



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



Instituto de Biología
Funcional y Genómica

Estudio de la bacterioferritina Bfr codificada por el gen *SCO2113* de
Streptomyces coelicolor

Study of the bacterioferritin Bfr encoded by the gene *SCO2113* of
Streptomyces coelicolor



Trabajo Fin de Grado nº **20TFG406**

Grado en Biotecnología

Curso 2019-2020

Javier García Martín

DNI:04866458R

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La bacterioferritina Bfr, codificada por el gen *SCO2113* de *Streptomyces coelicolor*, está implicada en la producción de antibióticos por este organismo^[1]. En este trabajo, se ha estudiado el efecto que la sobreexpresión de este gen ejerce sobre la diferenciación morfológica y sobre la producción de los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina. Se ha valorado la respuesta del promotor de este gen a hierro y se ha estudiado su expresión en *Escherichia coli* bajo el control del promotor T7. Por otro lado, también se ha estudiado la respuesta al estrés oxidativo del mutante delecionado en el gen correspondiente (Δbfr). Los resultados han mostrado una reducción en la síntesis de los antibióticos estudiados en condiciones de sobreexpresión del gen y se ha comprobado que el promotor de la bacterioferritina no responde directamente a la concentración de hierro. La expresión del gen *bfr* en *E. coli* nos permitió purificar gran cantidad de esta proteína y observar que forma agregados al mantenerse a 4 °C durante al menos 2 días. Por último, el ensayo de estrés oxidativo ha revelado una mayor sensibilidad del mutante Δbfr al peróxido de hidrógeno.

Palabras clave: *Streptomyces*, bacterioferritina, hierro, antibióticos, estrés oxidativo

ABSTRACT AND KEYWORDS

The bacterioferritin Bfr, encoded by the gene *SCO2113* of *Streptomyces coelicolor*, is involved in antibiotics production by this organism^[1]. In this work, the effect of overexpression of this gene in morphological differentiation and actinorhodin and undecylprodigiosin antibiotics production has been studied. The response to iron of the promoter of this gene has been observed and its expression in *Escherichia coli* under the control of T7 promoter has been studied. Furthermore, the response to oxidative stress of the deletion mutant in the corresponding gene (Δbfr) has also been analyzed. Results have shown a reduction in the synthesis of the studied antibiotics under gene overexpression conditions and it has been checked that the bacterioferritin promoter does not respond directly to iron concentration. The *bfr* gene expression in *E. coli* allowed us to purify a big quantity of this protein and observe that it forms aggregates when it is kept at 4 °C during at least 2 days. Finally, the oxidative stress assay has revealed an increased sensitivity of the Δbfr mutant to oxygen peroxide.

Keywords: *Streptomyces*, bacterioferritin, iron, antibiotics, oxidative stress

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Bacterias del género <i>Streptomyces</i>	4
1.2 Relación entre el hierro y el metabolismo secundario.....	5
1.3 Homeostasis del hierro en <i>Streptomyces</i>	5
1.3.1 Bacterioferritinas	6
1.3.2 Sistemas de dos componentes bacterianos y hierro	8
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	10
3. MATERIALES.....	11
3.1 Microorganismos utilizados	11
3.2 Plásmidos utilizados	11
3.3 Medios de cultivo utilizados.....	11
3.3.1 Antibióticos añadidos a los medios.....	12
4. METODOLOGÍA	13
4.1 Manipulación de ácidos nucleicos e introducción en microorganismos	13
4.1.1 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	13
4.1.2 Aislamiento de plásmidos	13
4.1.3 Transformación de <i>Streptomyces coelicolor</i>	13
4.2 Análisis de la morfología y producción de antibióticos	13
4.2.1 Caracterización fenotípica en medio sólido de la sobreexpresión de <i>bfr</i>	13
4.2.2 Cuantificación de actinorrodina y undecilprodigiosina	14
4.2.3 Extracción de compuestos con metanol y análisis por HPLC.....	14
4.2.4 Conservación de cepas	14
4.3 Estudio del comportamiento ante el estrés oxidativo	15
4.3.1 Obtención de esporas de <i>S. coelicolor</i>	15
4.3.2 Ensayos de tolerancia a peróxido de hidrógeno	15
4.4 Estudio del promotor de <i>bfr</i>	15
4.4.1 Crecimiento en medio sólido de colonias que sobreexpresan <i>bfr</i>	15
4.4.2 Cultivos en medio líquido con distintas concentraciones de hierro	16
4.4.3 Precipitación de proteínas con 10 % ácido tricloroacético (TCA).....	16
4.4.4 Electroforesis de proteínas SDS-PAGE	16
4.5 Producción y purificación de Bfr en <i>Escherichia coli</i>	17
4.5.1 Cultivo de células e inducción de la producción de proteína.....	17
4.5.2 Lisis celular de <i>E. coli</i> en molino criogénico	17
4.5.3 Purificación de la proteína.....	17
4.6 Programas informáticos utilizados y bases de datos	18
5. RESULTADOS.....	19

5.1	Sobreexpresión de <i>bfr</i> : estudio fenotípico y producción de compuestos	19
5.2	Estudio del promotor de <i>bfr</i> bajo distintas concentraciones de hierro en el medio.....	21
5.3	Producción y purificación de Bfr en <i>E. coli</i>	24
5.4	Tolerancia al peróxido de hidrógeno de las cepas de <i>S. coelicolor</i> M145 y Δbfr	26
6.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	28
7.	CONCLUSIONES	30
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Bacterias del género *Streptomyces*

Las bacterias del género *Streptomyces* son bacterias Gram-positivas que pertenecen al grupo de las actinobacterias. Son bacterias abundantes en el suelo que, de forma similar a los hongos, crecen mediante hifas filamentosas. Su ciclo de vida se inicia con un tubo de germinación que emerge de una espora, el cual generará una hifa que se irá ramificando y formará una red de filamentos que conforman el micelio vegetativo. Este micelio ancla la colonia de células al sustrato y en él las células replican su material genético sin tabicarse cada vez, de manera que las hifas tienen varias copias del cromosoma bacteriano. Cuando hay escasez de nutrientes, se genera el micelio aéreo, de hifas no ramificadas cubiertas de una capa hidrofóbica, cuyas hifas se convertirán en esporas unigenómicas, mediante un proceso de compartimentalización muy regulado^[2].

Este género de bacterias con un alto contenido en G+C (de más del 70 %)^[3] es conocido por su gran capacidad de producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios. Los análisis genómicos y metagenómicos han demostrado que en *Streptomyces* hay una gran variedad de genes de rutas biosintéticas de metabolitos secundarios, por lo que estas bacterias están siendo muy estudiadas, sobre todo ante la necesidad de encontrar nuevos antibióticos y nuevas moléculas con aplicación médica^[4].

Streptomyces coelicolor A3(2) se ha usado como organismo modelo para estudiar a este género y establecer el ciclo de desarrollo (Figura 1) y la regulación en la producción de antibióticos. Presenta un genoma con un cromosoma lineal de unas 8,7 Mb^[3]. Entre los antibióticos que produce se encuentran dos moléculas pigmentadas, la actinorrodina (ACT), azul a pH básico y roja en medio ácido ($\text{pH} < 3$), y la undecilprodigiosina (RED), de color rojo, lo cual permite, mediante visualización del color de las colonias y halos generados, estudiar el papel fisiológico de los antibióticos^[4] y el efecto en la producción de estos metabolitos al generar mutantes o sobreexpresar genes.

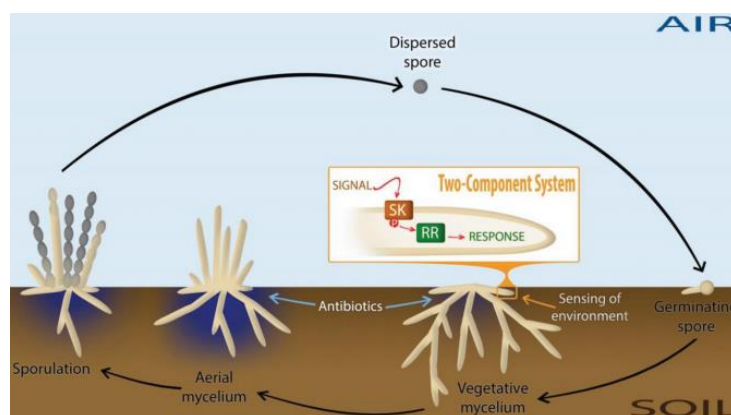


Figura 1. Representación del ciclo de vida de *Streptomyces* en medio sólido y de la percepción de señales por sistemas de dos componentes (TCS). Tomado de Urem et al., 2016^[5].

1.2 Relación entre el hierro y el metabolismo secundario

El hierro es un elemento necesario en los seres vivos para muchos procesos, como la replicación del DNA o la respiración. Suele actuar como cofactor de enzimas implicadas en procesos esenciales de la célula^[6].

En *Streptomyces* hay evidencias de que el hierro tiene un papel importante en el desarrollo y el metabolismo secundario. Al limitar la disponibilidad de hierro, la formación de micelio aéreo se retrasa y se altera la expresión de genes del desarrollo. En estas condiciones se induce la expresión del *cluster* biosintético de la desferrioxamina E (un sideróforo), cuya delección conlleva un crecimiento y desarrollo anormal. También, en condiciones limitantes de hierro, en *S. coelicolor* y otras especies, la producción de metabolitos secundarios, en general, se ve alterada, aunque los mecanismos moleculares aún se desconocen^[7]. La delección del gen *desE*, que codifica un receptor para desferrioxamina E, disminuye la síntesis de ACT y afecta severamente al crecimiento y la esporulación^[8].

La producción de antibióticos también está influenciada por los reguladores del metabolismo del hierro, como se detalla posteriormente en el apartado “Homeostasis del hierro en *Streptomyces*”.

Además de los sideróforos, algunos metabolitos secundarios aumentan cuando *Streptomyces* crece en condiciones limitantes de hierro, como es el caso del antibiótico ACT, cuyo aumento en la síntesis es mayor si se establece una competencia por el hierro con otro organismo, como se ha visto con *Myxococcus xanthus*. Este aumento puede deberse también a que la ACT, por su estructura, es capaz de actuar como quelante de hierro. Dado que los sideróforos producidos por *Streptomyces* pueden ser utilizados por otros organismos, se activa la síntesis de otros metabolitos con actividad antimicrobiana y de captación de hierro para permitir la supervivencia en ese ambiente pobre en hierro^[9].

1.3 Homeostasis del hierro en *Streptomyces*

El hierro puede presentarse en dos formas iónicas: Fe^{2+} , soluble en agua, y Fe^{3+} , insoluble. A pesar de su carácter esencial en los procesos celulares, el ion Fe^{2+} puede reaccionar con el oxígeno molecular y generar especies reactivas de oxígeno (ROS), de forma que las bacterias deben tener un riguroso control de la homeostasis del hierro en su interior para evitar la toxicidad^[6].

