



Universidad de Oviedo

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE
BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR**

**Estudio del fosfoproteoma y de la
formación de células deficientes de pared
en *Streptomyces coelicolor***

Sergio Alonso Fernández

Mayo, 2024

TESIS DOCTORAL



Universidad de Oviedo

**PROGRAMA DE DOCTORADO DE
BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR**

TESIS DOCTORAL

**Estudio del fosfoproteoma y de la
formación de células deficientes de pared
en *Streptomyces coelicolor***

Sergio Alonso

Ángel Manteca

Carlos Olano

Nathaly González



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Estudio del fosfoproteoma y de la formación de células deficientes de pared en <i>Streptomyces coelicolor</i>	Inglés: Study of the phosphoproteome and the formation of wall-deficient cells in <i>Streptomyces coelicolor</i>
2.- Autor	
Nombre: Sergio Alonso Fernández	
Programa de Doctorado: Biomedicina y Oncología Molecular	
Órgano responsable: Centro Internacional de Posgrado	

RESUMEN (en español)

Streptomyces es un género de bacterias de gran importancia industrial al producir dos tercios de los metabolitos secundarios con relevancia clínica (antibióticos y otros). Presenta un ciclo vital complejo con procesos de crecimiento micelial, diferenciación morfológica, esporulación y muerte celular programada (MCP).

El objetivo de esta tesis fue ampliar el conocimiento sobre la regulación del desarrollo y diferenciación de *Streptomyces coelicolor*, para lo cual seguimos varias estrategias:

- Buscamos mutantes con fenotipos relevantes en una librería de mutantes aleatorios creada usando el transposón mini-Tn5, identificando el mutante *SCO1760::Tn5*.
- Caracterizamos la función de varios genes diferencialmente expresados durante el desarrollo de *Streptomyces* (*SCO0698*, *SCO0837*, *SCO0954* y *SCO2795*).
- Analizamos el fosfoproteoma de las fases vegetativa y esporulante en la cepa silvestre de *S. coelicolor* utilizando por primera vez en bacterias Zr(IV)-IMAC para el enriquecimiento de fosfopéptidos.

La mutagénesis aleatoria y dirigida nos permitió encontrar varios genes (*SCO0954*, *SCO1758* y *SCO4439-40*) cuyas mutaciones generan un fenotipo muy novedoso consistente en hifas hinchadas y células similares a protoplastos a las 48 horas de desarrollo en cultivos en medio GYM. Este fenotipo se vio potenciado al suplementar el medio con 0,64M sacarosa, asemejándose a las células S inducidas por estrés osmótico y descritas por Ramijan *et al.* (2018, Nat Commun, 9, 5164) en *Kitasatospora viridifaciens*.



Propusimos que la alteración del peptidoglicano (PG) puede estar implicada en la formación de células deficientes de pared en los mutantes. Cuantificamos el *cross-linking* del PG en todas las cepas mediante bloqueo de extremos amino libres con 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno (FNDB) acoplado a hidrólisis del PG y a la derivatización con orto-ftalaldehído (OPA), y medimos también la metionina y la metionina sulfóxido (oxidada) del PG para comprobar si *SCO0954* afecta al equilibrio de oxidación de la metionina.

Vimos que la metionina no oxidada disminuye en los mutantes en los genes *SCO1758* y *SCO4439-40*, y que tanto la forma sulfóxido como la no oxidada disminuyen en el *knockout* en el gen *SCO0954*. También observamos que los plásmidos integrativos Φ BT1 (pMS82, pNG3 y pNG4) afectan los niveles de metionina no oxidada y total del PG, aumentando en pMS82 y disminuyendo en pNG4. La integración de estos plásmidos afecta a la expresión del gen *SCO4849*, el cual pudimos caracterizar como una exosortasa que libera péptidos unidos al PG, disminuyendo así la metionina total.

En resumen, las proteínas *SCO0954* (N-acetiltransferasa con dominio YncA), *SCO1758* (GTPasa con dominio EngA), *SCO4439* (D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa) y *SCO4440* (proteína con dominio GOLPH3) participan en la formación de células deficientes de pared en *S. coelicolor*, así como en la modulación del *cross-linking* del PG, la cantidad de de los muropéptidos unidos al mismo y el estado de oxidación de las metioninas de estos péptidos. Los genes analizados también modulan la resistencia a glicopéptidos. La exosortasa *SCO4849* participa en la remodelación del PG, pero no en la formación de células sin pared. Esta es la primera vez que se encuentran células sin pared en *S. coelicolor* y la primera vez que la reorganización del PG se correlaciona con su formación.

También analizamos el fosfoproteoma de las fases vegetativa y esporulante en la cepa silvestre de *S. coelicolor*. Usando Zr(IV)-IMAC, identificamos 361 sitios de fosforilación (41% pSer, 56,2% pThr, 2,8% pTyr) en 351 fosfopéptidos derivados de 186 fosfoproteínas, así como 4 nuevos motivos de fosforilación de Thr ("Kxxxx(pT)xxxxK", "DxE(pT)", "D(pT)" y "Exxxxx(pT)"). Identificamos 154 fosfoproteínas nuevas, casi el doble del número de fosfoproteínas de *Streptomyces* conocidas hasta ahora, que incluyeron 27 nuevas proteínas ribosomales fosforiladas durante la etapa vegetativa, así como proteínas de división celular (FtsK, CrgA) y reguladores del metabolismo (ArgR, AfsR, CutR y HrcA) fosforilados diferencialmente en las etapas vegetativa y esporulante.



RESUMEN (en inglés)

Streptomyces is a genus of bacteria of great industrial importance which produces two thirds of the secondary metabolites with clinical relevance. It presents a complex life cycle with processes of mycelial growth, morphological differentiation, sporulation and programmed cell death (PCD).

The aim of this thesis was to expand the knowledge about the regulation of the development and differentiation of *Streptomyces coelicolor*, for which we followed several strategies:

- We searched for mutants with relevant phenotypes in a random mutant library created using the mini-Tn5 transposon, identifying the *SCO1760::Tn5* mutant.
- We characterized the function of several genes differentially expressed during *Streptomyces* development (*SCO0698*, *SCO0837*, *SCO0954* and *SCO2795*).
- We analyzed the phosphoproteome of the vegetative and sporulating phases in the *S. coelicolor* wild-type strain using Zr(IV)-IMAC for the enrichment of phosphopeptides for the first time in bacteria.

Random and targeted mutagenesis allowed us to find several genes (*SCO0954*, *SCO1758* and *SCO4439-40*) whose mutations generate a very novel phenotype consisting of swollen hyphae and protoplast-like cells at 48 hours of development in GYM medium cultures. This phenotype was enhanced by supplementing the medium with 0,64M sucrose, resembling the S-cells described by Ramijan *et al.* (2018, Nat Commun, 9, 5164) in *Kitasatospora viridifaciens*.

We proposed that peptidoglycan (PG) alteration may be involved in the formation of wall-deficient cells in the mutants. We quantified PG cross-linking in all strains by blocking free amino ends with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FNDB) coupled to PG hydrolysis and derivatization with ortho-phthalaldehyde (OPA), and we also measured the methionine and methionine sulfoxide (oxidized) of PG to test whether *SCO0954* affects the methionine oxidation balance.

We saw that non-oxidized methionine decreases in the *SCO1758* and *SCO4439-40* mutants, and that both the sulfoxide and non-oxidized forms decrease in the *SCO0954* gene *knockout*. We also observed that the integrative Φ BT1 plasmids (pMS82, pNG3 and pNG4) affect the levels of non-oxidized and total methionine of the PG, increasing in pMS82 and decreasing in pNG4. The integration of these plasmids affects the expression of the *SCO4849* gene, which we were able to characterize as an exosortase that releases peptides linked to PG, thus decreasing total methionine.

In summary, the proteins *SCO0954* (N-acetyltransferase with YncA domain), *SCO1758* (GTPase with EngA domain), *SCO4439* (D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase) and *SCO4440* (protein with GOLPH3 domain) participate in the formation of wall-deficient cells in *S. coelicolor*, as well as in the modulation of PG cross-linking, the amount of



muropeptides bound to it and the oxidation state of the methionines of these peptides. The genes analyzed also modulate resistance to glycopeptides. The SCO4849 exosortase participates in PG remodeling, but not in the formation of wall deficient cells. This is the first time that wall-deficient cells have been found in *S. coelicolor* and the first time that PG reorganization is linked with their formation.

We also analyzed the phosphoproteome of the vegetative and sporulating phases in the *S. coelicolor* wild-type strain. Using Zr(IV)-IMAC, we identified 361 phosphorylation sites (41% pSer, 56.2% pThr, 2.8% pTyr) in 351 phosphopeptides derived from 186 phosphoproteins, as well as 4 novel Thr phosphorylation motifs ("Kxxxx (pT)xxxxK", "DxE(pT)", "D(pT)" and "Exxxxx(pT)"). We identified 154 new phosphoproteins, nearly doubling the number of known *Streptomyces* phosphoproteins, which included 27 new ribosomal proteins phosphorylated during the vegetative stage, as well as cell division proteins (FtsK, CrgA) and metabolism regulators (ArgR, AfsR, CutR and HrcA) differentially phosphorylated in the vegetative and sporulating stages.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE
DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR**

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 EL GÉNERO <i>STREPTOMYCES</i>	3
I.1.1 Características generales	3
I.1.2 Contexto histórico	5
I.1.3 Importancia biotecnológica	7
I.2. CICLO DE DESARROLLO DE <i>STREPTOMYCES</i>	10
I.2.1 Desarrollo en medio sólido	10
I.2.2 Desarrollo en medio líquido	13
I.2.3 Desarrollo en condiciones naturales	14
I.2.4 Muerte celular programada	14
I.2.5 Desarrollo en condiciones de estrés osmótico	16
a) Crecimiento exploratorio	17
b) Formas L	18
c) Células S	21
d) Vesículas extracelulares	22
I.2.6. Formación de vesículas intracelulares asociadas a la muerte celular programada y a la división celular	24
I.3. REGULACIÓN DEL DESARROLLO DE <i>STREPTOMYCES</i>	25
I.3.1 Germinación	31
I.3.2 Formación del primer micelio y muerte celular programada	33
I.3.3 Diferenciación de MI a MII sustrato	34
I.3.4 Diferenciación de MII sustrato a MII aéreo	35
I.3.5 Regulación del metabolismo secundario	36
I.3.6 Esporulación	38
I.3.7 Regulación del desarrollo en condiciones de estrés osmótico	39

I.4. TÉCNICAS USADAS PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS REGULADORES PLEIOTRÓPICOS EN LAS DISTINTAS FASES DEL DESARROLLO DE <i>STREPTOMYCES</i>	42
I.4.1. Mutagénesis aleatoria mediante transposones	42
I.4.2. Mutagénesis dirigida	44
a) Mutagénesis dirigida mediante transposones	44
b) Mutagénesis dirigida mediante CRISPR-Cas9	45
I.4.3. Fosfoproteómica	46
a) Proteómica clásica	47
b) Proteómica libre de gel (LC-MS/MS)	48
c) Proteómica cuantitativa	50
d) Fosfoproteómica de <i>Streptomyces</i>	51
II. OBJETIVOS	55
III. METODOLOGÍA	59
III.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	61
III.1.1. Cepas utilizadas	61
III.1.2. Medios de cultivo utilizados para <i>Escherichia coli</i>	62
III.1.3. Medios de cultivo utilizados para <i>Streptomyces coelicolor</i>	63
III.1.4. Condiciones de cultivo y conservación de <i>Escherichia coli</i>	65
III.1.5. Condiciones de cultivo y conservación de <i>Streptomyces coelicolor</i>	65
III.1.6. Plásmidos utilizados	66
III.1.7. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR	69
III.2. ANÁLISIS FENOTÍPICO, VALIDACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES ALEATORIOS DE <i>STREPTOMYCES COELICOLOR</i> GENERADOS CON EL TRANSPOSÓN MINI-TN5	73
III.2.1. <i>Screening</i> fenotípico de mutantes de inserción aleatoria	74

