Y DESCRIPCIÓN
LGA002	TTTTTTGGATCCCTAGAGGGAGCCC GGTCCCGACGGG	Amplificación de <i>bfr</i> y su promotor. Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción BamHI.
LGA015	GCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATT AATGTGAGT	Secuenciación en pKC796.
ESC01	CATGCCATGGCACACCGAATATTC CCTGCAGTTTTAGAGCTAGAAATAG C	Construcción del sgRNA dirigido a <i>SCO2359</i> (secuencia específica de <i>SCO2359</i> en negrita). Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción NcoI.
ESC02	CACACCGAATATTCCTGCAG	Comprobación por PCR de la ligación del sgRNA de <i>SCO2359</i> en el vector. Posee la secuencia del sgRNA de <i>SCO2359</i> .
ESC03	TTTTAGGCCTGGAAGCGGTCCGGCA GACGG	Amplificación del brazo <i>downstream</i> del molde de delección de <i>SCO2359</i> y comprobación externa de la delección de <i>SCO2358</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción StuI.
ESC04	TTTTTCTAGA ^A ACTGGCCGACTCCGG ATGGAC	Amplificación del brazo <i>upstream</i> del molde de delección de <i>SCO2359</i> y de <i>SCO2359/2358</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción XbaI.
ESC05	TCCTCGGCGAGGATCACCCGCTACA CGTCGCGCCATGACTCGCATGATCG	Amplificación del brazo <i>upstream</i> del molde de delección de <i>SCO2359</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con 20 nt solapantes con el brazo <i>downstream</i> .
ESC06	AGTCATGGCGCGACGTGTAGCGGGT GATCCTCGCCGAGG	Amplificación del brazo <i>downstream</i> del molde de delección de <i>SCO2359</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con 20 nt solapantes con el brazo <i>upstream</i> .
ESC07	TTTTTCTAGATGATCGATTGCGGTGT ACCGC	Amplificación de <i>SCO2359</i> y su promotor y comprobación interna de la delección de <i>SCO2359</i> y <i>SCO2359/2358</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción XbaI.
ESC08	TTTTAGATCTTCACCCGCATGGCAG CTCC	Amplificación de <i>SCO2359</i> y su promotor y comprobación interna de la delección de <i>SCO2359</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción BglII.
ESC09	GCCACCGTGCGGTCCCGGCCG	Secuenciación del molde de delección de <i>SCO2359</i> y PCR de comprobación externa de la delección de este gen. Hibrida en el brazo <i>upstream</i> .
ESC10	CGGTCAGTCGGGCGAGCAGGTCGG	Secuenciación del molde de delección de <i>SCO2359</i> y PCR de comprobación externa de la delección de este gen. Hibrida en el brazo <i>downstream</i> .
ESC11	CATGCCATGGGCCCGAGGACGCCA ATCCGTGTTTTAGAGCTAGAAATAG C	Construcción del sgRNA dirigido a <i>SCO2215</i> (secuencia específica de <i>SCO2215</i> en negrita). Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción NcoI.
ESC12	GCCCGAGGACGCCAATCCGT	Comprobación por PCR de la ligación del sgRNA de <i>SCO2215</i> en el vector. Posee la secuencia del sgRNA de <i>SCO2215</i> .

NOMBRE	SECUENCIA	USO Y DESCRIPCIÓN
ESC13	TTTTTCTAGACTGCACCGCGGACGG CAC	Amplificación del brazo <i>upstream</i> del molde de delección de <i>SCO2215</i> y <i>SCO2215/16</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con sitio de restricción <i>XbaI</i> .
ESC14	TTTTAGGCCTGGGCAGTCGATCGTC GCGAC	Amplificación del brazo <i>downstream</i> del molde de delección de <i>SCO2215</i> y comprobación externa de la delección de <i>SCO2216</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción <i>StuI</i> .
ESC15	GGCTAGGACAACACGCAAGGGGCG TCAGTCTCGCCGAGGC	Amplificación del brazo <i>upstream</i> del molde de delección de <i>SCO2215</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con 20 nt solapantes con el brazo <i>downstream</i> .
ESC16	ATAGGATCCATGGAACGTGACGTGC GGCCCGCCCTGCG	Amplificación del brazo <i>downstream</i> del molde de delección de <i>SCO2215</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con 20 nt solapantes con el brazo <i>upstream</i> .
ESC21	TTTTTAGGCCTCGGCTGAACCAGGG CGCG	Amplificación del brazo <i>downstream</i> del molde de delección de <i>SCO2358</i> y <i>SCO2359/2358</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción <i>StuI</i> .
ESC22	ATAGAATTCGCAGGCGTCCAGCGCC AATTTGC	Amplificación del brazo <i>upstream</i> del molde de delección de <i>SCO2359/2358</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con 20 nt solapantes con el brazo <i>downstream</i> .
ESC23	AATGGATCCCGCTCCTCGCTCCTCTC AGTC	Amplificación del brazo <i>downstream</i> del molde de delección de <i>SCO2359/2358</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con 20 nt solapantes con el brazo <i>upstream</i> .
ESC24	TTTTTAGGCCTCTGGCACGAGGTGT CCGCGT	Amplificación del brazo <i>downstream</i> del molde de delección de <i>SCO2216</i> y <i>SCO2215/2216</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción <i>StuI</i> .
ESC25	GGGGCCCCGGGACGCGTCACAGG GGGCGTCAGTCTCGCCGAGGCGACG G	Amplificación del brazo <i>upstream</i> del molde de delección de <i>SCO2215/2216</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con 20 nt solapantes con el brazo <i>downstream</i> .
ESC26	CCGTCGCCTCGGCGAGACTGACGCC CCCTGTGACGCGTCCCGGGGGCCCC	Amplificación del brazo <i>downstream</i> del molde de delección de <i>SCO2215/2216</i> . Oligonucleótido <i>forward</i> con 20 nt solapantes con el brazo <i>upstream</i> .
ESC29	TTTTTAGATCTGCCGGGTCCCCCTCG G	Amplificación de <i>SCO2359/2358</i> con su promotor y comprobación interna de la delección de <i>SCO2359/2358</i> . Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción <i>BglII</i> .
SAM-051	ACGCCTACGTAAAAAAGCACCGA CTCGGTGCC	Construcción de los sgRNA en pCRISPR-Cas9. Oligonucleótido <i>reverse</i> con sitio de restricción <i>SnaBI</i> .
SAM-056	TCCACACGTGGCACCGCGAT	Secuenciación en pCRISPR-Cas9. Hibrida antes de la secuencia del sgRNA.
SAM-057	AGAGCATCACCGGCCTGTAC	Secuenciación en pCRISPR-Cas9. Hibrida antes del sitio de restricción <i>XbaI</i> .
RCD-057	GCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTC CTCGACGCGACCC	Comprobación por PCR de colonia de plásmidos pCRISPR-Cas9. Oligonucleótido <i>forward</i> .

ANEXOS

NOMBRE	SECUENCIA	USO Y DESCRIPCIÓN
RCD-058	GGCGGATGGCTGCCCTGACCGGCAA TCACCAACGC	Comprobación por PCR de colonia de plásmidos pCRISPR-Cas9. Oligonucleótido <i>reverse</i> .
JGM2215fw	GCCAGAGACGCAGAGCAGCACACA	Construcción del espaciador dirigido a <i>SCO2215</i> para su inhibición por CRISPRi. Oligonucleótido <i>forward</i> .
JGM2215rv	AAACTGTGTGCTGCTCTGCGTCTC	Construcción del espaciador dirigido a <i>SCO2215</i> para su inhibición por CRISPRi. Oligonucleótido <i>reverse</i> .
JGM2114fw	GCCAGTGTTTCGTCTGCAGCTGCTT	Construcción del espaciador dirigido a <i>bfd/SCO2114</i> para su inhibición por CRISPRi. Oligonucleótido <i>forward</i> .
JGM2114rv	AAACAAGCAGCTGCAGACGAACAC	Construcción del espaciador dirigido a <i>bfd/SCO2114</i> para su inhibición por CRISPRi. Oligonucleótido <i>reverse</i> .

ANEXOS

Tabla A.3. Comparación del metaboloma de *Δbfr* y M145. Compuestos detectados con significación estadística en la comparación de los metabolomas de la cepa silvestre M145 y el mutante *Δbfr*. Las abreviaciones usadas en el encabezado son las siguientes: “exp.” corresponde a “experimental”, “Int. HPLC” hace referencia a la intensidad del compuesto en el cromatograma y “Prob.” significa “probabilidad”. El color gris en “Int. HPLC” (indicador cualitativo de la mayor presencia de los compuestos en una cepa u otra) corresponde a la cepa silvestre, y el rojo, a *Δbfr*.

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
197.117 1782	3.5127 168		C ₁₁ H ₁₈ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Poliquétidos cíclicos	0.816	Germicidina A, Isogermicidina A	StreptomeDB, NPAtlas	196.109 9444	[M + H] ⁺	C ₁₁ H ₁₆ O ₃
211.132 6747	4.1951 804		C ₁₂ H ₂₀ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.998	Ácidos grasos	0.909	Ácido 10-hidroxicaprico, ácido 10-hidroxidodecanoico	KEGG	188.141 2445	[M + Na] ⁺	C ₁₀ H ₂₀ O ₃
						Poliquétidos	0.760	Ácido 9,12-dioxo-dodecanoico		228.136 16	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₂ H ₂₀ O ₄
								Ácido 3-hidroxicaprico	ChEBI	246.146 72	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₂ H ₂₂ O ₅
245.080 6791	3.1547 73		C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₇	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.638	Nucleósidos de pirimidina	1.000					
			C ₁₄ H ₁₄ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Shikimatos y fenilpropanoides	0.828					
						Fenoles	0.840					
261.159 7591	2.5199 332		C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.921	Dipéptidos	1.000	ciclo(L-leucil-L-phenilalanil)	KEGG, ChEBI	260.152 48	[M + H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂
								Phe-Leu/Ile	ChEBI	278.163 04	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₃
276.170 3239	2.9911 072		C ₁₅ H ₂₃ N ₃ O ₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.863	Ácidos carboxílicos y derivados	0.968	ciclo[(Z)-alfa,beta-didehidrophenilalanil-L-leucil], ciclo(dehidrophenilalanil-L-leucil)	KEGG, ChEBI	258.136 83	[M + NH ₄] ⁺	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₂