En bacterias Gram-positivas con alto contenido en G+C, la homeostasis del hierro está regulada por los reguladores de la familia DtxR (*Diphtheria toxin Regulator*) a diferencia de otras bacterias como las Gram negativas, en las que lo hace el regulador Fur (*Ferric uptake regulator*)^[10]. En condiciones de escasez de Fe^{2+} , el regulador está inactivo, y al unirse a este ion cuando su concentración es suficiente, el regulador dimeriza y se une a regiones promotoras con secuencias conservadas de 19

pares de bases, denominadas *iron boxes*, para reprimir la expresión de genes relacionados con la toma de hierro (y evitar, así, un exceso del nivel intracelular), aunque también modula la expresión de genes relacionados con otros procesos celulares. Los reguladores Fur y DtxR actúan, normalmente, como represores de la transcripción. *S. coelicolor* contiene dos homólogos de este regulador DtxR, DmdR1 y DmdR2 (cuyo gen está silenciado cuando el gen *dmdR1* se expresa), que se unen a sus correspondientes *iron boxes*, cuya secuencia consenso para ambos reguladores es 5'-TTAGGTTAGGCTCACCTAA-3'^[7]. El mecanismo molecular de actuación de estos reguladores es poco conocido. La delección de *dmdR1* conlleva una menor producción de antibióticos pigmentados, pero no se conoce el mecanismo por el que este regulador actúa en el metabolismo secundario^[10]. Existe, además, un gen antiparalelo a *dmdR1* en *S. coelicolor*, *adm*, que es esencial para la producción de desferrioxamina y que actúa como regulador negativo de la síntesis de antibióticos^[11].

En *Streptomyces avermitilis*, el homólogo de DmdR1, IdeR, es activado cuando hay suficiente hierro intracelular y reprime la expresión de genes relacionados con la toma de hierro (síntesis de sideróforos, transporte) y activa la síntesis de la bacterioferritina para guardar el hierro del citoplasma y evitar el estrés oxidativo. Los genes con los que interacciona IdeR poseen un motivo *iron box* en su promotor. Este regulador controla también genes involucrados en el metabolismo del hierro y activa genes involucrados en la esporulación y en la producción de avermectina^[10].

Las proteínas de la familia de las ferritinas, entre las que se incluyen las bacterioferritinas, tienen un papel primordial en la homeostasis de este elemento y en evitar el estrés oxidativo.

1.3.1 Bacterioferritinas

Las ferritinas constituyen una superfamilia de proteínas encontradas en eucariotas y procariotas de 24 subunidades, cada una con estructura de 4 α -hélices (Figura 2), que se agrupan para formar una estructura esférica con canales hacia el exterior y con una cavidad de aproximadamente 80 Å de diámetro. Su función en las células es la oxidación de Fe^{2+} usando O_2 o peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la acumulación de Fe^{3+} en su interior. Las bacterias tienen, normalmente, dos tipos de ferritinas: las ferritinas bacterianas (Ftn) y las bacterioferritinas (Bfr), siendo estas últimas exclusivas de bacterias. Aunque tienen estructura cuaternaria similar y están formadas por subunidades de cuatro hélices, las ferritinas bacterianas y bacterioferritinas tienen poca homología de secuencia, entre ellas y con ferritinas eucariotas. Otra diferencia es que las bacterioferritinas poseen 12 grupos hemo en las interfases entre subunidades, lo cual no ocurre en ferritinas^[6].

El mecanismo por el cual las proteínas de esta familia acumulan hierro implica la oxidación de dos iones Fe^{2+} mediante O_2 o H_2O_2 en el centro ferroxidasa y la transferencia de electrones desde otro ion

de Fe^{2+} y una tirosina (la cual recupera su electrón de otro ion Fe^{2+}) a dicho centro. Los iones del centro ferroxidasa recuperan su estado reducido para iniciar otro ciclo, mientras que los iones Fe^{3+} formados se almacenan en el núcleo proteico^[12].

La liberación del hierro de las ferritinas requiere la reducción de los iones Fe^{3+} y que los iones Fe^{2+} formados atraviesen los canales hasta otra proteína receptora. Los electrones son proporcionados por pequeñas moléculas, como flavina o quinol, y la molécula aceptora de hierro suele ser ferrozina o bipyridilo. La fuerza principal de la liberación del hierro es la formación del complejo aceptor- Fe^{2+} . En *Pseudomonas aeruginosa* se ha identificado una ferredoxina asociada a bacterioferritina (Bfd), que contiene un núcleo 2Fe-2S, que se posiciona cerca del grupo hemo para proporcionar los electrones necesarios y captar el hierro^[12].

Estas proteínas, además, poseen un papel en la eliminación de ROS. Algunas ferritinas son inducidas ante estrés oxidativo y podrían actuar proporcionando Fe^{2+} , que es oxidado directamente para contrarrestar a las ROS y eliminar el exceso de iones Fe^{2+} , o usado para sintetizar enzimas como la catalasa^[12].

Se desconoce por qué varias bacterias tienen dos sistemas de almacenamiento de hierro (ferritina y bacterioferritina), pero hay evidencias de que las ferritinas y bacterioferritinas tienen distintos papeles fisiológicos. Por ejemplo, en *E. coli* la ferritina es la principal fuente de acumulación de hierro, mientras que en *Salmonella enterica* lo es la bacterioferritina. En *P. aeruginosa*, la bacterioferritina codificada por el gen *bfrB* es quien controla, junto a la ferredoxina, la homeostasis del hierro, mientras que la ferritina codificada por el gen *ftnA* tiene una función desconocida pero posiblemente relacionada con el estrés oxidativo, pues su gen es adyacente al gen *katA* que codifica una hemo catalasa^[13].

En *Streptomyces* no hay ferritinas, siendo las bacterioferritinas los mecanismos de almacenamiento de hierro. En *S. coelicolor* la bacterioferritina codificada por el gen *SCO2113* fue cristalizada por Jobichen et al. (<https://www.rcsb.org/structure/5XX9>) y sus datos fueron depositados en la base de datos *Protein Data Bank* en 2017 (Figura 2). Sin embargo, no hay publicaciones sobre esta proteína.

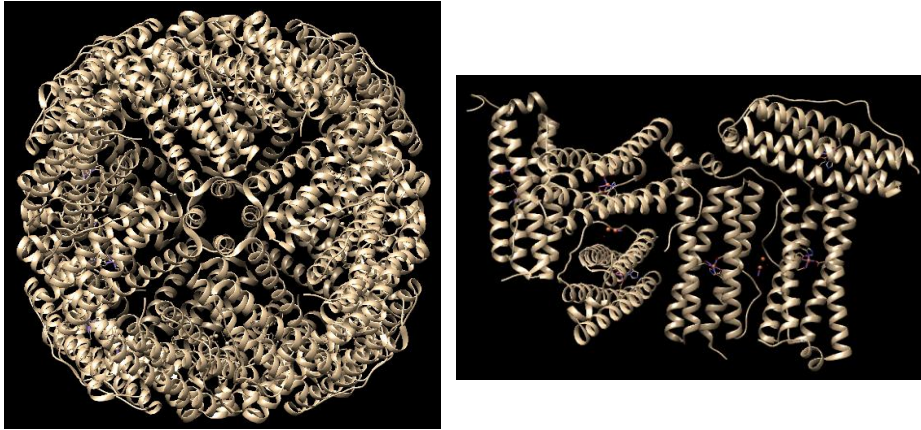


Figura 2. Bacterioferritina codificada por el gen *SCO2113* de *S. coelicolor* completa (izquierda) y conjunto de seis subunidades (derecha). Imagen extraída con el programa *Chimera 1.14*. PDB: 5XX9.

1.3.2 Sistemas de dos componentes bacterianos y hierro

En *Streptomyces* los sistemas de dos componentes (TCS) tienen un papel primordial como sistema de regulación y captación de señales del entorno (Figura 1), lo cual incluye la regulación de la síntesis de antibióticos y la detección del hierro.

Los TCS bacterianos son unos sistemas de regulación muy importante en los procariotas que permiten a las células detectar cambios en su entorno (cambios en los nutrientes, presión osmótica, presencia de antibióticos, pH...) y responder a estos cambios para adaptarse a las diferentes situaciones mediante la modificación de la expresión génica. La señal que activa estos TCS en muchos casos es desconocida^[14].

La primera proteína que actúa como sensor en los TCS es una histidina kinasa (HK) de membrana homodimérica, que recibe una señal en su extremo N-terminal (*input domain*), y es autofosforilada en un residuo de histidina conservado de su extremo C-terminal, ubicado en el citoplasma (*output domain*). Esta proteína fosforilada puede transmitir su grupo fosfato a un residuo de aspártico del extremo N-terminal de un regulador de respuesta (RR) homodimérico citoplasmático (*input domain*), lo cual resulta en la activación de su dominio C-terminal por su cambio de conformación (*output domain*). Esta proteína es la que completa la señalización actuando a nivel de expresión génica (Figura 3). A veces puede haber más de dos componentes implicados, como proteínas intermediarias que transfieran el fosfato desde la HK hasta el RR u otras proteínas necesarias para el funcionamiento de la HK o que actúen como otro RR^[14]. La desfosforilación de estos reguladores es llevada a cabo por fosfatasas o, a veces, por la propia HK como medida para atenuar la señal cuando el estímulo ha cesado y para evitar reacciones cruzadas entre varios TCS, aunque en ocasiones estos sistemas intervienen en más de una ruta^[15].

Esta interacción entre la HK y el RR es muy específica y normalmente sus genes se encuentran contiguos en el genoma construyendo una unidad transcripcional u operón. No obstante, existen también reguladores huérfanos, que no poseen en el genoma una HK o RR cercano^[14].

La adaptación de *Streptomyces* a los diversos entornos donde habita este género es posible gracias a los múltiples TCS que posee, lo que le permite adaptarse a múltiples situaciones de estrés. En el genoma de *S. coelicolor* hay 68 TCS emparejados, 17 HK huérfanas y 13 RR huérfanos. Estos TCS están implicados tanto en el desarrollo de *Streptomyces*, como en la diferenciación de las hifas y en el metabolismo primario y secundario, lo que incluye la producción de los antibióticos RED, ACT y el antibiótico dependiente de calcio (CDA). A pesar de la gran cantidad de estos sistemas encontrados en estos actinomicetos, la función de la mayoría de ellos sigue siendo desconocida^[16].

El TCS AbrA (AbrA1/AbrA2), descrito por el grupo en el que me he incorporado, regula negativamente la producción de antibióticos en *S. coelicolor* y responde a señales de hierro del medio^[17]. Los mutantes de delección de los genes del sistema AbrA muestran una sobreexpresión de genes relacionados con la toma y el aprovechamiento del hierro, como los genes de síntesis de la desferrioxamina (SCO2782-2783), activados en ausencia de hierro, genes de proteínas transportadoras de hierro y antibióticos (se han descrito transportadores de sideróforos que también transportan antibióticos) y flavohemoproteínas (SCO7094 y SCO7428) que reducen el Fe³⁺ del complejo hierro-sideróforo a Fe²⁺. Las desferrioxaminas añadidas al medio pueden estimular el desarrollo de *Streptomyces* y la síntesis de metabolitos secundarios, de forma que el aumento de estas sustancias por la ausencia del regulador AbrA induce la síntesis de antibióticos^[17].

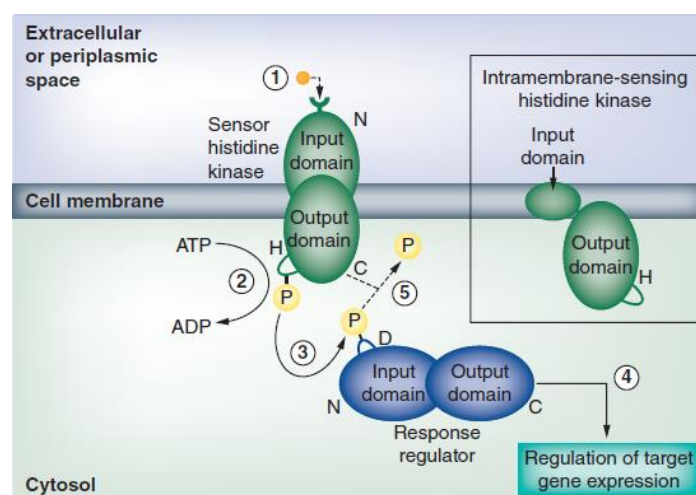


Figura 3. Esquema del funcionamiento de un TCS bacteriano. Tomado de Tierney and Rather, 2019^[14].