III.2.2. Identificación del sitio de integración del transposón mini-Tn5	75
<hr/>	
III.3. TÉCNICAS GENERALES DE MANIPULACIÓN DEL ADN Y MUTAGÉNESIS	76
III.3.1. Procedimiento general para clonación de fragmentos de ADN, purificación y conservación de plásmidos	76
III.3.2. Procedimiento general de electroporación y conjugación	77
III.3.3. Comprobación de los sitios de integración ϕ BT1 y ϕ C31 en vectores de integración	78
III.3.4. Edición genética mediante Crispr-Cas9	80
a) Creación del mutante <i>knockout</i> en el gen <i>SCO1758</i>	84
b) Creación del mutante <i>knockout</i> en el gen <i>SCO0954</i>	87
III.3.5. Sobreexpresión de los genes <i>SCO0837</i> , <i>SCO0954</i> y <i>SCO2795</i>	89
<hr/>	
III.3.6. Reducción de la traducción del gen <i>SCO0698</i> mediante la expresión de ARN antisentido	90
III.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	92
III.4.1. Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)	92
<hr/>	
III.4.2. PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR)	93
III.4.3. Análisis de la expresión génica mediante transcriptómica (RNAseq)	94
III.5 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	95
III.5.1. Tinción de viabilidad	95
III.5.2. Construcción y visualización de cepas expresando las proteínas mCherry y eGFP	96

a) Construcción de una cepa de <i>S. coelicolor</i> expresando la proteína SCO1758 unida a proteína fluorescente mCherry	___	96
b) Construcción de una cepa de <i>S. coelicolor</i> expresando la proteína SCO0954 unida a proteína fluorescente mCherry	___	97
c) Construcción de una cepa de <i>S. coelicolor</i> expresando la proteína SCO4440 unida a proteína fluorescente mCherry	___	98
d) Visualización de cepas expresando las proteínas mCherry y eGFP	_____	98
III.5.3. Técnicas de <i>time-lapse</i>	_____	99
III.5.4. Tinción de pared celular con aglutinina de germen de trigo (WGA)	_____	100
III.5.5. Cuantificación del tamaño de células deficientes de pared	_____	100
III.6. DISEÑO DE LAS CONSTRUCCIONES DE COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES <i>SCO1760::Tn5</i> y <i>SCO4439::Tn5062</i>	_____	101
III.6.1. Complementación del mutante <i>SCO1760::Tn5</i>	_____	101
a) Construcción “pNG3 <i>SCO1760</i> ”	_____	102
b) Construcción “pNG3 <i>SCO1760-1759</i> ”	_____	102
c) Construcción “pNG3 <i>SCO1760-1759-1758</i> ”	_____	103
III.6.2. Complementación del mutante <i>SCO4439::Tn5062</i>	_____	104
a) Diseño de “pRASK <i>SCO4439</i> ”	_____	104
b) Diseño de “pRASK <i>SCO4440-4441-4442</i> ”	_____	104
III.7. ESTUDIO DE LA PARED CELULAR	_____	104
III.7.1. Extracción del peptidoglicano y tratamiento con FDNB	_	104
III.7.2. Cuantificación del <i>cross-linking</i> y de metionina del peptidoglicano	_____	106

III.7.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de vancomicina _____	107
III.8. FOSFOPROTEÓMICA _____	108
III.8.1. Extracción proteica _____	108
III.8.2. Digestión, desalado y cuantificación de proteína _____	109
III.8.3. Precipitación de fosfopéptidos con fosfato cálcico (CPP) _____	110
III.8.4. Enriquecimiento con Zr(IV)-IMAC _____	111
III.8.5. Análisis por LC-MS/MS _____	111
III.8.6. Análisis bioinformático de los datos _____	112
IV. RESULTADOS _____	115
IV.1. BÚSQUEDA DE MUTANTES CON LA DIVISIÓN CELULAR ALTERADA _____	117
IV.1.1. <i>Screening</i> de mutantes de inserción aleatoria por transposición _____	117
IV.1.2. Análisis transcriptómico (RNAseq) del mutante en el gen <i>ftsZ</i> y estudio de la función de los genes diferencialmente expresados en comparación con la cepa salvaje _____	119
a) Comparación de los transcriptomas de la cepa salvaje de <i>Streptomyces coelicolor</i> y del mutante <i>ftsZ</i> _____	119
b) Fenotipo de <i>S. coelicolor</i> sobreexpresando o reprimiendo los genes cuya expresión está alterada en el mutante <i>ftsZ</i> _____	121
IV.2. LA MUTACIÓN DE LOS GENES <i>SCO0954</i> , <i>SCO1758</i> Y <i>SCO4439/40</i> CONDUCE A LA FORMACIÓN DE HIFAS Y CÉLULAS HINCHADAS DEFICIENTES DE PARED BAJO ESTRÉS OSMÓTICO EN <i>STREPTOMYCES COELICOLOR</i> _____	123
IV.2.1. Fenotipo de la cepa de <i>S. coelicolor</i> sobreexpresando el gen <i>SCO0954</i> _____	123

IV.2.2. Fenotipo del mutante <i>SCO0954 knockout</i> de <i>S. coelicolor</i>	126
IV.2.3. Caracterización del mutante <i>SCO1760::Tn5</i>	127
a) Fenotipo del mutante <i>SCO1760::Tn5</i>	127
b) Complementación del mutante <i>SCO1760::Tn5</i>	128
c) Expresión génica del gen <i>SCO1758</i> en la cepa salvaje de <i>Streptomyces coelicolor</i> y el mutante <i>SCO1760::Tn5</i>	129
d) Intento de creación de un mutante <i>knockout</i> en el gen <i>SCO1758</i>	131
IV.2.4. La mutación en <i>SCO4439-40</i> conduce a la formación de hifas y células hinchadas sin pared celular bajo estrés osmótico en <i>Streptomyces coelicolor</i>	132
IV.3. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y DINÁMICA DE FORMACIÓN DE LAS CÉLULAS DEFICIENTES DE PARED	136
IV.3.1. Experimentos de <i>time-lapse</i> de los mutantes <i>SCO1760::Tn5</i> , <i>SCO4439-40::Tn5062</i> , <i>SCO0954</i> sobreexpresado y Δ <i>SCO0954</i> en medio GYM suplementado con 0,64M sacarosa	136
IV.3.2. Los efectos de <i>SCO0954</i> y <i>SCO4439-40</i> en la formación de células sin pared son acumulativos, mientras que la mutación de <i>SCO1758</i> prevalece sobre la sobreexpresión de <i>SCO0954</i>	140
a) Sobreexpresión de <i>SCO0954</i> en el mutante <i>SCO4439-40::Tn5062</i>	140
b) Sobreexpresión de <i>SCO0954</i> en el mutante <i>SCO1760::Tn5</i>	141
IV.3.3. Formación de células sin pared en medio SFM suplementado con 0,64M de sacarosa	142
IV.3.4. Tamaño y abundancia de células sin pared en medio GYM suplementado con 0,64M sacarosa	145
IV.3.5. Tamaño y abundancia de células sin pared en medio SFM suplementado con 0,64M sacarosa	146

IV.3.6. Las células similares a protoplastos formadas en los mutantes <i>SCO1760::Tn5</i> , <i>SCO4439-40::Tn5062</i> y <i>SCO0954</i> carecen de pared celular _____	147
IV.4. LAS PROTEÍNAS <i>SCO0954</i> , <i>SCO1758</i> , <i>SCO4439</i> Y <i>SCO4440</i> ESTÁN ALTAMENTE CONSERVADAS EN <i>STREPTOMYCES COELICOLOR</i> ____	150
IV.4.1. Conservación y homologías de <i>SCO1758</i> _____	150
IV.4.2. Conservación y homologías de <i>SCO0954</i> _____	151
IV.4.3. Conservación y homologías de <i>SCO4439</i> y <i>SCO4440</i> _____	152
IV.5. ESTUDIO DE LA PARED CELULAR DE LOS MUTANTES <i>SCO1760::TN5</i> , <i>SCO4439-40::TN5062</i> , <i>SCO0954</i> SOBREENPRESADO Y <i>SCO0954 KNOCKOUT</i> _____	154
IV.5.1. <i>Cross-linking</i> del peptidoglicano de los mutantes <i>SCO1760::Tn5</i> , <i>SCO4439-40::Tn5062</i> , <i>SCO0954</i> sobreexpresado y <i>SCO0954 knockout</i> _____	154
IV.5.2. Niveles de metionina oxidada y no oxidada del peptidoglicano de los mutantes <i>SCO1760::Tn5</i> , <i>SCO4439-40::Tn5062</i> , <i>SCO0954</i> sobreexpresado y <i>SCO0954 knockout</i> _____	158
a) Metionina oxidada y no oxidada en el peptidoglicano de <i>Streptomyces coelicolor</i> con y sin los plásmidos utilizados para complementar los mutantes _____	159
b) Metionina oxidada y no oxidada en el peptidoglicano del mutante <i>SCO4439-40::Tn5062</i> y sus cepas complementadas_	163
c) Metionina oxidada y no oxidada en el peptidoglicano del mutante <i>knockout ΔSCO0954</i> y el mutante sobreexpresando <i>SCO0954</i> _____	164
d) Metionina oxidada y no oxidada en el peptidoglicano del mutante <i>SCO1760::Tn5</i> _____	166

IV.5.3. Efecto del potencial redox extracelular en la formación de células sin pared en los mutantes <i>SCO0954</i> sobreexpresado y <i>SCO0954 knockout</i>	167
IV.5.4. La resistencia a la vancomicina está ligeramente disminuida en el mutante <i>SCO1760::Tn5</i>	168
IV.6. DINÁMICA DE LAS PROTEÍNAS SCO1758, SCO4440 Y SCO0954 FUSIONADAS CON LA PROTEÍNA MCHERRY	170
IV.6.1. Dinámica de SCO1758-mCherry en medio SFM suplementado con 0,64M sacarosa	170
IV.6.2. Dinámica de SCO4440-mCherry en medio SFM suplementado con 0,64M sacarosa	172
IV.6.3. Dinámica de SCO0954-mCherry en medio SFM suplementado con 0,64M sacarosa	172
IV.7. FOSFOPROTEÓMICA	174
IV.7.1. Enriquecimiento de fosfopéptidos por Zr(IV)-IMAC en <i>Escherichia coli</i>	174
IV.7.2. Estudio del fosfoproteoma de <i>Streptomyces coelicolor</i> mediante Zr(IV)-IMAC	176
IV.7.3. Análisis de los sitios y motivos de fosforilación	179
IV.7.4. Diferencias en los fosfoproteomas del micelio sustrato y aéreo	180
a) Fosfopéptidos diferencialmente fosforilados en el micelio sustrato y aéreo agrupados por clústeres de expresión	180
b) Proteínas diferencialmente fosforiladas en el micelio sustrato y aéreo agrupadas por sus funciones	183
c) Proteínas fosforiladas sin diferencias en el micelio sustrato y aéreo agrupadas por sus funciones	185

IV.7.5. La distribución de los sitios de fosforilación de S/T identificados no es aleatoria ya que están ubicados en regiones proteicas estructurales _____	186
V. DISCUSIÓN _____	189
V.1. FORMACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES Y CÉLULAS SIN PARED (CÉLULAS S Y FORMAS L) EN ACTINOMICETOS _____	191
V.1.1 La cepa salvaje de <i>Streptomyces coelicolor</i> es capaz de formar células S y formas L en medio SFM suplementado con 0,64M sacarosa _____	192
V.1.2. La mutación de los genes <i>SCO0954</i> , <i>SCO1758</i> , <i>SCO4439</i> Y <i>SCO4440</i> induce la formación de células deficientes de pared (células S y formas L) en <i>Streptomyces coelicolor</i> en cultivos sólidos en medio GYM y altera la formación de este tipo de células en medio SFM	194
a) Homologías y posibles funciones de <i>SCO0954</i> _____	195
b) Homologías y posibles funciones de <i>SCO1758</i> _____	197
c) Homologías y función de <i>SCO4439</i> _____	199
d) Homologías y posibles funciones de <i>SCO4440</i> _____	200
e) La exosortasa <i>SCO4849</i> participa en la eliminación de péptidos del PG _____	202
f) Las proteínas <i>SCO0954</i> , <i>SCO1758</i> , <i>SCO4439</i> , <i>SCO4440</i> y <i>SCO4849</i> participan en la remodelación del peptidoglicano__	202
g) Las proteínas <i>SCO0954</i> , <i>SCO1758</i> , <i>SCO4439</i> y <i>SCO4440</i> participan en la formación de células sin pared en <i>Streptomyces coelicolor</i> _____	205
V.1.3. Experimentos futuros para caracterizar mejor las alteraciones de pared generadas por las mutaciones de los genes <i>SCO0954</i> , <i>SCO1758</i> , <i>SCO4439</i> y <i>SCO4440</i> _____	205

V.2. LA FOSFOPROTEÓMICA UTILIZANDO EL ENRIQUECIMIENTO DE FOSFOPÉPTIDOS CON ZR(IV)-IMAC HA PERMITIDO CASI DUPLICAR EL FOSFOPROTEOMA CONOCIDO DE <i>STREPTOMYCES COELICOLOR</i> _	207
V.2.1. El enriquecimiento de fosfopéptidos con Zr(IV)-IMAC ha permitido casi duplicar el fosfoproteoma conocido de <i>Streptomyces coelicolor</i> _____	207
V.2.2. La técnica de enriquecimiento de fosfopéptidos con Zr(IV)-IMAC reporta fosfopéptidos diferentes a la técnica de enriquecimiento con TiO ₂ _____	209
V.2.3. Los sitios de fosforilación identificados se localizan en dominios estructurales y funcionales de las proteínas fosforiladas _____	210
V.2.4. Variaciones en el fosfoproteoma de <i>Streptomyces coelicolor</i> en el micelio sustrato y el micelio aéreo _____	211
VI. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS _____	215
VII. REFERENCIAS _____	221

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lista parcial de antibióticos descubiertos en actinomicetos entre la década de 1940 y de 2000.	8
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Streptomyces coelicolor</i> en medio sólido.	10
Figura 3. Esquema del desarrollo de <i>Streptomyces</i> en medio sólido.	12
Figura 4. Desarrollo de <i>Streptomyces</i> en medio líquido.	13
Figura 5. Esquema del desarrollo de <i>Streptomyces</i> en condiciones naturales (suelos).	14
Figura 6. Esquema de la proliferación de formas L mediante formación de burbujas (<i>blebbing</i>), tubulación y vesiculación.	20
Figura 7. Representación del ciclo de formación de células S y formas L en condiciones de estrés inducido, adaptado al ciclo de vida tradicional de <i>Streptomyces</i>	22
Figura 8. Principales rutas biomoleculares conocidas de los procesos de diferenciación en <i>Streptomyces</i>	36
Figura 9. Representación del transposón mini-Tn5 dentro del vector replicativo pHL734 utilizado para mutagénesis aleatoria.	44
Figura 10. Estructura del transposón Tn5062.	45
Figura 11. Representación del plásmido CRISPR-Cas9 con el complejo sgRNA ampliado.	46
Figura 12. Esquema con los fundamentos de la proteómica clásica.	48
Figura 13. Esquema en el que se representa el fundamento de las técnicas de “proteómica avanzada” libre de gel (LC-MS/MS).	49
Figura 14. Esquema en el que se representa el fundamento de la técnica de proteómica cuantitativa mediante marcaje isobárico.	51
Figura 15. Esquema de construcción del molde (<i>overlap</i>) para CRISPR-Cas9.	82