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Dipéptidos	0.650	Lys-Phe	ChEBI	293.173 94	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₅ H ₂₃ N ₃ O ₃
								Val-Pro-Pro	ChEBI	311.184 51	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₅ H ₂₅ N ₃ O ₄
311.257 7938	5.7731 13		C ₁₉ H ₃₆ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Alcoholes de ácidos grasos	0.982	monoacilglicerol 16:1	ChEBI	328.261 36	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₉ H ₃₆ O ₄
						Monoacilgliceroles	0.998	Ácido nonadecandioico	ChEBI	328.261 36	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₉ H ₃₆ O ₄
								1/2-[(9Z)-hexadecenoil]glicerol	ChEBI	328.261 36	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₉ H ₃₆ O ₄
321.144 4406	2.6380 498		C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.995	Ácidos carboxílicos y derivados	0.924					
						Bencenoides	0.864					
365.258 7267	4.1516 623		C ₂₄ H ₃₄ N ₂ O ₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Bencenoides	0.848					
376.284 7055	6.9277 544		C ₂₃ H ₃₇ NO ₃	[M + H] ⁺	0.992	Amidas de ácidos grasos	0.926	N-oleoil-L-glutámico	ChEBI	411.298 47	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₂₃ H ₄₁ NO ₅
						Ácidos benzoicos y derivados	0.867	N-oleoil alanina	ChEBI	353.292 99	[M + Na] ⁺	C ₂₁ H ₃₉ NO ₃

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Ácidos acilaminobenzoicos y derivados	0.757	N-Palmitoil prolina	ChEBI	353.292 99	[M + Na] ⁺	C ₂₁ H ₃₉ NO ₃
394.172 2387	2.6892 357		C ₁₆ H ₂₉ NO ₁₁	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.936	Glúcidos	0.724	riboflavina, vitamina B2, lactoflavina	BioCyc, KEGG, COCONUT	376.138 2844	[M + NH ₄] ⁺	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆
						Monosacáridos	0.831	His-His-His	ChEBI	429.187 3	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₈ H ₂₃ N ₉ O ₄
								lisidina	ChEBI	371.180 48	[M + Na] ⁺	C ₁₅ H ₂₅ N ₅ O ₆
								Asn-Phe-Asn	ChEBI	393.164 83	[M + H] ⁺	C ₁₇ H ₂₃ N ₅ O ₆
								Gln-Pro-Gln	ChEBI	371.180 48	[M + Na] ⁺	C ₁₅ H ₂₅ N ₅ O ₆
404.316 0124	6.6575 25		C ₂₅ H ₄₃ NO ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.973	Amidas de ácidos grasos	0.997	N-Palmitoil fenilalanina	ChEBI	403.308 64	[M + H] ⁺	C ₂₅ H ₄₁ NO ₃
						Fenilalanina y derivados	0.929	N-estearoil prolina	ChEBI	381.324 29	[M + Na] ⁺	C ₂₃ H ₄₃ NO ₃
			C ₂₅ H ₄₁ NO ₃	[M + H] ⁺	1.000	Ácidos acilaminobenzoicos y derivados	0.973					
416.236 6113	4.4279 814		C ₁₉ H ₃₅ N ₃ O ₈	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.833	Ácidos carboxílicos y derivados	0.968					

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Aminoácidos y péptidos	0.718					
438.256 8542	4.5420 89		C ₂₆ H ₃₇ N ₃ O ₂ S	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.745	Aminoácidos y péptidos	0.784	His-Lys-His	ChEBI, COCONUT	420.223 35	[M + NH ₄] ⁺	C ₁₈ H ₂₈ N ₈ O ₄
						Bencenoides	0.698					
456.165 2525	3.0109 055		C ₂₀ H ₂₇ N ₅ O ₅	[M + K] ⁺	0.483	Ácidos carboxílicos y derivados	0.943					
458.265 1421	3.6322 665		C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.986	Péptidos	0.717					
463.123 6058	2.6031 25		C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M + H] ⁺	1.000	Glucósidos fenólicos	0.974					
						Dépsidos y depsidonas	0.847					
						Fenoles	0.844					
480.246 7938	4.9143 5		C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₅	[M + Na] ⁺	0.988	Aminoácidos y péptidos	0.844					
503.351 4362	6.0675 626		C ₂₅ H ₅₂ O ₈	[M + Na] ⁺	0.932	Ácidos grasos	0.844					
			C ₂₅ H ₅₂ O ₈	[M + NH ₄] ⁺	0.932	Polietilenglicoles	0.993					
537.339 5782	6.3343 663		C ₃₀ H ₅₀ O ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.922							

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
553.365 4861	6.7119 6		C ₃₈ H ₅₀ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.914			PA(14:1(9z)/14:1(9z))	ChEBI	588.379 11	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₃₁ H ₅₇ O ₈ P
564.350 7169	6.3866 15		C ₃₁ H ₅₁ NO ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Macrólidos	0.762					
566.274 9602	4.3431 168		C ₃₂ H ₄₁ NO ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.772	Pseudoalcaloides (transamidación)	0.815	Coeliquelina**	StreptomeDB	565.270 7551	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₁
			C ₂₇ H ₄₅ NO ₉	[M + K] ⁺	0.438	Lípidos y derivados	0.889					
611.534 0918	5.8160 5		C ₃₉ H ₇₂ O ₃	[M + Na] ⁺	0.904	Ácidos grasos	0.817					
613.209 9209	2.4273 834		C ₄₄ H ₃₀ O ₂	[M + Na] ⁺	0.563	Fluorenos	0.819					
						Selaginellinas	0.823					
619.144 7368	2.7271 938		C ₃₂ H ₂₈ O ₁₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Shikimatos y fenilpropanoides	0.972					
						Flavonas	0.865					
						Flavonoides O-glucosídicos	0.841					
629.329 8177	6.0801 73		C ₃₃ H ₅₀ O ₁₀	[M + Na] ⁺	0.937	Poliquétidos	0.645					
631.108 3091	4.0427 294		C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.997	Poliquétidos	0.789	Ácido actinorródico	StreptomeDB, COCONUT	666.122 08	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Bisnaftalenos	0.712	γ -Actinorrodina	StreptomeDB, COCONUT	630.100 9554	[M + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₂ O ₁₄
637.155 2673	2.7271 874		C ₃₂ H ₂₈ O ₁₄	[M + H] ⁺	1.000	Shikimatos y fenilpropanoides	0.972					
						Flavonas	0.865					
						Flavonoides O-glucosídicos	0.841					
649.155 285	3.4063 31		C ₃₃ H ₂₈ O ₁₄	[M + H] ⁺	1.000	Shikimatos y fenilpropanoides	0.905					
						Flavonas	0.790					
663.080 4077	4.6281 123		C ₂₈ H ₂₄ O ₂₀	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.998	Shikimatos y fenilpropanoides	0.896					
						Ácidos hidroxibenzoicos y derivados	0.805					
666.144 8772	3.8085 754		C ₂₉ H ₃₇ N ₃ O ₈ S ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.759	Oligopéptidos	0.997					
701.149 0067	3.0794 969		C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Flavonas	0.949					
			C ₄₄ H ₅₀ O ₉	[M + H] ⁺	1.000	Triterpenoides	0.717					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
723.352 9498	6.1558 12					Poliquétidos	0.990					
733.591 0562	6.7055 836		C ₄₇ H ₈₂ O ₃	[M + K] ⁺	1.000							
855.321 7934	4.3382 626		C ₄₇ H ₅₀ O ₁₅	[M + H] ⁺	0.999	Poliquétidos	0.762					
						Glúcidos	0.798					
			C ₃₉ H ₅₂ N ₄ O ₁₆	[M + Na] ⁺	0.879	Oligopéptidos	0.966					
945.151 1358	3.8166 332		C ₄₈ H ₃₄ O ₂₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.997							
1053.71 7461	5.0105 56		C ₇₁ H ₉₄ N ₂ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.116							

Tabla A.4. Comparación del metaboloma de *ΔabrA* y M145. Compuestos detectados con significación estadística en la comparación de los metabolomas de la cepa silvestre M145 y el mutante *ΔabrA*. Las abreviaciones usadas en el encabezado son las siguientes: “exp.” corresponde a “experimental”, “Int. HPLC” hace referencia a la intensidad del compuesto en el cromatograma y “Prob.” significa “probabilidad”. El color gris en “Int. HPLC” (indicador cualitativo de la mayor presencia de los compuestos en una cepa u otra) corresponde a la cepa silvestre, y el morado, a *ΔabrA*.

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
124.086 3695	6.9030 28		C ₈ H ₁₃ O ₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000			Histidinol	BioCyc, KEGG, ChEBI, COCONUT	141.090 212	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₆ H ₁₁ N ₃ O
164.106 6401	3.0249 44		C ₁₀ H ₁₅ N O ₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.508	Amidas de ácidos carboxílicos	0.950	N-Hexanoil-L-homoserina lactona	KEGG, NPAtlas	199.120 8434	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃
169.085 603	2.9885 75		C ₉ H ₁₄ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Poliquétidos	0.961	Germicidina D, Surugapirona A	StreptomeDB	168.078 6442	[M + H] ⁺	C ₉ H ₁₂ O ₃
						Cetonas	0.828	Germicidina H	NPAtlas	168.078 6442	[M + H] ⁺	C ₉ H ₁₂ O ₃
183.101 4171	3.2598 124		C ₁₀ H ₁₆ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Poliquétidos cíclicos simples	0.757	Germicidina B	StreptomeDB, NPAtlas	182.094 2943	[M + H] ⁺	C ₁₀ H ₁₄ O ₃
						Cetonas	0.852	Germicidina C	NPAtlas, COCONUT	182.094 3	[M + H] ⁺	C ₁₀ H ₁₄ O ₃
								Isogermicidina B	NPAtlas	182.094 3	[M + H] ⁺	C ₁₀ H ₁₄ O ₃
241.085 5902	3.9432 266		C ₁₅ H ₁₄ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Flavonoides	0.904					
						Anisoles	0.717					
275.054 641	3.2961 464		C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₃	[M + K] ⁺	0.564	Péptidos pequeños	0.987	Deoxiribonucleósido de purina, 2'-Deoxinebularina	KEGG, ChEBI	236.090 9403	[M + K] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₃

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Aminoácidos y derivados	0.913					
285.075 6583	4.6680 226		C ₁₆ H ₁₄ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Shikimatos y fenilpropanoides	0.731	Sek34, 2-hidroxi-5-[(4-hidroxi-6-oxopiran-2-il)metil]-2-metil-3H-cromen-4-ona	StreptomeDB	302.079 0382	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₆
						Benzopiranos	0.805	THK-OH	StreptomeDB	320.089 605	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₆ O ₇
						Fenoles	0.922	Dihidrokalafungina	StreptomeDB, KEGG, ChEBI	302.079 0382	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₆
						Anisoles	0.723	Dehidromutactina, 6-(4,5-Dihidroxi-2-metilnaphthalen-1-il)-4-hidroxi-2H-piran-2-ona	StreptomeDB	284.068 4735	[M + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
								DHK-OH; DHKred-OH	StreptomeDB, KEGG, ChEBI	320.089 6029	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₆ O ₇
303.086 1949	2.8567		C ₁₆ H ₁₆ O ₇	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.940	Bencenoides	0.898	Sek34, 2-hidroxi-5-[(4-hidroxi-6-oxopiran-2-il)metil]-2-metil-3H-cromen-4-ona	StreptomeDB	302.079 0382	[M + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₆
						Compuestos organoheterocíclicos	0.909	THK-OH	StreptomeDB	320.089 605	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₆ O ₇
								Dihidrokalafungina	StreptomeDB, KEGG, ChEBI	302.079 0382	[M + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₆
								DHK-OH; DHKred-OH	StreptomeDB, KEGG, ChEBI	320.089 6029	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₆ O ₇
343.284 2308	6.0325 21		C ₂₀ H ₃₈ O ₄	[M + H] ⁺	1.000	Diterpenoides	0.804	monoacilglicerol 17:1	ChEBI	342.277 01	[M + H] ⁺	C ₂₀ H ₃₈ O ₄