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El laboratorio en el que me incorporé está trabajando en los TCS de *S. coelicolor*, dada su importancia en la producción de antibióticos. Como ya se ha mencionado, en este microorganismo, el TCS AbrA1/AbrA2 actúa como regulador negativo de la producción de antibióticos y la diferenciación. Además, se demostró que el operón *AbrA* responde a hierro^[18] y que mutantes de delección en este TCS poseían menor expresión de la bacterioferritina^[17]. Por otra parte, se demostró que el gen de la bacterioferritina (*SCO2113*) era regulado directamente por el RR AbrC3 que forma parte del TCS AbrC, también estudiado por el grupo. Este sistema, formado por dos HK, AbrC1 y AbrC2, y un RR, AbrC3, activa la producción de antibióticos. Mutantes deficientes en el regulador AbrC3 tienen menor expresión de varios genes, entre ellos el de la bacterioferritina, cuyo promotor es diana directa de este regulador^[19]. *SCO2113* es, además, sobreexpresado en los mutantes carentes de Aor1, un RR huérfano y regulador positivo de la producción de antibióticos también estudiado por el grupo^[20]. Todos estos estudios previos ponen de manifiesto que la bacterioferritina parece poseer un papel relevante en la producción de antibióticos, dado que siempre está desregulada con todos los TCSs estudiados en el grupo.

Posteriormente, en un trabajo previo realizado en el laboratorio, se caracterizó el mutante de delección de *S. coelicolor* en la bacterioferritina, Δbfr , que mostró una menor producción de antibióticos, un retraso en la diferenciación del micelio aéreo y un mayor crecimiento, en comparación con la cepa silvestre^[1]. Dicho trabajo demostró la existencia de una relación entre el gen *bfr* (*SCO2113*) y la síntesis de antibióticos.

El objetivo de este trabajo es ahondar en aspectos de la bacterioferritina, Bfr, que no se abordaron en el trabajo anterior. Se ha estudiado el efecto de la sobreexpresión del gen *bfr* en la diferenciación morfológica y en la producción de antibióticos. También se ha analizado el promotor de dicho gen y su respuesta a la concentración de hierro y se ha expresado el gen *bfr* en *E. coli*. Por otro lado, se estudió también el comportamiento del mutante Δbfr ante el estrés oxidativo generado por la presencia de peróxido de hidrógeno en el medio de cultivo.

3. MATERIALES

3.1 Microorganismos utilizados

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	Cepa silvestre; SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻	[3]
<i>S. coelicolor</i> M145 Δbfr	Derivada de <i>S. coelicolor</i> M145; $\Delta SCO2113$	[1]
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , $\phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYAargF)U169$, <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>	[21]
<i>E. coli</i> ET1257	<i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>hsdS</i> , <i>cat</i> , <i>tet</i>	[22]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Cepa B de <i>E. coli</i> F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ^S)	[23]

3.2 Plásmidos utilizados

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pN702GEM3	Vector bifuncional <i>E. coli</i> – <i>Streptomyces</i> de alto número de copias, resistencia a neomicina.	[25]
pNX4	Derivado del pN702GEM3 con expresión de xilanasa troncada Xys1 bajo el control del promotor <i>xysA</i> de <i>Streptomyces halstedii</i> .	[26]
pNB4	Derivado del pNX4 con Xys1 bajo el control del promotor de <i>bfr</i> .	[1]
pNBfr	Derivado del pN702GEM3 con <i>bfr</i> bajo el control de su propio promotor.	[1]
pET-22b(+)	Vector para expresar proteínas con cola 6xHis en extremo N-terminal, alto número de copias, resistencia a ampicilina.	Quiagen
pET22Bfr	Derivado del pET-22b(+) con el gen <i>bfr</i> bajo el control del promotor T7.	[1]

3.3 Medios de cultivo utilizados

Cuando los medios de cultivo descritos a continuación se utilizaron de forma sólida se añadió agar al 2%. Todos ellos fueron esterilizados en autoclave antes de su uso.

- Medio R2YE: sacarosa 103 g/L, Cl₂Mg·6 H₂O 10 g/L, K₂SO₄ 0,25 g/L, glucosa 10,12 g/L, casaminoácidos 0,1 g/L, TES 5,73 g/L, extracto de levadura 5 g/L, elementos traza* 2 mL/L, pH 7,2. Después de autoclavar se añadió, por cada 100 mL: KH₂PO₄ 0,5 %, 1 mL, CaCl₂·2 H₂O 5 M, 0,4 mL, L-prolina 20 %, 1,5 mL^[27]. Medio de cultivo de uso general para *Streptomyces*.

* Elementos traza para R2YE (en un litro de agua): $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200 mg, ZnCl_2 40 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10 mg.

- Medio NMMP: $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 g/L, casaminoácidos 5 g/L, elementos traza** 1 mL/L, pH 7,2. Después de autoclavar se añadió, por cada 100 mL: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M pH 6,8, 4,5 mL y glucosa 40 %, 1,25 mL^[28]. Medio mínimo utilizado para visualización del fenotipo y el crecimiento, en el cual el hierro queda a una concentración de 3,6 μM .

** Elementos traza para NMMP (en un litro de agua): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 1 g y CaCl_2 1 g. El hierro queda a una concentración de 3,6 mM.

- Medio NMMP con bajo hierro: misma receta que el NMMP pero los elementos traza tienen una concentración de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ de 10 μM (se añaden 2,8 mg/L de este reactivo en estos elementos traza) frente a 3,6 mM que tienen los elementos traza normales, de forma que el medio tiene una concentración final de hierro de 10 nM. Medio mínimo utilizado para la visualización del fenotipo y el crecimiento con bajas cantidades de hierro.

- Medio TSB: peptona de caseína 17 g/L, peptona de soja 3 g/L, NaCl 5 g/L, K_2HPO_4 2,5 g/L, dextrosa 2,5 g/L, pH 7,3^[28]. Medio rico utilizado para crecimiento rápido de microorganismos.

- Medio LB: bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7,5^[21]. Medio de cultivo de uso general.

- Medio SFM o MSA (Manitol Soja Agar): medio preparado con agua de grifo: manitol 20 g/L, harina de soja 20 g/L^[27]. Medio de esporulación.

- Medio YEPD: extracto de levadura 10 g/L, glucosa 10 g/L, peptona 20 g/L^[29]. Medio para el recuento de esporas.

3.3.1 Antibióticos añadidos a los medios

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN FINAL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Ampicilina	100
Kanamicina	50
Neomicina	20

4. METODOLOGÍA

4.1 Manipulación de ácidos nucleicos e introducción en microorganismos

4.1.1 Transformación de *Escherichia coli*

Para la introducción de plásmidos en *E. coli* se siguió un protocolo de choque térmico establecido por Hanahan^[30]. Se emplearon las cepas DH5 α para obtener cantidad suficiente de los plásmidos, BL21(DE3) para producir bacterioferritina y ET1257 para desmetilar dichos plásmidos antes de transformar *S. coelicolor*. Las células transformadas fueron sembradas en medio sólido con el antibiótico correspondiente (ampicilina o kanamicina) para seleccionar aquellas que incorporaron el plásmido.

4.1.2 Aislamiento de plásmidos

Los plásmidos fueron aislados desde *E. coli* mediante el kit comercial *Plasmid DNA Purification NucleoSpin (Macherey-Nagel)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos fueron comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % teñidos con bromuro de etidio.

4.1.3 Transformación de *Streptomyces coelicolor*

La transformación de *S. coelicolor* se llevó a cabo a partir de protoplastos y de plásmidos desmetilados (purificados previamente de *E. coli* ET1257) según un método descrito por Kieser et al.^[27]. Las células transformadas se sembraron en medio R2YE y se incubaron a 28 °C. Al día siguiente a la transformación, se añadió una cobertera de agua con neomicina, de forma que el antibiótico quedara a la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$, para seleccionar aquellas células que incorporaron el plásmido.

4.2 Análisis de la morfología y producción de antibióticos

4.2.1 Caracterización fenotípica en medio sólido de la sobreexpresión de *bfr*

De la placa con colonias transformadas con el plásmido pNBfr se seleccionaron 4 de ellas y se resembraron en nuevas placas de medio R2YE con neomicina a modo de parches, empleando palillos estériles. También se resembraron colonias de células control (con el plásmido pN702GEM3) en el mismo medio. Tras incubarlas a 28 °C durante 3-4 días, se sembraron en dos medios sólidos (LB y R2YE) dos parches de células control y dos parches de un clon que sobreexpresaba *bfr*. Los parches tenían un tamaño de 1,5 x 1,5 cm. Las placas se incubaron a 28 °C y se observó el crecimiento día a día.

4.2.2 Cuantificación de actinorrodina y undecilprodigiosina

La cuantificación de los antibióticos ACT y RED se realizó siguiendo el protocolo establecido por Kieser et al.^[27]. Se partió de cultivos de *S. coelicolor* con el plásmido control y con el plásmido pNBfr (3 clones) en matraces con tres indentaciones en medio TSB (10 mL) con neomicina, incubados durante 24 h a 28 °C en agitación (200 rpm). Se cogieron 200 µL de micelio y se pasaron a matraces con tres indentaciones con 10 mL medio líquido R2YE o LB, ambos con neomicina, con un lavado previo del micelio en sacarosa 10,3 %. Los cultivos en R2YE y LB se hicieron por duplicado y se incubaron a 28 °C en agitación (200 rpm).

Se recogieron dos muestras de 700 µL de micelio con sobrenadante a las 48 h y las 92 h en tubos eppendorf de 1,5 mL previamente pesados. Las muestras se incubaron a 4 °C overnight en oscuridad tras añadirles 700 µL de KOH 1 N y agitarlas en vórtex, se centrifugaron 10 minutos a 12000 rpm y se recogió el sobrenadante para medir la densidad óptica a 640 nm en un espectrofotómetro U-2000 *Spectrophotometer (Hitachi)* y determinar la cantidad de ACT. Para cuantificar RED, se lavaron los precipitados con HCl 0,5 M dos veces, se resuspendieron en 1050 µL de HCl 0,5 N en metanol y se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Transcurrida la incubación, se centrifugó 5 minutos a 10000 rpm, se tomó el sobrenadante y se midió su absorbancia a 530 nm.

Por último, los eppendorfs con el micelio precipitado se secaron en una estufa a 50 °C overnight y se pesaron después para referir la cantidad de antibiótico por peso seco de biomasa.

4.2.3 Extracción de compuestos con metanol y análisis por HPLC

Se sembraron los clones de *S. coelicolor* con el plásmido pN702GEM3 y con el plásmido pNBfr en césped, en placas con medio R2YE con neomicina, y se incubaron a 28 °C durante 3 días. Con un sacabocados de 0,4 cm de diámetro, se sacaron 3 tacos de cada cultivo y se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL. Se añadió 1 mL de metanol 100 % y se incubó 1 h en un roller a temperatura ambiente. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras y se pasó el sobrenadante a tubos eppendorfs de 1,5 mL. Dichos sobrenadantes fueron desecados en vacío en un *SpeedVac* overnight y después se conservaron las muestras a 4 °C.

El análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de las muestras fue realizado por el Servicio de Análisis Elemental, Cromatografía y Masas del servicio de apoyo a la investigación Nucleus de la Universidad de Salamanca.

4.2.4 Conservación de cepas

Las células de *Streptomyces* que se quisieron guardar se cultivaron en 10 mL de medio líquido TSB en matraces a 28 °C con agitación (200 rpm) durante 24-36 horas. El contenido de los matraces se

pasó a tubos de plástico de 13 mL y se centrifugaron a 4500 rpm unos 7 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en glicerol 20 % para pasarlas a viales que se llevaron al congelador a -80 °C.

4.3 Estudio del comportamiento ante el estrés oxidativo

4.3.1 Obtención de esporas de *S. coelicolor*

A partir de parches de *S. coelicolor* con el plásmido pN702GEM3 y de un clon con el plásmido pNBfr se sembraron las células en césped, con un hisopo estéril, en 10 placas de medio SFM con neomicina a 20 µg/mL, incubadas a 28 °C durante dos semanas. Posteriormente, las esporas fueron recogidas usando Tween-80 0,1 % siguiendo un protocolo descrito por Hopwood et al.^[28] y la solución resultante se filtró mediante una jeringa con algodón estéril. Las esporas se centrifugaron 8 min a 4500 rpm y se lavaron con 20 mL de agua estéril. Se repitió la centrifugación y el precipitado, las esporas, se resuspendió en 1 mL de glicerol 20% y se conservó a -20 °C.

Para cuantificar la concentración de esporas, se sembraron diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} de las soluciones con esporas en placas de YEPD con neomicina y se incubaron a 28 °C durante 3 días. Además, se inocularon 10 µL de las diluciones 10^{-2} y 10^{-4} en medio líquido YEPD y se incubaron 3 días a 28 °C en agitación (200 rpm) para comprobar que las soluciones con esporas no estaban contaminadas.

4.3.2 Ensayos de tolerancia a peróxido de hidrógeno

En placas con medio LB se sembraron $5 \cdot 10^5$ esporas de *S. coelicolor* M145 y Δbfr partiendo de diluciones de las soluciones de esporas guardadas. Una vez extendida la solución de esporas y secada, se hicieron cuatro pocillos equidistantes con un sacabocados de 0,4 cm de diámetro en las placas y se añadió en cada pocillo 100 µL de una solución de H₂O₂ a las concentraciones 2, 4, 6, y 8 mM. Las placas se dejaron 1 h a 4 °C para que el H₂O₂ difundiera y se incubaron boca arriba a 28 °C durante varios días en los que se observó la formación de halos, cuyo diámetro se midió. Se sembraron 3 placas de la cepa M145 y 3 placas de la cepa Δbfr .

4.4 Estudio del promotor de *bfr*

4.4.1 Crecimiento en medio sólido de colonias que sobreexpresan *bfr*

La metodología seguida fue análoga a la descrita en el apartado “Caracterización fenotípica en medio sólido de la sobreexpresión de *bfr*”, pero se utilizaron placas Petri con medio NMMP (3,6 µM de hierro) y NMMP con bajo hierro (10 nM) para sembrar los parches y estudiar el efecto que tiene la distinta concentración de hierro sobre la diferenciación y la producción de antibióticos coloreados.

4.4.2 Cultivos en medio líquido con distintas concentraciones de hierro

En este ensayo se estudió la secreción de xilanas, excretada al medio extracelular, bajo el control de su propio promotor (pNX4) y del promotor de *bfr* (pNB4). Para ello, a partir de placas de R2YE con neomicina con las células sembradas en parche, se hicieron tacos de agar y se inocularon en matraces con tres indentaciones que contenían 10 mL de NMMP y NMMP con bajo hierro. Se hicieron tres réplicas de cada tipo de célula en cada medio (*S. coelicolor* con los plásmidos pN702GEM3, pNX4 y pNB4). Se incubaron durante 4 días a 28 °C en agitación (200 rpm) y posteriormente se recogió el contenido en tubos de 13 mL de plástico, que fue centrifugado 8 min a 4500 rpm. Los sobrenadantes se pasaron a nuevos tubos y sus proteínas, entre las que se encontraba la xilanas, fueron precipitadas, siguiendo el procedimiento descrito en el siguiente apartado, y visualizadas mediante SDS-PAGE. Por otro lado, la biomasa fue transferida a tubos eppendorfs de 1,5 mL, previamente pesados, y secada en estufa a 50 °C overnight para determinar el peso seco y estandarizar.

4.4.3 Precipitación de proteínas con 10 % ácido tricloroacético (TCA)

Se añadieron 100 µL de TCA 100 % a tubos eppendorf con 1 mL de sobrenadante y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Tras centrifugar 5 min a 13000 rpm se eliminó el sobrenadante y se añadieron 600 µL de TCA 0,2 % en agua. Se repitió la centrifugación dos veces para eliminar el sobrenadante y los precipitados se resuspendieron en 100 µL de *Laemmly protein loading buffer* (para el buffer 4X: Tris HCl 250 mM pH 6,8; SDS 8 %; glicerol 40 %; azul de bromofenol 0,05 % y 50 mM DTT).

4.4.4 Electroforesis de proteínas SDS-PAGE

Las electroforesis de proteínas se realizaron en equipos de *BIORAD*. Para los geles de separación se partió de una solución de 50 mL de acrilamida:bis-acrilamida 37,5:1, 25 mL de Tris HCl (1,5 M pH 8,8) y 25 mL de agua destilada por cada 100 mL de disolución, y para los geles de empaquetamiento, de una solución de 6,5 mL de acrilamida:bis-acrilamida 37,5:1, 12,5 mL de Tris HCl (0,5 M pH 6,8) y 31 mL de agua destilada por cada 50 mL de disolución.

Para cada gel de separación de 0,7 mm de grosor se usaron 4 mL de solución de gel de separación, 40 µL de SDS 10 %, 20 µL de APS 10 % y 2 µL de TEMED, mientras que para los geles de empaquetamiento las proporciones fueron de 2 mL de solución de gel de empaquetamiento, 20 µL de SDS 10 %, 10 µL de APS 10 % y 2 µL de TEMED.

En los geles se cargaron marcadores de peso molecular (*BIORAD, Low Molecular Weight Markers*) y las muestras de proteínas suspendidas en *Laemmly protein loading buffer* previamente hervidas durante 5 min. Las electroforesis se efectuaron en tampón de carrera (dilución 1:5 de una solución de

15,14 g de Tris base, 72 g de glicina y 50 mL de SDS 10 % por cada litro) a una corriente de 30 mA por gel. Tras aproximadamente 17 minutos, se detenía el proceso y se teñían los geles con soluciones de tinción (0,25 % de azul de Coomassie R-250 en metanol:acético:agua en proporciones 50:10:40) durante media hora para después tratarlos dos o tres veces con solución de destinción (igual a solución de tinción pero sin azul de Coomassie) durante 15 minutos y finalmente fijarlos con etanol 25 %.

4.5 Producción y purificación de Bfr en *Escherichia coli*

4.5.1 Cultivo de células e inducción de la producción de proteína

Células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con los plásmidos pET-22b(+) y pET22Bfr fueron sembradas en medio LB sólido con ampicilina e incubadas a 37 °C overnight. Al día siguiente se inocularon las cepas en matraces con 20 mL de medio LB líquido con ampicilina por triplicado y se incubaron a 37 °C en agitación (200 rpm) overnight. A continuación, se midió la densidad óptica de una dilución 1:20 de los cultivos en un espectrofotómetro U-2000 *Spectrophotometer* (Hitachi) y se inoculó un nuevo cultivo de 400 mL de medio con células para obtener una densidad óptica de 0,3. El volumen necesario de células para conseguir esta densidad en los 400 mL se centrifugó 10 minutos a 4500 rpm y se resuspendió en LB con ampicilina para, a continuación, ser trasladado a un matraz con los 400 mL de este medio, que fue incubado a 37 °C con 200 rpm de agitación. Cuando la densidad óptica alcanzó el valor 1, se añadió IPTG 0,2 mM y se incubaron las células 25 °C overnight con la misma agitación. Este proceso se hizo para las células con los dos plásmidos.

4.5.2 Lisis celular de *E. coli* en molino criogénico

Una vez transcurrido el periodo de incubación, las células fueron repartidas en tubos para ultracentrífuga de 200 mL, centrifugadas a 4 °C a 5000 rpm durante 10 minutos y lavadas tres veces con Tris 10 mM (pH 7.5) mediante centrifugaciones a 4 °C a 4500 rpm durante 10 minutos, disminuyendo en cada lavado el volumen en el que se resuspendían las células (45 mL en el primer lavado, 20 mL en el segundo y 10 mL en el tercero) y juntando las células con el mismo plásmido. Las células se mantuvieron en un tubo Falcon congelado a -80 °C y fueron lisadas posteriormente en un molino criogénico *Freezer/Mill* (SPEX *SamplePrep*), mediante enfriamiento de las muestras 1 minuto en nitrógeno líquido, su traspaso a viales previamente enfriados, un nuevo enfriamiento en nitrógeno líquido durante 1 minuto y tratamientos en el molino con 4 ciclos de 1 minuto cada uno con un ratio de impacto de 15 CPS (ciclos por segundo).

4.5.3 Purificación de la proteína

Dado que en las células control no se hallaba la bacterioferritina, todo el procedimiento con dichas células se realizó con la mitad del volumen para gastar menos reactivos. El polvo resultante de la lisis

en el molino fue resuspendido en 20 mL (10 mL el control) de buffer de lisis ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, NaCl 300 mM, Triton X100 0,1 %, imidazol 5 mM, pH 7,5) y fue centrifugado a 4 °C 70 minutos a 45000 rpm en ultracentrífuga. La fracción soluble se recogió en tubos, mientras que la insoluble se resuspendió en 20 mL de buffer de equilibrado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 7,5) y fue guardada a -20°C.

La purificación de la proteína se realizó mediante la resina *HisPur Cobalt Resin* (*Thermo Scientific*) en columnas de plástico vacías de *BIORAD* en una cámara fría a 4 °C. Se usó 1 mL de resina por cada 10 mL de muestra, que se centrifugó a 700 g 2 minutos para quitar su sobrenadante y se lavó con 5 mL de buffer de equilibrado. La resina se resuspendió con las fracciones solubles de la lisis y se mantuvo 3 horas en rotadores a 4 °C. Después, se añadió el contenido en las columnas y se recogió la fracción no retenida. Se hicieron dos lavados con buffer de equilibrado con imidazol 20 mM y dos lavados con buffer de equilibrado con imidazol 30 mM, dejando 5 minutos de reposo de la resina con el buffer y recogiendo después el líquido. Para recuperar la proteína, se hicieron 4 eluciones con buffer de equilibrado con imidazol 250 mM y dos eluciones con buffer de equilibrado con imidazol 1 M, dejando 5 minutos antes de recoger. Las fracciones se guardaron a -20 °C.

Las fracciones fueron comprobadas posteriormente mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida.

4.6 Programas informáticos utilizados y bases de datos

Para el tratamiento de los datos se usó la hoja de cálculo *Excel* del paquete *Microsoft Office*.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa *GraphPad* mediante análisis ANOVA o test t de Student (en caso de haber solo dos grupos) para un 95 % de confianza.

