



**MÁSTER EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**  
**FACULTAD DE BIOLOGÍA**  
**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE  
PROMOTORES POR EL SISTEMA AbRA.  
INTEGRACIÓN DEL METABOLISMO  
PRIMARIO Y LA PRODUCCIÓN DE  
ANTIBIÓTICOS**

Ricardo Sánchez de la Nieta Moreno

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

Salamanca, 2017



# ÍNDICE

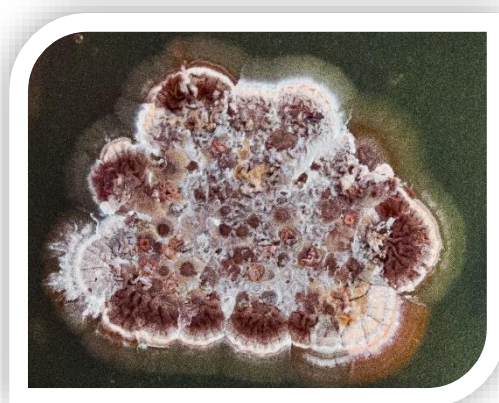
<b>Resumen</b> .....	2
<b>1. Introducción</b> .....	3
1.1 El género bacteriano <i>Streptomyces</i> .....	3
1.2 Sistemas de dos componentes.....	5
1.3 Coordinación del metabolismo primario y la producción de antibióticos .....	6
1.4 Antecedentes.....	7
1.4.1 El sistema AbrA.....	7
1.4.2 Metabolismo del fosfato. Sistema Pst.....	8
<b>2. Objetivos y plan de trabajo</b> .....	10
<b>3. Resultados</b> .....	11
3.1 Optimización de la metodología REDprobe.....	11
3.2 Estudio del regulón del TCS AbrA.....	15
3.3 Análisis de promotores .....	18
3.4 Estudio de la regulación del promotor del operón <i>pst</i> por el sistema AbrA .....	20
<b>4. Discusión y conclusiones</b> .....	22
<b>5. Materiales y métodos</b> .....	24
5.1 Cepas y condiciones de cultivo.....	24
5.2 Metodología REDprobe. Condiciones de ensayo.....	26
5.3 Construcción de la cepa <i>S. coelicolor</i> M512 $\Delta$ <i>abrA</i> mediante CRISPR-Cas9 .....	26
5.4 Manipulación y visualización de ácidos nucleicos.....	27
5.5 Construcción de plásmidos .....	30
5.6 Transferencia de plásmidos .....	31
5.7 Cuantificación de undecilprodigiosina (RED).....	33
5.8 Manipulación y visualización de proteínas.....	33
5.9 Análisis estadístico .....	35
5.10 Procesamiento, análisis y presentación de datos .....	35
<b>6. Bibliografía</b> .....	36
<b>Material suplementario</b> .....	39

*Streptomyces* es un género bacteriano prolífico en la producción de metabolitos de gran interés biomédico e industrial, como antibióticos, antitumorales o enzimas hidrolíticas. Entre el amplio y diverso abanico de sistemas de regulación que presentan estos organismos, el sistema de dos componentes AbrA se ha descrito como un regulador pleiotrópico negativo de la producción de antibióticos, y del desarrollo y diferenciación morfológicos.

El presente estudio profundiza en el regulón de este sistema, validando la regulación observada previamente sobre su propio operón, sobre el regulador específico de la ruta de síntesis del antibiótico actinorrodina (*actII-ORF4*), y sobre el lantibiótico codificado por el gen *SCO0268*; así como incorporando un nuevo componente a este regulón, el sistema Pst de captación de fosfato. El estudio de la regulación de este último sistema por AbrA ha permitido, asimismo, determinar un motivo nucleotídico que responde a la regulación por dicho sistema de dos componentes.

Estos resultados sitúan al sistema AbrA como una nueva ruta de integración del metabolismo primario con la producción de antibióticos, de forma parcialmente análoga y parcialmente antagonista al principal sistema de regulación del metabolismo del fosfato, el sistema PhoP/R; lo cual podría tener interesantes implicaciones ecológicas.

La comprensión de las redes de regulación del sistema AbrA resulta de gran interés, no sólo desde el punto de vista de la biología básica, en cuanto a entender cómo integran los diferentes procesos biológicos bacterias tan complejas como *Streptomyces*; sino también desde el punto de vista de la biología aplicada, en cuanto a darnos las herramientas para activar el gran arsenal de metabolitos secundarios que aún permanece silenciado en este grupo de organismos y para desarrollar plataformas biológicas más eficientes de producción de metabolitos de interés.

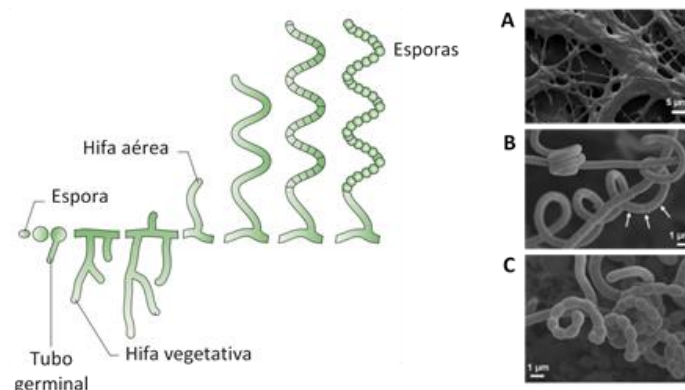


# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El género bacteriano *Streptomyces*

*Streptomyces* es un género de bacterias perteneciente al filum Actinobacteria que forman estructuras miceliales muy ramificadas, y engloba a más de 500 especies descritas, siendo uno de los grupos de microorganismos más amplio y diverso. Como principales características, podemos destacar que son Gram-positivas, aerobias facultativas, mesófilas (con una temperatura óptima de crecimiento entre 25 - 35 °C), neutrófilas (con un pH óptimo de crecimiento entre 6.5 - 8.0) y quimiorganotrofas, con un metabolismo oxidativo. El principal hábitat natural de la mayoría de las especies de estreptomicetos es el suelo, un medio muy complejo y variable que explica la plasticidad genómica, la diversidad metabólica y la compleja red de regulación que han desarrollado estos microorganismos para sobrevivir en el mismo. Estas bacterias son capaces de emplear fuentes de carbono y nitrógeno muy variadas, lo cual, unido a su capacidad de degradar y metabolizar multitud de compuestos y restos orgánicos, las sitúa como organismos saprófitos esenciales en el ecosistema del suelo. El amplio y diverso metabolismo secundario de estos microorganismos, capaces de sintetizar compuestos como antibióticos, antitumorales, inmunosupresores o enzimas hidrolíticas, entre otros, justifica el gran interés en ellos, tanto a nivel de investigación como a nivel industrial. [1]

Las bacterias incluidas en este género son multicelulares, y su crecimiento y desarrollo difieren notablemente del resto de bacterias. Su ciclo vital (Fig.1) es relativamente complejo y comprende varios estadios. La fase inicial es la espora que, bajo condiciones favorables, germina formando el tubo germinal. Esta estructura crece formando hifas, lo que da lugar a un micelio vegetativo muy ramificado. Ante determinadas señales, como un déficit de nutrientes en el medio, se inicia un proceso de diferenciación morfológica que desemboca en la formación



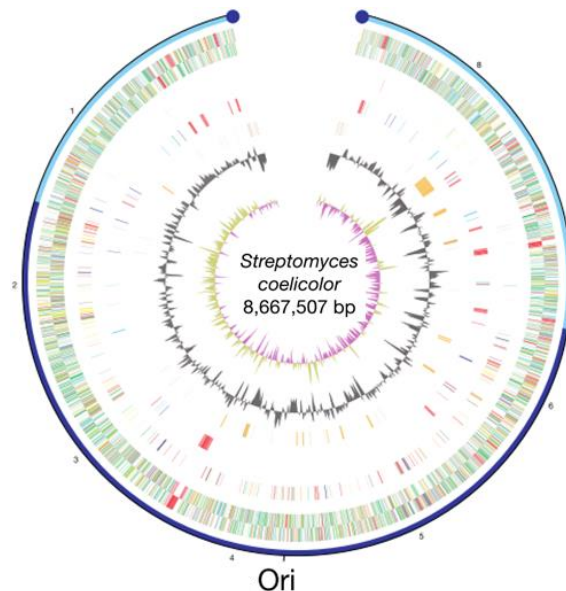
**Figura 1. Ciclo vital de *Streptomyces*.** Las micrografías electrónicas muestran: (A) micelio vegetativo, (B) hifa aérea en el proceso de esporulación, (C) cadena de esporas maduras. Adaptado de [2], [37]

## Introducción

de un micelio aéreo. Finalmente, tiene lugar un proceso de esporulación en las hifas aéreas, lo que cierra el ciclo vital (aunque la mayoría de especies solo esporula en medio sólido, se han descrito especies con esporulación sumergida, como *S. venezuelae*). [1], [2]

Respecto a la organización genómica, estos microorganismos presentan un cromosoma lineal de un tamaño de 7 - 12 Mb con un elevado contenido en G+C (en torno a un 70 %). Este cromosoma presenta un núcleo central donde se concentran los genes esenciales, mientras que las regiones de los extremos (denominadas “brazos”), de mayor variabilidad, contienen genes adaptativos (*Fig.2*). [1], [3]

Dentro de los estreptomicetos, una de las principales especies modelo es *S. coelicolor* ya que fue una de las primeras que se caracterizó a nivel morfológico y genómico. Esta especie es capaz de sintetizar varios antibióticos: actinorrodina (ACT), undecilprodigiosina (RED), antibiótico dependiente de calcio (CDA), metilenomicina (MM) y un poliquétido críptico (CPK). El antibiótico ACT es un poliquétido aromático pigmentado que presenta una coloración azul en medio básico y es secretado al medio extracelular; mientras que RED es un tripirrol hidrofóbico que muestra una coloración roja y es intracelular. La coloración tan característica de estos dos compuestos los ha posicionado como herramientas de gran interés en los estudios genéticos sobre biosíntesis de antibióticos. [1], [4]

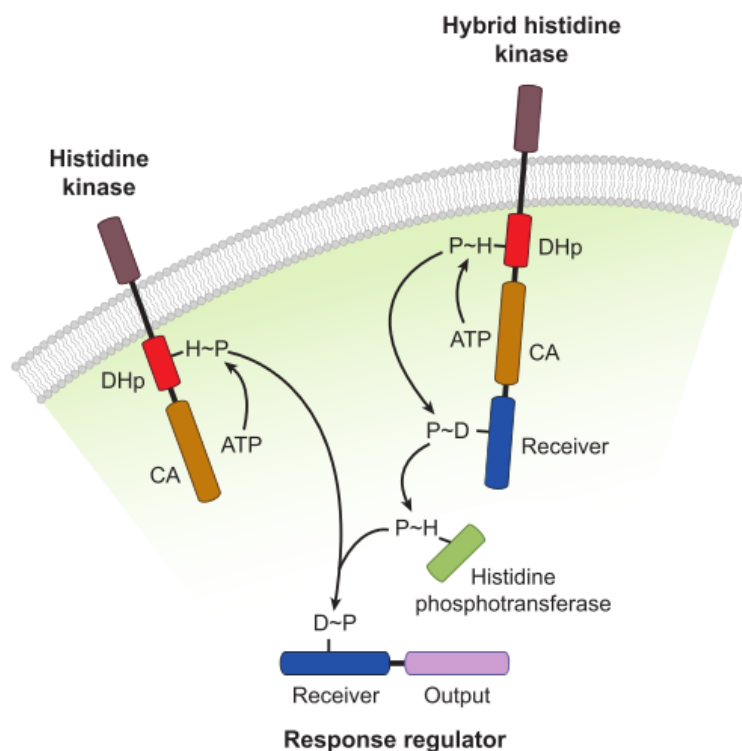


**Figura 2. Cromosoma de *S. coelicolor*.** Este cromosoma presenta un tamaño de 8.7 Mb. Se indica el núcleo (azul oscuro) y los “brazos” (azul claro). Los círculos 1 y 2 (desde el exterior), muestran todos los genes (7825) en ambas cadenas, coloreados en base a su función (negro, metabolismo energético; rojo, metabolismo secundario; verde oscuro, asociado a superficie; cian, degradación de grandes moléculas; magenta, degradación de pequeñas moléculas; amarillo, metabolismo central o intermediario; azul, reguladores; naranja, proteínas hipotéticas conservadas; marrón, pseudogenes; verde, desconocido). Los círculos 3, 4, 5, 6 y 7 muestran los genes esenciales, los genes de “contingencia”, los elementos móviles, el contenido en G+C y el GC bias, respectivamente. También se indican el origen de replicación (Ori) y las proteínas terminales (círculos azules en los extremos). [38]

## 1.2 Sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes (TCSs; *Two Component Systems*) son sistemas de regulación globales presentes fundamentalmente en eubacterias, aunque también se han identificado en arqueobacterias, levaduras, hongos, protozoos y plantas. Los TCSs son los sistemas de transducción de señales más importantes en procariotas, permitiéndoles responder a multitud de señales externas e internas, ya que son capaces de percibir una gran diversidad de estímulos y están implicados en todos sus procesos biológicos, desde el metabolismo hasta la comunicación intercelular. Los TCSs ejercen una regulación pleiotrópica, es decir, un mismo sistema puede actuar sobre diferentes procesos biológicos, lo que permite su coordinación e integración. [5]

Los TCSs constan, al menos de forma canónica, de dos elementos: una proteína sensora denominada histidina quinasa (HK) y un regulador de respuesta (RR); aunque se han descrito modelos alternativos que incorporan componentes adicionales, como por ejemplo los *phosphorelays*, compuestos por una HK híbrida, una histidina fosfotransferasa (HPt) y un RR (Fig.3). La HK consta de un dominio sensor, capaz de reconocer una señal o conjunto de señales específico (extracelular, intracelular o a nivel de membrana); un dominio de dimerización y fosfotransferencia (DHp), que permite la oligomerización de estos receptores y



**Figura 3. Sistemas de dos componentes.** A la izquierda se muestra un TCS canónico, con una HK y un RR. A la derecha se muestra un modelo alternativo de TCS, concretamente un *phosphorelay*, que consta de una HK híbrida, una HPt y un RR. El esquema indica el mecanismo molecular de acción de estos sistemas. [7]

## Introducción

contiene el residuo de histidina (H) que es fosforilado; y un dominio catalítico (CA), capaz de unir ATP. El RR consta de un dominio regulador (*receiver*), que contiene el residuo de aspartato (D) que es fosforilado; y de un dominio efector (*output*), que puede tratarse de un dominio de unión a ADN (es lo más habitual, la mayoría de RRs son factores transcripcionales), ARN o proteínas, o un dominio con actividad catalítica. El mecanismo molecular canónico de acción de un TCS presenta los siguientes pasos:

1. La HK percibe un determinado estímulo a través de su dominio sensor, lo que produce un cambio conformacional en la proteína.
2. El receptor oligomeriza y se autofosforila en un residuo de H. El fosfato se transfiere desde el ATP unido al dominio catalítico.
3. El fosfato se transfiere al residuo de D del RR, lo que produce un cambio conformacional en la proteína.
4. El RR oligomeriza y se activa el dominio efector, dando lugar a una respuesta celular.

Por regla general cada HK es muy específica de su respectivo RR; además, las parejas HK-RR suelen encontrarse juntas a nivel genético y formando parte del mismo operón. Sin embargo, también se han descrito HKs y RRs que carecen de pareja y que se denominan “huérfanos”, así como fenómenos de regulación cruzada entre distintos TCSs, lo que aumenta notablemente la complejidad de estas redes de regulación. [5]–[7]

El número de TCSs presente en un organismo está íntimamente relacionado con el hábitat del mismo y, por ende, con el rango de estímulos y condiciones a los que debe hacer frente. En el caso de *S. coelicolor*, cuyo hábitat es el suelo (entorno con condiciones ambientales cambiantes y acceso a nutrientes muy variable) presenta 67 TCSs, 17 HKs huérfanas y 13 RRs huérfanos. [6]

### 1.3 Coordinación del metabolismo primario y la producción de antibióticos

Las bacterias del género *Streptomyces* se encuentran entre los mayores productores naturales de antibióticos, fungicidas, etc.; esta capacidad es clave para su supervivencia en un hábitat como el suelo, donde deben competir con otros muchos organismos. La producción de antibióticos responde a situaciones de estrés, que en la mayoría de los casos están relacionadas a déficit de nutrientes. La generación de estos compuestos permite a estos microorganismos competir más eficazmente con el resto de organismos del medio por el acceso a los recursos; sin embargo, la síntesis de los mismos supone un gasto energético y de precursores metabólicos.