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Monoacilgliceroles	0.992					
352.211 5876	4.3656 793		C ₁₉ H ₃₁ N O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.897	Pseudoalcaloides (transamidación)	0.813					
						Ácidos carboxílicos y derivados	0.978					
394.172 1654	2.6902 332		C ₁₆ H ₂₉ N O ₁₁	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Ácidos grasos	0.840	riboflavina, vitamina B2, lactoflavina	BioCyc, KEGG, COCONUT	376.138 2844	[M + NH ₄] ⁺	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆
						Amidas de ácidos grasos	0.684	His-His-His	ChEBI	429.187 3	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₈ H ₂₃ N ₉ O ₄
								lisidina	ChEBI	371.180 48	[M + Na] ⁺	C ₁₅ H ₂₅ N ₅ O ₆
								Asn-Phe-Asn	ChEBI	393.164 83	[M + H] ⁺	C ₁₇ H ₂₃ N ₅ O ₆
								Gln-Pro-Gln	ChEBI	371.180 48	[M + Na] ⁺	C ₁₅ H ₂₅ N ₅ O ₆
404.315 9149	6.6567 69		C ₂₅ H ₄₃ N O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.992	N-acil aminas	0.998	N-Palmitoil fenilalanina	ChEBI	403.308 64	[M + H] ⁺	C ₂₅ H ₄₁ NO ₃
			C ₂₅ H ₄₁ N O ₃	[M + H] ⁺	1.000	Ácidos acilaminobenzoicos y derivados	0.948	N-estearoil prolina	ChEBI	381.324 29	[M + Na] ⁺	C ₂₃ H ₄₃ NO ₃

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
410.243 3667	5.7853 045		C ₂₄ H ₃₃ N ₃ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.988	Ácidos carboxílicos y derivados	0.989					
						Aminoácidos y derivados	0.876					
424.259 1484	4.6005 793		C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Ácidos carboxílicos y derivados	0.914					
						Aminas	0.920					
426.238 672	5.5850 21		C ₂₄ H ₃₃ N ₃ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.648	Aminoácidos y péptidos	0.928					
426.238 7336	5.9035 225											
426.275 2136	4.7583 76		C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Ácidos carboxílicos y derivados	0.937					
						N-acil-alfa aminoácidos y derivados	0.788					
440.313 4742	6.9958 396		C ₂₈ H ₄₃ N O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.533			1-oleil-sn-glicero-3-fosfato O 1-octadecilglicerona 3-fosfato	ChEBI, COCO0NUT (glycerone)	422.279 73	[M + NH ₄] ⁺	C ₂₁ H ₄₃ O ₆ P
								1-hexadecil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	ChEBI	439.306 27	[M + H] ⁺	C ₂₁ H ₄₆ NO ₆ P
					0.998	Aminoácidos y péptidos	0.867					

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
442.269 0738	4.5981 75		C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺		N-acil-alfa aminoácidos y derivados	0.754					
						Poliquétidos de cadena abierta	0.790					
442.270 2781	4.1656 29		C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.998	Péptidos pequeños	0.746					
						Poliquétidos de cadena abierta	0.790					
						N-acil-alfa aminoácidos y derivados	0.754					
445.113 1949	2.6838 145		C ₂₂ H ₂₀ O ₁₀	[M + H] ⁺	1.000	Flavonas	0.919	Granaticina, Litomicina, Granatomicina C, Granaticina A	StreptomeDB, KEGG, ChEBI, NPAtlas	444.105 6468	[M + H] ⁺	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₀
						Dépsidos y depsidonas	0.999					
						Éteres	0.871					
448.103 1642	3.0372 56		C ₂₄ H ₁₇ N O ₈	[M + H] ⁺	0.892	Cumarinas	0.763					
						Ácidos carboxílicos y derivados	0.998					
455.169 991	3.4813 294		C ₂₅ H ₂₆ O ₈	[M + H] ⁺	1.000	Compuestos organoheterocíclicos	0.847					
						Éteres	0.742					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Poliquétidos	0.885					
469.313 7204	6.5746 73		C ₂₆ H ₄₆ O ₈	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Glicerolípidos	0.980					
						Poliquétidos	0.794					
497.276 0579	4.5906 878		C ₂₇ H ₃₈ N ₄ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.854	Aminoácidos y péptidos	0.897					
506.144 7648	3.3954 785		C ₂₂ H ₂₅ N 3O ₁₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Ácidos carboxílicos y derivados	0.938					
						Aminoácidos y derivados	0.782					
508.160 4415	3.0813 458		C ₂₀ H ₃₁ N ₅ O ₆ S	[M + K] ⁺	0.304	Aminoácidos y péptidos	0.732					
511.324 5298	6.7499 17		C ₂₈ H ₄₈ O ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.993	Lípidos y derivados	0.811					
			C ₂₉ H ₄₄ N ₄ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.548	Alcaloides	0.772					
						Compuestos organoheterocíclicos	0.920					
548.264 4551	5.2459 88		C ₂₉ H ₄₁ O ₁₁	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.990	Poliquétidos	0.722	Coeliquelina (media)	StreptomeDB, KEGG, ChEBI, NPAtlas	565.270 7551	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₁
						Lípidos y derivados	0.785					

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
553.284 1707	4.2611 337		C ₂₂ H ₄₆ N ₆ O ₇ S ₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.549	Oligopéptidos	0.882					
581.349 156	4.5921 087		C ₃₆ H ₄₆ N ₄ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.189							
615.506 7702	7.1037 79		C ₃₃ H ₆₈ N ₄ O ₇	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.793	Oligopéptidos	0.915					
635.139 8007	3.8926 952		C ₃₂ H ₂₈ O ₁ 5	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.880	Anguciclinas	0.778	Actinorrodina	StreptomeDB, KEGG, ChEBI, COCONUT	634.132 2555	[M + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₄
						Antraquinonas	0.748					
			C ₃₂ H ₂₆ O ₁ 4	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.996	Shikimatos y fenilpropanoides	0.765					
						Flavonas	0.780					
651.133 3248	3.8241 25		C ₃₂ H ₂₈ O ₁ 6	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.999	Shikimatos y fenilpropanoides	0.739	E'-actinorrodina	StreptomeDB	650.127 1701	[M + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₅
						Compuestos organoheterocíclicos	0.899					
						Benzopiranos	0.677					
693.091 6729	4.2278 77		C ₃₃ H ₂₆ O ₁ 6S	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.979	Poliquétidos	0.725					
						Bencenoides	0.980					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
703.165 6677	3.1545 86		C ₃₆ H ₃₂ O ₁₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.802	Poliquétidos	0.690					
						Compuestos organoheterocíclicos	0.855					
719.198 25	3.3051 279		C ₃₃ H ₃₀ N ₆ O ₁₃	[M + H] ⁺	0.482	Glúcidos	0.886					
						Alcaloides de piridina	0.669					
						Aminoácidos y derivados	0.834					
724.569 3836	2.7547 312		C ₄₀ H ₇₉ N ₈ O ₈	[M + Na] ⁺	0.724			D-galactosil/glucosil-N-hexadecanoilfingánina	ChEBI, COCONUT	701.580 57	[M + Na] ⁺	C ₄₀ H ₇₉ NO ₈
733.558 243	6.9881 43		C ₄₂ H ₇₈ O ₈	[M + Na] ⁺	0.339							
773.244 0675	3.7473 83		C ₄₁ H ₄₂ O ₁₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Flavonoides	0.826					
						Glucósidos flavonoides	0.667					
			C ₃₆ H ₄₆ O ₁₆	[M + K] ⁺	0.722	Glucósidos	0.892					
823.539 9097	4.9848 194		C ₅₀ H ₇₀ N ₄ O ₆	[M + H] ⁺	0.323							
859.353 6655	4.6161 375		C ₄₇ H ₅₆ O ₁₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.999	Poliquétidos	0.970					
						Glúcidos	0.839					

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
1023.41 5921	5.9699 52		C ₄₄ H ₆₄ N ₈ O ₂₁	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.924	Lipopéptidos	0.835					
						Depsipéptidos cíclicos	0.882					
			C ₆₀ H ₆₄ O ₁₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.915	Poliquétidos	0.934					
						Macrólidos	0.721					
1094.58 1838	5.4894 166		C ₄₇ H ₈₃ N ₉ O ₂₀	[M + H] ⁺	0.022							

ANEXOS

Tabla A.5. Comparación de los metabolomas de $\Delta aor1$ y M145. Compuestos detectados con significación estadística en la comparación de los metabolomas de la cepa silvestre M145 y el mutante $\Delta aor1$. Las abreviaciones usadas en el encabezado son las siguientes: “exp.” corresponde a “experimental”, “Int. HPLC” hace referencia a la intensidad del compuesto en el cromatograma y “Prob.” significa “probabilidad”. El color gris en “Int. HPLC” (indicador cualitativo de la mayor presencia de los compuestos en una cepa u otra), y el naranja, a $\Delta aor1$.

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
111.019 9656	5.3655 567											
209.128 3661	2.1962 276		C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Alcaloides de piridina	0.824	ciclo(4-hidroxi-R-Pro-S-Leu)	ChEBI, NPAtlas	226.1317 4	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃
						Aminoácidos y derivados	0.846	ciclo(2-OH-D-Pro-L-Leu)	ChEBI, NPAtlas	226.1317 4	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₄
								ciclo(L-Leu-trans-4-hidroxi-L-Pro)	ChEBI, NPAtlas	226.1317 4	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃
								ciclo(2-hidroxi-Pro-R-Leu)	ChEBI, NPAtlas	226.1317 4	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃
213.641 4019	3.7557 085											
234.206 224	3.0340 834		C ₁₂ H ₂₇ N O ₃	[M + H] ⁺	1.000	Ácidos grasos	0.992	Ácido hidroxiláurico	ChEBI, COCONUT	216.1725 4	[M + NH ₄] ⁺	C ₁₂ H ₂₄ O ₃
						Bases esfingoides	0.953	Ácido hidroxidodecanoico	KEGG, COCONUT, ChEBI	216.1725 446	[M + NH ₄] ⁺	C ₁₂ H ₂₄ O ₃
						Aminas	0.953					
243.158 8332	2.5078 027		C ₁₃ H ₂₂ O ₄	[M + H] ⁺	0.990	Terpenoides	0.972	A-factor, 2S-isocaprilol-3S-hidroxiometil-γ-butirolactona	StreptomeDB, ChEBI, COCONUT	242.1518 092	[M + H] ⁺	C ₁₃ H ₂₂ O ₄