Figura 16. Región génica de <i>SCO1760</i> y construcciones de complementación.....	101
Figura 17. Fenotipo del mutante <i>SCO1760::Tn5</i>	119
Figura 18. Hifas hinchadas y células con apariencia de protoplastos en <i>Streptomyces coelicolor</i> sobreexpresando <i>SCO0954</i> y creciendo en medio GYM sin sacarosa a las 48 horas de cultivo.	122
Figura 19. Células con deficiencia de pared inducida por estrés osmótico en la cepa sobreexpresando <i>SCO0954</i>	124
Figura 20. Cuantificación del área de las vesículas membranosas formadas en la cepa salvaje de <i>S. coelicolor</i> sobreexpresando el gen <i>SCO0954</i>	125
Figura 21. Células con deficiencia de pared inducida por estrés osmótico y cuantificación del área de las vesículas en el mutante <i>knockout</i> de <i>SCO0954</i>	126
Figura 22. Fenotipo del mutante <i>SCO1760::Tn5</i> en medio GYM suplementado con 0,64M sacarosa a las 48 horas de cultivo.....	127
Figura 23. Cuantificación del área de las vesículas en la cepa <i>SCO1760::Tn5</i>	128
Figura 24. Complementación del fenotipo del mutante <i>SCO1760::Tn5</i>	130
Figura 25. Expresión del gen <i>SCO1758</i> en cultivo sólido de GYM a las 48 horas.	131
Figura 26. Fenotipo del mutante <i>SCO4439::Tn5062</i> en medio GYM suplementado con 0,64M sacarosa a las 48 horas de cultivo.....	133
Figura 27. Cuantificación del área de las vesículas en el mutante <i>SCO4439-40::Tn5062</i>	133
Figura 28. Esquema de la región comprendida entre los genes <i>SCO4437</i> y <i>SCO4442</i>	134

Figura 29. Complementación del mutante <i>SCO4439-40::Tn5062</i>	135
Figura 30. Dinámica de las hifas hinchadas y células inducidas por estrés osmótico del mutante <i>SCO1760::Tn5</i>	137
Figura 31. Dinámica de las hifas hinchadas y células inducidas por estrés osmótico en los mutantes sobreexpresante y <i>knockout</i> de <i>SCO0954</i> ..	139
Figura 32. Dinámica de las hifas hinchadas y células inducidas por estrés osmótico del mutante <i>SCO4439-40::Tn5062</i> en medio GYM..	140
Figura 33. Efecto de la sobreexpresión de <i>SCO0954</i> en el mutante <i>SCO4439-40::Tn5062</i>	141
Figura 34. Efecto de la sobreexpresión de <i>SCO0954</i> en el mutante <i>SCO1760::Tn5</i>	142
Figura 35. Formación de células S y formas L en medio SFM suplementado con 0,64M sacarosa.....	144
Figura 36. Gráfica de cajas y bigotes del tamaño y abundancia de vesículas (células sin pared) entre los mutantes <i>SCO1760::Tn5</i> , <i>SCO4439-40::Tn5062</i> , <i>SCO0954</i> sobreexpresado y <i>SCO0954 knockout</i> en medio GYM suplementado con 0,64M de sacarosa.....	146
Figura 37. Gráfica de cajas y bigotes del tamaño y abundancia de vesículas (células sin pared) entre los mutantes <i>SCO1760::Tn5</i> , <i>SCO4439-40::Tn5062</i> , <i>SCO0954</i> sobreexpresado y <i>SCO0954 knockout</i> en medio SFM suplementado con 0,64M de sacarosa.	147
Figura 38. Tinción de membrana y de pared celular de las células S en la cepa salvaje de <i>S. coelicolor</i> y el mutante <i>SCO4439-40::Tn5062</i>	149
Figura 39. Homologías y conservación de <i>SCO1758</i> en <i>Streptomyces</i> . 151	
Figura 40. Homologías y conservación de <i>SCO0954</i> en <i>Streptomyces</i>	152
Figura 41. Homologías y conservación de <i>SCO4439</i> y <i>SCO4440</i> en <i>Streptomyces</i>	153

Figura 42. Representación del <i>cross-linking</i> en un fragmento de peptidoglicano de la pared celular.....	155
Figura 43. Comparativa del índice <i>cross-linking</i> del peptidoglicano entre la cepa salvaje de <i>S. coelicolor</i> (Wt) y los mutantes estudiados.....	157
Figura 44. Representación de la estructura de un muropéptido monomérico con un puente interpeptídico.....	159
Figura 45. Metionina sulfóxido, metionina no oxidada y metionina total en la cepa de tipo salvaje de <i>S. coelicolor</i> y en las cepas de tipo salvaje con los plásmidos pMS82, pNG3, pNG4 y pRASK.....	161
Figura 46. Abundancia de transcrito de <i>SCO4849</i>	162
Figura 47. Metionina sulfóxido, metionina no oxidada y metionina total en el mutante <i>SCO4439-40::Tn5062</i> y cepas complementadas.	163
Figura 48. Metionina sulfóxido, metionina no oxidada y metionina total en los mutantes <i>SCO0954 knockout</i> (Δ <i>SCO0954</i>) y sobreexpresado (cepa Wt [pNG4 <i>SCO0954</i>]).....	165
Figura 49. Metionina sulfóxido, metionina no oxidada y metionina total en el mutante <i>SCO1760::Tn5</i> y en la cepa complementada (cepa <i>SCO1760::Tn5</i> [pNG3 <i>SCO1760-59-58</i>]).	166
Figura 50. Formación de células S en medio GYM suplementado con 0,64M sacarosa y 5 mM DTT.	168
Figura 51. Concentración mínima inhibitoria de vancomicina en los mutantes <i>SCO1760::Tn5</i> y <i>knockout/sobreexpresante</i> de <i>SCO0954</i> . .	169
Figura 52. Dinámica de <i>SCO1758-mCherry</i> en cultivos de 48h en SFM suplementado con 0,64M sacarosa.....	171
Figura 53. Dinámica de <i>SCO4440-mCherry</i> y <i>SCO0954-Cherry</i> en cultivos de 48h en SFM suplementado con 0,64M sacarosa..	173
Figura 54. Fosfoproteómica de <i>E. coli</i> usando Zr(IV)-IMAC..	175

Figura 55. Caracterización de la fosfoproteómica de <i>S. coelicolor</i> mediante Zr(IV)-IMAC y espectrometría de masas.....	178
Figura 56. Motivos de fosfotreonina (pT) y posibles clústeres funcionales de proteínas.....	180
Figura 57. Abundancias cuantitativas de fosfopéptidos en cultivos de 30 y 65 h.	182
Figura 58. Abundancias de fosfopéptidos agrupadas por función..	184
Figura 59. Estructuras predichas mediante AlphaFold de proteínas seleccionadas de <i>S. coelicolor</i> y sus sitios de fosforilación determinados experimentalmente.....	188
Figura 60. Modelo que describe el papel de <i>SCO0954</i> en la reorganización del peptidoglicano y la formación de células S y L..	196
Figura 61. Modelo del papel de <i>SCO1758</i> en la reorganización del peptidoglicano y la formación de células S y formas L.....	198
Figura 62. Modelo que describe el papel de <i>SCO4440</i> en la reorganización del peptidoglicano y la formación de células S y L..	201
Figura 63. Modelo que describe el papel de <i>SCO0954</i> , <i>SCO4439</i> y <i>SCO4849</i> en la reorganización del PG y la formación de células S y L..	203
Figura 64. Variaciones del fosfoproteoma durante el desarrollo de <i>S. coelicolor</i> en el micelio sustrato (30 horas) y en micelio aéreo esporulado (65 horas).....	212

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales genes que regulan la diferenciación fisiológica y morfológica de <i>Streptomyces</i>	26
Tabla 2. Descripción general de las fosfoproteínas S/T/Y identificadas en la fosfoproteómica de <i>Escherichia coli</i> y <i>Streptomyces coelicolor</i>	54
Tabla 3. Cepas utilizadas de <i>E. coli</i> y <i>S. coelicolor</i> A3(2) utilizadas en este trabajo.	61
Tabla 4. Plásmidos utilizados en esta tesis.	66
Tabla 5. Construcciones realizadas para el estudio de los genes <i>SCO0954</i> , <i>SCO1758</i> , <i>SCO4439</i> y <i>SCO4440</i>	67
Tabla 6. Cebadores utilizados en esta tesis.....	69
Tabla 7. Secuencia sintetizada del promotor SP44.	91
Tabla 8. Número de mutantes aleatorios estudiados en esta tesis y fenotipo destacable.....	118
Tabla 9. Datos cuantitativos del transcriptoma del mutante <i>ftsZ</i> (recogida en cultivo sólido GYM de 24h) en comparación con cepa salvaje (Wt) recogida a las 16 y 72h en cultivo GYM.....	120

ABREVIATURAS

ADNc: ADN complementario

BSA: Albúmina de suero bovino

D-Ala: D-alanina

DTT: Ditionitrosol

Gly: Glicina

GYM: *Glucose, Yeast, Malt Extract*

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

IP: Ioduro de propidio

LC-MS/MS: *Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry*

L,LA₂pm: Ácido 2,6-diaminopimélico

MCP: Muerte celular programada

MI: Primer micelio

MII: Segundo micelio

Met: Metionina

MetO: Metionina sulfóxido

MM: Medio mínimo

NAG: N-acetilglucosamina

NAM: Ácido N-acetilmurámico

PG: Peptidoglicano

RT-qPCR: PCR cuantitativa con transcriptasa inversa

SFM: *Soy Flavour Manitol*

TiO₂: Dióxido de titanio

TSA: *Tryptic Soy Agar*

TSB: *Tryptic Soy Broth*

WGA: *Wheat Germ Agglutinin*

Zr(IV)-IMAC: Cromatografía de afinidad con iones Zr(IV) inmovilizados

I. INTRODUCCIÓN

I.1 EL GÉNERO *STREPTOMYCES*

I.1.1 Características generales

Streptomyces (Waksman and Henrici, 1943) es un género de bacterias Gram positivas multicelulares, aerobias y heterótrofas. Representa uno de los taxones más grandes dentro del dominio procariota, con 533 especies descritas en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, cifra que ha ido creciendo con los años al descubrirse nuevas especies (Komaki, 2023). Una cepa en particular, *Streptomyces coelicolor* A3(2), es considerada uno de los organismos modelo para el estudio del género.

La secuenciación del genoma completo de *S. coelicolor* A3(2) en 2002 reveló un cromosoma lineal de gran tamaño (entre 8 y 9 Mb) con cerca de 8.000 genes, casi el doble que *Escherichia coli* o *Mycobacterium tuberculosis* (Bentley *et al.*, 2002). Esta capacidad de codificación adicional comprende familias de proteínas involucradas en la regulación, el transporte y la degradación de nutrientes extracelulares (Paradkar *et al.*, 2003).

Dicho cromosoma se caracteriza por tener un alto contenido de G+C (66-78%) y un origen de replicación *oriC* ubicado en el centro del cromosoma, a partir del cual tiene lugar una replicación bidireccional (Zakrzewska-Czerwińska and Schrempf, 1992). Presenta también extremos cromosómicos con repeticiones terminales invertidas (TIR) que varían en tamaño de 20 a 550 kb según la especie (Lezhava *et al.*, 1995, Pandza *et al.*, 1997). Una característica notable del mapa genético de *S. coelicolor* es la ausencia de genes esenciales en un tercio del cromosoma, extendiéndose casi simétricamente desde sus extremos. A este respecto, ninguno de los genes esenciales para su supervivencia en medio mínimo,

INTRODUCCIÓN

a excepción de *argG*, se encuentra a 1,2 Mb de cada extremo, dejando un 40% de cromosoma desprovisto de genes (Redenbach *et al.*, 1996).

Los estreptomicetos se caracterizan por tener un ciclo de vida celular complejo, el cual detallaremos en el apartado 1.2, con procesos de diferenciación morfológica, muerte celular programada (MCP) y esporulación, lo que los lleva a ser considerados modelos procarióticos de multicelularidad (Chater, 1984).

En general, son organismos mesófilos y su distribución es amplia en la naturaleza, aunque existen estreptomicetos termotolerantes capaces de crecer a más de 45 °C (Kim *et al.*, 2000a). Su hábitat principal es el suelo, y en contraste con otros filos de bacterias, tienen genes que codifican para un amplio espectro de enzimas capaces de degradar la biomasa vegetal. Esta riqueza de enzimas, combinada con su abundancia en suelos, contribuye a la degradación de la biomasa vegetal junto a hongos y otros organismos saprófitos, lo que los convierte en un potencial biofertilizante acelerando procesos de compostaje (Beroigui and Errachidi, 2023). Junto a algunas cianobacterias, los estreptomicetos son capaces también de producir geosmina, una sustancia química perceptible cuando la tierra se humedece y responsable del característico olor a tierra mojada (Chater, 2015).