## Introducción

Por ello, estos microorganismos han desarrollado complejas redes de regulación que les permiten coordinar la producción de antibióticos al flujo del metabolismo primario y al acceso a nutrientes. Esta coordinación es posible gracias a los sistemas de regulación pleiotrópicos, siendo uno de los mayores exponentes los TCSs. [8]

Los principales TCSs descritos que coordinan el metabolismo primario con la producción de antibióticos en *Streptomyces* son AfsQ1/Q2, DraR/K y PhoP/R. [8]

El sistema AfsQ1/Q2 responde a un exceso de nitrógeno y coordina el balance C/N/P, modulando la asimilación de nitrógeno y la captación de fósforo y carbono. Además, es un regulador positivo de la producción de los antibióticos ACT, RED y CDA en *S. coelicolor*, actuando tanto de forma directa, modulando a los reguladores principales de sus rutas biosintéticas, como de forma indirecta, controlando la activación de *sigQ*, un factor sigma que actúa como regulador negativo de la producción de antibióticos.

El sistema DraR/K responde a cambios en el ratio C/N debido a un exceso de nitrógeno, de forma similar a AfsQ1/Q2, y regula el metabolismo del nitrógeno. Además, constituye un activador de la producción de ACT, y un represor de la producción de los antibióticos RED y  $\gamma$ CPK.

El sistema PhoP/R constituye el principal sistema de control del metabolismo de fósforo en *Streptomyces*. Este sistema responde a la limitación de fósforo, modulando los sistemas de captación y reciclaje de esta molécula. Asimismo, controla la transición a la fase estacionaria y el metabolismo secundario, actuando como regulador positivo de la producción de ACT y RED. El control por fósforo de la biosíntesis de antibióticos y otros metabolitos secundarios es un fenómeno descrito en multitud de bacterias a través de este TCS; es un proceso que está muy conservado en los organismos procariotas, aunque los entresijos del mecanismo a nivel molecular aún no están claros.

### 1.4 Antecedentes

#### 1.4.1 El sistema AbrA

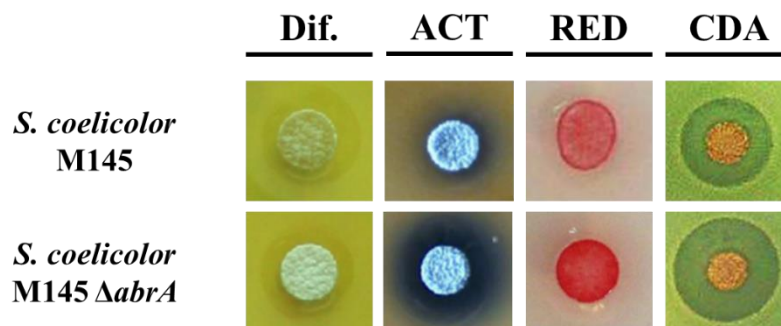
El sistema AbrA es un TCS canónico (formado por una HK y un RR) que actúa como regulador pleiotrópico negativo de la producción de los antibióticos ACT, RED y CDA, así como del proceso de diferenciación (*Fig.4*). Se ha descrito que la activación de este sistema está asociada a los elementos Mg y/o Fe, aunque se desconoce si de forma directa o indirecta. La HK, denominada AbrA1, es codificada por el gen *SCO1744*; y el RR, denominado AbrA2, por el gen *SCO1745*. Ambos genes forman parte de un mismo operón junto con los genes



*SCO1742* y *SCO1743*, que codifican para un sistema de transporte ABC, que podría estar implicado en el funcionamiento del TCS AbrA. Este sistema es capaz de autorregularse a sí mismo, actuando como regulador positivo del promotor de su propio operón. [9]–[11]

AbrA2 parece ser un factor transcripcional, ya que posee un motivo de unión al ADN (motivo hélice-giro-hélice de la familia LuxR). Sin embargo, hasta el momento no se han identificado dianas directamente reguladas por esta proteína y, por ende, tampoco secuencias o motivos génicos que puedan ser reconocidos por la misma. La mayor parte de las observaciones realizadas en cuanto a la búsqueda de dianas de este sistema son de carácter fenotípico; aunque también se ha realizado un ensayo de *microarray* que ha permitido identificar varios genes potencialmente regulados por este sistema, directa o indirectamente, y que se incluyen en el metabolismo primario, el desarrollo y diferenciación morfológicos, y en la producción de antibióticos. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para validar estos últimos resultados, por encontrarse en el límite en cuanto a su aceptación con rigor estadístico. [10], [11]

El sistema AbrA está muy poco conservado en el género *Streptomyces*, estando solo presente en *S. coelicolor* y *S. lividans*, a pesar de la conservación que sí muestra su entorno génico en otras especies de estreptomicetos (*Fig.5*).

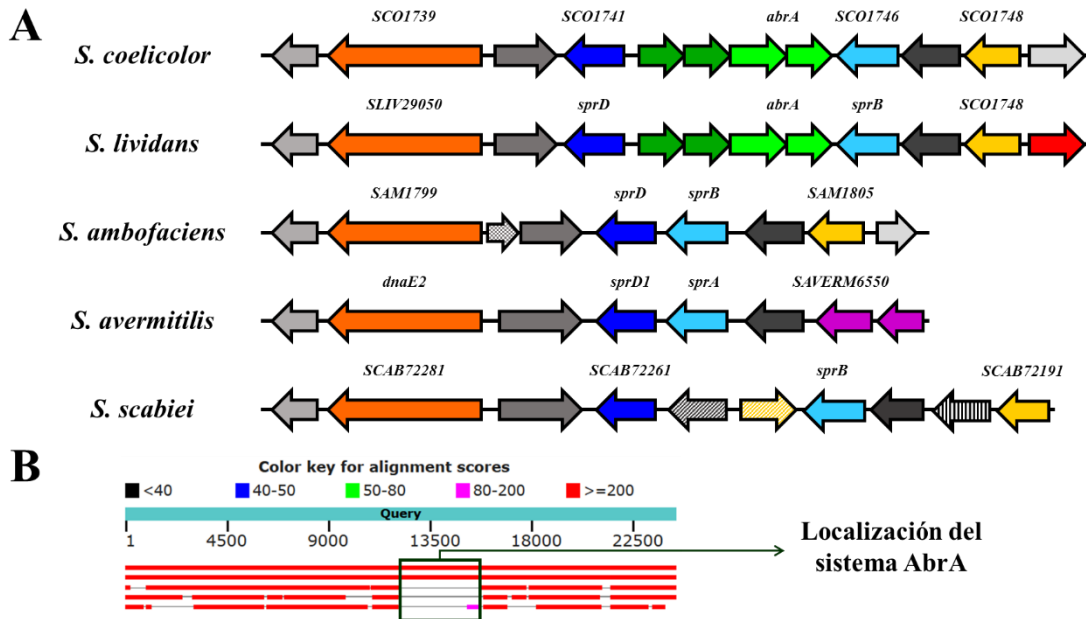


**Figura 4. Estudio fenotípico de la delección del TCS AbrA.** La delección del sistema AbrA ( $\Delta$ *SCO1744/45*) incrementa la velocidad de diferenciación (**Dif.**; medio YEPD), y la producción de los antibióticos **ACT** (medio YEPD), **RED** (medio PGA) y **CDA** (bioensayo contra *Bacillus subtilis*). [10]

#### 1.4.2 Metabolismo del fósforo. Sistema Pst

El fósforo es un elemento esencial a nivel celular para muchos procesos biológicos como el mantenimiento del material genético o el metabolismo energético. La principal forma asimilable de fósforo en bacterias es el fosfato inorgánico (Pi); su homeostasis es controlada principalmente por el regulón Pho, un sistema que incluye enzimas extracelulares capaces de obtener Pi a partir de fosfato orgánico, transportadores específicos de Pi y enzimas involucradas

## Introducción



**Figura 5. Conservación del sistema AbrA en el género *Streptomyces*.** (A) Representación del entorno génico del operón *SCO1742-45* (donde se incluye el TCS AbrA) en *S. coelicolor* y comparación con otras especies de *Streptomyces* (*S. lividans*, *S. ambofaciens*, *S. avermitilis* y *S. scabiei*). Las flechas con el mismo patrón de color y trama están conservadas entre las distintas especies (incluyendo su orientación y posición relativa respecto al resto de genes). Las funciones de los genes se han codificado por color: **gris**, proteína hipotética; **naranja**, subunidad alfa de la ADN polimerasa; **azul**, enzima serín proteasa; **verde**, operón del sistema AbrA; **amarillo**, regulador transcripcional; **rojo**, componente de la maquinaria de división celular; **magenta**, enzima oxigenasa. (B) Alineamiento de secuencia mediante la herramienta BLAST (NCBI) de las regiones génicas mostradas en A (especies de estreptomicetos en el mismo orden). Como *query* se ha utilizado la región génica procedente de *S. coelicolor*. Se indica la localización del sistema AbrA en el alineamiento.

en su almacenamiento. Este regulón es controlado por el TCS PhoP/R (denominación dada en *Streptomyces*, la nomenclatura es variable en otros organismos), cuyo RR, PhoR, es capaz de reconocer secuencias específicas denominadas *PHO boxes*, variables entre organismos. [12]

Dentro del regulón Pho, el sistema Pst constituye el principal transportador específico de Pi, concretamente se trata de un sistema de transporte ABC de alta afinidad por el Pi, que está muy conservado en bacterias. Este sistema está codificado por el operón *pst* que contiene los genes *pstS*, *pstC*, *pstA* y *pstB* (en *Streptomyces*); siendo PstS la proteína que une directamente el Pi. Al margen de la regulación mediante el sistema PhoP/R a la que está sometido el sistema Pst a través de las *PHO boxes* presentes en su promotor (de forma análoga al resto del regulón Pho), se ha descrito una regulación coordinada al metabolismo del C, acumulándose la proteína PstS en presencia de fructosa y otras fuentes de carbono.[13]–[15]



## 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo general del presente trabajo es profundizar en el regulón del TCS AbrA. Para ello se han establecido una serie de objetivos parciales, siendo el plan de trabajo propuesto el siguiente:

- 1) **Optimización de la metodología REDprobe.** Incorporar al laboratorio una nueva herramienta para el seguimiento de la actividad transcripcional de promotores de interés *in vivo*.
- 2) **Estudio del regulón del TCS AbrA.** Estudiar la actividad transcripcional de 11 promotores seleccionados por estar potencialmente regulados por el sistema AbrA, en presencia y ausencia de este TCS mediante la metodología REDprobe.
- 3) **Análisis de promotores.** Analizar las secuencias promotoras reguladas por el sistema AbrA para la búsqueda de motivos nucleotídicos que puedan intervenir en dicha regulación.
- 4) **Estudio de la regulación del promotor del operón *pst* por el sistema AbrA.** Profundizar en el estudio de este proceso de regulación para determinar el papel de un motivo identificado en este promotor en la regulación por AbrA.

## 3. RESULTADOS

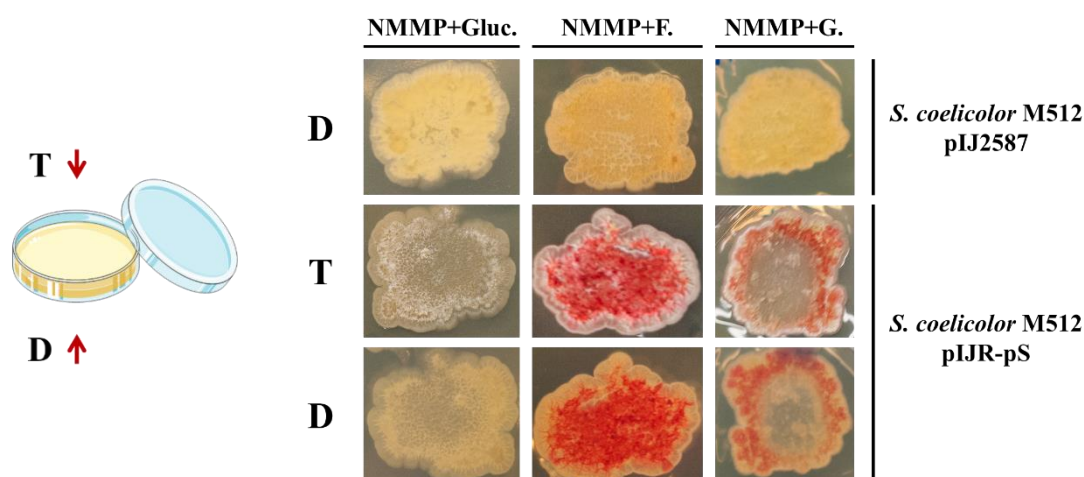
### 3.1 Optimización de la metodología REDprobe

Monitorizar la regulación de promotores *in vivo* en un organismo, ya sea procariota o eucariota, constituye una herramienta genética básica y esencial para el estudio y comprensión de sus procesos biológicos. Con el objetivo de introducir en el laboratorio una nueva herramienta para este propósito, se optimizó el sistema de análisis *in vivo* de promotores en *S. coelicolor* y *S. lividans* desarrollado por van Wezel *et al.* ([16]); al cual denominaremos, de aquí en adelante, sistema REDprobe. El sistema REDprobe se basa en la aplicación del regulador transcripcional RedD como reportero. Esta proteína es el regulador específico de la ruta de síntesis del antibiótico RED, y se ha descrito que los niveles de este antibiótico dependen esencialmente de la concentración intracelular de dicho regulador, por lo que sus niveles correlacionan directamente. Por lo tanto, la transcripción asociada a los promotores que se deseen estudiar se puede seguir *in vivo* a través de la síntesis de antibiótico coloreado RED ([16], [17]). Este sistema reportero se ha seleccionado por presentar una serie de ventajas que resultan de interés para la aplicación que se le pretende dar en el laboratorio de cara a futuros experimentos, entre las que destacan: aplicación rápida y sencilla, lo que facilita el análisis masivo de promotores; la actividad transcripcional de los promotores bajo estudio se puede seguir visualmente (lo que permite su aplicación en escrutinios a gran escala de librerías de promotores) y se puede cuantificar; y elevada resolución, gracias a la amplificación que supone la activación de la ruta biosintética de RED por parte del regulador RedD. Finalmente es importante destacar que este sistema ha sido diseñado para su aplicación en la cepa *S. coelicolor* M512 (carece de los genes *actII-ORF4* y *redD*, por lo que no es capaz de producir, *per se*, antibióticos coloreados que interfieran en el estudio), así como en *S. lividans* (en las condiciones de trabajo habituales en el laboratorio no presenta producción de RED). [16]

Con el fin de comprobar si la metodología REDprobe funcionaba correctamente en nuestras manos se analizó la actividad transcripcional del promotor del gen *pstS* de *S. lividans* (*pstSp-SL*). Este promotor, caracterizado previamente en el laboratorio ([14], [15], [18]), se induce en presencia de fuentes de carbono alternativas como la fructosa, por lo que se analizó la producción de RED de *S. coelicolor* M512 transformado con el plásmido pIJR-pS (plásmido derivado de pIJ2587 en el que el gen *redD* se encuentra bajo el control transcripcional del promotor *pstSp-SL*; véase *Materiales y métodos*) en medio mínimo NMMP (tanto sólido como líquido) suplementado con diferentes fuentes de carbono: glucosa 0.5 %, fructosa 5 % y glicerol

## Resultados

1 %. Como se puede observar en la *Figura 6*, el sistema REDprobe funcionó correctamente en NMMP-Agar, observándose, tal y como se había descrito previamente, una reducida actividad transcripcional del promotor *pstSp* en presencia de glucosa, una moderada actividad en presencia de glicerol y una elevada actividad en presencia de fructosa. Por el contrario, el sistema REDprobe no funcionó en caldo NMMP, puesto que no se observó síntesis de RED en ninguna de las condiciones ensayadas (*Fig.7*). Las notables diferencias observadas en un mismo medio entre su forma sólida y su forma líquida son habituales al trabajar con *Streptomyces*, pudiendo ser atribuibles, entre otros factores, al distinto desarrollo y diferenciación morfológica que muestran estos organismos en dichas condiciones y/o a la capacidad de ciertas especies, como *S. coelicolor*, de producir agarasas que le permiten utilizar el agar presente en medios sólidos, lo cual afecta a su metabolismo.