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Sesquiterpenoides	0.878					
248.200 844	5.2978 168		C ₁₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Péptidos pequeños	0.999	Leu-Val o Ile-Val	ChEBI	230.1630 4	[M + NH ₄] ⁺	C ₁₁ H ₂₂ N ₂ O ₃
	5.4699 46		C ₁₆ H ₂₇ N O ₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Dipéptidos	0.932	N-Dodecanoil-DL-homoserina lactona	ChEBI	283.2147 4	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₂₉ NO ₃
261.075 4985	2.9059 167		C ₁₄ H ₁₄ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Derivados de shikimato y fenilpropanoides	0.865	Dehipoxantina futasolina	KEGG, ChEBI	296.0896 029	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₄ H ₁₆ O ₇
						Bencenoides	0.915	3-isobutil-1-metil-7H-xantina o 3-isobutil-1-metil-9H-xantina, isobutilmetilxantina	ChEBI, COCONUT	222.1116 8	[M + K] ⁺	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O ₂
262.237 3344	3.4765 248		C ₁₄ H ₃₁ N O ₃	[M + H] ⁺	0.994	Ácidos grasos	0.981	ácido hidroxitetradecanoico/hidroximirístico	COCONUT, KEGG, ChEBI	244.2038 4	[M + NH ₄] ⁺	C ₁₄ H ₂₈ O ₃
						Bases esfingoides	0.871					
						Aminas	0.915					
267.195 3995	5.2815					Ácidos grasos	0.951					
274.273 8774	3.8618 417		C ₁₆ H ₃₅ N O ₂	[M + H] ⁺	1.000	Bases esfingoides	0.942	hexadecasfinganina	KEGG, ChEBI	273.2667 794	[M + H] ⁺	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂
						Aminas	0.997					
						Aminoalcoholes	0.957					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
284.196 6762	2.4590 209		C ₁₄ H ₂₇ N ₃ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.946	Péptidos pequeños	0.994	Leu/Ile-Leu/Ile-Gly	ChEBI	301.2001 6	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₄ H ₂₇ N ₃ O ₄
						Tripéptidos	0.913	Ile/Leu-Ala-Val	ChEBI	301.2001 6	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₄ H ₂₇ N ₃ O ₄
293.137 9217	3.0829 36		C ₁₆ H ₂₂ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.994	Poliquétidos	0.726					
303.086 2319	2.8578 877		C ₁₆ H ₁₆ O ₇	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.937	Derivados de shikimato y fenilpropanoides	0.519	DHK-OH; DHKred-OH	StreptomeDB, KEGG, ChEBI	320.0896 029	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₆ O ₇
						Piranos	0.626	THK-OH	StreptomeDB	320.0896 029	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₆ O ₇
						Bencenoides	0.898	SEK34	StreptomeDB	302.0790 382	[M + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₆
						Compuestos organoheterocíclicos	0.909	Dihidrokalafungina	StreptomeDB, KEGG	302.0790 382	[M + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₆
305.101 4338	3.0190 03		C ₁₆ H ₁₆ O ₆	[M + H] ⁺	1.000	Poliquétidos	0.735	Dihidrokalafungina dihidroquinona; T3HN, DHKred, CHEBI:81706, C18360	StreptomeDB; KEGG, ChEBI	304.0946 9		C ₁₆ H ₁₆ O ₆
311.257 8904	5.7742 376					Bencenoides	0.966					
319.081 1693	2.8024 814		C ₁₆ H ₁₄ O ₇	[M + H] ⁺	1.000	Poliquétidos	0.755	SEK4b	GNPS, ChEBI	318.0739 528	[M + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₇

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Compuestos organoheterocíclicos	0.895					
357.060 5426	3.3649 72		C ₁₈ H ₁₄ O ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Poliquétidos	0.795	alfa-D-Galactosil-(1,1')-sn-glicerol 3-fosfato o 2-(alfa-D-Glucosil)-sn-glicerol 3-fosfato	KEGG	334.0664 98	[M + Na] ⁺	C ₉ H ₁₉ O ₁₁ P
						Compuestos carbonilo	0.817					
359.196 4054	2.3866 105		C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₄	[M + H] ⁺	0.729	Alcaloides de ornitina	0.884	Palmitoil fosfato	ChEBI, COCONUT	336.2065 612	[M + Na] ⁺	C ₁₆ H ₃₃ O ₅ P
						Alcaloides de pirrolidina	0.777					
360.289 9481	6.3501 73											
363.053 2438	4.2709 293		C ₁₇ H ₁₆ O ₈ S	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.980	Poliquétidos	0.919					
373.248 3874	5.7972 956					Naftoquinonas	0.92					
375.227 9868	4.1297 197		C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.996	Aminoácidos y derivados	0.782					
376.284 5772	6.9294 43							3-hidroxihexadecadienoilcarnitina	ChEBI	411.2984 7	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₂₃ H ₄₁ NO ₅
392.233 4828	3.9608 269		C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O ₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Aminoácidos y derivados	0.777					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
392.269 7848	4.5896 31		C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₂	[M + H] ⁺	0.744	Alcaloides	0.926	Streptorubin	GNPS	391.2623 627	[M + H] ⁺	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O
						Bencenoides	0.907	Metacicloprodigosina, metilciclodecylprodiginina o butilciclohexilprodigosina	ChEBI	391.2623 6	[M + H] ⁺	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O
394.248 6777	3.9489 918		C ₂₄ H ₃₃ N ₃ O ₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Aminoácidos y derivados	0.97	Lys-Met-Val	ChEBI	376.2144 3	[M + NH ₄] ⁺	C ₁₆ H ₃₂ N ₄ O ₄ S
						Péptidos pequeños	0.838					
						Alcaloides	0.704					
						Bencenoides	0.871					
						N-acil alfa aminoácidos y derivados	0.829					
406.248 8122	4.1714 88		C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Alcaloides	0.901					
						Bencenoides	0.517					
408.264 4063	4.6206 67		C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Alcaloides	0.856	23-cetoundecilprodiginina	NPAAtlas	407.2572 773	[M + H] ⁺	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₂
						Alcaloides de triptófano	0.545					
						Bencenoides	0.579					
						Lípidos y derivados	0.572					

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
414.250 0159	2.8748 665		C ₂₂ H ₃₃ N ₅ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.887	Aminoácidos y derivados	0.984	Streptorubina B, BMCHP; butil-meta-cicloheptilprodiginina; ChEMBL1812867; ciclonona(b)pirrol, 4-butil-1,4,5,6,7,8,9,10-octahidro-2-((3-metoxi-5-(1H-pirrol-2-yl)-2H-pirrol-2-ilidene)metil)-; (6S)-5-[3-metoxi-5-(1H-pirrol-2-yl)-2H-pirrol-2-ylidenemetil]-6-butyl-2,4-heptano-1H-pirrol	StreptomeDB	391.2623 627	[M + Na] ⁺	C ₂₅ H ₃₃ N ₅ O
						Péptidos pequeños	0.825	butilciclohexilprodigiosina, Metacicloprodigiosina, Propil-metaciclooctylprodiginina, metilciclodecilprodiginina	ChEBI	391.2623 6	[M + K] ⁺	C ₂₅ H ₃₃ N ₅ O
						N-acil alfa aminoácidos y derivados	0.865	Lys-Val-Trp	ChEBI	431.2532 5	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₂₂ H ₃₃ N ₅ O ₄
414.311 101	4.7383 585											
422.280 3246	4.1714 96		C ₂₆ H ₃₇ N ₃ O ₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Aminoácidos y derivados	0.818					
						Alcaloides de triptófano	0.636					
426.275 0424	3.7538 877		C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Aminoácidos y derivados	0.889					
						Péptidos pequeños	0.628					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						N-acil alfa aminoácidos y derivados	0.602					
430.092 2077	3.0387 707		C ₂₄ H ₁₇ N O ₈	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.911	Poliquétidos y fenilpropanoides	0.55					
						Cumarinas	0.763					
						Aminoácidos y derivados	0.692					
434.249 6667	3.0687 628		C ₁₉ H ₃₇ N ₃ O ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.995	Glúcidos	0.836	Lys-His-Lys	ChEBI, COCONUT	411.2594	[M + Na] ⁺	C ₁₈ H ₃₃ N ₇ O ₄
						Aminoglucósidos	0.606					
436.259 3711	3.9294 71		C ₂₆ H ₃₅ N ₃ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Alcaloides	0.618					
						Compuestos organoheterocíclicos	0.973					
						Pirroles	0.658					
						Aminoácidos y derivados	0.725					
439.284 9686	6.4073 806											
440.254 4872	3.7589 083		C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Aminoácidos y derivados	0.746					

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
442.268 991	4.5997 586		C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Aminoácidos y derivados	0.825					
	3.8255 334		C ₂₂ H ₄₃ O ₆	[M + K] ⁺	0.659	Lípidos y derivados	0.953					
						Ácidos grasos	0.868					
445.113 1886	2.6850 436		C ₂₂ H ₂₀ O ₁₀	[M + H] ⁺	1.000	Derivados de shikimato y fenilpropanoides	0.815	Granaticina, Litomycina, Granaticina C , Granaticina A	StreptomeDB, KEGG, ChEBI, NPAtlas	444.1056 468	[M + H] ⁺	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₀
						Flavonas	0.919					
						Cumarinas y derivados	0.746					
						Flavonoides glucósidos	0.708					
448.102 7618	3.0375 46		C ₂₄ H ₁₇ N O ₈	[M + H] ⁺	0.936	Cumarinas	0.763					
						Poliquétidos y fenilpropanoides	0.55					
						Aminoácidos y derivados	0.692					
450.118 4646	2.9093 5		C ₂₄ H ₂₁ N O ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.999	Compuestos organoheterocíclicos	0.957					
						Fenilpirrolidinas	0.906					
			C ₂₅ H ₂₆ O ₈	[M + H] ⁺	1.000	Poliquétidos	0.689					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
455.169 9129	3.4822 834					Compuestos organoheterocíclicos	0.812					
						Benzopiranos	0.517					
456.249 3765	5.8538 666		C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.993	Aminoácidos y derivados	0.563	N-Formil-norleucil-leucil-phenylalanil-metil éster	KEGG	433.2576 712	[M + Na] ⁺	C ₂₃ H ₃₅ N ₃ O ₅
458.264 829	3.6461 277		C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Aminoácidos y derivados	0.687					
						Ácidos orgánicos y derivados	0.993					
463.270 4122	4.5898 54											
469.313 681	6.5775 504							Arg-Arg-Arg	ChEBI, COCONUT	486.3139	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₈ H ₃₈ N ₁₂ O ₄
475.150 7042	3.9093 39		C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₈	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.949	Poliquétidos	0.702					
						Bencenoides	0.991					
483.329 0341	6.7132 38							fosfatidiletanolamina 16:0 zwitterion	ChEBI	467.2648	[M + Na] ⁺	C ₂₁ H ₄₂ NO ₈ P
490.254 8444	5.6582 5							1-hexanoil-2-heptanoil-sn-glicero-3-fosfocolina o 2-hexanoil-1-heptanoil-sn-glicero-3-fosfocolina	ChEBI	467.2648	[M + Na] ⁺	C ₂₁ H ₄₂ NO ₈ P
								fosfatidilcolina 13:0	ChEBI	467.2648	[M + Na] ⁺	C ₂₁ H ₄₂ NO ₈ P