Los geles de poliacrilamida del estudio del promotor se analizaron con el programa *ImageJ*.

Las bases de datos utilizadas fueron *StrepDB* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>) para la búsqueda de genes en *S. coelicolor* y, para consultar información sobre Bfr, *UniProt* (<https://www.uniprot.org/>) y *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). También se utilizó la herramienta bioinformática *MEMESuite* (<http://meme-suite.org/>) para el análisis del promotor de *bfr*.

5. RESULTADOS

5.1 Sobreexpresión de *bfr*: estudio fenotípico y producción de compuestos

Como se detalla en antecedentes, la ausencia de *bfr* en un mutante de delección tenía un efecto deletéreo para la producción de antibióticos en la mayoría de los medios de cultivo. Estábamos, por lo tanto, interesados en comprobar si su sobreexpresión implicaría un incremento de la producción de antibióticos.

Para ello, se introdujeron en la cepa silvestre de *S. coelicolor* el plásmido que sobreexpresaba el gen *bfr* bajo su propio promotor (pNBfr) y el plásmido vacío (pN702GEM3) y se seleccionaron varios clones para su análisis mediante selección en el antibiótico correspondiente. Posteriormente, para realizar el estudio fenotípico de los clones que sobreexpresaban *bfr*, se sembraron dos parches de cepa control, con el plásmido vacío, y dos parches de un clon de *S. coelicolor* que sobreexpresaba *bfr*, como se detalla en el apartado “Caracterización fenotípica en medio sólido de la sobreexpresión de *bfr*” de “Metodología” (página 13). Los medios de cultivo sólidos empleados en este estudio fueron LB y R2YE, pues en ellos se observaron diferencias en la producción de antibióticos entre la cepa silvestre M145 y la cepa mutante $\Delta bfr^{[1]}$. Se analizaron las diferencias que pudiera haber tanto en la forma y color de las colonias (indicativo de la esporulación, ya que las esporas son grises y el micelio aéreo blanco) de las colonias y en la producción de antibióticos pigmentados (RED es roja e intracelular, ACT es azul y es secretada al medio).

En medio LB, tras 3 y 5 días de la siembra, las células que sobreexpresaban *bfr* crecían de forma menos homogénea y no esporulaban como lo hacía el control, que tenía mayor cantidad de esporas. En cuanto a la producción de antibióticos, el halo de ACT secretado al medio, de color azul, era ligeramente menor en las células que sobreexpresaban la bacterioferritina (Figura 4-A).

Por otro lado, en medio R2YE, las células con mayor cantidad de Bfr formaban colonias sin diferencias apreciables en la esporulación. A tiempos tempranos (3 días) las colonias con el plásmido pNBfr tenían menor crecimiento. A los 5 días se podía observar halo de antibióticos en ambos tipos celulares, teniendo el halo de las células que sobreexpresaban *bfr* una ligera tonalidad más azulada (Figura 4-B).

Estas diferencias fenotípicas sugerían que la producción de compuestos estaba alterada por la sobreexpresión de *bfr*. Para comprobarlo, se analizaron extractos de las células control y de tres clones que sobreexpresaban *bfr* cultivados en medio R2YE, como se describe en “Extracción de compuestos con metanol y análisis por HPLC” dentro de “Metodología” (página 14). Mientras que el extracto control presentaba un tono más rojizo, los otros tres tenían un color más rosado. El análisis por HPLC demostró que los perfiles cromatográficos de ambos tipos de células eran similares, pero en las células que sobreexpresaban *bfr* la producción de metabolitos disminuía en comparación con las células control (Figura 4-C).

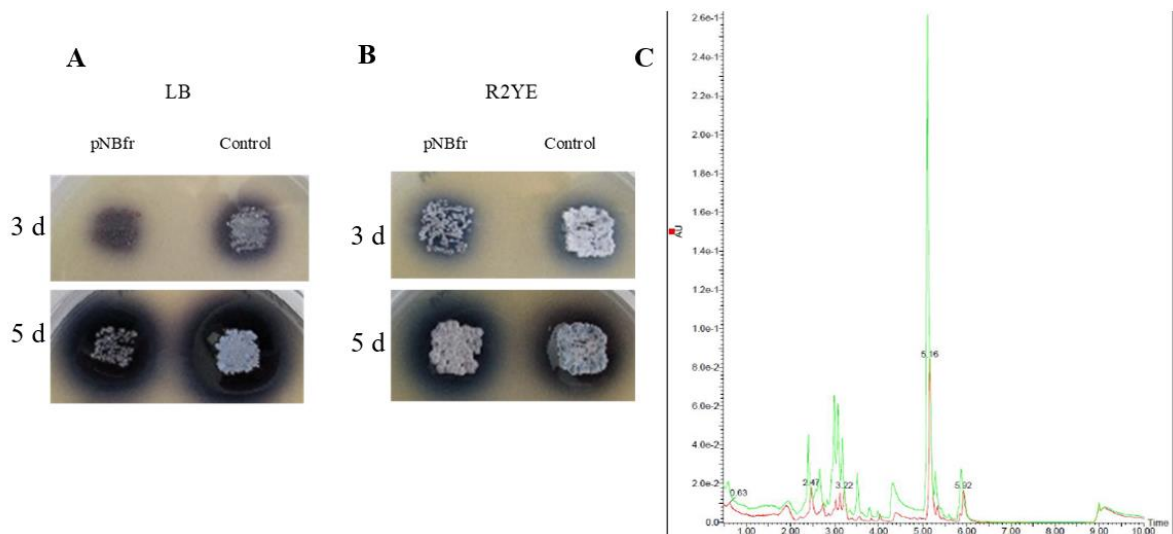


Figura 4. Comparación entre las colonias de *S. coelicolor* con plásmido pNBfr (sobreexpresión de *bfr*) y el plásmido control (pN702GEM3) en medio LB (A) y R2YE (B) a los 3 y 5 días de la siembra y perfil cromatográfico de los compuestos extraídos con metanol de cultivos en R2YE (C) con el plásmido pN702GEM3 (verde) y pNBfr (rojo).

Para ver con más precisión cómo afectaba la sobreexpresión a la producción de antibióticos, se cuantificó la cantidad de RED y ACT en medio líquido (R2YE y LB) tras 48 y 92 h, siguiendo el procedimiento descrito en “Cuantificación de actinorrodina y undecilprodigiosina” en “Metodología” (página 14). Los cultivos en medio LB tuvieron una mayor variabilidad (Figura 5), mientras que en R2YE los datos fueron más uniformes (Figura 6). Se comprobó que la producción de antibióticos disminuía, sobre todo de ACT (Figura 6-B), en las células que sobreexpresan *bfr*. Esta disminución en ACT se hace notable a las 92 h de la inoculación, mientras que la disminución de RED se percibe desde las 48 h aunque no es tan significativa estadísticamente a las 92 (Figura 6-A).

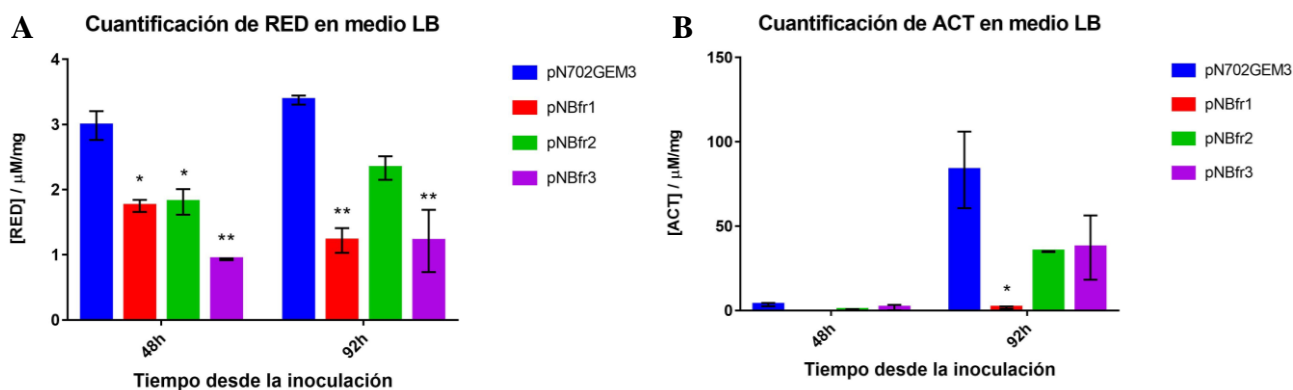


Figura 5. Cuantificación en medio LB de RED (A) y ACT (B). Los asteriscos indican diferencias significativas con $p < 0,05$.

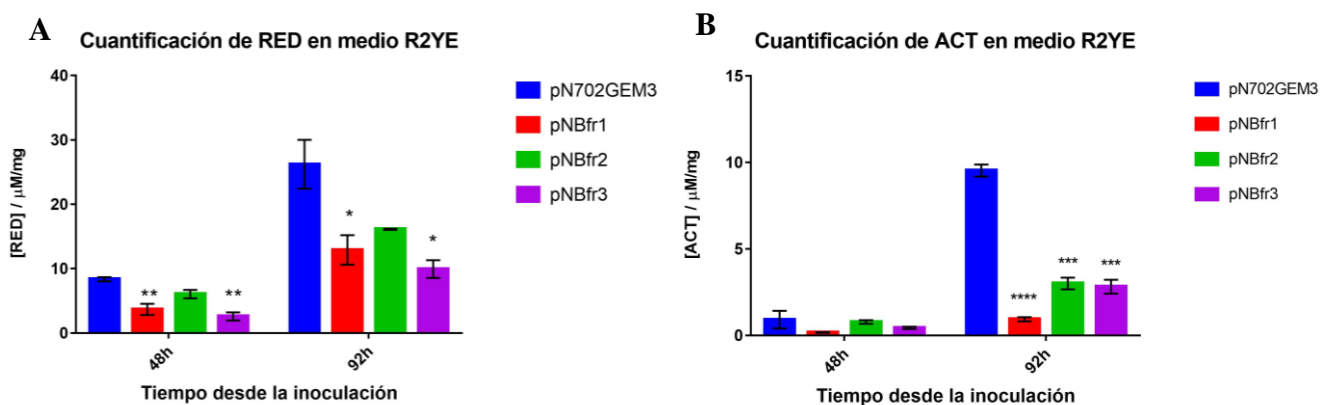


Figura 6. Cuantificación en medio R2YE de RED (A) ACT (B). Los asteriscos indican diferencias significativas con $p < 0,05$.

5.2 Estudio del promotor de *bfr* bajo distintas concentraciones de hierro en el medio

Sabemos que el promotor de *bfr* está directamente controlado por el RR AbrC3^[19] pero hasta la fecha no se han hecho estudios para saber cuál es su respuesta frente a diferentes concentraciones de hierro.

Para realizar este estudio abordamos dos tipos de experimentos; en el primero estudiamos el efecto de la sobreexpresión de *bfr* en medio NMMP sólido con contenido normal de hierro (3,6 µM) y en el mismo medio con bajo hierro (10 nM). Para ello sembramos los clones obtenidos en el apartado anterior y que sobreexpresaban *bfr* con su propio promotor (pNBfr) en ambos medios. A todos los tiempos de estudio, las colonias con sobreexpresión de *bfr*, comparadas con el control (plásmido pN702GEM3), presentaban un peor crecimiento en ambos medios, con colonias más dispersas. En medio NMMP, la síntesis de antibióticos era más notable en las células con plásmido pNBfr a los 7 días (rodeadas de un halo oscuro) que en el control. Por lo tanto, el comportamiento en este medio es diferente a los medios ensayados en los apartados anteriores (LB y R2YE), ya que la sobreexpresión de *bfr* sí que induce mayor producción de antibióticos en NMMP (Figura 7).