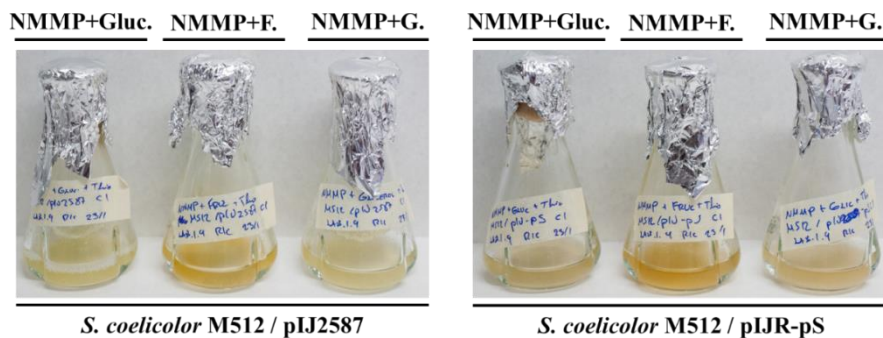
**Figura 6. Optimización del sistema REDprobe.** Análisis de la actividad transcripcional del promotor *pstSp*-SL mediante el sistema REDprobe. Se muestran cultivos de *S. coelicolor* M512 transformados con los plásmidos pIJ2587 (control negativo; gen *redD* sin promotor) y pIJR-pS (*redD* bajo el control de *pstSp*-SL) en NMMP-Agar suplementado con diferentes fuentes de carbono: glucosa 0.5 % (**Gluc.**), fructosa 5 % (**F.**) y glicerol 1 % (**G.**). Las fotografías de las colonias fueron tomadas tras 10 días de incubación desde la parte superior de la placa Petri (**T**) y desde la parte inferior (**D**); tal y como indica el diagrama de la izquierda.

Una vez confirmada la funcionalidad del sistema REDprobe, se realizó una batería de ensayos en diferentes medios de uso común en el laboratorio, tanto en su variante sólida como líquida, para identificar los más adecuados de cara a futuros estudios en los que se desee incorporar esta metodología; así, se incluyeron en esta batería de ensayos los medios LB, R2YE y PGA/PGB (además, se incorporó el medio NMMP suplementado con glucosa 0.5 % como control negativo). Adicionalmente al promotor *pstSp*-SL, se incluyó en esta batería de ensayos al promotor del gen *xysA* de *S. halstedii* JM8 (*xysA*p-SH), caracterizado previamente en el laboratorio ([18], [19]); para ello, se incorporó al estudio el plásmido pIJR-xA (plásmido derivado de pIJ2587 en el que el gen *redD* se encuentra bajo el control transcripcional del

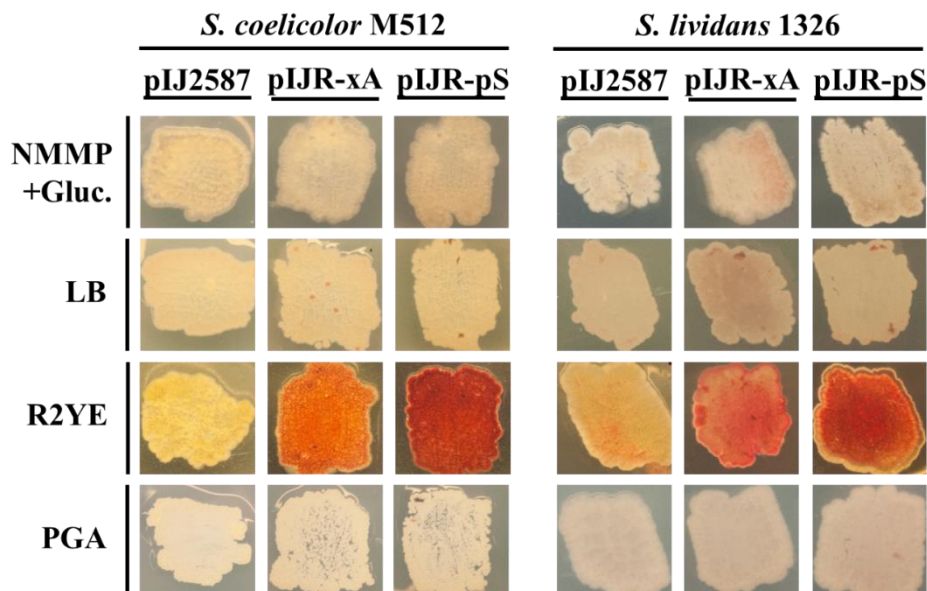
## Resultados

promotor *xyS*Ap-SH; véase *Materiales y métodos*). Paralelamente a la optimización en *S. coelicolor* M512, los ensayos también se realizaron en *S. lividans* 1326, microorganismo empleado en el laboratorio como plataforma de producción enzimática, con el fin de poner a punto el sistema REDprobe también en esta cepa, para su potencial aplicación en futuros estudios.

De entre los medios ensayados (LB, R2YE y PGA/PGB), el sistema REDprobe solo funcionó en el medio sólido R2YE-Agar y en los medios líquidos R2YE y PGB, tanto en *S. coelicolor* M512 como en *S. lividans* 1326, para los dos promotores estudiados (*Fig.8* y *Fig.9*).



**Figura 7. Optimización del sistema REDprobe.** Análisis de la actividad transcripcional del promotor *pstSp-SL* mediante el sistema REDprobe. Se muestran cultivos de *S. coelicolor* M512 transformados con los plásmidos pIJ2587 (control negativo; gen *redD* sin promotor) y pIJR-pS (*redD* bajo el control de *pstSp-SL*) en caldo NMMP suplementado con diferentes fuentes de carbono: glucosa 0.5 % (**Gluc.**), fructosa 5 % (**F.**) y glicerol 1 % (**G.**). Las fotografías de los cultivos fueron tomadas tras 10 días de incubación.

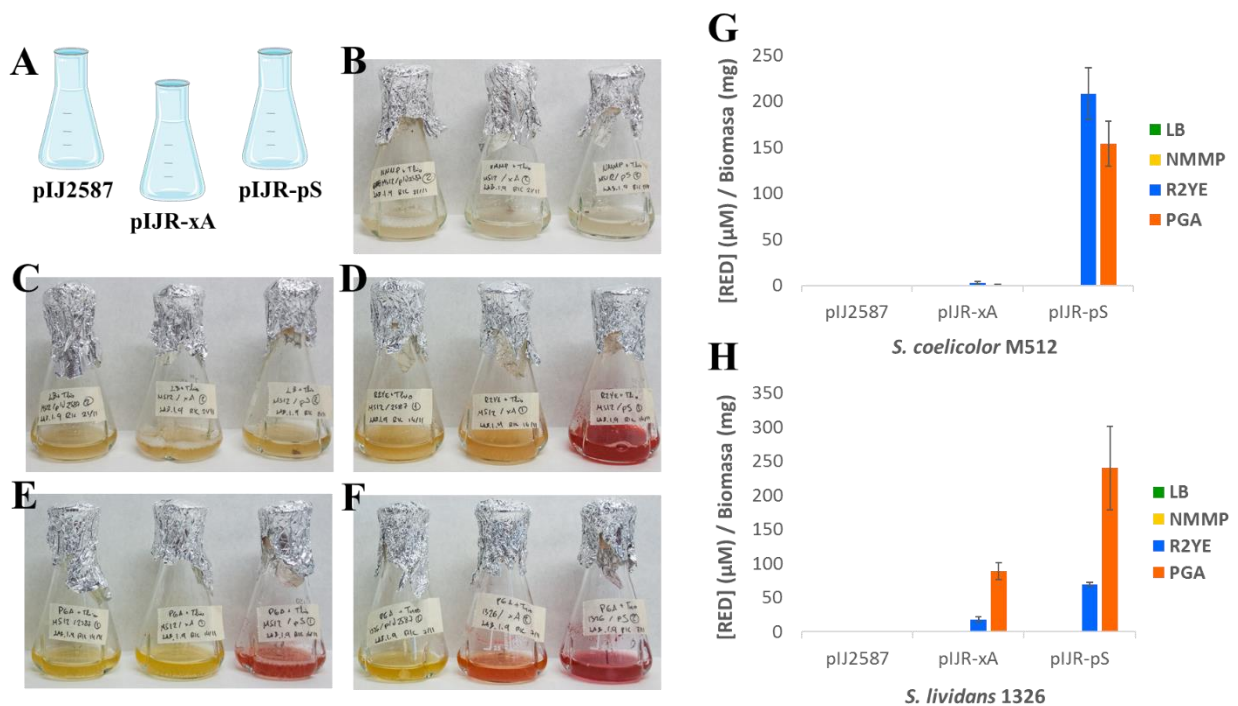


**Figura 8. Optimización del sistema REDprobe.** Análisis de la actividad transcripcional de los promotores *pstSp-SL* y *xyS*Ap-SH mediante el sistema REDprobe. Se muestran cultivos de *S. coelicolor* M512 (izquierda) y *S. lividans* 1326 (derecha) transformados con los plásmidos pIJ2587 (control negativo; gen *redD* sin promotor), pIJR-xA (*redD* bajo el control de *xyS*Ap-SH) y pIJR-pS (*redD* bajo el control de *pstSp-SL*) en los medios sólidos NMMP-Agar suplementado con glucosa 0.5 % (medio empleado como control negativo para ambos promotores), LB-Agar, R2YE-Agar y PGA. Las fotografías de las colonias fueron tomadas tras 7 días de incubación desde la parte inferior de la placa Petri.

## Resultados

En resumen, los resultados obtenidos durante el proceso de optimización fueron:

- El sistema REDprobe funciona tanto en *S. coelicolor* M512 como en *S. lividans* 1326.
- Existen notables diferencias en ciertos medios entre su “forma sólida” y su “forma líquida”.
- Los medios sólidos adecuados para la aplicación del sistema REDprobe son NMMP-Agar y R2YE-Agar.
- Los medios líquidos adecuados para la aplicación del sistema REDprobe son R2YE y PGB.



**Figura 9. Optimización del sistema REDprobe.** Análisis de la actividad transcripcional de los promotores *pstSp-SL* y *xysAp-SH* mediante el sistema REDprobe. Tal y como se muestra en **A**, los cultivos de cada imagen se corresponden a las cepas *S. coelicolor* M512 o *S. lividans* 1326 transformadas, de izquierda a derecha, con los plásmidos pIJ2587 (control negativo; gen *redD* sin promotor), pIJR-xA (*redD* bajo el control de *xysAp-SH*) y pIJR-pS (*redD* bajo el control de *pstSp-SL*). Se muestran cultivos de *S. coelicolor* M512 en medios NMMP suplementado con glucosa 0.5 % (**B**) como control negativo, LB (**C**), R2YE (**D**) y PGB (**E**); así como cultivos de *S. lividans* 1326 en medio PGB (**F**). Las fotografías de los cultivos fueron tomadas tras 4 días de incubación. Los gráficos **G** y **H** muestran la cuantificación de la producción de RED por unidad de biomasa en los cultivos de 4 días de cada medio para *S. coelicolor* M512 y *S. lividans* 1326 respectivamente. Los datos se corresponden a la media de 3 réplicas biológicas; las barras de error muestran la desviación estándar de la media.

### 3.2 Estudio del regulón del TCS AbrA

El TCS AbrA parece ser un regulador clave en el desarrollo y en la producción de antibióticos en *S. coelicolor*. Aunque los análisis bioinformáticos parecen indicar que el RR AbrA2 es un regulador transcripcional; hasta el momento no se han identificado dianas directamente reguladas por esta proteína y, por ende, tampoco secuencias o motivos génicos que puedan ser reconocidos por la misma.

Con el fin de profundizar en el estudio del regulón del TCS AbrA, se procedió a la validación de la potencial regulación de varios promotores de interés por parte de este sistema a través de la metodología REDprobe, para la monitorización de su actividad transcripcional *in vivo*. Se seleccionaron promotores de genes de interés que, en estudios fenotípicos y un ensayo de *microarray* previos, habían mostrado ser potenciales dianas del sistema AbrA ([9]–[11]). Entre los genes seleccionados se incluyeron genes clave en el metabolismo, la diferenciación morfológica y la producción de antibióticos (*Tabla 1*). Así mismo, se introdujo en este estudio el promotor del gen *pstS* de *S. lividans* (utilizado en la optimización del sistema REDprobe) ya que resultados preliminares obtenidos durante este trabajo sugirieron una posible regulación del mismo por parte del sistema AbrA.

Para este estudio se generaron plásmidos derivados de pIJ2587 en los que el gen *redD* quedase bajo el control transcripcional de los promotores de interés para la aplicación del sistema REDprobe en el análisis de su actividad transcripcional (véase *Materiales y métodos*). Así mismo se generó la cepa *S. coelicolor* M512  $\Delta$ *abrA* mediante la tecnología CRISPR-Cas9 (véase *Materiales y métodos*). Los plásmidos generados se introdujeron en las cepas *S. coelicolor* M512 y *S. coelicolor* M512  $\Delta$ *abrA* para determinar si existían diferencias en el patrón de expresión de cada promotor entre ambas, lo que indicaría una regulación de los mismos (directa o indirecta) por el sistema AbrA. Como control interno del estudio se incluyó el promotor del propio sistema AbrA (*SCO1742-45p*), ya que previamente se había descrito que este TCS se autorregula positivamente ([9]). El seguimiento se realizó en el medio líquido PGB tanto a nivel cualitativo (en base a la observación de la aparición del color rojo característico del antibiótico RED en las células) como a nivel cuantitativo (se determinó la concentración de RED producida por unidad de biomasa).

Los resultados del análisis transcripcional a través de la metodología REDprobe (*Fig.10* y *Fig.11*) muestran, tal y como se había descrito previamente, que el sistema AbrA se autorregula positivamente, disminuyendo significativamente la actividad transcripcional del promotor *abrAp* (pIJR-AA) en ausencia del TCS (cepa *S. coelicolor* M512  $\Delta$ *abrA*); aunque realmente no



## Resultados

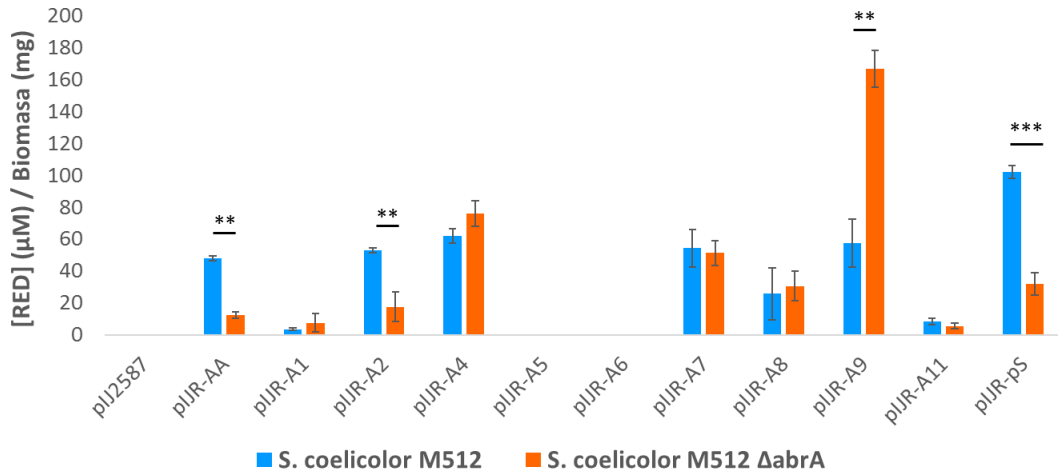
es una regulación de “todo o nada” como se había observado en las condiciones descritas con anterioridad. Respecto al resto de promotores estudiados, únicamente 3 de los mismos muestran diferencias significativas entre las dos cepas (*Fig.10* y *Fig.11*). Por un lado, los promotores *SCO0268p* (pIJR-A2) y *pstSp-SL* (pIJR-pS), que controlan la expresión de un lantibiótico y del sistema de transporte de fosfato Pst respectivamente, son regulados positivamente por el sistema AbrA, ya que la delección del mismo da lugar a una disminución significativa de su actividad transcripcional. Por otro lado, el promotor *actII-ORF4p* (pIJR-A9), que controla la expresión del regulador específico de la ruta de síntesis del antibiótico ACT, es regulado negativamente por el sistema AbrA, ya que la delección del mismo da lugar a un aumento significativo de su actividad transcripcional.