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
								PE(8:0/8:0)	ChEBI	467.2648	[M + Na] ⁺	C ₂₁ H ₄₂ NO ₈ P
500.275 5584	3.2974 749		C ₂₇ H ₃₉ N ₃ O ₇	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.728	Alcaloides	0.607	2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	ChEBI	477.2855 4	[M + Na] ⁺	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P
						Aminoácidos y derivados	0.825	lisofosfatidilcolina 15:2	ChEBI	477.2855 4	[M + Na] ⁺	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P
						Ácidos carboxílicos y derivados	0.985	PA(22:6/0:0)	ChEBI	482.2433 4	[M + NH ₄] ⁺	C ₂₅ H ₃₉ O ₇ P
								lisofosfatidiletanolamina 18:2	ChEBI	477.2855 4	[M + Na] ⁺	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P
								fosfatidiletanolamina 20:3 zwitterion	ChEBI	517.2804 5	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₂₅ H ₄₄ NO ₈ P
509.155 6651	3.4008 107		C ₂₂ H ₂₆ N ₆ O ₆	[M + K] ⁺	0.772	Ácidos carboxílicos y derivados	0.982					
						Aminoácidos y derivados	0.602					
530.265 0551	4.1117 806		C ₃₀ H ₃₃ N ₇ O	[M + Na] ⁺	0.088			lisofosfatidilcolina 16:2	ChEBI	491.3011 9	[M + K] ⁺	C ₂₄ H ₄₆ NO ₇ P
539.350 2636	6.3986 36											
564.259 1991	5.0828 633											

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
572.442 0099	7.2535 9							1-tetracosanoil-sn-glicero-3-fosfolina, lisofosfatidilcolina 24:0	ChEBI	607.4576 9	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₆₆ NO ₇ P
								N-tetradecanoylsphingosine 1-fosfato	ChEBI	589.4471 3	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₆₄ NO ₆ P
576.350 865	6.2946 54											
578.366 2215	6.6984 415											
582.296 0385	4.3968 463		C ₃₀ H ₄₁ N ₅ O ₈	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.473			lisofosfatidilcolina 20:4	ChEBI, COCONUT	543.3324 9	[M + K] ⁺	C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P
597.519 3698	5.7438 83											
598.291 4489	4.3959 794		C ₃₀ H ₄₁ N ₅ O ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.401	Aminoácidos y derivados	0.911					
						Oligopéptidos	0.798					
613.209 9091	2.4290 917		C ₄₄ H ₃₀ O ₂	[M + Na] ⁺	0.501							
615.113 6873	3.5858 939		C ₃₂ H ₂₄ O ₁₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.992	Poliquétidos	0.803	Γ'-actinorrodina	StreptomeDB, COCONUT	632.1166 1	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₄
						Compuestos organoheterocíclicos	0.746	E'-actinorrodina	StreptomeDB	648.1115 201	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₅

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Benzopiranos	0.781					
637.155 2488	2.7284 875		C ₃₂ H ₂₈ O ₁₄	[M + H] ⁺	1.000	Poliquétidos y fenilpropanoides	0.984					
						Flavonoides	0.943					
						Flavonoides glucósidos	0.88					
649.115 0697	4.1697 28		C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Derivados de shikimato y fenilpropanoides	0.908	ε-actinorrodina	StreptomeDB	648.1115 201	[M + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅
						Poliquétidos y fenilpropanoides	0.847	Actinorhodic acid	StreptomeDB	666.1220 847	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆
						Flavonas	0.833					
661.064 8618	4.7384 42											
669.087 6225	4.8615 694											
675.317 6107	6.2577 95											
690.521 4461	5.7372 6							fosfatidiletanolamina P-36:3 / O-36:4 / (P-16:0/20:3) / (P-18:0/18:3)	ChEBI, COCONUT	725.5359 4	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₄₁ H ₇₆ NO ₇ P
								fosfatidilcolina O-33:4	ChEBI	725.5359 4	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₄₁ H ₇₆ NO ₇ P

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
701.186 659	3.3103 5		C ₃₇ H ₃₄ O ₁₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Poliquétidos y fenilpropanoides	0.989					
						Flavonas	0.96					
						Flavonoides glucósidos	0.871					
708.327 9491	4.2371 28		C ₄₁ H ₄₇ N ₃ O ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.884	Aminoácidos y derivados	0.67					
	4.0456 934					Macrólidos	0.812					
						Ácidos carboxílicos y derivados	0.989					
731.579 1897	6.6766 887											
745.595 1852	6.7216 11											
746.598 3598	6.7224 426											
769.248 8933	3.8020 5		C ₄₂ H ₄₂ O ₁₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Poliquétidos y fenilpropanoides	0.795					
						Flavonoides	0.723					

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
831.285 9289	3.5868 57		C ₄₂ H ₄₈ O ₁₆	[M + Na] ⁺	0.527	Lípidos y derivados	0.699					
			C ₄₄ H ₄₈ O ₁₇	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Poliquétidos	0.653					
						Glúcidos y derivados	0.818					
833.352 7345	5.8358 574							D-GalNAc-(1→3)-[D-GalNAc-(1→4)]-D-GalNAc-(1→3)-D-GalNAc-ol	ChEBI	832.3437	[M + H] ⁺	C ₃₂ H ₅₆ N ₄ O ₂₁
853.379 5561	6.1329 436											
869.374 213	5.6373 73											
891.356 3687	5.6376 357											
921.441 9301	6.6941 88											
947.165 5314	3.9815 261		C ₄₃ H ₄₀ O ₂₂	[M + K] ⁺	0.849	Bisnaftalenos	0.832					
			C ₃₄ H ₄₄ N ₈ O ₁₇ S ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.381	Oligopéptidos	0.999					
						RiPPs	0.649					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						N-acil alfa aminoácidos y derivados	0.858					

Tabla A.6. Comparación de los metabolomas de Δ SCO3750 y M145. Compuestos detectados con significación estadística en la comparación de los metabolomas de la cepa silvestre M145 y el mutante Δ SCO3750. Las abreviaciones usadas en el encabezado son las siguientes: “exp.” corresponde a “experimental”, “Int. HPLC” hace referencia a la intensidad del compuesto en el cromatograma y “Prob.” significa “probabilidad”. El color gris en “Int. HPLC” (indicador cualitativo de la mayor presencia de los compuestos en una cepa u otra) corresponde a la cepa silvestre, y el verde, a Δ SCO3750.

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
169.085 5888	2.9885 087		C ₉ H ₁₄ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Poliquétidos	0.970	Germicidina D, Surugapirona A	StreptomeDB	168.0786 442	[M + H] ⁺	C ₉ H ₁₂ O ₃
						Poliquétidos cíclicos	0.614	Germicidina H	NPAAtlas	168.0786 442	[M + H] ⁺	C ₉ H ₁₂ O ₃
						Ácidos vinílogos	0.562					
223.122 7231	2.9913 5		C ₇ H ₂₀ N ₄ O ₃ S	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.764	Alcaloides	0.835	ciclo(dehidrofenilalanil-L-leucil)	ChEBI, KEGG	258.1368 3	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₂
						Alcaloids de histidina	0.954	anserina, beta-alanil-N(pi)-metil-L-histidina	KEGG	240.1222 404	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₃
						Alcaloides de imidazol	0.955	N(alpha)-γ-L-Glutamilhistamine	KEGG	240.1222 404	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₃
235.096 2688	2.8401 46		C ₁₃ H ₁₄ O ₄	[M + H] ⁺	0.803	Shikimatos y fenilpropanoides	0.667	GTRI-02, 7-acetil-3,6-dihidroxi-8-metil-tetralona, 7-acetil-3,6-dihidroxi-8-metil-3,4-dihidronaftaleno-1(2H)-ona	StreptomeDB, ChEBI, NPAAtlas	234.0892 089	[M + H] ⁺	C ₁₃ H ₁₄ O ₄
						Bencenoides	0.974					
						Isocumarinas	0.883					
						Compuestos organoheterocíclicos	0.883					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Cetonas	0.927					
247.107 492	2.8529 599		C ₁₀ H ₂₀ N ₂ O ₄ S	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.965	Aminoácidos y péptidos	0.972	9-mercaptodetiobiotin	MetaCyc	246.1038 136	[M + H] ⁺	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₃ S
			C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃	[M + H] ⁺	0.870	Péptidos pequeños	0.890	N2-fenilacetil-L-glutamina	ChEBI, KEGG	264.1110 1	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₄
						N-acil alfa aminoácidos	0.996	Thr-Tyr	ChEBI	282.1215 7	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₅
						Amidas de alfa aminoácidos	0.872	N-acetilriptófano	ChEBI, KEGG, NPAtlas	246.1004 4	[M + H] ⁺	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₃
275.054 7531	3.2950 394		C ₁₄ H ₁₂ O ₇	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Poliquétidos	0.781	Deoxirribonucleósido de purina	KEGG	236.0909	[M + K] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₃
						Shikimatos y fenilpropanoides	0.644	S-(4-metiltiobutyltiohidroximoi)-L-cisteína	KEGG	252.0602	[M + Na] ⁺	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ S ₂
						Naftoquinonas	0.812					
						Isocumarinas	0.871					
						Compuestos organoheterocíclicos	0.839					
						Naftopiranonas	0.657					
294.119 4735	2.1215 436		C ₁₂ H ₁₉ N ₅ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.868	Glúcidos	0.975	Ser-His-Ser	ChEBI	329.1335 3	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₂ H ₁₉ N ₅ O ₆