Aunque en gran medida se conocen como las “bacterias del suelo”, su capacidad de responder a una gran variedad de señales ambientales y fisiológicas los hace especialmente adaptativos a la vida en un entorno altamente competitivo. Debido a ello, podemos encontrarlos también en ambientes marinos, especialmente en sedimentos de ríos y lagos (Starr *et al.*, 2013).

La gran mayoría de los estreptomicetos son inocuos para el ser humano. Sin embargo, un pequeño número de especies dentro del género *Streptomyces* puede provocar enfermedades en humanos y producir actinomicetoma, una infección localizada, crónica y progresiva de piel y tejidos subcutáneos endémica en algunas regiones subtropicales (Hamid, 2011). No obstante, sí existe un mayor número de especies fitopatogénicas que causan plagas con importantes pérdidas económicas como la sarna de la patata, provocada por *S. scabiei* (Khatri *et al.*, 2010).

I.1.2 Contexto histórico

Streptomyces representa el género más extenso dentro del grupo Actinobacteria, un filo con un origen evolutivo que se remonta a hace más de 2.700 millones de años (Battistuzzi *et al.*, 2004). Junto a *Cyanobacteria* y *Deinococcus*, estos linajes comparten un ancestro común con el filo *Firmicutes*, con una divergencia estimada hace 3.000 millones de años (Lewin *et al.*, 2016).

En consonancia con la evolución en una atmósfera anóxica, se cree que las primeras actinobacterias fueron anaerobias obligadas, presentaban morfologías simples, no eran filamentosas ni tenían capacidad para formar esporas (Lewin *et al.*, 2016). Su capacidad de crecer como filamentos y producir esporas evolucionó en linajes más recientes (Lewin *et al.*, 2016).

El primer microorganismo clasificado como actinobacteria fue *Mycobacterium leprae*, descubierta por Armauer Hansen en 1874 en pacientes con lepra y descrita posteriormente como el agente etiológico

INTRODUCCIÓN

de esta enfermedad (Hopwood, 2007). Apenas un año después, en 1875, Ferdinand Cohn aisló una actinobacteria de conductos lagrimales humanos a la que denominó *Streptothrix foersteri*. Cohn observó que esta bacteria tenía características morfológicas de hongos y de bacterias, un atributo típico de *Streptomyces* debido a su desarrollo micelial (Cohn, 1875).

En 1877, Carl Otto Harz describió el agente etiológico de la actinomicosis bovina (comúnmente llamada "*lumpy jaw*"), una enfermedad zoonótica y de distribución mundial que provoca inflamación y deformación ósea en las zonas mandibular y maxilar del ganado (Biberstein and Chung Zee, 1994). Al igual que Cohn, Harz también observó estructuras similares a las peculiares hifas fúngicas y llamó al microorganismo *Actinomyces bovis* (Hopwood, 2007). En 1882, Robert Koch descubrió el agente causante de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, y observó características morfológicas similares al agente descrito por Hansen (Daniel *et al.*, 1994).

Aunque había una clara relación entre estos microorganismos, no fue hasta el siglo XX cuando se sugirió una clasificación para este grupo. En 1916, R.E. Buchanan sugirió el orden *Actinomycetales*, con los géneros *Actinobacillus*, *Leptotrichia*, *Actinomyces* y *Nocardia* (Buchanan, 1918). En 1943, Waksman y Henrici propusieron una nueva clasificación basada en la capacidad para formar células ramificadas. Waksman y Henrici observaron que un grupo de actinomicetos formaba un micelio de hifas ramificadas e interconectadas capaces de producir esporas reproductivas. El *Streptothrix* descrito por Cohn recayó en este grupo, que fue rebautizado como *Streptomyces*, que significa "hongo retorcido" (Waksman, 1953).

I.1.3 Importancia biotecnológica

A mediados del siglo XX, durante la Segunda Guerra Mundial, se produjo una necesidad urgente para encontrar antibióticos que llenasen el vacío dejado por la penicilina, ineficaz contra la tuberculosis y otras bacterias Gram negativas, lo cual llevó al descubrimiento de un amplio número de actinomicetos con un potencial biotecnológico importante para la industria farmacéutica (Quinn *et al.*, 2020).

El género *Streptomyces* es ampliamente reconocido por su capacidad para producir compuestos bioactivos tales como antibióticos, antimicrobianos, antiparasitarios y compuestos inmunosupresores a través de su metabolismo secundario. En 1943, Albert Schatz, un estudiante de doctorado de Selman Waksman, descubrió la estreptomicina. Inspirado por el descubrimiento de Fleming, Waksman instruyó a su estudiante de doctorado para examinar aislados de bacterias contra una cepa de tuberculosis altamente virulenta. Fue aquí donde Schatz descubrió la estreptomicina a partir de un aislado de *Streptomyces anulatus* subsp. *griseus* (anteriormente *S. griseus*) procedente de mollejas de pollo (Kingston, 2004). La estreptomicina se convirtió en el segundo antibiótico terapéuticamente útil, después de la penicilina, y proporcionó la primera cura eficaz contra la tuberculosis. Además, su descubrimiento le valió a Selman Waksman el Premio Nobel en 1952.

Este avance despertó un especial interés en el estudio de los actinomicetos como fuente natural de agentes antimicrobianos, abriendo la edad dorada de los antibióticos entre las décadas de 1940 y 1960 (figura 1) (Chopra *et al.*, 2002). Durante esta época, la aparición de nuevos antibióticos fue creciendo de forma exponencial: en la década de

INTRODUCCIÓN

1940 se aislaron antibióticos como el cloranfenicol, procedente de una cepa de *S. venezuelae* (Ehrlich *et al.*, 1948), y la tetraciclina, aislada de *S. aureofaciens* (Duggar, 1948). En sucesivos años se descubrieron nuevos compuestos como la eritromicina, producida por *Saccharopolyspora erythraea* (anteriormente *S. erythreus*) (McGuire *et al.*, 1952), y la lincomicina, aislada de una cepa de *S. lincolnensis* en un suelo de Lincoln (Nebraska) en 1955 (Mason *et al.*, 1962). También se aislaron por primera vez glicopéptidos como la vancomicina, observada en *S. orientalis* (McCormick *et al.*, 1955). Los glicopéptidos inhiben la biosíntesis de la pared celular bacteriana, formando un complejo con los grupos terminales L-Lys-D-Ala-D-Ala y bloqueando elementos necesarios para la formación del *cross-linking* en la pared celular de bacterias Gram positivas.

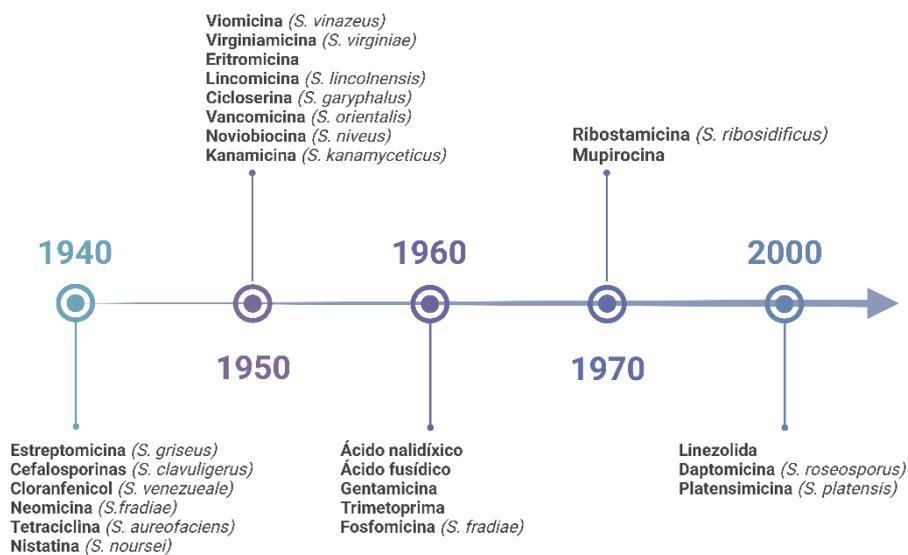


Figura 1. Lista parcial de antibióticos descubiertos en actinomicetos entre la década de 1940 y de 2000. Se indica la especie de procedencia del género *Streptomyces*. Esquema adaptado de Procópio *et al.* (2012).

Esta época fue seguida de un largo periodo de inacción en la investigación con antibióticos, con descubrimientos más esporádicos pero importantes como la daptomicina, un lipopéptido aislado en *S. roseosporus* en la década de 1980 y aprobado para su uso en humanos por la FDA en 2003 (Eisenstein *et al.*, 2010). En los últimos 35 años, solo se han descubierto tres nuevas clases de antibióticos. Uno de estos últimos compuestos es la platensimicina, una nueva clase de antibiótico de *S. platensis* que inhibe selectivamente la biosíntesis de lípidos celulares (Martens and Demain, 2011).

En general, podemos ver que las actinobacterias tienen un alto potencial para producir compuestos bioactivos. Se estima que solo el género *Streptomyces* produce 12.400 compuestos conocidos, pero solo 130 se usan con fines terapéuticos (Hamedi *et al.*, 2017). Sin embargo, a pesar de los avances en el descubrimiento y producción de antibióticos, las enfermedades infecciosas son la segunda causa de muerte a nivel global después de las enfermedades cardiovasculares, causando aproximadamente 13,7 millones de muertes anuales (Gray and Sharara, 2022). Esta situación, unida al aumento de resistencias microbianas, especialmente en hospitales, así como a la aparición de enfermedades emergentes como el virus Zika o el SARS-Cov-2, capaces incluso de provocar situaciones pandémicas, hace necesario un nuevo impulso en la investigación clínica para obtener nuevos fármacos capaces de combatir dichas enfermedades.

I.2. CICLO DE DESARROLLO DE *STREPTOMYCES*

I.2.1 Desarrollo en medio sólido

El ciclo de vida de *Streptomyces*, estudiado en más detalle en la cepa modelo *S. coelicolor* A3(2), se inicia con tubos germinativos que emergen de una espora previamente inactiva (figura 2). Dichos tubos se extienden por crecimiento polar en las puntas de las hifas, con ramas adicionales que emergen de las paredes laterales a intervalos aleatorios. Estos ciclos continuos de crecimiento polar y ramificación dan como resultado la formación de una densa red de filamentos denominada micelio vegetativo o sustrato (Jones *et al.*, 2017). Este micelio ramificado, con hifas de un diámetro medio de 0,7 μm , se extiende por el sustrato formando una red similar a las raíces de una planta (Hodgson, 1992).

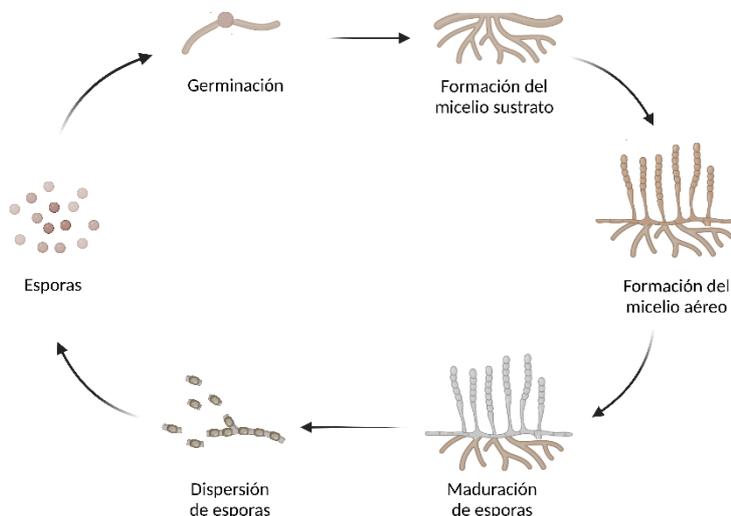


Figura 2. Ciclo de vida de *Streptomyces coelicolor* en medio sólido. Adaptado de Barka *et al.* (2016).

En respuesta a la falta de nutrientes, *Streptomyces* comienza su segunda etapa de crecimiento diferenciado. Las hifas aéreas no ramificadas se elevan en el aire, lejos del micelio vegetativo, y se recubren de una capa de proteínas hidrofóbicas formada por rodlinas (*rdIA*, *rdIB*) y chaplinas (*chpE*, *chpH*), entre otras (Claessen *et al.*, 2003, de Jong *et al.*, 2012). El micelio aéreo también se caracteriza por la acumulación de sustancias de reserva como glucógeno, trehalosa y polifosfatos (Brana *et al.*, 1986). La transición de micelio vegetativo a aéreo requiere reguladores como los genes *bld*, llamados así por el fenotipo *bald* (calvo) de sus mutantes, los cuales carecen de hifas aéreas.

Una vez que cesa el crecimiento aéreo, los filamentos multinucleados sufren una septación sincrónica, generando cadenas de compartimentos con una sola copia del genoma que luego maduran para formar esporas pigmentadas (Claessen *et al.*, 2006). Las esporas permanecen latentes hasta que germinan de nuevo dando origen al micelio sustrato. Esta transición requiere, entre otros, genes reguladores denominados *whi* (de *white*, blanco), nombre que deriva de la falta del pigmento asociado a las esporas maduras.

Ambos micelios, sustrato y aéreo, son multinucleados, es decir, tienen septos esporádicos en sus hifas que separan fragmentos multigenómicos. Las esporas serían, por tanto, la única fase con compartimentos unigenómicos (Flärdh and Buttner, 2009).