**Tabla 1.** Promotores potencialmente regulados por el sistema AbrA. Se indica la denominación del plásmido derivado de pIJ2587 en el que el gen *redD* queda bajo el control de cada promotor.

Promotor	Genes bajo el control del promotor		Plásmido
<i>SCO1742-45p</i> ( <i>abrAp</i> )	<i>SCO1742</i>	Transportador ABC	pIJR-AA
	<i>SCO1743</i>	Transportador ABC	
	<i>SCO1744</i>	<i>abrA1</i> (Histidina quinasa)	
	<i>SCO1745</i>	<i>abrA2</i> (Regulador de respuesta)	
<i>SCO0141p</i>	<i>SCO0141</i>	Proteína de unión a calcio	pIJR-A1
<i>SCO0268p</i>	<i>SCO0268</i>	Lantibiótico	pIJR-A2
<i>SCO2435/36p</i>	<i>SCO2435</i>	Proteína de unión a calcio	pIJR-A4
	<i>SCO2436</i>	Proteína integral de membrana	
<i>SCO2716p</i>	<i>SCO2716</i>	<i>chpA</i> (Chaplina)	pIJR-A5
<i>SCO2719p</i>	<i>SCO2719</i>	<i>rdlB</i> (Rodlina)	pIJR-A6
<i>SCO4562-75p</i>	<i>SCO4562</i>	<i>nuoA</i> (Sub. NADH deshidrogenasa)	pIJR-A7
	<i>SCO4563</i>	<i>nuoB</i> (Sub. NADH deshidrogenasa)	
	<i>SCO4564</i>	<i>nuoC</i> (Sub. NADH deshidrogenasa)	
	<i>SCO4565</i>	<i>nuoD</i> (Sub. NADH deshidrogenasa)	
	<i>SCO4566</i>	<i>nuoE</i> (Sub. NADH deshidrogenasa)	
	<i>SCO4567</i>	<i>nuoF</i> (Sub. NADH deshidrogenasa)	
	<i>SCO4568</i>	<i>nuoG</i> (Sub. NADH deshidrogenasa)	
	<i>SCO4569</i>	<i>nuoH</i> (Sub. NADH deshidrogenasa)	
	<i>SCO4570</i>	<i>nuoI</i> (Sub. NADH deshidrogenasa)	
	<i>SCO4571</i>	<i>nuoJ</i> (Sub. NADH deshidrogenasa)	
	<i>SCO4572</i>	<i>nuoK</i> (Sub. NADH deshidrogenasa)	
	<i>SCO4573</i>	<i>nuoL</i> (Sub. NADH deshidrogenasa)	
<i>SCO4574</i>	<i>nuoM</i> (Sub. NADH deshidrogenasa)		
<i>SCO4575</i>	<i>nuoN</i> (Sub. NADH deshidrogenasa)		
<i>SCO4988-90p</i>	<i>SCO4988</i>	Carbohidrato quinasa	pIJR-A8
	<i>SCO4989</i>	Regulador transcripcional	
	<i>SCO4990</i>	Regulador de la síntesis de purinas	
<i>SCO5085p</i> ( <i>actII-ORF4p</i> )	<i>SCO5085</i>	<i>actII-ORF4</i> (Regulador del <i>cluster act</i> )	pIJR-A9
<i>SCO3217p</i>	<i>SCO3217</i>	<i>cdaR</i> (Regulador del <i>cluster cda</i> )	pIJR-A11
<i>pstSp-SL</i>	<i>pstS</i>	Proteína de unión a fosfato (T. ABC)	pIJR-pS
	<i>pstC</i>	Transportador ABC de fosfato	
	<i>pstA</i>	Transportador ABC de fosfato	

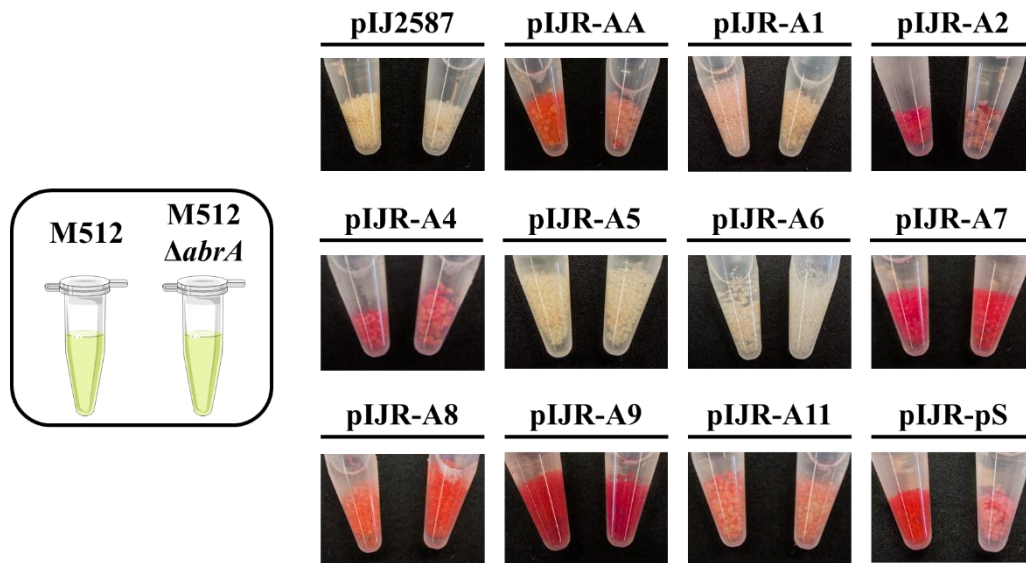
**Nota:** Todos los genes pertenecen a *S. coelicolor* a excepción de los tres últimos (*pstS*, *pstC* y *pstA*), que pertenecen a *S. lividans*.

## Resultados



**Figura 10. Estudio del regulón del TCS AbrA.** Análisis cuantitativo de la actividad transcripcional de los promotores de interés (detallados en la *Tabla 1*) en las cepas *S. coelicolor* M512 y *S. coelicolor* M512  $\Delta$ abrA. Se ha determinado la concentración de RED por unidad de biomasa en cultivos de 3 días (cultivos con los plásmidos pIJ2587, pIJR-A2, pIJR-A4 y pIJR-pS) y 4 días (cultivos con el resto de plásmidos). Los datos se corresponden a la media de 3 réplicas; las barras de error muestran la desviación estándar.

\*\* indica diferencias significativas con P-Valor < 0.01.  
 \*\*\* indica diferencias significativas con P-Valor < 0.001.



**Figura 11. Estudio del regulón del TCS AbrA.** Análisis cualitativo de la actividad transcripcional de los promotores de interés (detallados en la *Tabla 1*) en las cepas *S. coelicolor* M512 (eppendorf de la izquierda, como indica el esquema) y *S. coelicolor* M512  $\Delta$ abrA (eppendorf de la derecha). Las fotografías se han tomado de cultivos de 3 días (cultivos con los plásmidos pIJ2587, pIJR-A2, pIJR-A4 y pIJR-pS) y 4 días (cultivos con el resto de plásmidos).

En resumen, los resultados obtenidos en el estudio del regulón del TCS AbrA fueron:

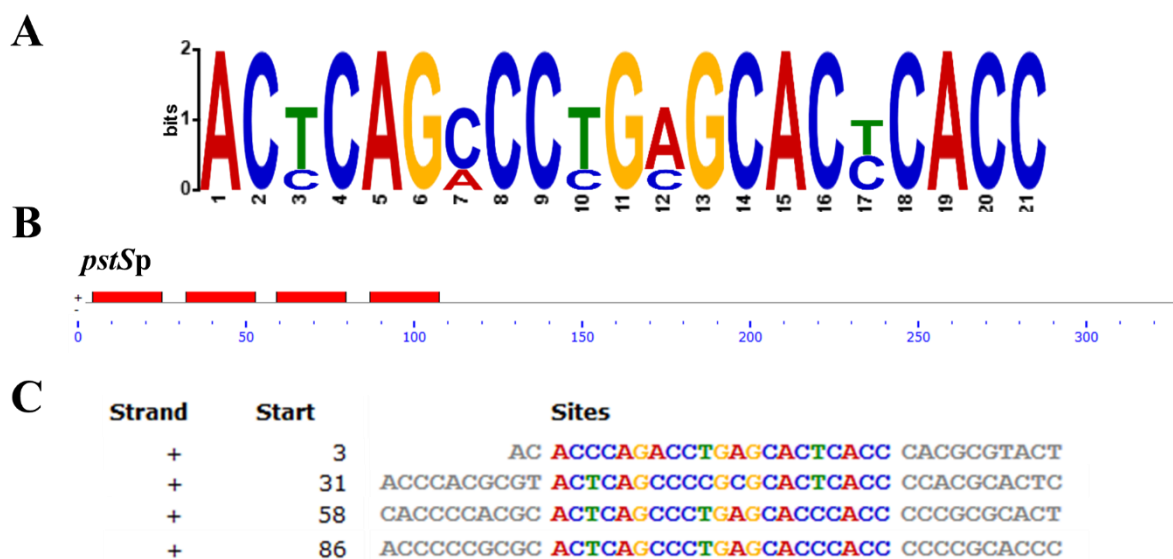
- El sistema AbrA actúa como regulador positivo (directo o indirecto) de su propio promotor, autorregulándose; y de los promotores *SCO0268p*, que controla la expresión de un lantibiótico en *S. coelicolor*; y *pstSp-SL*, que controla la expresión del sistema de transporte de fosfato Pst en *S. lividans*.

## Resultados

- El sistema AbrA actúa como regulador negativo (directo o indirecto) del promotor *actII-ORF4p*, que controla la expresión del regulador específico de la ruta de síntesis del antibiótico ACT.
- En las condiciones estudiadas, el sistema AbrA no regula a los promotores *SCO0141p*, *SCO2435/36p*, *SCO2716p*, *SCO2719p*, *SCO4562-75p*, *SCO4988-90p*, *SCO5085p* y *SCO3217p*.

### 3.3 Análisis de promotores

Con el fin de identificar secuencias o motivos de nucleótidos sobre los que pudiera encontrarse actuando el sistema AbrA, se realizó el análisis de las secuencias promotoras identificadas como sus dianas en el apartado anterior. Para ello se recurrió a MEME (*Multiple Em for Motif Elicitation*; [20]), una herramienta bioinformática de análisis de secuencias basado en motivos, que permitió identificar la presencia de un motivo repetido 4 veces en el promotor *pstSp-SL* (Fig.12), aunque ausente en el resto de promotores regulados por AbrA (no se identificó ningún motivo suficientemente significativo que estuviese presente en todos los promotores analizados).



**Figura 12. Análisis del promotor *pstSp* de *S. lividans*.** (A) Motivo (AC<sub>T/C</sub>CAG<sub>C/A</sub>CC<sub>T/C</sub>G<sub>A/C</sub>GCAC<sub>T/C</sub>CACC) identificado en el promotor *pstSp-SL* mediante la herramienta MEME. (B) Localización del motivo en el promotor *pstSp-SL*. (C) Descripción de las regiones de la secuencia donde se ha localizado el motivo.

**Nota:** La posición de los nucleótidos indicada en la figura hace referencia a la secuencia analizada numerada desde el extremo 5', no a su posición respecto al codón de inicio del gen *pstS*.

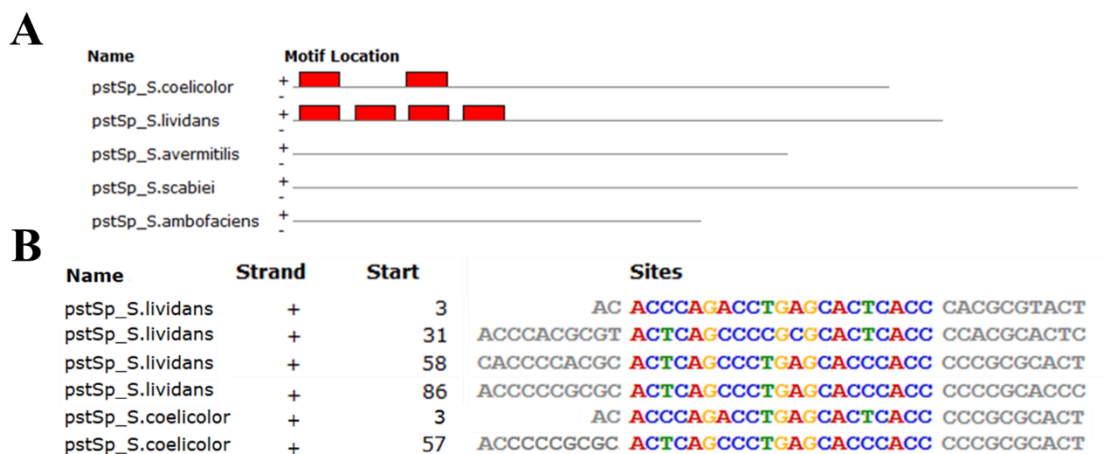
Con el fin de profundizar en el estudio del promotor *pstSp* (que realmente es el promotor del operón *pst*) se realizó una comparación entre los promotores del operón *pst* de *S. lividans*, *S. coelicolor* y otras especies de *Streptomyces*, concretamente *S. scabiei*, *S. avermitilis* y *S.*

## Resultados

*ambofaciens*, para determinar si el motivo identificado en el promotor de *S. lividans* se encuentra conservado en el resto de especies de *Streptomyces*. Se realizó un análisis FIMO (*Find Individual Motif Occurrences*; [21]) de los promotores indicados, observándose que el motivo identificado en *S. lividans* solo se encuentra conservado en *S. coelicolor*, estando ausente en el resto de promotores del operón *pst* de las otras especies de *Streptomyces* analizadas (Fig.13). Aunque el motivo está presente tanto en el promotor procedente de *S. lividans* como del procedente de *S. coelicolor*, el número de repeticiones es distinto, siendo 4 en el caso de *S. lividans*, y 2 en el caso de *S. coelicolor* (Fig.13).

Que este motivo solo esté presente en los promotores del operón *pst* de *S. lividans* y *S. coelicolor* sugiere notablemente que dicho motivo pueda estar sometido a la regulación por el sistema AbrA, ya que como se indicó previamente, el sistema AbrA únicamente se encuentra presente en estas dos especies de *Streptomyces* (Fig.5). Por ello, a partir de este momento nos referiremos al motivo identificado como *AR motif* (*AbrA Recognition motif*).