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
			C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.707	Nucleósidos	0.948	N-acetilmurámico acid	ChEBI, KEGG, COCONUT	293.11107	[M + H] ⁺	C ₁₁ H ₁₉ NO ₈
						Nucleósidos de purina	0.827	N6-(2-hidroxietyl)adenosina	NPAAtlas	311.12297	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₅
								N2,N2-dimetilguanosina	ChEBI, NPAAtlas	311.12297	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₅
305.2586401	5.5486546		C ₁₉ H ₃₄ N ₂ O ₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.996	Ácidos grasos	0.862					
						Lípidos y derivados	0.511					
307.1172876	3.1315105		C ₁₆ H ₁₈ O ₆	[M + H] ⁺	1.000	Bencenoides	0.899	N5-Citryl-D-oritina	KEGG	306.1063	[M + H] ⁺	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₈
						Cumarinas	0.737	Leu/Ile-His	ChEBI, KEGG, COCONUT	268.15354	[M + K] ⁺	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₃
						Compuestos organoheterocíclicos	0.952					
			C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Dipéptidos	0.995					
307.1539182	3.2962644		C ₁₇ H ₂₄ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Terpenoides	0.749					
						Sesquiterpenoides	0.683					
321.1444327	2.4701273		C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.963	Ácidos carboxílicos y derivados	0.911					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
323.112 3152	3.1523 001		C ₁₆ H ₁₈ O ₇	[M + H] ⁺	0.999	Glúcidos	0.717					
						Compuestos organoheterocíclicos	0.913					
			C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.951	Péptidos pequeños	0.886					
331.044 2737	3.1575 866		C ₁₄ H ₁₂ O ₈	[M + Na] ⁺	0.982	Shikimatos y fenilpropanoides	0.771	IMP, ácido inosínico	BioCyc, ChEBI, KEGG, COCONUT	348.0471 004	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ N ₄ O ₈ P
						Fenoles	0.834	IMP ciclico 3',5'	ChEBI, KEGG, COCONUT	330.0365 4	[M + H] ⁺	C ₁₀ H ₁₁ N ₄ O ₇ P
331.284 1596	6.2717 395		C ₁₉ H ₃₈ O ₄	[M + H] ⁺	1.000	Glicerolípidos	0.996	3-palmitoil-sn-glicerol, 2-palmitoilglicerol, 1-monopalmitoilglicerol	ChEBI, COCONUT	330.2770 1	[M + H] ⁺	C ₁₉ H ₃₈ O ₄
						Monoacilgliceroles	0.997	1-hexadecanoil-sn-glicerol, 1-acilglicerol 16:0, 2-acilglicerol 16:0	ChEBI	330.2770 1	[M + H] ⁺	C ₁₉ H ₃₈ O ₄
								(3R,18R)-ácido 3,18-dihidroxinonadecanoico, (3R)-ácido 3,19-dihidroxinonadecanoico	ChEBI	330.2770 1	[M + H] ⁺	C ₁₉ H ₃₈ O ₄
336.107 8146	2.5388 148		C ₁₆ H ₁₇ N O ₇	[M + H] ⁺	1.000	Ácidos carboxílicos y derivados	0.935	Ala-His-Ala	ChEBI	297.1437	[M + K] ⁺	C ₁₂ H ₁₉ N ₅ O ₄
			C ₁₆ H ₁₄ O ₇	[M + NH ₄] ⁺	1.000	Fenilpropanoides y poliquétidos	0.793	SEK4b	NPAAtlas	318.0739 528	[M + NH ₄] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₇
						Compuestos organoheterocíclicos	0.910					

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Flavonoides	0.809					
						Benzopiranos	0.780					
339.107 8035	2.7963 977		C ₁₆ H ₁₈ O ₈	[M + H] ⁺	1.000	Poliquétidos	0.667					
						Glúcidos	0.965					
						Compuestos glicosílicos	0.813					
439.284 5258	6.4066 706		C ₂₃ H ₄₄ O ₅	[M + K] ⁺	0.511	Lípidos y derivados	0.968	1,2-didecanoilglicerol	ChEBI, KEGG	400.3188 7	[M + K] ⁺	C ₂₃ H ₄₄ O ₅
440.160 0969	3.0848 393		C ₁₈ H ₂₇ N ₅ O ₇ S	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.988	Nucleósidos	0.923					
						Nucleósidos de purina	0.964					
455.169 837	3.3219 564		C ₂₅ H ₂₈ O ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.785	Poliquétidos	0.733					
			C ₂₅ H ₂₆ O ₈	[M + H] ⁺	0.746	Bencenoides	0.992					
						Compuestos organoheterocíclicos	0.874					
463.389 4913	7.0044 785		C ₂₈ H ₅₀ N ₂ O ₃	[M + H] ⁺	0.546	Ácidos grasos	0.914					
						Aminoácidos y derivados	0.789					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
482.111 8851	2.8530 917		C ₂₂ H ₁₉ N ₅ O ₆ S	[M + H] ⁺	0.396	Ácidos carboxílicos y derivados	0.993					
						Aminoácidos y derivados	0.858					
491.145 0897	3.6283 336		C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.883	Bencenoides	0.978					
523.269 3011	4.7032 943		C ₃₁ H ₄₀ O ₈	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Poliquétidos	0.939					
						Éters	0.845					
567.437 9009	6.4031		C ₃₇ H ₆₀ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000							
578.366 2824	6.6966 08		C ₃₂ H ₅₃ N O ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.882							
597.397 143	6.3960 896		C ₃₃ H ₅₈ O ₁₀	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.650							
625.551 5278	5.9173 393		C ₃₇ H ₇₄ N ₂ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.705							
631.108 1902	3.7057 405		C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Poliquétidos	0.905	ε-actinorrodina	StreptomeDB, COCONUT	648.1115 201	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅
	4.0421 185		C ₂₇ H ₂₈ O ₁₅	[M + K] ⁺	0.657	Bisnaftalenos	0.864	Ácido actinorródico	StreptomeDB, COCONUT	666.1220 8	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Bencenoides	0.992	γ -actinorrodina	StreptomeDB, COCONUT	630.1009 554	[M + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₂ O ₁₄
						Flavonas	0.759					
637.155 2663	2.7270 77		C ₃₂ H ₂₈ O ₁₄	[M + H] ⁺	1.000	Shikimatos y fenilpropanoides	0.986					
						Fenilpropanoides y poliquétidos	0.967					
						Flavonoides	0.857					
						Flavonas	0.763					
647.175 7507	3.7273 474		C ₃₄ H ₃₂ O ₁₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.625	Shikimatos y fenilpropanoides	0.965					
						Fenilpropanoides y poliquétidos	0.936					
						Flavonas	0.838					
757.249 2793	3.8888 898		C ₃₄ H ₄₆ O ₂₀	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.604	Glúcidos	0.905	β -D-Galp6N ⁺ -(1→4)-[β -D-GalpA--(1→4)- β -D-Glcp-(1→6)]- β -D-GlcpNAc-OMe	ChEBI	734.2593 1	[M + Na] ⁺	C ₂₇ H ₄₆ N ₂ O ₂₁
						Compuestos O-glicosílicos	0.780					
			C ₄₁ H ₄₂ O ₁₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Shikimatos y fenilpropanoides	0.697					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Fenilpropanoides y poliquétidos	0.908					
						Flavonas	0.725					
773.244 1521	3.6138 499		C ₄₁ H ₄₂ O ₁₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Shikimatos y fenilpropanoides	0.780					
						Fenilpropanoides y poliquétidos	0.839					
						Flavonoides	0.826					
			C ₃₆ H ₄₆ O ₁₆	[M + K] ⁺	0.597	Compuestos glicosílicos	0.892					
785.317 6183	5.2491 77		C ₃₆ H ₅₀ N ₈ O ₉ S ₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.431	Oligopéptidos	1.000					
817.139 9004	4.8386 59		C ₃₈ H ₃₄ O ₁₈	[M + K] ⁺	0.923	Shikimatos y fenilpropanoides	0.914					
						Bencenoides	0.995					

Tabla A.7. Comparación de los metabolomas de Δ SCO2359 y M145. Compuestos detectados con significación estadística en la comparación de los metabolomas de la cepa silvestre M145 y el mutante Δ SCO2359. Las abreviaciones usadas en el encabezado son las siguientes: “exp.” corresponde a “experimental”, “Int. HPLC” hace referencia a la intensidad del compuesto en el cromatograma y “Prob.” significa “probabilidad”. El color gris en “Int. HPLC” (indicador cualitativo de la mayor presencia de los compuestos en una cepa u otra) corresponde a la cepa silvestre, y el amarillo, a Δ SCO2359.

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
189.054 3349	2.7284 043		C ₁₁ H ₁₀ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.969	Bencenoides	0.964					
						Fenoles	0.718					
						Ácidos benzoicos y derivados	0.823					
			C ₇ H ₁₃ NO ₄ P	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.827	Péptidos pequeños	0.963					
235.096 2031	2.8411 543		C ₁₃ H ₁₄ O ₄	[M + H] ⁺	0.808	Bencenoides	0.967	GTRI-02, 7-acetil-3,6-dihidroxi-8-metil-tetralona	StreptomeDB, ChEBI	234.089 2089	[M + H] ⁺	C ₁₃ H ₁₄ O ₄
						Cetonas	0.889					
			C ₁₃ H ₁₆ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Shikimatos y fenilpropanoides	0.789					
						Isocumarinas	0.883					
259.059 9759	2.8030 562		C ₁₄ H ₁₂ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.643	Cromonas	0.955	Dehipoxantina futasina cíclica	KEGG, ChEBI	294.073 9528	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₄ H ₁₄ O ₇
						Benzopiranos	0.932					
			C ₁₅ H ₁₈ O ₄	[M + H] ⁺	1.000	Sesquiterpenoides	0.988					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
263.127 5527	3.2193 75					Lípidos fenólicos	0.705					
291.086 1518	3.0651 596		C ₁₅ H ₁₆ O ₇	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.998	Naftoquinonas	0.636	Histidilprolina	COCONUT	252.122 24	[M + K] ⁺	C ₁₁ H ₁₆ N ₄ O ₃
						Compuestos organoheterocíclicos	0.924					
						Bencenoides	0.948					
293.137 9755	3.0838 187		C ₁₆ H ₂₂ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.996	Poliquétidos	0.726					
						Macrólidos	0.622					
305.101 8022	3.4096 62		C ₁₆ H ₁₆ O ₆	[M + H] ⁺	1.000	Shikimatos y fenilpropanoides	0.853	Dihidrokalafungina dihidroquinona; T3HN, DHKred, CHEBI:81706, C18360	StreptomeDB; KEGG	304.094 69	[M + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₆ O ₆
			C ₁₆ H ₁₈ O ₇	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.805	Fenilpropanoides y poliquétidos	0.743					
						Bencenoides	0.996					
						Cumarinas	0.798					
336.107 8569	2.5386 333		C ₁₆ H ₁₇ NO ₇	[M + H] ⁺	0.990	Ácidos carboxílicos y derivados	0.891					
			C ₁₆ H ₁₄ O ₇	[M + NH ₄] ⁺	1.000	Fenilpropanoides y poliquétidos	0.808					