Durante los últimos veinte años, nuestro grupo de investigación extendió el ciclo de desarrollo tradicional de *Streptomyces* analizando los cambios asociados a la diferenciación (figura 3). En este sentido, se encontró una fase transitoria denominada primer micelio (MI), previa a la fase de

INTRODUCCIÓN

micelio sustrato y formada por un micelio joven y segmentado (Manteca and Sanchez, 2009). Dicho micelio sufre un proceso de MCP en el que se alternan segmentos vivos y muertos dentro de una propia hifa (representados en verde y en rojo respectivamente en la imagen), de forma que los primeros crecen y se diferencian a un micelio multinucleado, llamado segundo micelio (MII) y que se corresponde con el micelio sustrato (Manteca *et al.*, 2005b, Manteca *et al.*, 2005a). Al final se produce la fase de esporulación.

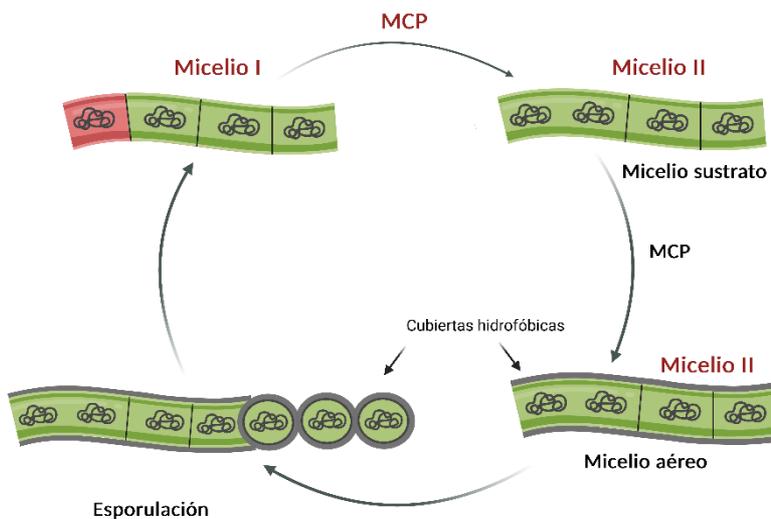


Figura 3. Esquema del desarrollo de *Streptomyces* en medio sólido. En rojo se representan segmentos muertos de micelio, y en verde, segmentos vivos. En caracteres rojos se señalan las fases del ciclo descritas por nuestro grupo de investigación. MCP: muerte celular programada. Adaptado de Yagüe *et al.* (2013b).

I.2.2 Desarrollo en medio líquido

La mayoría de estreptomicetos no esporulan en cultivos líquidos, por lo que antiguamente se suponía que bajo estas condiciones no había diferenciación. Sin embargo, la producción industrial de antibióticos y otros compuestos bioactivos se realiza principalmente en biorreactores, por lo que el estudio del ciclo de vida de *Streptomyces* en medio líquido presenta especial importancia desde un punto de vista industrial.

Actualmente, se sabe que en cultivos líquidos la diferenciación es comparable a la observada en cultivos sólidos. En cultivos líquidos hay una fase de germinación seguida de una primera etapa de micelio (MI), una etapa de MCP y una última fase de diferenciación hacia MII. Sin embargo, en la mayoría de cepas de *Streptomyces*, la formación de micelio aéreo y la esporulación están bloqueadas, y las hifas forman gránulos y grumos en el medio (Manteca *et al.*, 2010a). El MII sería el encargado de expresar los genes implicados en el metabolismo secundario tanto en cultivos sólidos como líquidos (Manteca *et al.*, 2008) (figura 4).

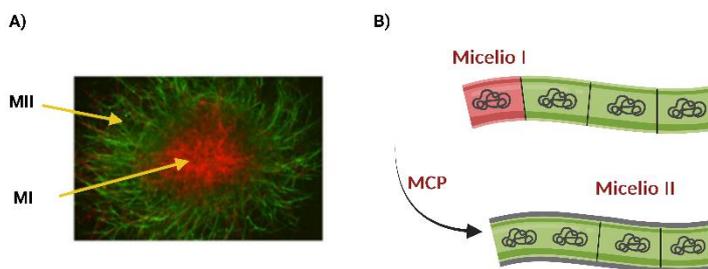


Figura 4. Desarrollo de *Streptomyces* en medio líquido. (A) Imagen de microscopía confocal con pellet de *Streptomyces antibioticus* en medio líquido (tinción con SYTO9 e yoduro de propidio). (B) Representación esquemática del ciclo en medio líquido. En rojo se dibujan segmentos muertos de micelio, y en verde, segmentos vivos. MCP: muerte celular programada. Adaptado de Yagüe *et al.* (2013b).

INTRODUCCIÓN

I.2.3 Desarrollo en condiciones naturales

Streptomyces está ampliamente distribuido en el suelo, donde crece de forma muy diferente al modo en que lo hace en condiciones controladas de laboratorio (figura 5). En tierra, la germinación de *Streptomyces* es un proceso muy lento y asincrónico que comienza aproximadamente a los 7 días y dura al menos 21 días, alcanzando su máximo en torno a las dos semanas. Además, el micelio no se agrupa para formar gránulos densos, como ocurre en laboratorio; en cambio, permanece en la fase de primer micelio (MI) hasta un mes, sin evolucionar hacia las fases de MCP, MII o de esporulación (Manteca and Sanchez, 2009).

En este contexto, se postuló que la MCP y la esporulación deben tener lugar al final de la larga fase vegetativa, cuando el desequilibrio de nutrientes da lugar a una rápida y transitoria diferenciación bacteriana que precede a la formación de esporas (Manteca and Sanchez, 2009).

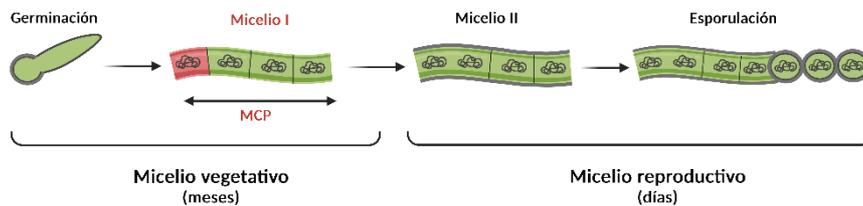


Figura 5. Esquema del desarrollo de *Streptomyces* en condiciones naturales (suelos). En rojo se dibujan segmentos muertos de micelio, y en verde, segmentos vivos. MCP muerte celular programada. Adaptado de Yagüe *et al.* (2013a).

I.2.4 Muerte celular programada

El término “muerte celular programada” es utilizado para describir la capacidad de una célula para inducir su propia destrucción mediante la

activación de mecanismos reguladores específicos frente a condiciones de estrés, daño, estado metabólico o historia de desarrollo (Engelberg-Kulka *et al.*, 2006). Es parte fundamental para el desarrollo y la integridad de organismos multicelulares, contribuyendo a mantener su homeostasis (Galluzzi *et al.*, 2015), y se ha descrito en bacterias de diferentes taxones como *Bacillus* y *Echerichia coli* (Engelberg-Kulka *et al.*, 2006), *Streptococcus* (Guiral *et al.*, 2005), *Staphylococcus* (Chatterjee *et al.*, 2010) y *Myxobacteria* (Søgaard-Andersen and Yang, 2008), entre otros.

El número de etapas de MCP en *Streptomyces* es dependiente de las condiciones de cultivo. En cultivos sólidos hay dos rondas de MCP (Manteca *et al.*, 2006a), mientras que en cultivos líquidos hay una sola MCP que separa la fase vegetativa de MI de la fase productora de metabolitos secundarios (MII) (Rioseras *et al.*, 2014).

En cultivos sólidos, la primera ronda afecta al MI y representa una fase clave del ciclo de vida al preceder a la formación del MII (Manteca *et al.*, 2006a). La segunda ronda antecede a la formación del micelio aéreo y contribuye a la liberación de nutrientes adicionales necesarios para la esporulación (Miguélez *et al.*, 1999, Yagüe *et al.*, 2014).

Ambas fases siguen un patrón estructurado que requiere la activación de enzimas hidrolíticos encargados del desmantelamiento celular e implica la muerte selectiva de partes específicas del micelio, en un tiempo y una duración determinados (Manteca *et al.*, 2006a, Manteca *et al.*, 2007, Yagüe *et al.*, 2010).

La MCP en *Streptomyces* involucra nucleasas específicas similares en algunas características a las nucleasas apoptóticas de eucariotas, las

cuales participan en la degradación gradual y coordinada de ADN cromosómico (Nicieza *et al.*, 1999). Es por ello que algunos autores suponen que los mecanismos de MCP en *Streptomyces*, así como en otros microorganismos con un ciclo de desarrollo complejo, pueden ser precursores filogenéticos de algunos mecanismos de apoptosis eucariotas (Nicieza *et al.*, 1999, Filippova and Vinogradova, 2017).

1.2.5 Desarrollo en condiciones de estrés osmótico

En laboratorio, las condiciones de cultivo para el crecimiento de *Streptomyces* difieren mucho de las condiciones naturales. En el suelo, las bacterias pueden encontrarse con fluctuaciones osmóticas rápidas causadas por agentes externos como la lluvia, las inundaciones o la desecación. En esta situación, las bacterias responden a los cambios osmóticos modulando rápidamente el potencial osmótico dentro de la célula, ya sea mediante la importación o exportación de iones y solutos compatibles (Bhowmick *et al.*, 2023).

Se conoce muy poco sobre cómo los cambios osmóticos afectan a la morfología celular. La forma de una bacteria está dictada principalmente por la pared celular, una estructura altamente dinámica que actúa como barrera principal, protegiendo frente a cambios ambientales. La síntesis de su principal componente, el peptidoglicano (PG), implica la formación de complejos proteicos que incorporan nuevos precursores de PG en las cadenas crecientes de glicano en la superficie celular. Estas hebras luego se entrecruzan (*cross-linking*) para formar un único sáculo gigante que envuelve a la célula (Claessen *et al.*, 2008, Typas *et al.*, 2012).

La pérdida de la pared celular también puede reconocerse como un mecanismo de defensa frente a fagos (Ongena *et al.*, 2022, Wohlfarth *et al.*, 2023). Como bacterias ambientales, los estreptomicetos están bajo constante amenaza por el ataque de fagos, y la pérdida de la pared celular conlleva la eliminación de receptores específicos para la entrada del fago en el actinomiceto. A fecha de hoy, se han identificado múltiples mecanismos de defensa frente a fagos en especies como *S. coelicolor* y *S. venezuelae*. Al respecto, Ongena *et al.* (2022) observaron que la exposición de una cepa natural de *Streptomyces* a cultivos de fagos conduce a la formación de células deficientes de pared (CDP), que permanecen viables en condiciones osmoprotectoras a pesar de la presencia del fago (Schlimpert and Elliot, 2023).

Algunas de las estrategias que adopta *Streptomyces* para responder a situaciones de estrés (osmótico y otros) que se detallan a continuación son el crecimiento exploratorio (Jones *et al.*, 2017), las formas L (*L-forms*) (Gumpert, 1982), las células S (*S-cells*) (Ramijan *et al.*, 2018) y las vesículas extracelulares (Fröjd and Flärdh, 2019a).

a) Crecimiento exploratorio

Tras la germinación, y en condiciones de estrés osmótico o de déficit nutricional, *Streptomyces* puede cambiar su ciclo de vida. Recientemente se ha descubierto que el cocultivo de algunas especies de *Streptomyces* con diversas levaduras conducen a un comportamiento novedoso e inédito denominado "crecimiento exploratorio", un fenómeno que se inicia una vez que la glucosa en las inmediaciones de *Streptomyces* se agota (Jones *et al.*, 2017).

INTRODUCCIÓN

El crecimiento exploratorio implica la aparición de hifas hidrófilas y aparentemente vegetativas que no se ramifican, una característica asociada a las hifas aéreas pero que en este contexto vegetativo pueden contribuir a una mayor expansión hacia el exterior de las colonias exploradoras. Este crecimiento tampoco requiere ninguno de los reguladores clásicos *bld* o *whi* (Jones *et al.*, 2017). La exploración también requiere condiciones alcalinas, facilitadas por la síntesis de trimetilamina (TMA) en *Streptomyces*, un compuesto orgánico volátil que puede elevar el pH adyacente y promover la exploración (Jones *et al.*, 2017).

Cuando se cultiva sólo, el patrón de crecimiento filamentoso y la diferenciación celular de *Streptomyces* también se ven afectados por estrés osmótico (Bhowmick *et al.*, 2023). Se ha observado que la exposición de *S. coelicolor* a estrés hiperosmótico por adición de sacarosa o cloruro sódico conduce a una detención del crecimiento entre 2 y 3 horas. Tras este retraso adaptativo, *Streptomyces* reanuda su crecimiento, pero reestructurando completamente su polaridad celular y su patrón de crecimiento (Hempel *et al.*, 2012, Fuchino *et al.*, 2017).

b) Formas L

Como hemos mencionado, la pared celular es un elemento estructural crítico formado por un componente, el peptidoglicano, que define la forma celular y protege a la célula de la lisis debido a cambios en la presión osmótica. Sin embargo, hay ocasiones en las que algunas bacterias pueden propagarse bajo formas L o “*L-forms*”. Las formas L fueron originalmente descritas en el *Lister Institute* (de cuya inicial toma el nombre) por Emmy Klieneberger en cultivos de *Streptobacillus*

moniliformis (Klieneberger, 1936), y desde entonces se ha descubierto una amplia gama de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, capaz de producirlas, incluyendo el género *Streptomyces* (Domingue Sr and Woody, 1997).