Por otro lado, en medio NMMP con bajo hierro (10 nM), la síntesis de ACT también era más apreciable a los 3 y 5 días en las células que sobreexpresaban *bfr* que en el control. Sin embargo, la producción acababa siendo superada por aquella de las células control a los 7 días (Figura 7).

Por lo tanto, la sobreexpresión de *bfr* en presencia de distintas concentraciones de hierro no tiene un efecto excesivamente drástico. Con menor hierro se observa que la síntesis de antibióticos comienza antes al sobreexpresar *bfr*, pero la producción final es menor respecto al control.

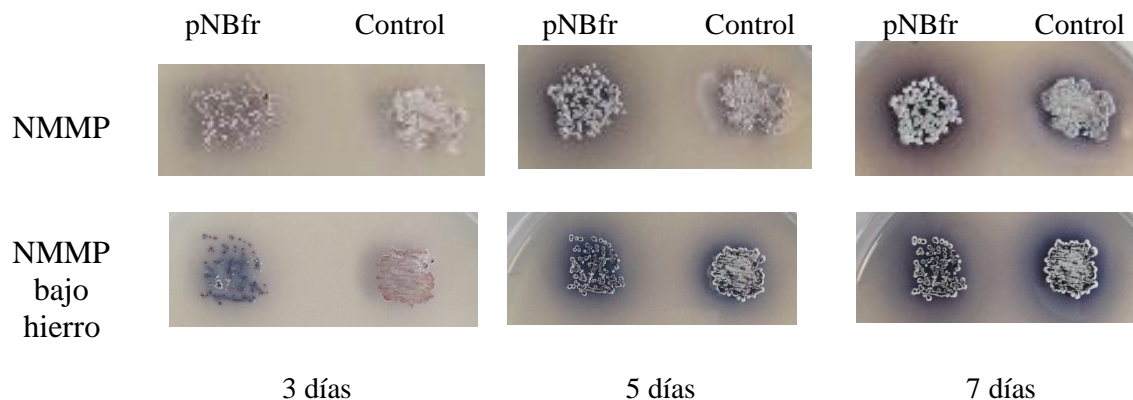


Figura 7. Comparación entre colonias de *S. coelicolor* con el plásmido pNBfr (sobreexpresión de *bfr*) y el plásmido pN702GEM3 (control) en medio sólido NMMP (3,6 μM) y NMMP con bajo hierro (10 nM) a los 3, 5 y 7 días de la siembra.

En el segundo experimento, estudiamos si la región encontrada a 191 pb *upstream* de la secuencia codificante del gen *bfr* estaba o no sometida a una regulación directa por la concentración de hierro empleando como *reporter* una xilanasa Xys1 aislada de *S. halstedii* y que ha sido empleada extensamente por el grupo de trabajo^[31]. Para este fin, se construyó un plásmido en el que dicho promotor, de *bfr*, controlaba la expresión de la proteína testigo mencionada Xys1, que se denominó pNB4. Al mismo tiempo se emplearon los plásmidos pN702GEM3, usado como control negativo de la producción, y el plásmido que portaba el gen de Xys1 con su propio promotor (pNX4) empleado como control negativo de la regulación por hierro. La xilanasa *reporter* Xys1, de aproximadamente 30 kDa, es excretada al exterior. Se hicieron cultivos en medio líquido utilizando, de nuevo, NMMP y NMMP con bajo hierro para controlar la cantidad de este elemento. Posteriormente, se analizaron, por electroforesis SDS-PAGE, los sobrenadantes de dichos cultivos precipitados con 10 % TCA tras 4 días de incubación para cuantificar la cantidad de proteína *reporter* producida en las diferentes condiciones.

Xys1 aparecía en los sobrenadantes de cultivos de células con plásmido pNX4 y pNB4, mientras que estaba ausente en sobrenadantes de células con pN702GEM3, como era esperable. Se observó que

con ambos plásmidos utilizados para expresar Xys1 la cantidad de xilanasa en los cultivos con menor concentración de hierro, cualitativamente, era menor que en aquellos cultivados en NMMP estándar (Figura 8).

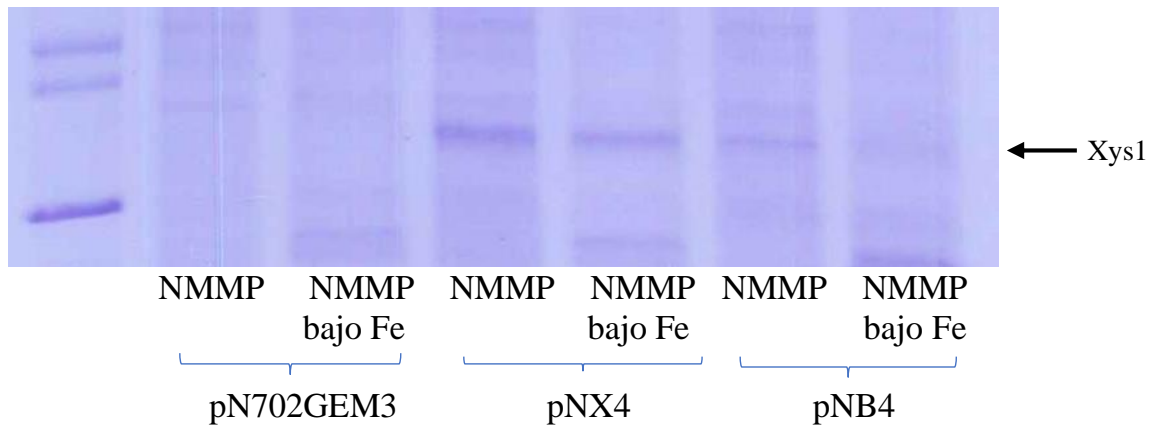


Figura 8. Visualización de las bandas de xilanasa (marcada con una flecha) en gel de poliacrilamida de los sobrenadantes de células con plásmido pN702GEM3 (plásmido vacío), pNX4 (xilanasa con su promotor propio) y pNB4 (xilanasa con el promotor de *bfr*) en medio NMMP y NMMP con bajo hierro.

Una vez normalizada la cantidad de proteína por biomasa, la intensidad de las bandas de xilanasa fue analizada con el programa *ImageJ* para obtener las correspondientes áreas de pico y cuantificar la producción. Se compararon las diferencias en la producción de xilanasa en los dos medios con cada plásmido. El resultado esperado era que la producción con pNX4 (con el propio promotor de la xilanasa) no variase con la cantidad de hierro; sin embargo, aunque no hubo diferencias significativas, esta era menor de forma apreciable en el medio con baja cantidad de hierro (Figura 9-A). Por otro lado, la producción de esta proteína con menor cantidad de hierro con el plásmido pNB4 era menor de forma significativa respecto a la producción en NMMP normal (Figura 9-B). En NMMP con bajo hierro, la producción de xilanasa con el plásmido pNX4 era un 50 % menor respecto a la producción en NMMP, mientras que con el plásmido pNB4, la producción de Xys1 en NMMP con bajo hierro representaba un 23 % de la producción en NMMP.

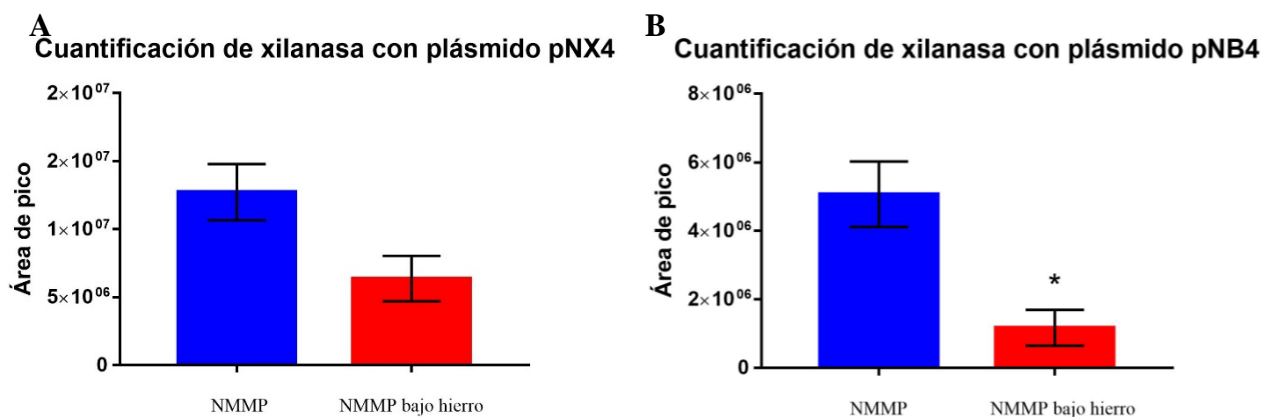


Figura 9. Análisis estadístico de la cuantificación de Xys1 mediante las áreas de pico determinadas con *ImageJ* comparando la cuantificación en NMMP y NMMP con bajo hierro de las células con plásmido pNX4 (A, xilanasas con su propio promotor) y pNXBfr (B, xilanasas con el promotor de *bfr*). Los asteriscos indican diferencias significativas con $p < 0,05$.

Por otro lado, el genoma de *S. coelicolor* fue analizado con la herramienta FIMO del programa online *MEMESuite*, que busca motivos concretos en secuencias, para identificar si el promotor de *bfr* poseía motivos *iron box* reconocidos por el regulador DmdR1 (TTAGGTTAGGCTCACCTAA). Al introducir la *iron box* de *S. coelicolor*, el programa detectó varias posiciones con estos motivos en el genoma, pero ninguna correspondía a la región donde se halla el promotor del gen *bfr* (*SCO2113*).

Por lo tanto, podemos concluir que el promotor de *bfr* responde a las concentraciones de hierro del medio, aunque no parece que sea de forma directa, al menos a través de una regulación por DmdR1. Estaba previsto hacer un experimento adicional para comprobar si la menor concentración de hierro disminuía la expresión de *bfr* y otros genes involucrados en la síntesis de antibióticos, mediante qRT-PCR (*Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), pero dada la situación nacional no se pudo concluir el experimento pese a tener todas las herramientas y los primers diseñados y preparados para su uso.

5.3 Producción y purificación de Bfr en *E. coli*

Otro punto de interés en nuestro estudio era analizar la funcionalidad de la proteína y su capacidad de almacenar hierro, dado que su función estaba predicha solo por medios informáticos. Para ello, nos pusimos como objetivo la purificación de la proteína Bfr en cantidad suficiente en *E. coli* para poder realizar ensayos bioquímicos y obtención de anticuerpos. El plásmido (pET22Bfr) en el que la proteína Bfr estaba *downstream* del promotor T7 y etiquetada con una cola de 6 residuos de histidina, el cual se introdujo en la cepa *E. coli* BL21, se había construido previamente en el laboratorio^[1] (ver “Materiales”). Para la producción de Bfr en gran cantidad, se realizó un cultivo líquido en LB de la cepa portadora del plásmido pET22Bfr, se indujo su expresión con IPTG y la proteína Bfr fue

purificada, tras la lisis celular en molino criogénico, a partir de las fracciones solubles de los extractos celulares mediante una resina de afinidad para colas de histidina, siguiendo el procedimiento detallado en “Producción y purificación de Bfr en *Escherichia coli*” dentro de “Metodología” (páginas 17-18).