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Flavonoides	0.678					
						Benzopiranos	0.670					
						Compuestos organoheterocíclicos	0.895					
341.065 6342	4.0270 123		C ₁₈ H ₁₄ O ₈	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.997	Poliquétidos	0.966					
						Naftalenos	0.772					
						Bencenoides	0.998					
410.243 2817	6.0437 92		C ₂₄ H ₃₃ N ₃ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Ácidos carboxílicos y derivados	0.984					
						Aminoácidos y derivados	0.652					
422.280 3826	4.5094 58		C ₂₆ H ₃₇ N ₃ O ₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.666	Alcaloides	0.841					
						Compuestos organoheterocíclicos	0.952					
424.259 329	5.2348 27		C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Alcaloides	0.876					
						Bencenoides	0.874					
						Ácidos carboxílicos y derivados	0.884					
			C ₂₄ H ₁₇ NO ₈	[M + H] ⁺	0.907	Cumarinas	0.763					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
448.102 8474	3.0376 773					Ácidos carboxílicos y derivados	0.998					
						Aminoácidos y derivados	0.713					
463.325 3188	2.9811 48		C ₂₄ H ₄₈ O ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.995							
491.145 0893	3.6281 44		C ₂₆ H ₂₄ N ₂ O ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.974	Bencenoides	0.992					
			C ₃₆ H ₇₂ N ₂ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.983	Amidas lipídicas	0.864					
611.533 1401	5.8201 284					N-acil aminas	0.883					
						Ácidos carboxílicos y derivados	0.999					
613.134 1043	3.4173 646		C ₃₃ H ₂₆ O ₁₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Shikimatos y fenilpropanoides	0.904					
						Flavonas	0.985					
						Fenilpropanoides y poliquétidos	0.977					
631.108 3447	4.5694 04		C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.974	Shikimatos y fenilpropanoides	0.930	ε-actinorrodina	StreptomeDB, COCONUT	648.111 5201	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Poliquétidos	0.869	Ácido actinorródico	StreptomeDB, COCONUT	666.12208	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆
						Fenilpropanoides y poliquétidos	0.833	γ-actinorrodina	StreptomeDB, COCONUT	630.1009554	[M + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₂ O ₁₄
						Bisnaftalenos	0.724					
649.118 8296	3.9418 166		C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.999	Poliquétidos	0.780	Ácido actinorródico	StreptomeDB, COCONUT	666.12208	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆
						Bencenoides	0.991	ε-actinorrodina	StreptomeDB, COCONUT	648.1115201	[M + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅
						Compuestos organoheterocíclicos	0.831					
649.155 2903	3.4103 584		C ₃₃ H ₂₈ O ₁₄	[M + H] ⁺	1.000	Shikimatos y fenilpropanoides	0.905					
						Fenilpropanoides y poliquétidos	0.847					
						Flavonoides	0.759					
665.095 8058	4.6764 956		C ₂₆ H ₂₆ O ₁₉	[M + Na] ⁺	0.963	Shikimatos y fenilpropanoides	0.772					
						Flavonas	0.785					
						Glúcidos fenólicos	0.716					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
669.087 821	4.8542 128		C ₂₉ H ₂₆ O ₁₆	[M + K] ⁺	0.968							
703.165 906	3.1564 977		C ₃₆ H ₃₂ O ₁₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.699	Compuestos organoheterocíclicos	0.855					
706.122 3447	4.2444 916		C ₂₆ H ₃₃ N ₃ O ₁₇ S ₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.963	Aminoácidos y péptidos	0.919	(R/S)-NADHX, (6R/6S)-6beta-hidroxi-1,4,5,6-tetrahidronicotinamida-adenín dinucleótido	BioCyc, KEGG, ChEBI	683.135 3373	[M + Na] ⁺	C ₂₁ H ₃₁ N ₇ O ₁₅ P ₂
919.426 6637	6.3205 314		C ₅₄ H ₆₄ O ₁₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Triterpenoides	0.950					
						Poliquétidos	0.967					
						Lípidos fenólicos	0.911					
1041.42 6432	5.9710 183		C ₆₀ H ₆₆ O ₁₇	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.999	Poliquétidos	0.934	PIP3(18:0/16:1(9Z)); PIP3(16:0/18:1(11Z)); PIP3(16:0/18:1(9Z))	COCONUT	1076.44 047	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₄₃ H ₈₄ O ₂₂ P ₄
						Glúcidos	0.749					

Tabla A.8. Comparación de los metabolomas de Δ SCO2359/2358 y M145. Compuestos detectados con significación estadística en la comparación de los metabolomas de la cepa silvestre M145 y el mutante Δ SCO2359/2358. Las abreviaciones usadas en el encabezado son las siguientes: “exp.” corresponde a “experimental”, “Int. HPLC” hace referencia a la intensidad del compuesto en el cromatograma y “Prob.” significa “probabilidad”. El color gris en “Int. HPLC” (indicador cualitativo de la mayor presencia de los compuestos en una cepa u otra) corresponde a la cepa silvestre, y el azul oscuro, a Δ SCO2359/2358.

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
105.069 425	3.3505 373		C ₈ H ₈	[M + H] ⁺	1.000	Bencenoides	0.99	ácido 5,7-octadienoico	ChEBI	140.083 73	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₈ H ₁₂ O ₂
			C ₈ H ₁₂ O ₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000			ácido graso 8:2	ChEBI	140.083 73	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₈ H ₁₂ O ₂
122.095 9917	3.3649 724		C ₈ H ₈	[M + NH ₄] ⁺	1.000	Bencenoides	0.99	2-feniletilamina	BioCyc, KEGG, ChEBI	121.089 1494	[M + H] ⁺	C ₈ H ₁₁ N
151.038 6397	3.0367 708		C ₈ H ₈ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.992	Shikimatos y fenilpropanoides	0.870	Ácido homogentísico, Ácido 2,5-Dihidroxifenilacético	StreptomeDB, KEGG	168.042 2587	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₈ H ₈ O ₄
						Bencenoides	0.997	N-dimetiletanolamina fosfato, Demanil fosfato	BioCyc	169.050 3949	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₄ H ₁₂ NO ₄ P
						Ácidos fenilacéticos	0.772					
157.049 2308	2.3842 187							Ácido shikímico	ChEBI, COCONUT	174.052 8234	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₇ H ₁₀ O ₅
164.106 6474	3.3517 334		C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.724	Ácidos carboxílicos y derivados	0.999	N-Hexanoil-L-Homoserina lactona	KEGG, NPAtlas	199.120 8434	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃
						N-acetil-2-ariletilaminas	0.675					
			C ₈ H ₁₃ NO ₃ S		0.998	Aminoácidos y péptidos	0.956					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
186.057 9715	2.9940 946			[M - H ₂ O + H] ⁺		Compuestos organoheterocíclicos	0.851					
197.117 1405	4.0250 22		C ₁₁ H ₁₈ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Poliquétidos cíclicos	0.735	Germicidina A, Isogermicidina A	StreptomeDB, NPAtlas	196.109 9444	[M + H] ⁺	C ₁₁ H ₁₆ O ₃
						Cetonas	0.727					
217.085 7417	2.8571 73		C ₁₃ H ₁₄ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.980	Bencenoides	0.967	Dehidroxi-GTRI-02, 1-(3,8-Dihidroxi-1-metilnaftalen-2-il)etanona	StreptomeDB	216.078 6442	[M + H] ⁺	C ₁₃ H ₁₂ O ₃
								GTRI-02	StreptomeDB, ChEBI, NPAtlas	234.089 2089	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₃ H ₁₄ O ₄
223.107 5647	2.3869 123		C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₃	[M + H] ⁺	0.615	Dipéptidos	0.992	N5-fenil-L-glutamina	KEGG, ChEBI	222.100 4423	[M + H] ⁺	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₃
						Alcaloides	0.934	ciclo-(Ile-Ser)	ChEBI, NPAtlas	200.116 09	[M + Na] ⁺	C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₃
								Gly-Phe	ChEBI	222.100 44	[M + H] ⁺	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₃
								Ácido (R)-indol-3-láctico	ChEBI, COCONUT	205.073 8932	[M + NH ₄] ⁺	C ₁₁ H ₁₁ NO ₃
235.096 2727	3.0825 71		C ₁₃ H ₁₆ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.980	Isocumarinas	0.883	GTRI-02, 7-acetil-3,6-dihidroxi-8-metil-tetralona	StreptomeDB, NPAtlas	234.089 2089	[M + H] ⁺	C ₁₃ H ₁₄ O ₄
						Compuestos organoheterocíclicos	0.883					

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Compuestos carbonilo	0.897					
248.200 7452	4.0437 19		C ₁₆ H ₂₇ NO ₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.935	Alcaloides	0.815	Leu-Val o Ile-Val	ChEBI	230.163 04	[M + NH ₄] ⁺	C ₁₁ H ₂₂ N ₂ O ₃
						Ácidos grasos	0.742	N-Dodecanoil-DL-homoserina lactona	ChEBI, NPAtlas	283.214 7438	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₂₉ NO ₃
261.075 5538	3.1542 168		C ₁₄ H ₁₄ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Shikimatos y fenilpropanoides	0.865	Dehipoxantina futasolina	KEGG, ChEBI	296.089 6029	[M-2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₄ H ₁₆ O ₇
						Fenoles	0.770					
275.054 7553	3.7459 626		C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₃	[M + K] ⁺	0.605	Péptidos pequeños	0.987	Deoxirribonucleósido de purina, 2'-deoxinebularina	KEGG, ChEBI	236.090 9403	[M + K] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₃
276.170 3435	3.3120 084							Val-Pro-Pro	ChEBI	311.184 51	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₅ H ₂₅ N ₃ O ₄
								Lys-Phe	ChEBI	293.173 94	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₅ H ₂₃ N ₃ O ₃
277.143 3559	3.8914 73		C ₁₆ H ₂₀ O ₄	[M + H] ⁺	0.550	Bencenoides	0.922					
						Fenoles	0.791					
285.075 6049	3.7199 047		C ₁₆ H ₁₄ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.999	Shikimatos y fenilpropanoides	0.731	Dihidrokalafungina	StreptomeDB, KEGG, ChEBI	302.079 0382	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₆
	3.3607 519					Poliquétidos	0.834	Sek34, 2-hidroxi-5-[(4-hidroxi-6-oxopiran-2-il)metil]-2-metil-3H-cromen-4-ona	StreptomeDB	302.079 0382	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₆

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
	3.8901 274					Benzopiranos	0.805	THK-OH	StreptomeDB	320.089 605	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₆ O ₇
						Fenoles	0.922	DHK-OH; DHKred-OH	StreptomeDB, KEGG, ChEBI	320.089 6029	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₆ O ₇
								Dehidromutactina, 6-(4,5-Dihidroxi-2-metilnaphthalen-1-il)-4-hidroxi-2H-piran-2-ona	StreptomeDB	284.068 4735	[M + H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
299.257 9331	6.9025 836		C ₁₈ H ₃₆ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Ácidos grasos	0.999	Ácido cetosteárico, ácido 2-oxooctadecanoico	KEGG, COCONUT	298.250 7949	[M + H] ⁺	C ₁₈ H ₃₄ O ₃
						Monoacilgliceroles	0.996	Ácido 9,10-dihidroxiesteárico, ácido dihidroxiocetadecanoico	KEGG, ChEBI	316.261 3596	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₈ H ₃₆ O ₄
307.153 9212	3.7420 7		C ₁₇ H ₂₄ O ₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.986	Sesquiterpenoides	0.572					
315.049 8489	3.7569 606		C ₁₆ H ₁₂ O ₈	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Poliquétidos aromáticos cíclicos	0.817	Ribósido-5'-Monofosfato de purina, mononucleótido de purina	KEGG, COCONUT	332.052 1858	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ N ₄ O ₇ P
						Antraquinonas y antronas	0.858	dIMP, 2'-deoxiinosina 5'-fosfato	KEGG, ChEBI, COCONUT	332.052 1858	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ N ₄ O ₇ P
						Bencenoides	0.999					
315.133 8442	3.3970 752		C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.986	Alcaloides	0.809					
						Ácidos carboxílicos y derivados	0.949					