En términos generales, las formas L son células sin pared celular, similares a protoplastos, que pueden proliferar y dividirse mediante mecanismos independientes de FtsZ (Dell'Era *et al.*, 2009, Leaver *et al.*, 2009, Briers *et al.*, 2012, Errington, 2013). En contraposición a otras bacterias, *Streptomyces* no necesita de FtsZ para su desarrollo vegetativo (Santos-Beneit *et al.*, 2017), aunque sí para su esporulación (McCormick *et al.*, 1994).

A diferencia de los protoplastos, las formas L muestran una morfología variable caracterizada por un pleomorfismo extremo, a veces presentando diámetros mayores de 10–20 μm frente a los 1–3 μm de las células con pared (Allan *et al.*, 1993). En el caso de *B. subtilis*, un análisis genético de las formas L demostró que la conversión a esta fase era viable con tan solo dos mutaciones, abandonando por completo la maquinaria de división celular tradicional y proliferando mediante mecanismos de tubulación o formación de burbujas (*blebbing*) en la membrana (Leaver *et al.*, 2009). También se han observado formas L en *Listeria monocytogenes* capaces de dividirse y propagarse mediante vesiculación, en el cual las vesículas que contienen el genoma se forman dentro de una forma L agrandada y posteriormente se liberan al colapsar la célula madre (figura 6) (Dell'Era *et al.*, 2009).

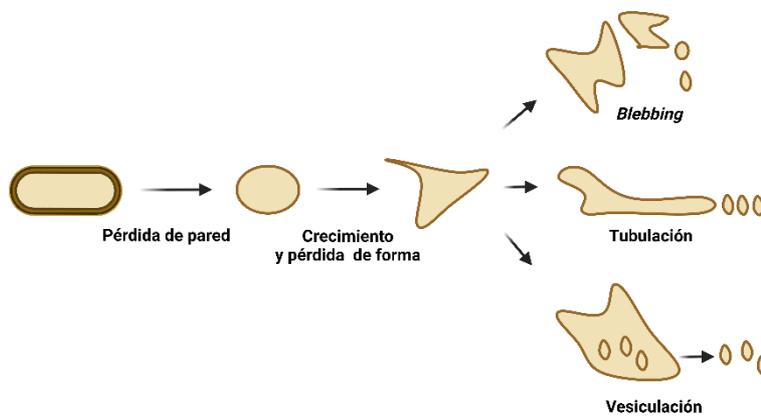


Figura 6. Esquema de la proliferación de formas L mediante formación de burbujas (*blebbing*), tubulación y vesiculación. Adaptado de Errington (2013).

Como hemos mencionado, estos procesos son completamente independientes de la ruta de síntesis de precursores de pared celular y de las principales proteínas del citoesqueleto, tales como MreB y FtsZ (Santos-Beneit *et al.*, 2017).

Se sugiere que la forma de división mediante formación de burbujas en la membrana (*blebbing*) podría representar un modo temprano de proliferación utilizado por células primitivas, antes de la aparición evolutiva de la pared celular (Leaver *et al.*, 2009). Es probable que las células actuales hayan conservado el mecanismo como un proceso de respaldo para su uso cuando la síntesis de la pared celular está comprometida. Este riesgo es probablemente antiguo, ya que grupos antiguos de bacterias son productores de antibióticos activos contra la pared celular como β -lactámicos, glicopéptidos y lipopéptidos (Gupta, 2011).

Las formas L han sido estudiadas durante muchas décadas y se han generado artificialmente en laboratorios mediante tratamientos combinados de lisozima con altos niveles de antibióticos que inhibían la síntesis de pared celular (Errington, 2013, Errington *et al.*, 2016). Por ello, un paso limitante en la formación de formas L es la síntesis de un protoplasto a partir del sáculo de la pared celular que requiere actividad lítica, generalmente de la lisozima (Kawai *et al.*, 2018).

c) Células S

Ramijan *et al.* (2018) descubrieron recientemente que, en respuesta únicamente a condiciones hiperosmóticas, algunas actinobacterias como *Kitasatospora viridifaciens* y *Streptomyces venezuelae* pueden producir células análogas a las formas L llamadas células S o “S-cells” (de “stress-induced cells”), por lo que los actinomicetos tendrían una capacidad natural para liberar células deficientes de pared cuando se exponen a condiciones hiperosmóticas.

Las células S son también células recubiertas de membrana que contienen ADN, pero de mayor tamaño y con baja capacidad de síntesis de pared celular (Ramijan *et al.*, 2018, Fröjd and Flärdh, 2019b). Además, parecen surgir por extrusión de los extremos apicales de las hifas después de detenerse el crecimiento apical, y lo que es más importante, no representan un estado terminalmente diferenciado, ya que pueden retornar a un modo de crecimiento micelial una vez eliminadas las condiciones de estrés (figura 7).

INTRODUCCIÓN

Además, la exposición continua a condiciones hiperosmóticas puede conducir a la formación de células L estables tras la adquisición de mutaciones genéticas (Ramijan *et al.*, 2018).

Hasta la fecha, no se han observado células deficientes de pared (formas L o células S) en *S. coelicolor*, *S. griseus* o *S. lividans* (Ramijan *et al.*, 2018).

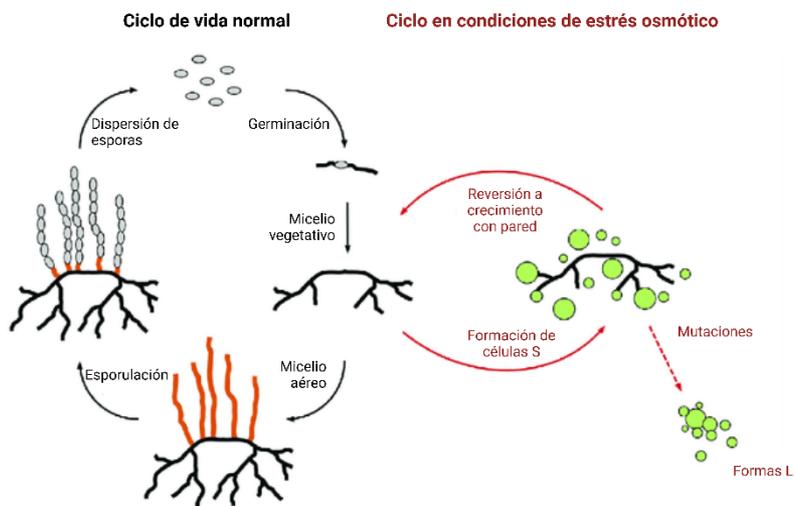


Figura 7. Representación del ciclo de formación de células S y formas L en condiciones de estrés inducido, adaptado al ciclo de vida tradicional de *Streptomyces*. Adaptado de Claessen and Errington (2019).

d) Vesículas extracelulares

En los últimos años se ha observado en actinomicetos la formación de vesículas extracelulares (“*extracelullar membrane vesicles*” en inglés), compartimentos de diferentes tamaños sin capacidad de propagación y liberados por células de todos los dominios. Durante mucho tiempo, se consideró que las bacterias Gram positivas no eran capaces de formar vesículas extracelulares debido a la falta de una capa de membrana

exterior y a la presencia de una pared celular gruesa (Kim *et al.*, 2015). No obstante, en años posteriores sí se ha observado la liberación de vesículas al medio en especies de Firmicutes y Actinobacterias. Fröjd and Flärdh (2019b) observaron la liberación de vesículas desde las puntas de las hifas vegetativas de *S. venezuelae* y demostraron que el tratamiento con vancomicina, que bloquea la síntesis de peptidoglicano, conduce a una alta frecuencia de extrusión de vesículas.

Varios autores sugieren que la producción de vesículas, capaces de albergar proteínas, metabolitos y ácidos nucleicos, puede considerarse también una respuesta bacteriana a condiciones de estrés (Kulp and Kuehn, 2010, Baumgarten *et al.*, 2012, MacDonald and Kuehn, 2013). En *S. coelicolor* se ha observado evidencia entre las señales de estrés y la diferenciación morfológica (Puglia *et al.*, 1995, Bucca *et al.*, 1995, Compton *et al.*, 2015). Estudios proteómicos de las vesículas en *S. coelicolor* demostraron que las vesículas incluyen proteínas de respuesta al estrés (GroEL1, GroEL2, DnaK, ClpP1 y ClpP2), con un papel también relevante en funciones de diferenciación morfofisiológica (Faddetta *et al.*, 2022).

Las vesículas membranosas extracelulares de *S. coelicolor* tienen un diámetro de 80 a 400 nm (área de 0,02-0,5 μm^2) (Schrempf *et al.*, 2011). Fröjd and Flärdh (2019) describieron que las vesículas extracelulares de *Streptomyces venezuelae* son mucho más heterogéneas, mostrando imágenes de vesículas de hasta 2,5 μm de diámetro (área de 3,14 μm^2). La formación de estas vesículas extracelulares se ha estudiado habitualmente en medios con altas concentraciones osmóticas, como el medio J que contiene 120 g de glucosa por litro (Faddetta *et al.*, 2022) o el medio MYM suplementado con 0,5M de sacarosa (Fröjd and Flärdh,

2019, Barrows and Goley, 2021), lo que probablemente contribuirá a la prevención de su lisis osmótica y a su formación.

Todos estos hallazgos sugieren que las células deficientes de pared están relacionadas de algún modo con el ciclo vital de los estreptomicetos, particularmente con la diferenciación y el desarrollo fisiológico. Sin embargo, el papel biológico exacto es prácticamente desconocido (Faddetta *et al.*, 2022).

1.2.6. Formación de vesículas intracelulares asociadas a la muerte celular programada y a la división celular

Ante señales de estrés exógeno, *S. coelicolor* presenta un sistema de inyección contráctil (CIS^{Sc}) regulado por los genes *SCO4256*, *SCO4257* y *SCO4258* que desencadena la MCP (Casu *et al.*, 2023). Estos sistemas de inyección contráctil (CIS) son estructuras similares a colas de bacteriófagos que median en las interacciones entre bacterias. La contracción de este sistema CIS^{Sc} ante señales exógenas de estrés conduce a una reducción de la integridad celular y a la formación de conjuntos membranosos vesiculares ocasionales (Casu *et al.*, 2023).

Dichos conjuntos membranosos vesiculares también han sido descritos por Celler *et al.* (2016), que observaron un sistema de membranas y de vesículas membranosas intracelulares en las hifas vegetativas de *Streptomyces* que vincularon a la compartimentación celular. Esta división del micelio multinucleado es independiente de la segmentación celular basada en la maquinaria guiada por FtsZ, que solo ocurre durante la esporulación (Celler *et al.*, 2016).

Esta compartimentación no dependiente de FtsZ fue también observada por Yagüe *et al.* (2016) en hifas vegetativas jóvenes de *S. coelicolor*, formando compartimentos de 1 μm mediante barreras impermeables a tinción de ácidos nucleicos. Al menos algunas de estas barreras están formadas por membranas sin peptidoglicano detectable (Yagüe *et al.*, 2016).

I.3. REGULACIÓN DEL DESARROLLO DE *STREPTOMYCES*

El ciclo de desarrollo de *Streptomyces* es un proceso complejo y extenso que requiere múltiples mecanismos de señalización, tanto en la diferenciación fisiológica (de MI vegetativo a MII productor de metabolitos secundarios) como en la diferenciación morfológica (de MI segmentado a MII multinucleado sustrato, seguido de un MII aéreo y finalmente la esporulación) (Horinouchi, 2002).

El desarrollo del micelio aéreo y la esporulación son las fases mejor caracterizadas en cuanto a regulación, frente a otras fases históricamente menos estudiadas como la germinación. La Tabla 1 recoge algunos de los genes clave que regulan la diferenciación fisiológica y morfológica en etapas clave del ciclo de *Streptomyces*.

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Principales genes que regulan la diferenciación fisiológica y morfológica de *Streptomyces*. Adaptado de Claessen *et al.* (2006), van Wezel and McDowall (2011) y Yagüe *et al.* (2014).