Se analizaron las distintas fracciones del proceso y se observó que la proteína se producía abundantemente y que una gran parte de ella se solubilizaba tras la lisis celular, aunque gran parte seguía quedando en la fracción insoluble (Figura 10-A), siendo capaces de purificar una buena cantidad a partir de la fracción soluble (Figura 10-B). La proteína purificada se mantuvo congelada a -20°C para su posterior análisis. Sin embargo, en los eppendorfs en los que se guardó, se formó un precipitado amarillento de la proteína ya a los 2 días tras su almacenamiento, indicativo de que se había vuelto insoluble, dificultando entonces tanto su cuantificación como su análisis funcional.

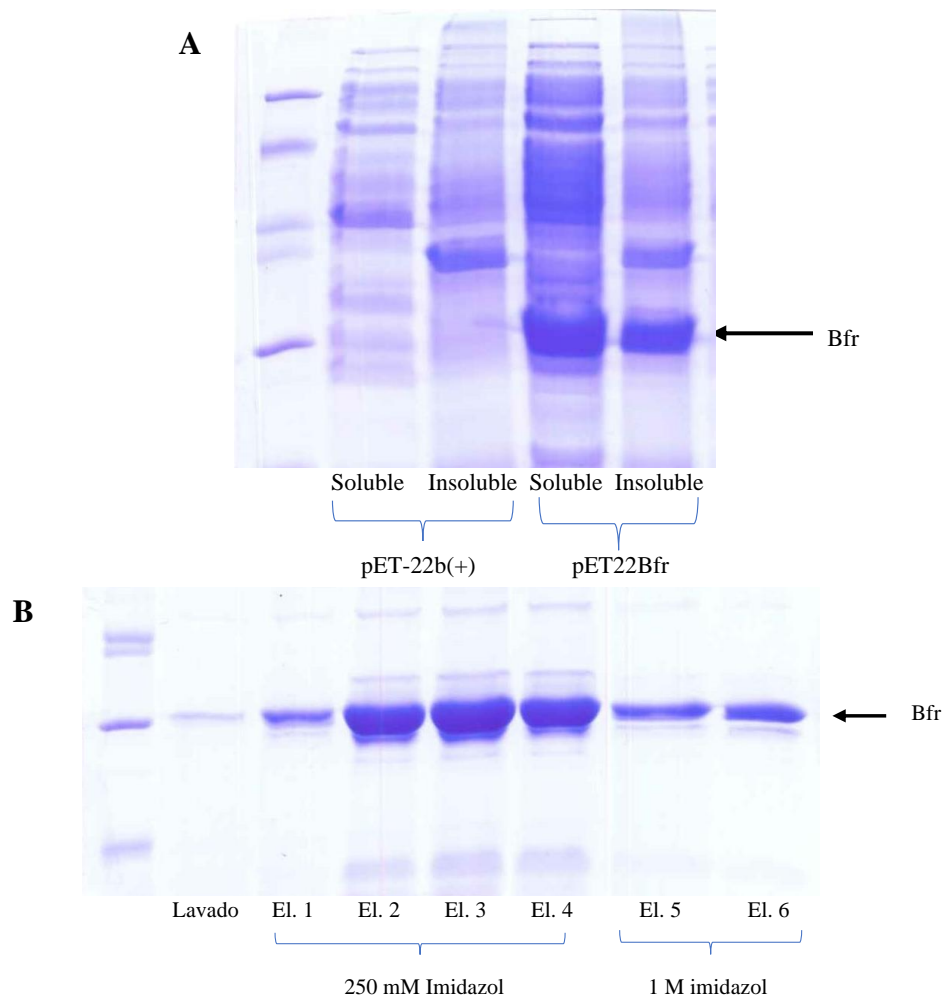


Figura 10. Geles de poliacrilamida con Bfr señalada con una flecha. **A:** fracciones solubles e insolubles de los extractos celulares con los plásmidos pET-22b(+) (plásmido vacío) y pET22Bfr (plásmido para producir Bfr recombinante). **B:** último lavado y distintas eluciones realizadas en el proceso de purificación a partir de las fracciones solubles de los extractos de células con el plásmido pET22Bfr.

Actualmente estamos probando diferentes condiciones en cuanto a la purificación y mantenimiento para que la proteína se mantenga soluble y así poder realizar los ensayos de funcionalidad con la misma. Este objetivo se ha visto afectado por la emergencia sanitaria y la parada en la investigación.

5.4 Tolerancia al peróxido de hidrógeno de las cepas de *S. coelicolor* M145 y Δbfr

El hierro, además de ser un elemento crucial en muchos procesos metabólicos, está implicado en el estrés oxidativo, pues el ion Fe^{2+} puede reaccionar para formar ROS. Por ello, y para completar estudios anteriores del laboratorio, otro objetivo de este trabajo fue analizar el comportamiento ante el estrés oxidativo, en este caso, ante la ausencia de la proteína Bfr, utilizando para ello el mutante de delección caracterizado previamente en el laboratorio^[1]. Dado que dicho mutante no posee la bacterioferritina para acumular el hierro en su forma insoluble, lo cual sirve como mecanismo de defensa ante el estrés oxidativo, esperábamos que este fuese más sensible al H_2O_2 .

Las cepas M145 y Δbfr fueron sembradas en medio sólido LB con pocillos donde se depositaron soluciones con diferente concentración de H_2O_2 , como se explicó en el apartado “Ensayos de tolerancia a peróxido de hidrógeno” en “Metodología” (página 15). Se sembraron el mismo número de esporas de ambos tipos celulares en todas las placas. En ambas cepas el halo de inhibición era mayor conforme aumentaba la concentración de H_2O_2 , lo que confirma que este compuesto supone un estrés oxidativo para las células. A los dos días de sembrar las placas ya se observaron halos de inhibición, siendo estos más pequeños en el mutante, con diferencias significativas a las dos concentraciones mayores probadas, 6 y 8 mM (Figura 11-A). A la semana de la siembra, las células de la cepa M145 crecieron alrededor del halo en colonias pequeñas azuladas, pues el H_2O_2 se degrada con el tiempo. Por otro lado, en la cepa mutante Δbfr crecieron colonias más dispersas en el centro del halo, más grandes y amarillentas, pudiéndose visualizar mejor los halos (Figura 11-B).

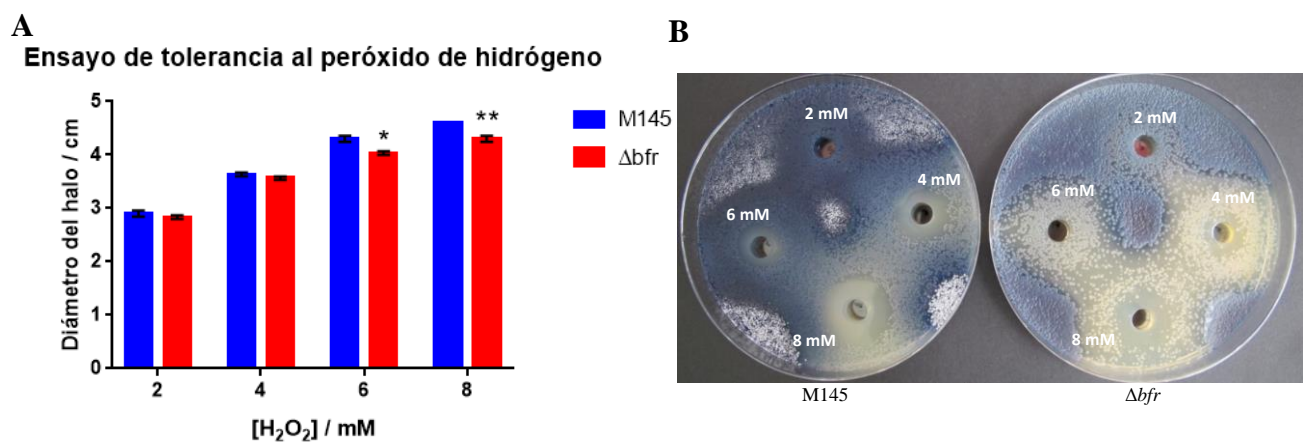


Figura 11. Resultado del ensayo con peróxido de hidrógeno. **A:** análisis estadístico del diámetro de los halos medido tras 2 días de la siembra formados en la cepa M145 (silvestre) y el mutante de delección Δbfr , con las diferencias significativas marcadas con asteriscos ($p < 0,05$). **B:** placas con cepa M145 y Δbfr tras 7 días de haber sembrado, con las concentraciones de peróxido de hidrógeno señaladas. El ensayo se realizó por triplicado.

Además de realizar este ensayo con el mutante de delección, quisimos comprobar si la sobreexpresión de *bfr* tenía algún efecto en la tolerancia al estrés oxidativo. Para ello, se obtuvieron esporas de células con plásmido vacío (pN702GEM3) y con el plásmido para sobreexpresar *bfr* (pNBfr) siguiendo la metodología descrita en “Obtención de esporas de *S. coelicolor*” (página 15). De esta forma, se obtuvieron unas soluciones de esporas sin contaminación cuyas concentraciones fueron $1,65 \cdot 10^{10}$ esporas/mL para las células con pN702GEM3 y $4,16 \cdot 10^9$ esporas/mL para las células con pNBfr. Estas esporas se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior utilización en un ensayo análogo al realizado con las cepas mutante y silvestre; sin embargo, debido al estado de alarma nacional, no se pudo realizar el ensayo con estas esporas.

6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En el trabajo previo de laboratorio sobre el gen *bfr* de *S. coelicolor*, se comprobó que las cepas que carecen de este gen producían una menor cantidad de RED y ACT^[1]. Mediante la cuantificación de antibióticos, se ha comprobado en este trabajo que la sobreexpresión de dicho gen también disminuye la producción de antibióticos en los medios complejos utilizados, LB y R2YE. Además, en el perfil cromatográfico comparativo entre la cepa silvestre con el plásmido control y la cepa que sobreexpresa el gen *bfr* se observa una bajada general de todos los metabolitos que se pudieron extraer con metanol. Sin embargo, el comportamiento en medio mínimo es diferente, habiendo una precoz producción de antibióticos con la sobreexpresión. Esta diferencia de comportamiento relacionada con la disponibilidad de hierro entre medios complejos y mínimos ya ha sido descrita con anterioridad^[32].

El hierro parece estar implicado en la producción de metabolitos secundarios, como se ha descrito con las oxigenasas Rieske, que participan en el metabolismo de RED^[33]. Mientras que la ausencia de la proteína Bfr podría conllevar una disminución del hierro almacenado y un aumento de los iones Fe²⁺ libres en el citoplasma, que podrían aumentar el estrés oxidativo e inhibir las enzimas biosintéticas, un aumento de Bfr podría tener el efecto contrario en el hierro intracelular. En *Pseudomonas aeruginosa* la liberación de hierro de su bacterioferritina (BfrB) está mediada por una ferredoxina (Bfd), y al inhibir la interacción de ambas proteínas o mutar los aminoácidos implicados, las células aumentan el nivel de hierro intracelular, pero disminuyen el hierro libre^[34]. Por lo tanto, la sobreexpresión de bacterioferritina en *S. coelicolor* podría disminuir la cantidad de hierro libre en el citoplasma y, en consecuencia, se reduciría la actividad catalítica de las enzimas implicadas en el metabolismo secundario; no obstante, se ha comprobado que la disminución de hierro en la cepa silvestre aumenta la síntesis de antibióticos^[9]. Es posible que Bfr interactúe con alguna proteína reguladora implicada en la síntesis de antibióticos y que una cantidad excesiva, además de secuestrar el hierro libre del citoplasma, impida la correcta función de otras biomoléculas.