Un análisis detallado de las secuencias promotoras del operón *pst* de las distintas especies de *Streptomyces* analizadas se incluye en el material suplementario (Fig.S1); donde se indican las posiciones del *AR motif* y de las *PHO boxes*, un motivo presente en todos estos promotores que es reconocido por el TCS PhoP/R, principal sistema de regulación del sistema Pst. [14], [15]



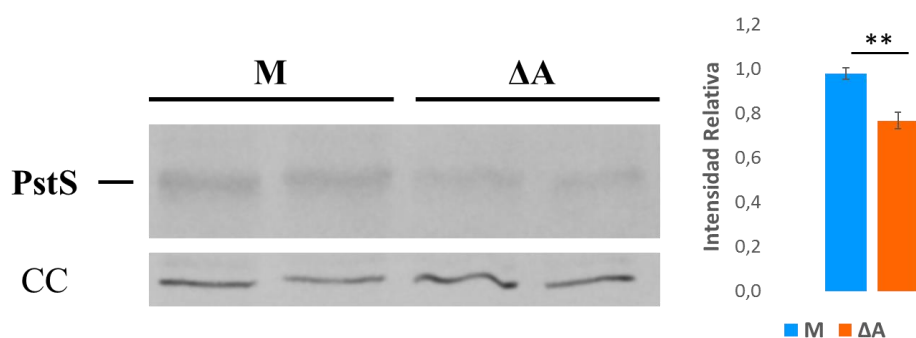
**Figura 13. Análisis del promotor del operón *pst* de diferentes especies de *Streptomyces*.** (A) Localización del motivo identificado inicialmente en *S. lividans* (Fig.12A) en los promotores del operón *pst* de las especies indicadas. (B) Descripción de las regiones de las secuencias donde se ha localizado el motivo. **Nota:** La posición de los nucleótidos indicada en la figura hace referencia a la secuencia analizada numerada desde el extremo 5', no a su posición respecto al codón de inicio del gen *pstS*.

### 3.4 Estudio de la regulación del promotor del operón *pst* por el sistema AbrA

A fin de profundizar en la regulación del promotor del operón *pst* por el sistema AbrA en *S. coelicolor* y *S. lividans* se llevaron a cabo las siguientes estrategias:

- Se estudió si el promotor *pstSp* de *S. coelicolor* (*pstSp*-SC) también era regulado por el sistema AbrA tal y como sugerían los resultados previos.
- Se estudió el papel del *AR motif* identificado en el promotor *pstSp* de *S. lividans* (*pstSp*-SL) en la regulación por el sistema AbrA.

Con respecto a la primera estrategia, se optó por determinar los niveles de expresión del gen *pstS* en las cepas *S. coelicolor* M145 (M) y *S. coelicolor* M145  $\Delta$ *abrA* ( $\Delta$ A) mediante *Western Blot*. Este análisis mostró que, efectivamente, el sistema AbrA es un regulador positivo del promotor del operón *pst* en *S. coelicolor*, ya que los niveles de la proteína PstS eran menores en la cepa que carecía de este TCS (*Fig.14*). Las diferencias de expresión en presencia y ausencia del sistema AbrA no son tan marcadas como las descritas anteriormente mediante la metodología REDprobe debido a varias razones: se está analizando la expresión de un gen contenido en el genoma, no en un plásmido multicopia (como es el caso del sistema REDprobe); se han analizado los niveles proteicos de la propia proteína PstS, no de un reportero (que en el caso de la metodología REDprobe permitía además un cierto grado de amplificación, ya que RedD es un factor transcripcional); y por último, en este caso se está analizando el promotor del propio *S. coelicolor*, no el procedente de *S. lividans* (promotores que a pesar de estar muy conservados presentan ciertas diferencias, como un distinto número de repeticiones del *AR motif*).

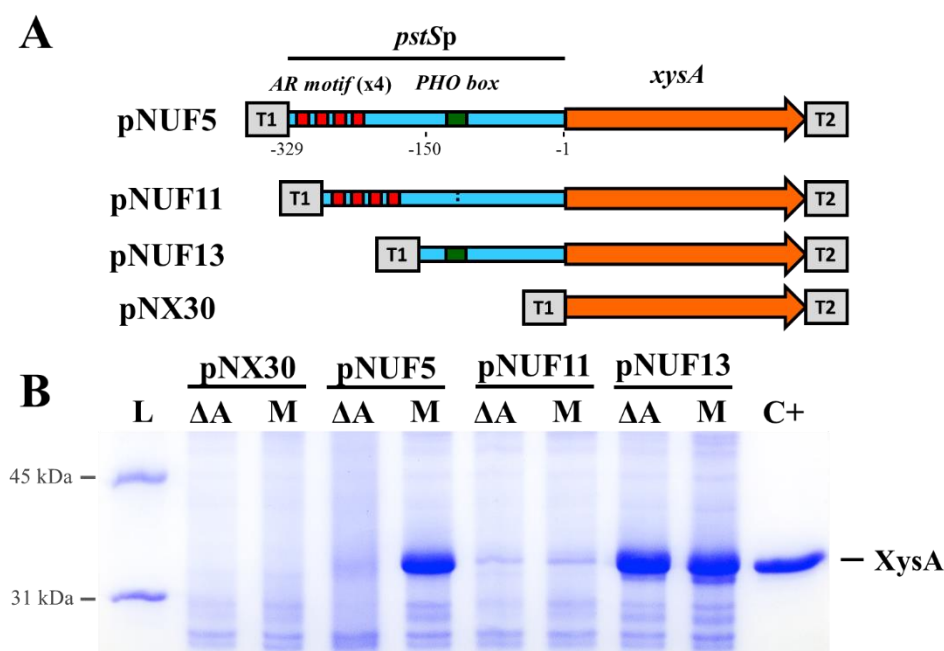


**Figura 14. Estudio de la regulación de *pstSp*-SC por el sistema AbrA.** Análisis de la expresión del gen *pstS* por el sistema AbrA en *S. coelicolor* M145 (M) y *S. coelicolor* M145  $\Delta$ *abrA* ( $\Delta$ A) mediante *Western Blot*. Se analizó la cantidad de proteína PstS intracelular. En el gráfico de la derecha se muestra la cuantificación de las bandas correspondientes a PstS de 3 réplicas; las barras de error muestran la desviación estándar. En la parte inferior se incluye el control de carga (CC).

\*\* indica diferencias significativas con P-Valor < 0.01.

## Resultados

Respecto a la segunda estrategia, para estudiar el papel del *AR motif* en la regulación del promotor *pstSp* de *S. lividans* por el sistema AbrA, se recurrió al gen reportero *xysA* procedente de *S. halstedii*, que codifica para una xilanasa. *S. coelicolor* M145 (M) y *S. coelicolor* M145  $\Delta$ *abrA* ( $\Delta$ A) fueron transformados con los plásmidos pNX30 (control negativo), pNUF5, pNUF11 y pNUF13 (obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio), que contienen el gen *xysA* bajo el control de diferentes versiones del promotor *pstSp*-SL (Fig.15A). Los resultados (Fig.15B) sugieren que el motivo *PHO box* es esencial en la expresión de este promotor, dado que en su ausencia (pNUF11) la producción de xilanasa disminuye drásticamente (regulación ejercida por el TCS PhoP/R descrita previamente; [14], [15]). Dicha regulación es independiente del sistema AbrA, ya que no se observan diferencias entre la cepa silvestre (M) y la cepa mutante ( $\Delta$ A). Así mismo, los resultados (Fig.15B) muestran que el *AR motif* parece ser esencial en la regulación del promotor ejercida por el sistema AbrA, ya que en su ausencia (pNUF13) no se observa una expresión diferencial entre la cepa silvestre (M) y la mutante ( $\Delta$ A).



**Figura 15. Estudio de la regulación del operón *pst* por el sistema AbrA.** (A) Representación esquemática del gen reportero en cada plásmido (T1 y T2 hace referencia a terminadores que flanquean esta región). El plásmido pNX30 contiene el gen *xysA* de *S. halstedii* (codifica para la xilanasa XysA) sin promotor; se empleará como control negativo. El plásmido pNUF5 contiene el gen *xysA* bajo el control del promotor *pstSp*-SL completo (se indica mediante una caja roja el *AR motif*, repetido 4 veces; y mediante una caja verde la *PHO box*). El plásmido pNUF11 contiene el gen *xysA* bajo el control del promotor *pstSp*-SL sin *PHO box* (se ha delecionado desde el nucleótido -141 hasta el -113). El plásmido pNUF13 contiene el gen *xysA* bajo el control del promotor *pstSp*-SL sin *AR motif* (se ha delecionado desde el nucleótido -329 hasta el -144). (B) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de sobrenadantes de cultivos de 3 días en PGB de *S. coelicolor* M145 (M) y *S. coelicolor* M145  $\Delta$ *abrA* ( $\Delta$ A) transformados con los plásmidos indicados en cada caso (la xilanasa XysA es secretada al medio, por lo que se encuentra en el sobrenadante de los cultivos). Las muestras se concentraron diez veces mediante precipitación con TCA previamente a ser cargadas en el gel y se estandarizaron en función de la biomasa. Como control negativo se emplearon cepas transformadas con el plásmido pNX30; como control positivo (C+) se utilizó el sobrenadante de un cultivo de 6 días de *S. lividans* 1326 / pNUF5 en YES suplementado con 5 % fructosa.

L: Marcador de peso molecular.

## 4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha validado la regulación ejercida por el TCS AbrA a su propio promotor y a los promotores *SCO0268p* y *actII-ORF4p*; y se ha descubierto un nuevo elemento perteneciente al regulón de este sistema, el promotor del operón *pst*. El sistema AbrA es un regulador negativo de la producción del antibiótico ACT, ya que controla la expresión del regulador específico de su ruta biosintética, *actII-ORF4*. Mientras que es un regulador positivo de la expresión de su propio operón, del antibiótico codificado por *SCO0268* y del sistema Pst. Se ha identificado, así mismo, un motivo que se ha denominado *AR motif*, implicado en la regulación del sistema Pst por el TCS AbrA en *S. lividans* y *S. coelicolor*, únicas especies del género *Streptomyces* en las que se han identificado dicho motivo y dicho TCS.

Estos resultados posicionan al TCS AbrA como un nuevo regulador pleiotrópico global que coordina el metabolismo primario, concretamente el metabolismo del fosfato, y la producción de antibióticos; aunque con una serie de peculiaridades que lo distinguen de lo descrito hasta el momento.

Que la producción de metabolitos secundarios esté fuertemente influenciada por los niveles de fosfato no es algo nuevo ([12]). Se ha descrito de forma exhaustiva que la limitación de fosfato en el medio desencadena un incremento de la producción de antibióticos, siendo el TCS PhoP/R el elemento regulador esencial en la integración del metabolismo del fosfato y del metabolismo secundario. Se ha propuesto que el sentido fisiológico y ecológico de esta coordinación consiste en un mecanismo desarrollado por estos microorganismos para, en condiciones limitantes de fosfato, competir más eficazmente con el resto de organismos del medio con el objetivo de acceder a las fuentes de fosfato y otros nutrientes.

Los resultados presentados en este trabajo indican, sin embargo, que el sistema AbrA integra el metabolismo del fosfato y la producción de antibióticos de forma distinta a lo descrito hasta ahora. Mientras que el TCS PhoP/R es un regulador positivo tanto del sistema Pst, principal transportador de fosfato, como de la producción de antibióticos; el TCS AbrA es un regulador positivo del sistema Pst, y un regulador negativo de la producción de antibióticos en *S. coelicolor* y *S. lividans*. El sistema AbrA podría tratarse, por tanto, de una estrategia desarrollada por estos microorganismos para hacer frente a condiciones limitantes de fosfato en las que no haya presentes otros organismos con los que competir para acceder a las fuentes de fosfato del suelo; situación en la que la producción de antibióticos constituiría un gasto energético y de precursores metabólicos inútil para estas células.

## Discusión y conclusiones

Resulta curioso, sin embargo, que esta posible estrategia aparentemente útil para las bacterias del género *Streptomyces* habitantes del suelo solo esté presente en *S. coelicolor* y *S. lividans*. Es necesario, por tanto, seguir profundizando en el sentido fisiológico y ecológico de un sistema tan exclusivo como es el TCS AbrA.

Llegar a comprender las redes de regulación de este sistema resulta de gran interés, no sólo desde el punto de vista de la biología básica, en cuanto a entender cómo integran los diferentes procesos biológicos bacterias tan complejas como *Streptomyces*; sino también desde el punto de vista de la biología aplicada, en cuanto a darnos las herramientas para activar el gran arsenal de metabolitos secundarios que aún permanece silenciado en este grupo de organismos y para desarrollar nuevas estrategias y plataformas biológicas más eficientes de producción de metabolitos de interés.

Como punto final, las conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son:

- 1) El TCS AbrA es un regulador positivo de la expresión de su propio operón, del antitibiótico codificado por *SCO0268* y del sistema de transporte de fosfato Pst.
- 2) El TCS AbrA es un regulador negativo de la expresión de regulador *actIII-ORF4* y, por tanto, de la producción del antibiótico ACT.
- 3) El *AR motif* (AC<sub>T/C</sub>CAG<sub>C/A</sub>CC<sub>T/C</sub>G<sub>A/C</sub>GCAC<sub>T/C</sub>CACC) está implicado en la regulación del sistema Pst por el TCS AbrA.
- 4) El TCS AbrA constituye un sistema de regulación pleiotrópico global que integra el metabolismo del fosfato y la producción de antibióticos de forma alternativa al sistema PhoP/R.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cepas y condiciones de cultivo

Los microorganismos utilizados en el presente trabajo se detallan en la *Tabla 2*. Los medios y antibióticos empleados en el cultivo de los mismos se detallan en la *Tabla 3* y la *Tabla 4* respectivamente.

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  se ha usado de forma rutinaria para la construcción y aislamiento de plásmidos. *E. coli* ET12567 se ha empleado para la demetilación de los plásmidos previamente a su introducción en *S. coelicolor*. *E. coli* ET12567 / pUZ8002 se ha empleado en la transferencia de plásmidos a *Streptomyces* por conjugación. Para cada propósito las distintas cepas de *E. coli* se cultivaron en caldo LB o LB-Agar (con el antibiótico correspondiente como marcador de selección) a 37 °C durante 12 horas. Las diferentes cepas de *E. coli* se conservaron en glicerol 20 % a -80 °C. La manipulación de estas bacterias se llevó a cabo según los procedimientos estándar ([22]).

*S. lividans* 1326 se ha utilizado en la optimización del sistema REDprobe. *S. coelicolor* M512 y sus cepas derivadas se han empleado en la optimización del sistema REDprobe y en el análisis del regulón del TCS AbrA mediante el mismo. *S. coelicolor* M145 y sus cepas derivadas se han empleado en el estudio de la regulación del promotor del operón *pst* por el sistema AbrA. La finalidad de los distintos medios utilizados en el cultivo de las cepas de *Streptomyces* se detalla a continuación:

- **TSB**: Medio rico utilizado para el crecimiento de cultivos, el aislamiento de ADN genómico y la transferencia de plásmidos por conjugación.
- **SFM**: Medio de esporulación; también empleado en la transferencia de plásmidos por conjugación.
- **YEPD**: Medio para la cuantificación de esporas.
- **YEG + MgCl<sub>2</sub>**: Medio para la obtención de protoplastos.
- **R2YE**: Medio de uso general, y para la transformación de *Streptomyces* y la regeneración de protoplastos. Empleado en la optimización del sistema REDprobe.
- **LB**: Medio de uso general. Empleado en la optimización del sistema REDprobe.
- **PGA/PGB**: Medio comúnmente empleado en la visualización y cuantificación del antibiótico RED. Empleado en la optimización del sistema REDprobe.
- **NMMP**: Medio mínimo de uso general. Empleado en la optimización del sistema REDprobe.

## Materiales y métodos

En cuanto a las condiciones de cultivo de *Streptomyces* en estos medios, los cultivos sólidos en placas Petri se incubaron a 30 °C; mientras que los cultivos en medio líquido se realizaron en todos los casos en un volumen de 10 mL en matraces indentados (ocupando 1/5 del volumen del matraz) y se incubaron a 28 °C bajo agitación orbital. Como marcador de selección se utilizó el antibiótico correspondiente en cada caso, en las concentraciones indicadas en la *Tabla 4*. Las diferentes cepas de *Streptomyces* se conservaron, bien como micelio en glicerol 20 % a -80 °C, bien como esporas en glicerol 20 % a -20 °C.