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
						Ácidos dicarboxílicos y derivados	0.700					
321.091 1589	3.0239 458		C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₄ S	[M + H] ⁺	0.755	Bencenoides	0.914					
323.102 5987	4.5077 333		C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.991	Alcaloides de triptófano	0.734	Asn-Cys-Ser	ChEBI	322.094 71	[M + H] ⁺	C ₁₀ H ₁₈ N ₄ O ₆ S
						Bencenoides	0.924					
333.217 1118	4.9837 804		C ₁₉ H ₃₀ N ₂ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Dipéptidos	0.884					
334.201 2739	6.1953 583		C ₁₉ H ₂₉ NO ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.839	Pseudoalcaloides (trasmidación)	0.893					
336.107 6584	3.0334 53		C ₁₆ H ₁₇ NO ₇	[M + H] ⁺	0.993	Alcaloides de ácido antranílico	0.984	Ala-His-Ala	ChEBI	297.143 7	[M + K] ⁺	C ₁₂ H ₁₉ N ₅ O ₄
336.107 7463	2.6380 312					Alcaloides de quinolina	0.879	SEK4b	NPAAtlas	318.074	[M + NH ₄] ⁺	C ₁₆ H ₁₄ O ₇
			C ₁₆ H ₁₄ O ₇	[M + NH ₄] ⁺	1.000	Benzopiranos	0.796	Met-Cys-Thr	ChEBI	353.107 91	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₁₂ H ₂₃ N ₃ O ₅ S ₂
						Shikimatos y fenilpropanoides	0.764					
						Naftoquinonas	0.928					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
366.181 2051	4.1702 003		C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.936	Aminoácidos y péptidos	0.934	Ala-Gln-Met	ChEBI	348.146 74	[M + NH ₄] ⁺	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₅ S
368.048 188	2.6597 779		C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	[M + K] ⁺	0.832	Azoles	0.889					
						Triazoles	0.767					
380.242 8769	3.8743 308											
384.079 5132	2.8499 3							Cys-His-Cys	ChEBI	361.087 85	[M + Na] ⁺	C ₁₂ H ₁₉ N ₅ O ₄ S ₂
400.139 2388	2.51		C ₂₁ H ₂₁ NO ₇	[M + H] ⁺	0.784	Bencenoides	0.949					
408.264 4611	5.4685 984		C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Alcaloides de triptófano	0.766	23-cetoundecilprodiginina	NPAAtlas	407.257 3	[M + H] ⁺	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₂
						Aminoácidos y péptidos	0.797					
412.259 2435	4.4332 666		C ₂₄ H ₃₅ N ₃ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.997	Aminoácidos y péptidos	0.946					
417.118 1167	2.7269 335		C ₂₁ H ₂₀ O ₉	[M + H] ⁺	1.000	Shikimatos y fenilpropanoides	0.926	Riboflavina reducida, dihidroriboflavina	KEGG, ChEBI	378.153 9	[M + K] ⁺	C ₁₇ H ₂₂ N ₄ O ₆
						Flavonoides	0.708					
						Fenilpropanoides y poliquétidos	0.890					

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
424.259 4324	4.6004 415		C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Ácidos carboxílicos y derivados	0.848					
						Bencenoides	0.920					
426.238 7732	6.7359 414		C ₂₄ H ₃₃ N ₃ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.971	Aminoácidos y péptidos	0.880					
426.275 0874	5.5478 816		C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Aminoácidos y péptidos	0.838					
440.159 8541	3.7242 644		C ₁₈ H ₂₇ N ₅ O ₇ S	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.970	Nucleósidos	0.923					
						Aminoácidos y derivados	0.815					
442.270 0047	3.9178 498		C ₂₅ H ₃₇ N ₃ O ₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.929	Aminoácidos y péptidos	0.943					
448.102 911	3.3982 835		C ₂₄ H ₁₇ NO ₈	[M + H] ⁺	0.918	Cumarinas	0.763					
						Ácidos carboxílicos y derivados	0.998					
						Alfa amino ácidos y derivados	0.713					
450.118 5908	3.0795 39		C ₂₄ H ₂₁ NO ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.998	Fenilpirrolidinas	0.906					
457.185 9329	4.4297 833		C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O ₇	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.605	Nucleósidos de purina	0.961	Ile-Thr-Trp	ChEBI	418.221 62	[M + K] ⁺	C ₂₁ H ₃₀ N ₄ O ₅

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
			C ₂₅ H ₂₈ O ₈	[M + H] ⁺	0.955	Cumarinas	0.711					
						Compuestos organoheterocíclicos	0.961					
462.085 451	3.7952 25		C ₁₇ H ₂₁ N ₅ O ₆ S	[M + K] ⁺	0.739	β-lactámicos	0.977					
						Aminoácidos y péptidos	0.966					
						N-acil-alfa aminoácidos y derivados	0.772					
463.123 7134	2.9647 167		C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M + H] ⁺	1.000	Florooglucinoles	0.752					
						Glucósidos fenólicos	0.919					
506.144 995	3.8910 334		C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₁ 2	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Aminoácidos y péptidos	0.794					
						N-acil-alfa aminoácidos y derivados	0.707					
507.309 9168	5.7297 37		C ₂₁ H ₄₄ N ₆ O ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.429	Ácidos grasos	0.773					
						Aminoácidos y derivados	0.851					
						N-acil-alfa aminoácidos y derivados	0.756					
509.155 7839	3.8888 168											

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
554.238 8703	6.4351 06		C ₂₆ H ₄₁ N ₃ O ₇ S ₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.519	Aminoácidos y péptidos	0.980					
						Poliquétidos lineares	0.729					
						Tiazoles	0.939					
562.335 2166	6.7217 355											
587.118 4028	6.1968 803											
615.113 5248	4.1348 5		C ₃₂ H ₂₄ O ₁₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Poliquétidos	0.802	Γ'-actinorrodina	StreptomeDB, COCONUT	632.116 61	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₄
						Benzopiranos	0.782	E'-actinorrodina	StreptomeDB	648.111 5201	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₅
615.149 6736	4.3100 72		C ₃₃ H ₂₈ O ₁₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Flavonoides	0.905					
						Flavonas	0.882					
631.108 2895	4.8626 623		C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.993	Poliquétidos	0.771	ε-actinorrodina	StreptomeDB, COCONUT	648.111 5201	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅
						Bisnaftalenos	0.769	Ácido actinorródico	StreptomeDB, COCONUT	666.122 08	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₆
						Compuestos organoheterocíclicos	0.856	γ-actinorrodina	StreptomeDB, COCONUT	630.100 9554	[M + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₂ O ₁₄

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
637.155 2736	2.8821 332		C ₃₂ H ₂₈ O ₁₄	[M + H] ⁺	1.000	Flavonoides	0.921					
						Flavonas	0.865					
651.133 697	4.6027 6		C ₃₂ H ₂₈ O ₁₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Compuestos organoheterocíclicos	0.846	E'-actinorrodina	StreptomeDB	650.127 1701	[M + H] ⁺	C ₃₂ H ₂₆ O ₁₅
666.145 0483	4.5407 5		C ₂₉ H ₃₃ N ₅ O ₇ S ₂	[M + K] ⁺	0.789	Oligopéptidos	0.994	ε-actinorrodina	StreptomeDB, COCONUT	648.111 5201	[M + NH ₄] ⁺	C ₃₂ H ₂₄ O ₁₅
690.066 8304	2.9037 375		C ₂₈ H ₂₁ N ₅ O ₁ 4	[M + K] ⁺	0.232	Ácidos carboxílicos y derivados	0.950					
						Aminoácidos y derivados	0.724					
708.540 646	6.2366 357		C ₄₁ H ₇₅ NO ₉	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.965	Glucosfingolípidos neutros	0.975	GlcCer(d15:1/18:0)	ChEBI	685.549 27	[M + Na] ⁺	C ₃₉ H ₇₅ NO ₈
723.084 0352	5.5786 62		C ₃₄ H ₂₄ N ₂ O ₁ 4	[M + K] ⁺	0.310	Nucleósidos	0.801					
						Ácidos benzoicos y derivados	0.893					
748.097 4603	4.6161 375		C ₂₈ H ₂₇ N ₇ O 15S2	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.375	Cefalosporinas	0.912					
						N-acil-alfa aminoácidos y derivados	0.995					
750.112 5536	4.8536 167		C ₂₁ H ₃₆ N ₇ O ₁ 6P ₃ S	[M - H ₂ O + H] ⁺	1.000	Nucleósidos, nucleótidos y análogos	0.752	coenzima A	BioCyc, KEGG, ChEBI, COCONUT	767.115 2103	[M - H ₂ O + H] ⁺	C ₂₁ H ₃₆ N ₇ O ₁₆ P ₃ S

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
			C ₃₄ H ₂₅ N ₅ O ₁ S	[M + Na] ⁺	0.835	Azobencenos	0.633					
752.128 6215	4.5461 707		C ₂₈ H ₃₉ N ₃ O ₁ S ₄	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.504	Oligopéptidos	0.913					
			C ₂₇ H ₃₁ N ₅ O ₁ S	[M + K] ⁺	0.359	Ácidos carboxílicos y derivados	0.909					
785.207 8447	5.4299 774											
866.294 9199	3.9618 444											
869.374 11	6.3217 97		C ₄₂ H ₆₀ O ₁₉	[M + H] ⁺	0.996	Glúcidos	0.938					
						Compuestos O-glucosílicos	0.751					
947.166 6329	4.2298 245		C ₄₈ H ₃₆ O ₂₂	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.560							
			C ₄₃ H ₄₀ O ₂₂	[M + K] ⁺	0.292	Shikimatos y fenilpropanoides	0.947					
						Fenilpropanoides y poliquétidos	0.788					
963.161 5122	4.4847 9		C ₄₈ H ₃₆ O ₂₃	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.859	Compuestos organoheterocíclicos	0.984					

ANEXOS

m/z exp.	RT exp.	Int. HPLC	Fórmula SIRIUS	Aducto SIRIUS	ZodiacScore SIRIUS	Tipo de molécula (NPC y ClassyFire)	Prob. SIRIUS	Posibles candidatos	Bases de datos	Masa	Aducto posible	Fórmula candidatos
1023.41 589	6.9103 5		C ₄₄ H ₆₄ N ₈ O ₂ 1	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.997	Oligopéptidos	0.999					
						Lipopéptidos	0.835					
						Desipéptidos cíclicos	0.882					
			C ₆₀ H ₆₄ O ₁₆	[M - H ₂ O + H] ⁺	0.959	Poliquétidos	0.934					
1041.42 6432	6.9270 334		C ₆₀ H ₆₄ O ₁₆	[M + H] ⁺	1.000	Poliquétidos	0.934	PIP3(18:0/16:1(9Z)), PIP3(16:0/18:1(11Z)), PIP3(16:0/18:1(9Z))	COCONUT	1076.44 047	[M - 2H ₂ O + H] ⁺	C ₄₃ H ₈₄ O ₂₂ P ₄
						Macrólidos	0.721					
1063.40 8922	6.9778 085		C ₄₂ H ₇₂ O ₂₉	[M + Na] ⁺	0.436			2,3-didehidropristanol-CoA	ChEBI	1045.37 617	[M + NH ₄] ⁺	C ₄₀ H ₇₀ N ₇ O ₁₇ P ₃ S