Aunque se ha descrito que en otros organismos la expresión de las bacterioferritinas a nivel génico es regulada por hierro a través del regulador IdeR, como en *Streptomyces avermitilis*, cuya bacterioferritina tiene una *iron box* en el promotor de su gen^[10], el promotor de *bfr* de *S. coelicolor* no parece responder directamente a este elemento a través de DmdR1. Los experimentos llevados a cabo con la secreción de xilanas como *reporter* muestran un descenso significativo en la secreción de esta proteína con el promotor de *bfr* cuando el hierro es menor en la célula, pero no hay presencia de *iron box* en dicho promotor. Además, la sobreexpresión de *bfr* bajo el control de su propio promotor en medio mínimo con distintas cantidades de hierro mostró diferencias en el crecimiento de las células y una producción anticipada de ACT con menor cantidad de hierro en el medio, aunque

inferior a la producida por las células control. Los resultados de la sobreexpresión corroboran la menor producción de antibióticos y la síntesis de estos de forma adelantada ante la disminución de hierro, pero no clarifica nada respecto a la menor expresión de *bfr* con menor hierro en el medio. La bacterioferritina podría variar sus niveles intracelulares en respuesta a la concentración de hierro mediante otros reguladores implicados en su expresión que sí respondan a hierro directamente. En este trabajo estaba previsto estudiar la expresión de *bfr* y de otros genes implicados en la regulación de la síntesis de antibióticos tras haber crecido las cepas en medios con distintas cantidades de hierro mediante qRT-PCR, pero no pudo realizarse dicho experimento debido al confinamiento generado por la crisis de la enfermedad COVID-19.

La reacción entre el ion Fe^{2+} y el H_2O_2 , conocida como reacción de Fenton, genera Fe^{3+} y dos ROS, el anión hidróxido (OH^-) el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que puede reaccionar con el DNA y producir la muerte celular. Este daño puede prevenirse mediante el almacenamiento de hierro en ferritinas o bacterioferritinas^[35], de manera que se podría pensar que aquellas células que carecen de este tipo de proteína serían más sensibles al estrés oxidativo. El resultado del ensayo con peróxido de hidrógeno muestra que, al contrario de lo que se esperaba, los halos de inhibición son menores en el mutante respecto a la cepa silvestre, lo cual podría indicar que las células poseen mecanismos alternativos a la bacterioferritina que detoxifican esta especie reactiva de oxígeno y que estos sean más notables ante la ausencia de Bfr, o que esta proteína no esté implicada en este proceso. A pesar de esto, parece que los mutantes son más sensibles al estrés oxidativo en el tiempo, teniendo una peor salida. Tras una semana del tratamiento con H_2O_2 (tiempo en que este compuesto se va inactivando) las células de Δbfr que han sobrevivido al tratamiento crecen por la zona de inhibición previa de forma más dispersa y no ocupan el halo de inhibición de la misma forma que lo hace la cepa silvestre. Una posible explicación a este hecho sería que las bacterias mutantes, carentes de Bfr, hayan eliminado la mayor parte del hierro intracelular libre para contrarrestar el estrés oxidativo por otros mecanismos que no lo acumulen para su posterior uso (por ejemplo, la reducción de Fe^{3+} por radical superóxido puede contrarrestar la reacción de Fenton, aunque no está claro si esto ocurre *in vivo*^[34]). Al no tener bacterioferritina para acumular hierro, la cepa Δbfr podría no disponer de una cantidad necesaria de hierro disponible para crecer correctamente tras haberse detoxificado el H_2O_2 por otros mecanismos.

Por último, el procedimiento utilizado para producir Bfr en *Escherichia coli* permitió obtener una gran cantidad de proteína con un sistema inducible por IPTG. Tras haber purificado la bacterioferritina, se observó que ésta precipitaba en los tubos donde se recolectó. Es posible que la cantidad de la proteína sea tan elevada que las subunidades agreguen y precipiten, lo cual no ha permitido su cuantificación y su estudio en profundidad. Se desconoce si la proteína sigue siendo

funcional, habría que reducir su concentración para solubilizarla y estudiar su actividad. Cabe destacar que, mientras que una subunidad de Bfr tiene un peso molecular de 19,2 kDa, la banda de bacterioferritina obtenida en los geles de acrilamida corresponde a un peso molecular de aproximadamente 31 kDa, indicando que la proteína oligomeriza *in vitro*.

7. CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de *bfr* en *S. coelicolor* disminuye la producción de los antibióticos RED y ACT en medios ricos, lo cual reitera la implicación de esta proteína y del hierro en la síntesis de estos compuestos.
2. El promotor de *bfr* de *S. coelicolor* responde ligeramente a las concentraciones de hierro, pero presumiblemente no de forma directa bajo la regulación de DmdR1 al carecer de las *iron boxes* reconocidas por esta proteína. Esto podría indicar una regulación indirecta de este gen por otros reguladores.
3. El mutante de delección Δbfr muestra una mayor resistencia al estrés oxidativo mediado por H_2O_2 en los primeros días de la exposición al estrés, pero presenta un peor crecimiento posterior.
4. Bajo el control del promotor T7, en un sistema inducible con IPTG 0,2 mM y a 25 °C, se puede obtener gran cantidad de Bfr en *E. coli* BL21(DE3) en la fracción soluble de los lisados celulares, aunque esta proteína oligomeriza cuando está en gran cantidad y se requieren futuros estudios para analizar su actividad de unión a hierro.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. García Abad, Laura. “Caracterización del mutante del gen de la bacterioferritina *SCO2113* en *Streptomyces coelicolor*.” Trabajo Fin de Máster, 2019.
2. Jones, Stephanie E.; Elliot, Marie A. “‘Exploring’ the regulation of *Streptomyces* growth and development”. *Current Opinion in Microbiology*, 2018, 42:25-30.
3. Bentley, S.D. et al. “Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)”. *Nature*, 2002, vol. 417, 141-147.
4. Chater KF. “Recent advances in understanding *Streptomyces*”. *F1000Research* 2016, 5(F1000 Faculty Rev):2795
5. Urem, M. et al. “OsdR of *Streptomyces coelicolor* and the dormancy regulator DevR of *Mycobacterium tuberculosis* control overlapping regulons”. *mSystems*, 2016, 1(3):e00014-16.
6. Rivera, M. “Bacterioferritin: Structure, Dynamics, and Protein–Protein Interactions at Play in Iron Storage and Mobilization.” *Accounts of Chemical Research*, 2017, 50, 331–340
7. Flores, F.J. & Martin, J.F. “Iron-regulatory proteins DmdR1 and DmdR2 of *Streptomyces coelicolor* form two different DNA-protein complexes with iron boxes”. *The Biochemical Journal*, 2004, 380, 497-503.
8. Tierrafría, V. H., et al. “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*, 2011, 4(2), 275–285.
9. Lee, N. et al. “Iron competition triggers antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* during coculture with *Myxococcus xanthus*”. *The ISME Journal*, 2020.
10. Cheng Y. et al. “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*, 2018, 84:e01503-18.
11. Tunca, S. et al. “Two overlapping antiparallel genes encoding the iron regulator DmdR1 and the Adm proteins control siderophore and antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2)”. *FEBS Journal*, 2009, 276, 4814–4827.
12. Bradley, J.M. et al. “Ferritins: furnishing proteins with iron”. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2016, 21:13-28.
13. Eshelman, K. et al. “Inhibiting the BfrB:Bfd interaction in *Pseudomonas aeruginosa* causes irreversible iron accumulation in bacterioferritin and iron deficiency in the bacterial cytosol.” *Metallomics*, 2017, 9, 646—659.
14. Tierney, A. R., & Rather, P. N. “Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance”. *Future Microbiology*. 2019, 14(6), 533-552.
15. Salazar, M. E., and Laub, M. T. “Temporal and evolutionary dynamics of two-component signaling pathways”. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2015, 24, 7–14.
16. Liu M, et al. “Novel two-component system MacRS is a pleiotropic regulator that controls multiple morphogenic membrane protein genes in *Streptomyces coelicolor*”. *Applied Environmental Microbiology*, 2019, 85:e02178-18.
17. Antoraz, S. “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, 2018.

18. Rico S, Yepes A, Rodríguez H, Santamaría J, Antoraz S, et al. “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*, 2014, 9(10): e109844.
19. Rico, S et al. “Deciphering the Regulon of *Streptomyces coelicolor* AbrC3, a Positive Response Regulator of Antibiotic Production”. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80:2417-2428.
20. Antoraz, S. et al. “Orphan Response Regulator Aor1 Is a New Relevant Piece in the Complex Puzzle of *Streptomyces coelicolor* Antibiotic Regulatory Network”. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8:2444.
21. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
22. MacNeil, D.J. et al. “Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector”. *Gene*, 1992, vol. 111, no. 1, 61-68.
23. William Studier, F. and Moffatt, Barbara A. “Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes”. *Journal of Molecular Biology*, 1986, 189:113-130.
24. Floriano, B., and Bibb, M. “*afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)”. *Mol Microbiol*, 1996, **21**:385–396.
25. Fernández-Ábalos et al. “Posttranslational processing of the xylanase Xys1L from *Streptomyces halstedii* JM8 is carried out by secreted serine proteases”. *Microbiology*, 2003, *149*(7), 1623–1632.
26. Díaz, M. et al. “The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*”. *Microbiology*, 2005, *151*(8), 2583–2592.
27. Kieser, T. et al. “Practical *Streptomyces* genetics”. *Innes Foundation*. 2000.
28. Hopwood, D. A. et al. “Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual”. *John Innes Foundation*, 1985.
29. Rose, M. D., Winston, F. M., & Heiter, P. “Methods in yeast genetics: a laboratory course manual”. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1990.
30. Hanahan, D. “Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids”. *Journal of Molecular Biology*, 1983, *166*(4), 557–580.
31. Rodríguez, S., Santamaría, R. I., Fernández-Ábalos, J. M., & Díaz, M. “Identification of the sequences involved in the glucose-repressed transcription of the *Streptomyces halstedii* JM8 *xysA* promoter”. *Gene*, 2005, 351, 1–9.
32. Senges, C. H. R. et al. “The secreted metabolome of *Streptomyces chartreusis* and implications for bacterial chemistry”. *PNAS*, 2018, 115, 2490-2495.
33. Perry, C. et al. “Rieske non-heme iron-dependent oxygenases catalyse diverse reactions in natural product biosynthesis”. *Natural Products Report*, 2018, 35, 622–632.
34. Soldano, A. et al. “Inhibiting Iron Mobilization from Bacterioferritin in *Pseudomonas aeruginosa* Impairs Biofilm Formation Irrespective of Environmental Iron Availability.” *ACS Infectious Diseases*, 2020, 6 (3), 447-458.
35. Ezraty, B. and Barras, F. “The ‘liaisons dangereuses’ between iron and antibiotics.” *FEMS Microbiology Reviews*, 2016, Vol. 40, No. 3, 418-435.