Número SCO	Gen	Referencia
Germinación		
<i>SCO0974</i>	<i>rpfD</i>	Haiser <i>et al.</i> (2009)
<i>SCO1240</i>	<i>swlA</i>	Haiser <i>et al.</i> (2009)
<i>SCO2077</i>	<i>divIVA</i>	Flardh (2003)
<i>SCO3097-98</i>	<i>rpfA</i>	Haiser <i>et al.</i> (2009)
<i>SCO3798</i>	<i>rpfC</i>	Haiser <i>et al.</i> (2009)
<i>SCO3926</i>	<i>ssgA</i>	Noens <i>et al.</i> (2005)
<i>SCO4002</i>	<i>nepA</i>	de Jong <i>et al.</i> (2009)
<i>SCO4582</i>	<i>swlB</i>	Haiser <i>et al.</i> (2009)
<i>SCO4762</i>	<i>groEL</i>	Bobek <i>et al.</i> (2004)
<i>SCO5396</i>	<i>filP</i>	Bagchi <i>et al.</i> (2008)
<i>SCO6773</i>	<i>swlC</i>	Haiser <i>et al.</i> (2009)
<i>SCO7458</i>	<i>rpfE</i>	Haiser <i>et al.</i> (2009)
<i>SCO7647</i>	<i>cabC</i>	Wang <i>et al.</i> (2008)

Tabla 1. Continuación

Número SCO	Gen	Referencia
Genes expresados al alza en primer micelio (MI)		
SCO0924		Yagüe <i>et al.</i> (2013b)
SCO3945	<i>cydA</i>	Yagüe <i>et al.</i> (2013b)
SCO1947	<i>gap1</i>	Yagüe <i>et al.</i> (2013b)
SCO2504	<i>glyS</i>	Manteca <i>et al.</i> (2010b)
SCO2951		Manteca <i>et al.</i> (2010b)
SCO3304	<i>argS</i>	Manteca <i>et al.</i> (2010b)
SCO3909	<i>rplI</i>	Yagüe <i>et al.</i> (2013b)
SCO4653	<i>rplL</i>	Manteca <i>et al.</i> (2010b)
SCO4711	<i>rpsQ</i>	Manteca <i>et al.</i> (2010b)
SCO4809	<i>sucD</i>	Manteca <i>et al.</i> (2010b)
SCO7511	<i>gap2</i>	Yagüe <i>et al.</i> (2013b)
Genes relacionados con MCP		
SCO0705		Manteca <i>et al.</i> (2006b)
SCO1091		Manteca <i>et al.</i> (2006b)
SCO1814	<i>inhA</i>	Manteca <i>et al.</i> (2006b)
SCO3333		Manteca <i>et al.</i> (2006b)
SCO3373	<i>clpC1</i>	Yagüe <i>et al.</i> (2013a)
SCO6248		Manteca <i>et al.</i> (2006b)

Tabla 1. Continuación

Número SCO	Gen	Referencia
Genes expresados al alza en segundo micelio (MII) sustrato		
<i>SCO0168</i>		Manteca <i>et al.</i> (2010b)
<i>SCO2110</i>	<i>pkaF</i>	Manteca <i>et al.</i> (2010b)
<i>SCO2792</i>	<i>bldH</i>	Manteca <i>et al.</i> (2010b)
<i>SCO5243</i>	<i>sigH</i>	Manteca <i>et al.</i> (2010b)
<i>SCO7399</i>	<i>cdtB</i>	Manteca <i>et al.</i> (2010b)

Número SCO	Gen	Referencia
Genes relacionados con la formación del micelio aéreo		
<i>SCO1674</i>	<i>chpC</i>	Claessen <i>et al.</i> (2003)
<i>SCO1675</i>	<i>chpH</i>	Claessen <i>et al.</i> (2003)
<i>SCO1800</i>	<i>chpE</i>	Claessen <i>et al.</i> (2003)
<i>SCO2699</i>	<i>chpG</i>	Claessen <i>et al.</i> (2003)
<i>SCO2705</i>	<i>chpF</i>	Claessen <i>et al.</i> (2003)
<i>SCO2716</i>	<i>chpA</i>	Claessen <i>et al.</i> (2003)
<i>SCO2717</i>	<i>chpD</i>	Claessen <i>et al.</i> (2003)
<i>SCO2718</i>	<i>rdIA</i>	Claessen <i>et al.</i> (2003)
<i>SCO2719</i>	<i>rdIB</i>	Claessen <i>et al.</i> (2003)
<i>SCO7257</i>	<i>chpB</i>	Claessen <i>et al.</i> (2003)

Tabla 1. Continuación

Número SCO	Gen	Referencia
Genes de respuesta a estrés osmótico		
<i>SCO3068</i>	<i>sigI</i>	Viollier <i>et al.</i> (2003)
<i>SCO3066</i>	<i>prsl</i>	Viollier <i>et al.</i> (2003)
<i>SCO3129</i>		He <i>et al.</i> (2018)
<i>SCO3130</i>		He <i>et al.</i> (2018)
<i>SCO3549</i>	<i>bldG</i>	Sevcikova <i>et al.</i> (2010)
<i>SCO5396</i>	<i>filP</i>	Ultee <i>et al.</i> (2021)
<i>SCO5243</i>	<i>sigH</i>	Sevcikova <i>et al.</i> (2010)
<i>SCO5244</i>		Sevcikova <i>et al.</i> (2010)

Número SCO	Gen	Referencia
Genes relacionados con la esporulación		
<i>SCO2102</i>		Fernández-García <i>et al.</i> (2022)
<i>SCO2103</i>	<i>metF</i>	Fernández-García <i>et al.</i> (2022)
<i>SCO2924</i>	<i>ssgG</i>	Noens <i>et al.</i> (2005)
<i>SCO3034</i>	<i>whiB</i>	McCormick and Flärdh (2012)
<i>SCO3158</i>	<i>ssgE</i>	Noens <i>et al.</i> (2005)
<i>SCO3926</i>	<i>ssgA</i>	Noens <i>et al.</i> (2005)
<i>SCO4543</i>	<i>whiA</i>	McCormick and Flärdh (2012)
<i>SCO5621</i>	<i>whiG</i>	McCormick and Flärdh (2012)
<i>SCO5819</i>	<i>whiH</i>	McCormick and Flärdh (2012)

Tabla 1. Continuación

Número SCO	Gen	Referencia
Genes relacionados con la esporulación		
<i>SCO6029</i>	<i>whil</i>	McCormick and Flärdh (2012)
<i>SCO6722</i>	<i>ssgD</i>	Noens <i>et al.</i> (2005)
<i>SCO7175</i>	<i>ssgF</i>	Noens <i>et al.</i> (2005)
<i>SCO7289</i>	<i>ssgC</i>	Noens <i>et al.</i> (2005)

Número SCO	Gen	Referencia
Reguladores pleiotrópicos de la diferenciación y del metabolismo secundario		
<i>SCO1979</i>		Zhu <i>et al.</i> (2020)
<i>SCO2730/31</i>		González-Quiñónes <i>et al.</i> (2019)
<i>SCO2792</i>	<i>adpA</i>	Lu <i>et al.</i> (2023)
<i>SCO3579</i>	<i>wblA</i>	Kim <i>et al.</i> (2012)
<i>SCO4230</i>	<i>phoP</i>	Barreiro and Martinez-Castro (2019)
<i>SCO4423</i>	<i>afsK</i>	Jin <i>et al.</i> (2021)
<i>SCO4425</i>	<i>afsS</i>	Jin <i>et al.</i> (2021)
<i>SCO4426</i>	<i>afsR</i>	Jin <i>et al.</i> (2021)
<i>SCO4441</i>	<i>scr1</i>	Santamaria <i>et al.</i> (2018)
<i>SCO4442</i>	<i>scr2</i>	Santamaria <i>et al.</i> (2018)
<i>SCO5231</i>	<i>dasR</i>	Chen <i>et al.</i> (2022)
<i>SCO6008</i>	<i>rok7B7</i>	Lu <i>et al.</i> (2023)

I.3.1 Germinación

Durante la germinación, *Streptomyces* pasa por tres etapas sucesivas: oscurecimiento, hinchamiento y emergencia del tubo germinativo (Hardisson *et al.*, 1978).

a) Oscurecimiento. La etapa de oscurecimiento requiere cationes divalentes exógenos (Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} o Mg^{2+}) y energía que se puede obtener de las reservas de las esporas. Los sitios de unión para el Ca^{2+} y el Mg^{2+} los proporcionan las unidades carboxilo del peptidoglicano y los grupos polifosfato del ácido teicoico en la pared de las esporas (Bobek *et al.*, 2017). El Ca^{2+} acumulado en la espora se libera gradualmente, un proceso mediado por la proteína CabC que se une al calcio y cuya mutación conduce a la germinación prematura de las esporas (Wang *et al.*, 2008).

Además, se reactivan hidrolasas como RpfA y SwIA que facilitan cambios morfológicos en las esporas. Estas hidrolasas escinden enlaces covalentes dentro de la capa de peptidoglicano: RpfA pertenece al subgrupo de transhidrolasas *rpf* que hidroliza el enlace β -(1,4)-glicosídico entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico (Haiser *et al.*, 2009). *S. coelicolor* posee cinco proteínas Rpf cuyos mutantes individuales sufren un retraso en la germinación (Haiser *et al.*, 2009). Otros tres enzimas líticos de la pared celular (SwIA, SwIB y SwIC) son también responsables del espesor adecuado de la pared de las esporas latentes, asegurando su resistencia al calor (Haiser *et al.*, 2009).

b) Hinchamiento. La etapa de hinchamiento se produce por la entrada continua de agua en la espora. Esta hidratación favorece la

reactivación de proteínas y ribosomas hasta entonces en estado de latencia. La chaperona GroEL y la DnaK ayudan en la reactivación del aparato proteosintético, y junto a otras chaperonas como GrpE se expresan constitutivamente a lo largo de la germinación, lo que sugiere que su presencia es necesaria (Strakova *et al.*, 2013). Otro paso esencial en esta fase es la hidrólisis de la trehalosa, provocada por la fosforilación de la trehalasa dependiente de AMPc (Thevelein, 1984).

- c) Emergencia del tubo germinativo. La etapa de emergencia del tubo germinativo tiene lugar de forma más o menos simultánea a la primera replicación de ADN, entre los 30-60 minutos en *S. coelicolor* (Ruban-Osmiałowska *et al.*, 2006). Las esporas son capaces de detectar fuentes externas de nutrientes y ajustan su metabolismo como respuesta. Dicha capacidad es debida a la actividad de reguladores peliotrópicos que actúan tanto a nivel transcripcional (BldD y factores sigma y antisigma) como traduccional (ribonucleasa RNasa III) (Strakova *et al.*, 2013).

Un papel importante en la aparición del tubo germinativo lo desempeña la proteína SsgA, que se ubica en los puntos donde emergerá el tubo (Noens *et al.*, 2007). Éste se alarga mediante extensión de la zona apical, donde se localiza la proteína DivIVA, que asegura el crecimiento de nueva pared celular (Flardh, 2003). Las proteínas Ftsz (asociada a la división celular) y FilP (asociada al crecimiento celular) se expresan también en esta etapa (Grantcharova *et al.*, 2005, Bagchi *et al.*, 2008). Otro regulador de la germinación es NepA, una proteína estructural de la pared celular

importante para el mantenimiento de la latencia de las esporas bajo condiciones desfavorables (de Jong *et al.*, 2009).

I.3.2 Formación del primer micelio y muerte celular programada

Tras la fase de germinación tiene lugar la formación de un micelio compartimentado (MI) que sufre una MCP ordenada, de modo que los segmentos viables de las hifas comienzan a agrandarse para formar un micelio multinucleado, correspondiente al segundo micelio (MII). Esta etapa, descrita en origen por nuestro grupo de investigación, presenta una regulación aún desconocida.

Un primer acercamiento a la regulación del MI fue realizado por nuestro equipo de investigación mediante análisis de transcriptómica en diferentes tiempos del ciclo de desarrollo usando cultivos sólidos (Manteca *et al.*, 2010b). Se observó que las proteínas más abundantes en MI en comparación con MII son proteínas involucradas en el metabolismo primario como proteínas ribosomales (*SCO4653* y *SCO4711*), enzimas glicolíticos (*SCO2951* y *SCO4809*) y enzimas involucrados en el metabolismo aminoacídico (*SCO2504* y *SCO3304*), entre otros. Un segundo estudio transcriptómico confirmó esta tendencia, observando la expresión al alza de genes que codifican proteínas ribosómicas (*SCO3909*) y relacionados con la fosforilación oxidativa (*SCO0924* y *SCO3945*) y la gluconeogénesis (*SCO1947* y *SCO7511*) (Yagüe *et al.*, 2013b).

Recientemente también se ha podido comprobar que FtsZ, primer componente celular del divisoma, participa en la formación de los tabiques del MI (Yagüe *et al.*, 2016). Sin embargo, lejos de los análisis de

INTRODUCCIÓN

transcriptómica y de la presencia de FtsZ en la formación de los tabiques, la regulación del primer micelio es desconocido.

Otro trabajo independiente realizó un análisis proteómico de las dos fases de MCP que tienen lugar en *S. coelicolor*, para el cual se obtuvieron muestras enriquecidas con células vivas y muertas (Manteca *et al.*, 2006b). Se observó que la MCP es un proceso ordenado que resulta de la inducción de proteínas involucradas tanto en el desmantelamiento celular como en la regulación global. Entre ellas figuran hidrolasas (*SCO6248*, *SCO3333* y *SCO0705*), proteasas (*SCO3373*) y enzimas del metabolismo de los ácidos grasos (*SCO1091* y *SCO1814*), posiblemente implicados en la degradación de la membrana (Manteca *et al.*, 2006b).

I.3.3 Diferenciación de MI a MII sustrato

La MCP del MI provoca una alternancia de segmentos vivos y muertos dentro de las hifas, de modo que los segmentos vivos crecen y se diferencian hacia un micelio multinucleado (MII sustrato). Esta transición entre las fases de MI y MII es prácticamente desconocida, ya que los principales estudios del desarrollo de *Streptomyces* se han centrado sobre todo en la formación del micelio aéreo y la esporulación. Algunas de las pocas proteínas regulatorias detectadas por nuestro grupo en mayor abundancia a las 24 horas de desarrollo frente a muestras de MI (12 horas) y de MII tardío (72 horas) fueron *SCO0168* (regulador transcripcional de unión a nucleótidos cíclicos), *SCO5243* (SigH), *SCO2792* (BldH), *SCO2110* (quinasa serina/treonina de tipo eucariota) y *SCO7399* (hipotético transportador ABC) (Manteca *et al.*, 2010b).