La manipulación de *Streptomyces* se llevó a cabo según los procedimientos estándar ([4], [23]).

**Tabla 2.** Cepas bacterianas empleadas.

<b>Cepa</b>	<b>Características genotípicas</b>	<b>Referencia</b>
<i>E. coli</i> DH5a	F-, $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ (lacZYAargF)U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-,mk+), <i>supE44</i> , $\lambda$ -, <i>thi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i>	[22]
<i>E. coli</i> ET12567	<i>Dam</i> , <i>dcm</i> , <i>hsdS</i> , <i>cat</i> , <i>tet</i>	[24]
<i>S. coelicolor</i> M145	SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup>	[23]
<i>S. coelicolor</i> M145 $\Delta$ <i>abrA</i>	Derivada de M145; $\Delta$ SCO1744/45	[11]
<i>S. coelicolor</i> M512	SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup> $\Delta$ <i>actII-ORF4</i> $\Delta$ <i>redD</i>	[25]
<i>S. coelicolor</i> M512 $\Delta$ <i>abrA</i>	Derivada de M512; $\Delta$ SCO1744/45	Este trabajo
<i>S. lividans</i> 1326	SLP2 SLP3	[26]

**Tabla 3.** Medios empleados.

<b>Medio</b>	<b>Composición</b>	<b>Referencia</b>
TSB	Peptona de caseína 17 g/L, peptona de soja 3 g/L, NaCl 5 g/L, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 g/L, dextrosa 2.5 g/L.	[23]
SFM (MSA)	Manitol 20 g/L, harina de soja 20 g/L, agar 2 %.	[4]
YEPD	Extracto de levadura 10 g/L, glucosa 10 g/L, peptona 20 g/L, agar 2 %.	[27]
YEG+MgCl <sub>2</sub>	Extracto de levadura 10g/L, sacarosa 103 g/L, MgCl <sub>2</sub> 5mM, glicina 0.5 %, glucosa 10 g/L	[4]
R2YE (R5)	Sacarosa 103 g/L, K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.25 g/L, Cl <sub>2</sub> Mg·6H <sub>2</sub> O 10 g/L, glucosa 10 g/L, casaminoácidos 0.1 g/L, elementos traza* 2 mL, extracto de levadura 5 g/L, TES 5.73 g/L, pH 7.2. Después de autoclavar añadir KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.005 %; CaCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O 0.02 M; L-prolina 0.3 %. Este medio se empleó tanto en forma líquida como sólida añadiendo agar 2 %.	[4]
LB	Bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L. pH 7.5. Este medio se empleó tanto en forma líquida como sólida añadiendo agar 2 %.	[22]
PGA/PGB	Bactopeptona 5 g/L, pH 7. Después de autoclavar añadir glicerol 1 %. Este medio se empleó tanto en forma líquida (PGB) como sólida (PGA) añadiendo agar 2 %.	[28]
NMMP	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 g/L, MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O 0.6 g/L, casaminoácidos 5 g/L, elementos traza* 1 mL/L, pH 7.2. Después de autoclavar añadir NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 6.8 0.0045 M, glucosa 0.5 %. Este medio se empleó tanto en forma líquida como sólida añadiendo agar 2 %.	[23]

\*Elementos traza: ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g/L, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1 g/L, CaCl<sub>2</sub> 1 g/L.

**Tabla 4.** Antibióticos empleados.

Antibiótico	Stock (mg/mL)	<i>Escherichia spp.</i>	<i>Streptomyces spp.</i>
		Concentración final (µg/mL)	Concentración final (µg/mL)
Ampicilina	100	100	-
Kanamicina	50	50	-
Neomicina	50	50	20
Tioestreptona	50	-	10

## 5.2 Metodología REDprobe. Condiciones de ensayo

En aquellos ensayos en los que se aplicó la metodología REDprobe se siguió el procedimiento que se indica a continuación.

Como primer paso, las cepas de interés se parchearon en placas de R2YE y se incubaron durante 7 días a 30 °C. Posteriormente se picó una fracción del micelio de estos parches y se inoculó en 1 mL de LB, donde se incubó a 28 °C durante 24 h (preinóculos). Los preinóculos se lavaron dos veces con PGB y se inocularon en 10 mL de este medio, donde se incubaron a 28 °C el tiempo correspondiente en cada caso. Finalmente se recogió el micelio de cada muestra y se determinó la concentración de RED producida (metodología descrita en un apartado posterior) y el peso seco de la biomasa (de cara a estandarizar la producción de RED). Se realizaron tres réplicas del ensayo para cada cepa transformada con cada plásmido.

## 5.3 Construcción de la cepa *S. coelicolor* M512 $\Delta$ abrA mediante CRISPR-Cas9

La cepa *S. coelicolor* M512  $\Delta$ abrA se generó mediante la tecnología CRISPR-Cas9 a partir de la cepa *S. coelicolor* M512 según la metodología desarrollada por Tong *et al.* ([29]).

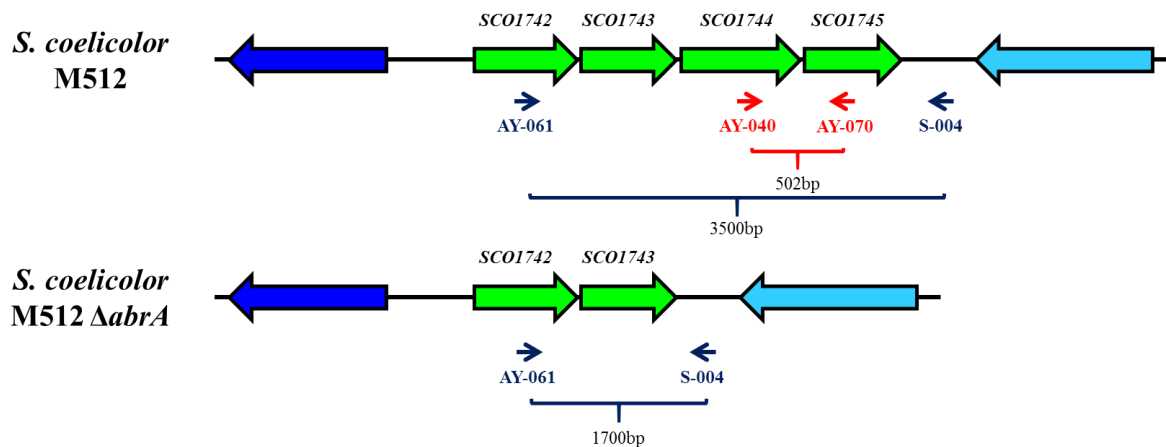
Se transformó *E. coli* ET12567 / pUZ8002 con el plásmido pCRISPR-AbrA, construido por Sergio Antoraz Martín (no publicado). Este plásmido contiene un sgARN frente a *SCO1744/45* y, como molde, las regiones adyacentes a dichos genes, lo que permite la reparación de la rotura por recombinación, delecionando la región de interés (*SCO1744/45*). El plásmido se transfirió desde esta cepa a *S. coelicolor* M512 mediante un proceso de conjugación. El proceso hasta este punto se repitió con los plásmidos pCRISPR-Cas9 (plásmido vacío sin sgARN ni molde para reparar) y pCRISPR-sgA (plásmido que contiene únicamente el sgARN; construido por Sergio Antoraz Martín), que constituyen el control negativo y el control de corte respectivamente.

Se comprobó si las colonias obtenidas presentaban la delección de *SCO1744/45* mediante PCR del ADN genómico de las mismas con cebadores que hibridaban en la zona delecionada

## Materiales y métodos

y cebadores que hibridaban en las regiones adyacentes (las condiciones se especifican en un apartado posterior). El esquema del proceso de chequeo se muestra en la *Figura 16*.

Se seleccionó una colonia en la que se había producido la delección y se sometió a varios pases en medio sin antibióticos, para promover la pérdida del plásmido pCRISPR-AbrA. Tras comprobar la pérdida de dicho plásmido se obtuvieron y almacenaron esporas de esta cepa (*S. coelicolor* M512  $\Delta$ abrA).



**Figura 16. Construcción de la cepa *S. coelicolor* M512  $\Delta$ abrA mediante la tecnología CRISPR-Cas9.** Esquema del procedimiento de chequeo de la delección de *SCO1744/45* mediante PCR. La pareja de cebadores AY-040 / AY-070 hibridan dentro de la región que se desea deleccionar y amplifican un fragmento de 502 bp. La pareja de cebadores AY-061 / S-004 hibridan en las regiones adyacentes a la región que se desea deleccionar y amplifican un fragmento de 3500 bp si no se ha producido la delección, o de 1700 bp si se ha producido.

### 5.4 Manipulación y visualización de ácidos nucleicos

#### - Aislamiento de ADN plasmídico

La obtención de ADN plasmídico procedente de *E. coli* se realizó mediante el kit comercial *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel), a excepción de aquellas minipreparaciones realizadas con fines de chequeo, que se realizaron siguiendo el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly ([30]). El procedimiento seguido para este último caso consistió en tratar las células obtenidas de cultivos de 12 h (en las condiciones descritas previamente) con 100  $\mu$ L de la solución P1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, RNasa) y 100  $\mu$ L de la solución P2 (0.2 M NaOH, 1 % SDS). Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente se añadieron 100  $\mu$ L de la solución P3 (2.55 M Acetato de potasio, pH 4.8) y se centrifugaron 15 min a 12000g. Los sobrenadantes se trataron con un volumen de isopropanol para precipitar el ADN y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, los pellets se lavaron con etanol al 70 % y, tras eliminar todo el etanol, se resuspendieron en solución TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA).

### - Aislamiento de ADN genómico

La obtención de ADN genómico procedente de *Streptomyces* se realizó mediante el método modificado de lisis neutra descrito por Kieser *et al.* ([4]). 50 mg de micelio procedentes de un cultivo de 24 h en medio TSB se lavaron con sacarosa 10.3 % y se resuspendieron en 500  $\mu$ L de solución de lisis (lisozima 2 mg/mL, sacarosa 0.3 M, EDTA 25 mM, Tris-HCl pH 8). Tras una incubación a 37 °C durante 30 min se añadieron 250  $\mu$ L de SDS 2 %. A continuación se realizó una etapa de fenolización, añadiendo 5 mL de solución fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) equilibrada; tras lo cual se centrifugó la muestra y se recuperó la fase acuosa (estos pasos se realizaron en tubos con resina *phase lock gel* para facilitar la recuperación. La fase recuperada se trató con 50  $\mu$ L de acetato sódico 3 M pH 4.8 y 400  $\mu$ L de isopropanol para precipitar el ADN. Tras una incubación de 15 min a temperatura ambiente, la muestra se centrifugó durante 15 min a 6000g; el pellet obtenido se lavó con etanol 70 %. Finalmente, tras eliminar todo el etanol, el pellet (ADN genómico) se resuspendió en solución TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA).

### -Manipulación enzimática del ADN

Las técnicas básicas de ingeniería genética aplicadas: digestión con enzimas de restricción (BamHI, BglIII, BstBI, EcoRI, EcoRV, HindIII, NdeI, SacI, SmaI), defosforilación de extremos con la enzima *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Thermo Fisher Scientific), relleno de extremos 5' protuberantes con la enzima *Klenow Fragment* (Thermo Fisher Scientific), y ligaciones con la enzima *T4 DNA Ligase* (Thermo Fisher Scientific) se realizaron de acuerdo a los procedimientos estándar descritos por Sambrook *et al.* ([22]) en las condiciones recomendadas por las casas comerciales suministradoras (Promega Corporation, New England BioLabs y Thermo Fisher Scientific).

### - PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La PCR se utilizó para chequear la delección de los genes *SCO1744/45* durante la construcción de la cepa *S. coelicolor* M512  $\Delta$ *abrA* mediante la tecnología CRISPR-Cas9, y para obtener los promotores detallados en la *Tabla 1* a partir de ADN genómico de *S. coelicolor* M145 para el estudio del regulón del sistema *AbrA*.

Para el primer propósito se utilizaron los cebadores indicados en la *Tabla 5* y la enzima *Bitools DNA Polymerase* (Bitools). Para el segundo propósito se utilizaron los cebadores indicados en la *Tabla 5* y la enzima *Phusion DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific). Las

condiciones de PCR para cada caso se indican en la *Tabla 6*. Para la realización de la PCR se utilizó el termociclador *C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler* (Bio-Rad)

**Tabla 5.** Oligonucleótidos empleados.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Función
AY-040	CGTCGAGGAGGCACTGACCAAC	
AY-070	GCACCCGGGGCGGGGAGTCG	Chequear la delección de <i>SCO1744/45</i> a nivel genómico generada por CRISPR-Cas9
AY-061	GGGCTCGCCGCGGCGCTCC	
S-004	GCTCCAGCTTCCC GGGAACG	
RS-PF.A1	ATAGAATT <u>CGCGAGGGCGCGGGCACCGAAC</u>	Amplificar el promotor del gen <i>SCO0141</i> .
RS-PR.A1	AATGGAT <u>CC</u> CAACAAGCCCTTCTCTCGCGG	
RS-PF.A2	ATAGAATT <u>CGAGCACACCCGCGGATCGAC</u>	Amplificar el promotor del gen <i>SCO0268</i> .
RS-PR.A2	AATGGAT <u>CC</u> GCTTCTCCCTGGGTGTTGGG	
RS-PF.A3	ATAGAATT <u>CGGCACCGCAGGCGCTGGACG</u>	Amplificar el promotor del operón <i>SCO0588-84</i> .
RS-PR.A3	AATGGAT <u>CC</u> TCCGCGGTCCCTCGGGTCCCTTG	
RS-PF.A4	ATAGAATT <u>CGACCCGGGTGTCGCTCCGG</u>	Amplificar el promotor del operón <i>SCO2435/36</i> .
RS-PR.A4	AATGGAT <u>CC</u> CGCTGTCTCCTCGTTCCCC	
RS-PF.A5	ATAGAATT <u>CCGGGCGTCTGTCCGGCAAC</u>	Amplificar el promotor del gen <i>SCO2716</i> .
RS-PR.A5	AATGGAT <u>CC</u> CCCTGCTCAGGGTCTGTGCG	
RS-PF.A6	ATAGAATT <u>CCAGCTGGGGGCTCATGTGCGC</u>	Amplificar el promotor del gen <i>SCO2719</i> .
RS-PR.A6	AATGGAT <u>CC</u> TGGTCAACTCCGTGGGTCCGG	
RS-PF.A7	ATAGAATT <u>CGCAGGCGTCCAGCGCAATTTGC</u>	Amplificar el promotor del operón <i>SCO4562-75</i> .
RS-PR.A7	AATGGAT <u>CC</u> CGCTCCTCGCTCCTCTCAGTC	
RS-PF.A8	ATAGAATT <u>CCTTGCCGTGCGGCGGAAGG</u>	Amplificar el promotor del operón <i>SCO4988-90</i> .
RS-PR.A8	AATGGAT <u>CC</u> GATGGTCTCTGGTCTCTTTCGC	
RS-PF.A9	ATAGAATT <u>CGGACCTTCGCCGCGCTGGCC</u>	Amplificar el promotor del gen <i>SCO5085</i> .
RS-PR.A9	AATGGAT <u>CC</u> CTGCGCCCCGTCGAGATTC	
RS-PF.A10	ATAGAATT <u>CCGCCGAAGGAGGAACCGAGGCG</u>	Amplificar el promotor del operón <i>SCO5877-80</i> .
RS-PR.A10	AATGGAT <u>CC</u> CCACCGAACGATCGGATTCGGG	
RS-PF.A11	ATAGAATT <u>CAGGCAGGGGGGAGCCGGCTAC</u>	Amplificar el promotor del gen <i>SCO3217</i> .
RS-PR.A11	AATGGAT <u>CC</u> GACCTCTTGATACCCCCGCG	
AY-033	TTTTTTGAATTCTCACGTCTCTGTGGGGGG	Amplificar el promotor del operón <i>SCO1742-45</i> .
AY-034	TTTTTTCAATATGTCGGAAGCCTCCGGTGTGCC	
RSN-Sec001	GTACGCCTTGGTTCAATCGGCG	Secuenciar los promotores clonados en el plásmido pIJ2587.

**Nota:** Las secuencias subrayadas indican sitios de corte para las enzimas de restricción EcoRI (línea continua), BamHI (línea discontinua) y NdeI (línea ondulada).

**Tabla 6.** Condiciones de PCR utilizadas

<i>Biotoools DNA Polymerase</i>			<i>Phusion DNA Polymerase</i>		
Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	5 min	1	98 °C	30 s	1
95 °C	20 s		98 °C	10 s	
T <sub>an</sub>	20 s	35	65 °C	30 s	35
72 °C	t <sub>ext</sub>		72 °C	30 s	
72 °C	7 min	1	72 °C	10 min	1
12 °C		∞	12 °C		∞

T<sub>an</sub>: Para la pareja de cebadores AY-061 / S-004 es 64 °C; para la pareja AY-040 / AY-070 es 62 °C.

t<sub>ext</sub>: Para la pareja de cebadores AY-061 / S-004 es 3 min 40 s; para la pareja AY-040 / AY-070, es 40 s.

### - Electroforesis en gel de agarosa

La separación de moléculas de ADN según su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8 % (p/v). Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 120 V en la solución tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 2 mM). Los ácidos nucleicos se marcaron con bromuro de etidio (0.5 µg/mL en el gel de agarosa) y las bandas se visualizaron mediante un transiluminador de luz UV acoplado al sistema fotográfico digital *Gel Doc 2000* (Bio-Rad). Como marcador de tamaño de los fragmentos de ADN se empleó *O'GeneRuler DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific).

### - Purificación de fragmentos de ADN

La purificación de los fragmentos de ADN de interés procedentes de las PCRs y de los geles de agarosa se realizó mediante el kit comercial *NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up* (Macherey-Nagel).

## 5.5 Construcción de plásmidos

Los plásmidos empleados se incluyen en la *Tabla 7*. A continuación, se detalla cómo se han construido los generados en este trabajo.

Para la construcción del plásmido pIJR-xA se obtuvo el promotor *xyS* de *S. halstedii* del plásmido pXHis1 por digestión con las enzimas NdeI y EcoRI. El fragmento obtenido se aisló en un gel de agarosa y se purificó. Los extremos cohesivos del fragmento se convirtieron en extremos romos por tratamiento con la enzima Klenow. El fragmento resultante se clonó en el plásmido pIJ2587 linealizado por digestión con SmaI y tratado con fosfatasa alcalina (desfosforilación de los extremos 5' para prevenir autoligaciones). El chequeo del plásmido resultante se realizó mediante digestión con las enzimas BstBI y HindIII.

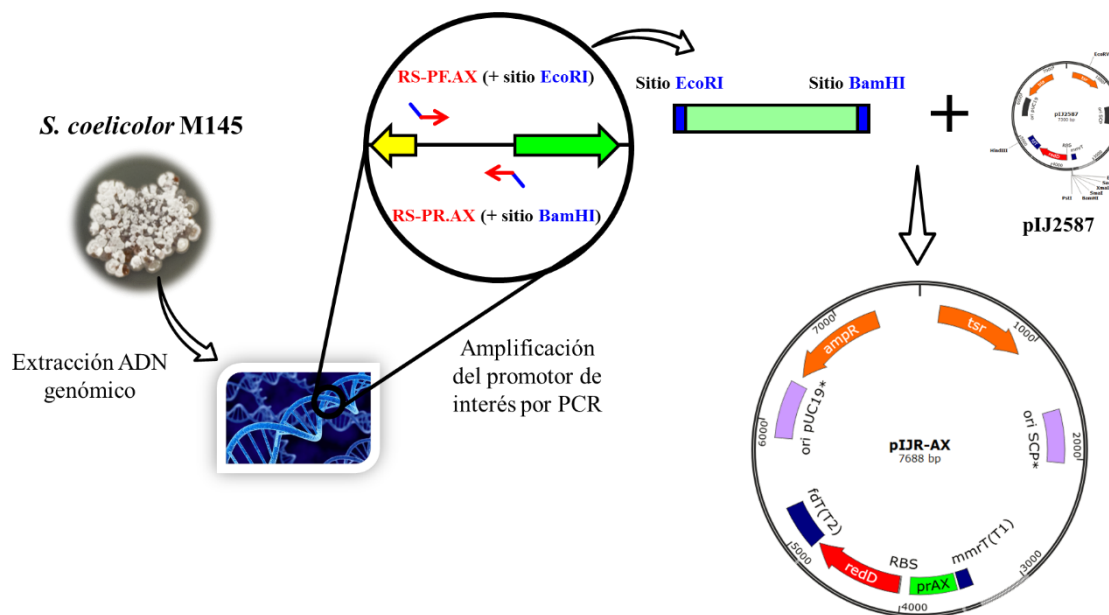
Para la construcción del plásmido pIJR-pS se obtuvo el promotor *pst* de *S. lividans* del plásmido pNUF5 por digestión con las enzimas NdeI y BglII. El fragmento obtenido se aisló en un gel de agarosa y se purificó. Los extremos cohesivos del fragmento se convirtieron en extremos romos por tratamiento con la enzima Klenow. El fragmento resultante se clonó en el plásmido pIJ2587 linealizado por digestión con SmaI y tratado con fosfatasa alcalina. El chequeo del plásmido resultante se realizó mediante digestión con la enzima EcoRI.

Para la construcción del resto de plásmidos derivados del plásmido pIJ2587 se siguió el procedimiento esquematizado en la *Figura 17*. El promotor de interés en cada caso (*Tabla 1*) se obtuvo a partir del ADN genómico de *S. coelicolor* M145 mediante amplificación por PCR

## Materiales y métodos

(los cebadores utilizados en cada caso se especifican en la *Tabla 5*). Los fragmentos obtenidos se purificaron y se digirieron con EcoRI y BamHI; tras lo cual se clonaron en el plásmido pIJ2587 digerido con estas mismas enzimas de restricción. Los plásmidos resultantes se chequearon mediante digestión con las parejas de enzimas EcoRV - SacI (a excepción del plásmido pIJR-A9, cuyo chequeo se realizó con EcoRV - SmaI) y EcoRI - BamHI.

La secuencia de todos los promotores, una vez clonados en el plásmido pIJ2587, se comprobó mediante secuenciación (como cebador se utilizó RSN-Sec001 en todos los casos).



**Figura 17. Construcción de plásmidos.** Procedimiento esquematizado de la construcción de los plásmidos derivados de pIJ2587 para el estudio del regulón del sistema AbrA (plásmidos pIJR-AX).

### 5.6 Transferencia de plásmidos

Las cepas de *E. coli* se transformaron con los plásmidos oportunos en cada caso utilizando células competentes de cada cepa mediante la metodología de choque térmico descrita por Hanahan y Meselson ([31]). A 50  $\mu$ L de células competentes se le añadieron 2  $\mu$ L de ADN (10  $\mu$ L en el caso de los productos de ligación). Tras una incubación a 4  $^{\circ}$ C durante 30 min, se aplicó un shock térmico de 42  $^{\circ}$ C durante 2 min; tras lo cual las muestras se mantuvieron a 4  $^{\circ}$ C durante otros 2 min. Se añadieron 0.5 mL de LB a las muestras y se incubaron a 37  $^{\circ}$ C durante 1 h. Finalmente, las muestras se sembraron en placas de LB con el correspondiente antibiótico y se incubaron 24 h a 37  $^{\circ}$ C.

La transferencia de plásmidos a *Streptomyces* se realizó, por regla general, mediante transformación de protoplastos de la cepa en cuestión ([4]), excepto durante la aplicación de la tecnología CRISPR-Cas9, donde se realizó por conjugación ([4]) a partir de la cepa conjugativa



## Materiales y métodos

**Tabla 7.** Plásmidos empleados.

Plásmido	Características	Referencia
pIJ2587	Vector lanzadera <i>Escherichia / Streptomyces</i> . Resistencia a ampicilina y tioestreptona. Contiene el gen <i>redD</i> sin promotor.	[16]
pIJR-A1	Derivado de pIJ2587. Contiene el gen <i>redD</i> bajo el control del promotor <i>SCO0141p</i> de <i>S. coelicolor</i> .	Este trabajo
pIJR-A2	Derivado de pIJ2587. Contiene el gen <i>redD</i> bajo el control del promotor <i>SCO0268p</i> de <i>S. coelicolor</i> .	Este trabajo
pIJR-A4	Derivado de pIJ2587. Contiene el gen <i>redD</i> bajo el control del promotor <i>SCO2435/36p</i> de <i>S. coelicolor</i> .	Este trabajo
pIJR-A5	Derivado de pIJ2587. Contiene el gen <i>redD</i> bajo el control del promotor <i>SCO2716p</i> de <i>S. coelicolor</i> .	Este trabajo
pIJR-A6	Derivado de pIJ2587. Contiene el gen <i>redD</i> bajo el control del promotor <i>SCO2719p</i> de <i>S. coelicolor</i> .	Este trabajo
pIJR-A7	Derivado de pIJ2587. Contiene el gen <i>redD</i> bajo el control del promotor <i>SCO4562-75p</i> de <i>S. coelicolor</i> .	Este trabajo
pIJR-A8	Derivado de pIJ2587. Contiene el gen <i>redD</i> bajo el control del promotor <i>SCO4988-90p</i> de <i>S. coelicolor</i> .	Este trabajo
pIJR-A9	Derivado de pIJ2587. Contiene el gen <i>redD</i> bajo el control del promotor <i>SCO5085p</i> de <i>S. coelicolor</i> .	Este trabajo
pIJR-A11	Derivado de pIJ2587. Contiene el gen <i>redD</i> bajo el control del promotor <i>SCO3217p</i> de <i>S. coelicolor</i> .	Este trabajo
pIJR-pS	Derivado de pIJ2587. Contiene el gen <i>redD</i> bajo el control del promotor <i>pstSp</i> de <i>S. lividans</i> .	Este trabajo
pIJR-xA	Derivado de pIJ2587. Contiene el gen <i>redD</i> bajo el control del promotor <i>xysAp</i> de <i>S. halstedii</i> .	Este trabajo
pIJR-AA	Derivado de pIJ2587. Contiene el gen <i>redD</i> bajo el control del promotor <i>SCO1742-45p</i> de <i>S. coelicolor</i> .	Este trabajo
pXHis1	Derivado de pBluescript SK. Resistencia a ampicilina. El promotor <i>xysAp</i> de <i>S. halstedii</i> controla la expresión de <i>xys1Δ</i> .	[32]
pN702Gem3	Vector lanzadera <i>Escherichia / Streptomyces</i> . Resistencia a neomicina.	[33]
pNX30	Derivado de pN702Gem3. Contiene el gen <i>xysA</i> sin promotor.	[15]
pNUF5	Derivado de pN702Gem3. El promotor <i>pstSp</i> de <i>S. lividans</i> controla la expresión de <i>xysA</i> .	[14]
pNUF11	Derivado de pNUF5. Se ha deleciónado la región que contiene la <i>PHO box</i> (desde -141 hasta -113).	[15]
pNUF13	Derivado de pNUF5. Se ha deleciónado la región que contiene el <i>AR motif</i> (desde -329 hasta -144).	[15]
pCRISPR-Cas9	Vector lanzadera <i>Escherichia / Actinomicetos</i> . Resistencia a apramicina y tioestreptona. Contiene el gen de la nucleasa <i>cas9</i> y el origen <i>oriT</i> que permite su transferencia por conjugación.	[29]
pCRISPR-sgA	Derivado de pCRISPR-Cas9. Codifica un sgRNA que tiene como diana el operón <i>SCO1742-45</i> .	Antoraz <i>et al.</i> (no public.)
pCRISPR-AbrA	Derivado de pCRISPR-sgA. Contiene las regiones adyacentes a los genes <i>SCO1744/45</i> que actúan como molde para la reparación y deleción de dichos genes.	Antoraz <i>et al.</i> (no public.)
pUZ8002	Resistencia a neomicina. Contiene operón <i>tra</i> que permite la transferencia por conjugación.	[34]

*E. coli* ET12567 / pUZ8002. Previamente a la transferencia de plásmidos a *S. coelicolor* mediante transformación, estos fueron demetilados en la cepa *E. coli* ET12567.

Para la transferencia por transformación se mezclaron 30-50  $\mu$ L de protoplastos, 1-5  $\mu$ L de ADN y 125  $\mu$ L de solución P con 25 % de PEG 6000. Tras una incubación de 2 min a temperatura ambiente se añadieron 0.4 mL de solución P y se sembraron en placas de R2YE sin antibiótico. Tras 24 h de incubación a 30 °C se añadió el antibiótico correspondiente a las placas de R2YE.

Para la transferencia por conjugación se mezclaron una suspensión de  $10^8$  esporas de *S. coelicolor* M512 con un cultivo de 12 h de *E. coli* ET12567 / pUZ8002 con el plásmido a transferir. Esta mezcla se plaqueó en SFM +  $MgCl_2$  y se realizaron varios pases de selección con antibióticos para eliminar a *E. coli* y purificar colonias de *Streptomyces* que hayan captado el plásmido.

### 5.7 Cuantificación de undecilprodigiosina (RED)

La cuantificación del antibiótico RED se realizó siguiendo una variante del método descrito por Kieser *et al.* ([4]). La cuantificación de este compuesto se aplicó en el análisis de la actividad transcripcional de los promotores de interés mediante la metodología REDprobe.

Las cepas de interés se cultivaron en 10 mL de medio PGB a 28 °C en matraces indentados, tal y como se ha descrito en apartados anteriores. Tras el periodo de incubación específico en cada caso se recogió el micelio total de cada matraz y se trató con KOH 1 N a 4 °C durante 12 h. Posteriormente, el micelio se lavó dos veces con HCl 0.5 M y se resuspendió en HCl-metanol 0.5 N, donde se dejó incubando 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente se recogió el sobrenadante y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 530 nm (el coeficiente de extinción molar del antibiótico RED es  $\epsilon_{530} = 100500 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) en un espectrofotómetro *Halo DB-20* (Dynamica). A lo largo de este procedimiento, las centrifugaciones se realizaron a 12000g durante 10 min.

### 5.8 Manipulación y visualización de proteínas

#### - Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteínas intracelulares de *S. coelicolor* se recogió el micelio de un cultivo de 3 días en PGB y se lavó con sacarosa 10.3 %. El micelio se resuspendió en Tris-HCl pH 7 con inhibidores de proteasas y se añadieron microesferas de vidrio. Se aplicaron 4 ciclos

## Materiales y métodos

de 15 s a máxima velocidad en una *Bio101 FastPrep FP120* (Savant Instruments). La muestra se centrifugó y se separó la fase acuosa, que contenía las proteínas intracelulares.

Para la obtención de la xilanasasa XysA empleada como reportero en el estudio de la regulación del promotor *pstSp* por el sistema AbrA, se recogió el sobrenadante de cultivos de 3 días en PGB (XysA es secretada al medio extracelular). Estas muestras se concentraron 10 veces mediante precipitación proteica con ácido tricloroacético (TCA).

La concentración de proteínas se determinó con un espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific), en base a la absorbancia a la longitud de onda de 280 nm.

### - SDS-PAGE

La separación de proteínas según su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) en un sistema *MiniProtean II* (Bio-Rad). Los geles separador y concentrador se prepararon a una concentración final de acrilamida del 15 % y el 4 % respectivamente. Las muestras de proteínas se estandarizaron en base a la biomasa de la que se extrajeron y se prepararon en un volumen total de 10-20  $\mu$ L de tampón de carga (glicerol 40 %, Tris-HCl 0.25 M pH 6.8, SDS 8 %, azul de bromofenol 0.05 % y DTT 0.05 M). Previamente a la electroforesis las muestras se hirvieron durante 5 min. La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis (Tris-HCl 30 g/L, glicerol 14.4 %, SDS 5 g/L) a un amperaje constante de 30 mA/gel. Como marcadores de peso molecular se utilizaron *Low Molecular Weight Marker* (Bio-Rad) y *Spectra<sup>TM</sup> Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific); este último marcador solo para aquellas muestras que se sometieron a *Western Blot*.

### - Visualización de proteínas mediante tinción Coomassie

Para la visualización de proteínas (de forma inespecífica) los geles procedentes de SDS-PAGE se tiñeron con Coomassie. Para ello los geles se mantuvieron 30 min en solución colorante (azul de Coomassie 0.5 %, ácido acético 10 % y metanol 50 %). Tras varios lavados con agua se mantuvieron en una solución metanol:acético:agua (25:10:65) para desteñir el gel. Finalmente, los geles se fijaron con etanol 25 % durante 30 min.

### - Western Blot

Para la detección de la proteína PstS por *Western Blot*, las muestras sometidas a SDS-PAGE se electrotransfirieron a membranas de PVDF (Inmobilon-P, Millipore) mediante el sistema *MiniTrans-Blot* (Bio-Rad) a un amperaje constante de 250 mA durante 1 h. Las membranas se

lavaron en agua y TBST (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 0.15 M, Tween-20 0.05 %) y se incubaron con una solución de BSA 1 % (*Bovine Serum Albumin*) en TBST durante 30 min a temperatura ambiente para bloquearlas. Posteriormente las membranas se incubaron 1 h a temperatura ambiente con una solución del anticuerpo primario en TBST; se empleó un anticuerpo anti-PstS de conejo. Tras la incubación, las membranas se lavaron tres veces con TBST y se incubaron 30 min a temperatura ambiente con una solución del anticuerpo secundario en TBST; se empleó un anticuerpo de ratón frente a la fracción constante de anticuerpos de conejo, conjugado a la fosfatasa alcalina. Tras la incubación las membranas se lavaron tres veces con TBST y se incubaron con la solución de revelado (Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NBT 0.33 mg/mL, BCIP 0.16 mg/mL).

### 5.9 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en el programa *IBM SPSS Statistics*. Para la comparación de medias se realizó un test de la t para muestras independientes con igualdad de varianzas.

### 5.10 Procesamiento, análisis y presentación de datos

Las representaciones gráficas y esquemas del presente trabajo se realizaron con el paquete ofimático *Microsoft Office 2016*.

Las fotografías de los cultivos, geles y membranas de *Western Blot* se obtuvieron con una cámara *OLYMPUS E-620*. El procesamiento de las fotografías se realizó con *Adobe Photoshop Lightroom*. Las membranas de *Western Blot* se analizaron con *ImageJ*.

La búsqueda de secuencias nucleotídicas y proteicas se realizó en la base de datos del NCBI (*National Centre of Biotechnology Information*). Para la comparación de secuencias nucleotídicas y proteicas se aplicaron las herramientas BLAST (*Basic Local Alignment Tool*; [35]) del NCBI y MSA (*Multiple Sequence Alignment Clustal Omega* ([36]) de EMBL-EBI (*European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute*). La manipulación *in silico* y visualización de secuencias se realizó con los programas *ApE* (*A Plasmid Editor*) y *SnapGene Viewer*.

La búsqueda y análisis de motivos en secuencias de nucleótidos se realizó con las herramientas MEME (*Multiple Em for Motive Elicitation*; [20]) y FIMO (*Find Individual Motif Occurrences*; [21]).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Goodfellow, “Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov.,” in *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3, W. Whitman, M. Goodfellow, P. Kämpfer, H. J. Busse, M. Trujillo, W. Ludwig, K. I. Suzuki, and A. Parte, Eds. John Wiley & Sons, Inc., 2012, pp. 1455–1767.
- [2] K. Flärdh and M. J. Buttner, “*Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, no. 1, pp. 36–49, 2009.
- [3] D. A. Hopwood, “Soil To Genomics: The *Streptomyces* Chromosome,” *Annu. Rev. Genet.*, vol. 40, no. 1, pp. 1–23, 2006.
- [4] T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood, *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, UK, 2000.
- [5] A. M. Stock, V. L. Robinson, and P. N. Goudreau, “Two-Component Signal Transduction,” *Reactions*, vol. 69, pp. 183–215, 2000.
- [6] M. I. Hutchings, P. A. Hoskisson, G. Chandra, and M. J. Buttner, “Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2),” *Microbiology*, vol. 150, no. 9, pp. 2795–2806, 2004.
- [7] M. T. Laub and M. Goulian, “Specificity in two-component signal transduction pathways.,” *Annu. Rev. Genet.*, vol. 41, pp. 121–145, 2007.
- [8] H. Rodríguez, S. Rico, M. Díaz, and R. I. Santamaría, “Two-component systems in *Streptomyces*: key regulators of antibiotic complex pathways.,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 12, p. 127, 2013.
- [9] S. Rico *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*, vol. 9, no. 10, 2014.
- [10] A. Yepes, S. Rico, A. Rodríguez-García, R. I. Santamaría, and M. Díaz, “Novel Two-component Systems Implied in Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor*,” *PLoS One*, vol. 6, no. 5, 2011.
- [11] A. Yepes, “Sistemas de dos componentes y regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor*,” Universidad de Salamanca / CSIC, 2010.
- [12] F. Santos-Beneit, “The Pho regulon: A huge regulatory network in bacteria,” *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. APR, pp. 1–13, 2015.
- [13] A. Sola-Landa, R. S. Moura, and J. F. Martin, “The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 10, pp. 6133–6138, 2003.
- [14] M. Díaz, A. Esteban, J. M. Fernández-Abalos, and R. I. Santamaría, “The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and

## Bibliografía

- mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*,” *Microbiology*, vol. 151, no. 8, pp. 2583–2592, 2005.
- [15] A. Esteban, M. Díaz, A. Yepes, and R. I. Santamaría, “Expression of the *pstS* gene of *Streptomyces lividans* is regulated by the carbon source and is partially independent of the PhoP regulator,” *BMC Microbiol.*, vol. 8, p. 201, 2008.
- [16] G. P. van Wezel, J. White, G. Hoogvliet, and M. J. Bibb, “Application of *redD*, the transcriptional activator gene of the undecylprodigiosin biosynthetic pathway, as a reporter for transcriptional activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*,” *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 2, no. 4, pp. 551–6, 2000.
- [17] E. Takano, H. C. Gramajo, E. Strauch, N. Andres, J. White, and M. J. Bibb, “Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2),” *Mol. Microbiol.*, vol. 6, no. 19, pp. 2797–2804, 1992.
- [18] L. Sevillano, E. Vijgenboom, G. P. van Wezel, M. Díaz, and R. I. Santamaría, “New approaches to achieve high level enzyme production in *Streptomyces lividans*,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 15, no. 1, p. 28, 2016.
- [19] A. Ruiz-Arribas, P. Sánchez, J. J. Calvete, M. Raida, J. M. Fernández-Abalos, and R. I. Santamaría, “Analysis of *xysA*, a gene from *Streptomyces halstedii* JM8 that encodes a 45-kilodalton modular Xylanase, Xys1,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, no. 8, pp. 2983–2988, 1997.
- [20] T. L. Bailey and C. Elkan, “Fitting a Mixture Model by Expectation Maximization to Discover Motifs in Bipolymers,” *Second Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.*, pp. 28–36, 1994.
- [21] C. E. Grant, T. L. Bailey, and W. S. Noble, “FIMO: Scanning for occurrences of a given motif,” *Bioinformatics*, vol. 27, no. 7, pp. 1017–1018, 2011.
- [22] J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Editio. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [23] D. A. Hopwood *et al.*, *Genetic manipulation of Streptomyces: A laboratory manual*. The John Innes Foundation, Norwich, UK and Cold Spring Harbour Laboratory, 1985.
- [24] D. J. MacNeil, K. M. Gewain, C. L. Ruby, G. Dezeny, P. H. Gibbons, and T. MacNeil, “Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector,” *Gene*, vol. 111, no. 1, pp. 61–68, 1992.
- [25] B. Floriano and M. Bibb, “*afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2).,” *Mol Microbiol*, vol. 21, no. 2, pp. 385–396, 1996.
- [26] D. A. Hopwood, T. Kieser, H. M. Wright, and M. J. Bibb, “Plasmids , Recombination and Chromosome Mapping in *Streptomyces lividans* 66,” *J. Gen. Microbiol.*, no. 1983, pp. 2257–2269, 1983.
- [27] M. Rose, F. Winston, and P. Hieter, *Methods in yeast genetics. A laboratory course*

## Bibliografía

- manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
- [28] E. A. Coco, K. E. Narva, and J. S. Feitelson, “New classes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) mutants blocked in undecylprodigiosin (Red) biosynthesis,” *Mol. Genet. Genomics*, vol. 227, pp. 28–32, 1991.
- [29] Y. Tong, P. Charusanti, L. Zhang, T. Weber, and S. Y. Lee, “CRISPR-Cas9 Based Engineering of Actinomycetal Genomes,” *ACS Synth. Biol.*, vol. 4, no. 9, pp. 1020–1029, 2015.
- [30] H. C. Birnboim and J. Doly, “A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 7, no. 6, pp. 1513–1523, 1979.
- [31] D. Hanahan and M. Meselson, “Plasmid screening at high colony density,” *Gene*, vol. 10, no. 1, pp. 63–67, 1980.
- [32] S. A. I. Adham, A. B. Campelo, A. Ramos, and J. A. Gil, “Construction of a Xylanase-Producing Strain of *Brevibacterium lactofermentum* by Stable Integration of an Engineered *xysA* Gene from *Streptomyces halstedii* JM8,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 12, pp. 5425–5430, 2001.
- [33] J. M. Fernández-Abalos, V. Reviejo, M. Díaz, S. Rodríguez, F. Leal, and R. I. Santamaría, “Posttranslational processing of the xylanase Xys1L from *Streptomyces halstedii* JM8 is carried out by secreted serine proteases,” *Microbiology*, vol. 149, no. 7, pp. 1623–1632, 2003.
- [34] M. S. B. Paget, L. Chamberlin, A. Atrih, S. J. Foster, and M. J. Buttner, “Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor  $\sigma_E$  is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2),” *J. Bacteriol.*, vol. 181, no. 1, pp. 204–211, 1999.
- [35] S. F. Altschul *et al.*, “Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, no. 17, pp. 3389–3402, 1997.
- [36] F. Sievers *et al.*, “Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, no. 1, pp. 539–539, 2014.
- [37] D. Jakimowicz and G. P. Van Wezel, “Cell division and DNA segregation in *Streptomyces*: How to build a septum in the middle of nowhere?,” *Mol. Microbiol.*, vol. 85, no. 3, pp. 393–404, 2012.
- [38] S. . Bentley *et al.*, “Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2).,” *Nature*, vol. 417, no. 2, pp. 141–147, 2002.

## Otras menciones

Portada y encabezados diseñados a partir del tema *Blue DNA structure background* creado por *Freepik*.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO

```

pstSp_S.scabiei      GGGACCGTGACCGGGCCGGGGCCCGGAGTGGGCGTAGGGCGGCCCGGATGGGGGATGG
pstSp_S.avermitilis -----
pstSp_S.coelicolor  -AC-----ACCCAGACCTGAGCACTCACCCCCGCGCA-----
pstSp_S.lividans    -AC-----ACCCAGACCTGAGCACTCACCCACGCGTAC-----TCAG
pstSp_S.ambofaciens -----

pstSp_S.scabiei      CTCTCTCTGTAGTTGAATGCGTTCCGAGAGTACAGAGTCGGGGAGTGGTGAGGCCGTG
pstSp_S.avermitilis -----
pstSp_S.coelicolor  -----CTCACCCCGCACTCACCCCGCGCACTCAGCCCTG
pstSp_S.lividans    CCCCGCGCACTCACCCACGCACTCAGCCCTGAGCACCCACCCCGCGCACTCAGCCCTG
pstSp_S.ambofaciens -----

pstSp_S.scabiei      TGGAACGCCTGGGTTCTGTGGGGTGCCGCGGGCCGGGGCCGGGATCGGGATCCTCGCGT
pstSp_S.avermitilis -----GGCCACACCCCGCCCGCCACCCGGCGCACC
pstSp_S.coelicolor  AGCAC-----CCACCCCGCGCACTCAGCGAGGCCCGAGCGCCCGGAACCGGCCGT
pstSp_S.lividans    AGCAC-----C-CACCCCGCGCACCCAGCGAGGCCCGAGCGCCCGGAACCGGCCGT
pstSp_S.ambofaciens -----

pstSp_S.scabiei      GCTCTTCCCGTGAGCGTTCCGTGACCTCACCGCACTTTCGGCAGGGGTTCACTCGCCGTT
pstSp_S.avermitilis CCATGGGACGCAACCGTTCCGTGACCTAACCCACCCGTCCGCGAGGGGTTCACTCGCCGTT
pstSp_S.coelicolor  GTCTTCGACGTAAGCGTTCCGTGACCTCACCGCACCGTCCACAGGGGTTCACTCGCCGTT
pstSp_S.lividans    GTCCTCGACGTAAGCGTTCCGTGACCTCACCGCACCGTCCACAGGGGTTCACTCGCCGTT
pstSp_S.ambofaciens -----CGTGAGCGTTCCGTGACCTCACCGCACCGTCCGTTCAGTTCACTCGCCGTT
                        ** * ***** ** ** ** ***** ****

pstSp_S.scabiei      CACTTCCGTCCATCGGCGGCTTACCTGATCTGCCTAATTCGGCCTTACCCGGTGCGGG
pstSp_S.avermitilis CACTTCCGTCCATCGGCGGCTTACCTGATCTGCCTAATTCGGCCTTACCCGGTGCGGG
pstSp_S.coelicolor  CATTACGCCCTTCGGCGCCTTACCTGATCTGCCTAATTCGGCCTTACCCGGTGCGGG
pstSp_S.lividans    CATTACGCCCTTCGGCGCCTTACCTGATCTGCCTAATTCGGCCTTACCCGGTGCGGG
pstSp_S.ambofaciens CATGTACGCCATCGGCGGCTTACCTGATCTGCCTAATTCAGCCTTACCGATACGGGG
                        ** ** * ***** ** ** ***** ***** *

pstSp_S.scabiei      ATGCGGGCCGAAACAGGCGGTGCACCCCGTACGACAGCAGTTCGAGGGACTGACGGCA
pstSp_S.avermitilis ACGGCGACCTGAATGTCGCCCTCCGCATT-----ACACAG-----ACTTCGCACGCCG
pstSp_S.coelicolor  ACGCCGCCGAATTCAGG-----
pstSp_S.lividans    ACGCCGCCGAATTCAGG-----
pstSp_S.ambofaciens CGCATCCCGAAACCGGTCCCGTATCCCCAGTCTTCATCGCAGTCTTCGCACGCCGCGTA
                        *

pstSp_S.scabiei      CCGACCGGGCAGGCCCC--GAGGCTGATACGACGACTTCGCACGCCGCCAT
pstSp_S.avermitilis CACCAGTCGGCGGCTCCTGGAAGGAACTCCCGAAAGTGAAGCTTCAGCGC-
pstSp_S.coelicolor  -----ACGGCGGCTCCTGGAAGGAACTCCCTCAAGTGAAGCTTCAGCGC-
pstSp_S.lividans    -----ACGGCGGCTCCTGGAAGGAACTCCCTCAAGTGAAGCTTCAGCG-
pstSp_S.ambofaciens TTCAGGCCGGCGCTCCTGGAAGGAACTCCCTCA-----
                        * ** * ** * ** *

```

**Figura S1. Análisis del promotor del operón *pst* de diferentes especies de *Streptomyces*.** Alineamiento múltiple de secuencia mediante la herramienta *Clustal Omega* (EMBL-EBI) de los promotores del operón *pst* de *S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. ambofaciens*, *S. avermitilis*, y *S. scabiei*. El AR motif ( $AC_{T/C}CAG_{C/A}CC_{T/C}G_{A/C}GCAC_{T/C}CACC$ ) está subrayado en las secuencias en las que está presente; las regiones equivalentes en los distintos promotores han sido marcadas con el mismo color. El motivo *PHO box* (GTTCAN<sub>6</sub>GTTCA) ha sido sombreado y remarcado.