I.3.4 Diferenciación de MII sustrato a MII aéreo

El MII sustrato se diferencia hacia un MII aéreo mediante la formación de hifas aéreas que se recubren de una cubierta hidrofóbica. Su regulación, al igual que otras etapas del desarrollo de *Streptomyces*, es compleja. El estudio de mutantes defectuosos ha permitido descubrir dos rutas reguladoras, la cascada *bld* y la ruta *sky*, que controlan la producción de proteínas estructurales involucradas en la formación de las hifas aéreas (figura 8):

- a) Cascada *bld*. La cascada *bld* tiene un papel central en la formación de hifas aéreas mediante el procesamiento de señales intracelulares y ambientales. Los genes *bld* activan el clúster *ram*, que codifica el precursor de SapB junto con su maquinaria de secreción. La cascada *bld* también induce la expresión de los genes *chpE* y *chpH*, que codifican proteínas tensioactivas. Tanto SapB como las chaplinas mencionadas contribuyen al crecimiento aéreo, siendo capaces de reducir la tensión superficial del agua en la colonia (Claessen *et al.*, 2006).

- b) Ruta *sky*. La ruta *sky* parece actuar de vía intermediaria entre la regulación de la cascada *bld* y la expresión de genes *whi* que regulan la esporulación. Una vez que comienzan a formarse hifas aéreas, la vía *sky* asume la regulación del desarrollo, expresando genes de forma específica como *rdIA* y *rdIB*, además de la mayoría de las chaplinas (Claessen *et al.*, 2006).

INTRODUCCIÓN

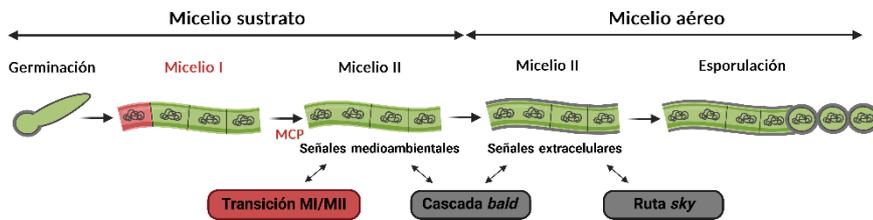


Figura 8. Principales rutas biomoleculares conocidas de los procesos de diferenciación en *Streptomyces*. Los nuevos mecanismos de regulación de las fases pre-esporulantes destacan en color rojo. Adaptado de Yagüe *et al.* (2013a).

I.3.5 Regulación del metabolismo secundario

El MII constituye la etapa reproductiva que está destinada a la producción de metabolitos secundarios y a la esporulación (Yagüe *et al.*, 2013a). Un amplio número de reguladores del metabolismo secundario se caracterizan por ser pleiotrópicos, y por tanto afectan a múltiples procesos como la diferenciación y a rutas de síntesis de antibióticos y de otros metabolitos.

La mayoría son fundamentalmente factores de transcripción, entre los que encontramos genes de las familias *abs* y *afs* (Jin *et al.*, 2021). Dentro de la familia *afs*, análisis de cambios de transcripción y de inactivación de genes indicaron que los genes *afsK*, *afsR* y *afsS* regulan la producción de pristinamicina en *S. pristinaespiralis* (Jin *et al.*, 2021). DasR, otro regulador transcripcional, es capaz de inhibir la producción de daptomicina al reprimir directamente los genes estructurales *dpt* y el gen regulador *adpA* en *S. rooseoeporus* (Chen *et al.*, 2022). AdpA, por su parte, activa la producción de daptomicina y el desarrollo morfológico (Chen *et al.*, 2022).

WbIA (*SCO3579*), además de ser un regulador a la baja en la producción de antibióticos en *S. coelicolor*, juega un papel negativo en la respuesta al estrés oxidativo a través de la regulación transcripcional de genes relacionados con el estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2012). En contraposición, el sistema toxina-antitoxina (TA) de tipo II integrado por Scr1 (*SCO4441*) y Scr2 (*SCO4442*) ejerce una regulación positiva sobre la producción de actinorrodina y prodigininas (Santamaria *et al.*, 2018).

PhoP (*SCO4230*) ha sido descrito como un regulador global que controla un amplio número de genes (desde la fosforilación oxidativa hasta la biosíntesis de nucleótidos, pasando por la producción de metabolitos secundarios) y que juega principalmente dos roles: el primero, obtener fosfato a la vez que se produce una represión transitoria del metabolismo central y de la diferenciación morfológica. Finalmente, dependiendo de la disponibilidad de fosfato, se restablece el crecimiento o la diferenciación (Barreiro and Martinez-Castro, 2019). Otros reguladores pleiotrópicos del metabolismo secundario incluyen *SCO1979*, que regula su propia transcripción y reprime la biosíntesis de actinorrodina y undecilprodigiosina (Zhu *et al.*, 2020), y *SCO6008*, que controla el desarrollo, la absorción de xilosa y glucosa, y la producción de avermectina y oligomicina A en *S. avermitilis* (Lu *et al.*, 2020)

Nuestro grupo de investigación también observó recientemente que el sistema de chaperona/transportador de cobre CopZ (*SCO2730*)/CopA (*SCO2731*), además de tener un papel relevante en la homeostasis del cobre en la germinación, interviene en procesos relacionados con la diferenciación morfológica y con la producción de undecilprodigiosina (González-Quiñónez *et al.*, 2021).

I.3.6 Esporulación

La última fase del desarrollo en *Streptomyces* en medio sólido consiste en la formación de esporas a partir de una célula apical denominada célula esporogénica (Grantcharova *et al.*, 2005). Cada célula apical se subdivide por septos de esporulación de forma uniforme en una cadena de esporas unicelulares que finalmente se liberan de forma individual. Coordinada con la septación tiene lugar la segregación uniforme de copias del genoma (McCormick and Flärdh, 2012).

El estudio de mutantes en genes *whi* (con una esporulación defectiva) permitió encontrar genes implicados en la segregación cromosómica y la diferenciación de esporas (Flärdh and Buttner, 2009). Algunos genes *whi* activan la expresión del gen *ftsZ*, que codifica para FtsZ, primer componente del divisoma y proteína clave en la esporulación (Barka *et al.*, 2016). FtsZ forma anillos Z que marcan el inicio de la división celular, y al cual se unen hasta 20 proteínas de división para formar el divisoma.

Otras proteínas implicadas en la regulación de este proceso son SsgA y SsgB, con un importante papel en la morfogénesis y el control de la división celular (Sevcikova and Kormanec, 2003), y las proteínas ParA y ParB, requeridas para la segregación del cromosoma (Kim *et al.*, 2000b). En términos generales, SsgA inicia el proceso de esporulación colocándose en puntos de la pared donde se formará un tabique.

A continuación, SsgB se une a SsgA, recluta directamente a FtsZ y también estimula su polimerización, logrando un espaciado simétrico de los anillos Z. Al mismo tiempo, ParA se extiende en forma de filamentos a lo largo de la hifa desde la zona apical. Sobre este filamento se distribuye regularmente el complejo ParB, para que cuando finalice la

división y la formación de compartimentos, cada uno cuenta con una sola copia del cromosoma (Flärdh and Buttner, 2009, Jakimowicz and van Wezel, 2012, Barka *et al.*, 2016).

Una vez formado los anillos Z, tiene lugar la condensación y segregación cromosómica, así como la producción de tabiques que delimitarán cada espora. Finalmente, se produce un engrosamiento de la pared, donde participan proteínas como MreB y Mbl (Heichlinger *et al.*, 2011). Por último, WhiE produce la pigmentación grisácea de las esporas, y SsgA señala los futuros sitios de germinación (Flärdh and Buttner, 2009).

Recientemente, nuestro grupo ha descubierto dos genes, *SCO2102* y *SCO2103*, cuya expresión es también esencial para la esporulación de *S. coelicolor*. *SCO2102* colocaliza con FtsZ en las hifas esporulantes y es esencial para posicionar metF (*SCO2103*) en estas hifas, estimulando la síntesis nucleotídica (Fernández-García *et al.*, 2022). El mutante en los genes *SCO2102* y *SCO2103* es incapaz de esporular (Fernández-García *et al.*, 2022).

I.3.7 Regulación del desarrollo en condiciones de estrés osmótico

Tal y como se indicó en el apartado I.2.5, el estrés osmótico induce la formación de células deficientes de pared (CDP). Los mecanismos de formación de estas células son prácticamente desconocidos, si bien podemos pensar que están estrechamente vinculados a cambios en la estructura de la pared celular. Aunque la pared celular es una estructura esencial en bacterias, muchas especies pueden deshacerse de ellas para superar amenazas dirigidas al peptidoglicano como la aplicación de antibióticos cuya diana celular es la pared celular (Claessen and

INTRODUCCIÓN

Errington, 2019). En condiciones de laboratorio, tal y como se mencionó en el apartado I.2.5, la formación de estas células está generalmente inducida por el uso de antibióticos o enzimas líticos dirigidos a la síntesis de PG, produciendo las conocidas como formas L (Allan *et al.*, 2009).

Otros laboratorios fueron capaces de obtener células deficientes de pared sin usar compuestos dirigidos a la síntesis de PG (Ramijan *et al.*, 2018). Estas células, llamadas células S o *S-cells*, se forman cuando son sometidas a un ambiente hiperosmótico y son expulsadas de las hifas después de detenerse el crecimiento en las puntas. Una de las primeras proteínas descubiertas relacionadas con la regulación de células S fue la proteína citoesquelética FilP, que modifica la morfología de las hifas y bloquea la formación de células S en *Kitasatospora viridifaciens* (Ultee *et al.*, 2021). También se observó que el cultivo con limitación de oxígeno promueve la formación de células S en esta cepa (Ultee *et al.*, 2021).

La proteína FilP es uno de varios reguladores implicados en el crecimiento apical de las hifas de actinomicetos y mencionada anteriormente en la fase de emergencia del tubo germinativo (apartado I.3.1). Este crecimiento está orquestado por un conjunto de proteínas llamado polarisoma que incluye a DivIVA y Scy. La primera es esencial para reclutar otras dos proteínas en espiral: Scy, que colocaliza con DivIVA y tiene un papel de andamiaje en el polarisoma, y FilP, que forma una red que proporciona soporte mecánico a la pared celular inmediatamente detrás de la punta de la hifa (Fröjd and Flärdh, 2019a).

En experimentos donde se aplica estrés osmótico, la mayoría de las hifas reprograman su polaridad celular, y los polarisomas se redistribuyen a

nuevos sitios, llevando a la aparición de múltiples ramas laterales a partir de las cuales se produce el crecimiento (Fuchino *et al.*, 2017).

El estudio descartó que reguladores conocidos del patrón de ramificación de *Streptomyces* como AfsK (una quinasa serina/treonina) y Scy participasen en esta reprogramación de la polaridad celular, lo que indica que existen mecanismos diferentes que, bajo condiciones ambientales de estrés, pueden controlar la ramificación de las hifas (Fuchino *et al.*, 2017).

En otro estudio, He *et al.* (2018) observaron que la mutación de *SCO3130* (una posible L-carnitina dehidratasa) provoca un fenotipo *bald* en *S. coelicolor* cuando se somete a estrés osmótico. Además, observaron que *SCO3129* (posible regulador transcripcional de tipo TetR) reprime la transcripción del operón *SCO3128-3130* mediante unión a la región promotora de *SCO3128* (posible desaturasa de ácidos grasos), regulando la transcripción del operón *SCO3128-3130* en respuesta a estrés osmótico (He *et al.*, 2018).

Otros genes expresados en condiciones de estrés osmótico son *sigI* (*SCO3068*) y *prsl* (*SCO3066*) (Viollier *et al.*, 2003). Su similitud con factores anti- σ y anti-anti- σ sugiere que puedan estar involucrados en la regulación de σ^I , y con ello un papel de σ^I en la respuesta al estrés osmótico (Viollier *et al.*, 2003). Un mecanismo regulador similar se observa con el factor σ^H (*SCO5243*) y su factor anti-sigma (*SCO5244*): en respuesta a estrés osmótico, se observó que la medida de la actividad del promotor de *SCO5243* está abolida en un mutante *bldG* de *S. coelicolor*, indicando el papel de BldG en la activación de σ^H (Sevcikova *et al.*, 2010).

I.4. TÉCNICAS USADAS PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS REGULADORES PLEIOTRÓPICOS EN LAS DISTINTAS FASES DEL DESARROLLO DE *STREPTOMYCES*

Tal y como se desarrollará en las siguientes secciones, el punto de partida de esta tesis consistió en la búsqueda de nuevos reguladores pleiotrópicos en las distintas fases del desarrollo de *Streptomyces*. Para ello se siguieron tres estrategias: el estudio de una librería de mutantes aleatorios, el estudio de mutantes creados mediante mutagénesis dirigida, y el análisis cuantitativo del fosfoproteoma de la cepa silvestre de *S. coelicolor* en diferentes tiempos de su ciclo vital. A continuación, se describirá brevemente el estado del arte en *Streptomyces* de estas metodologías.

I.4.1. Mutagénesis aleatoria mediante transposones

La mutagénesis mediante transposones se basa en el fenómeno de la transposición, un método ampliamente usado para estudios genéticos de bacterias basado en la capacidad de estos elementos génicos de moverse de una ubicación a otra en el cromosoma (Liberati *et al.*, 2006). Los primeros transposones de *Streptomyces*, derivados de Tn5, *mariner* o IS493, tuvieron un uso limitado debido a una baja frecuencia de transposición y a mutaciones no aleatorias (Baltz, 2016, Kieser, 2000). Recientemente, se desarrolló un sistema de transposición hiperactivo basado en Tn5 optimizando el sesgo de codones, y demostró su capacidad para mutar eficiente y aleatoriamente *in vivo* el genoma de *Streptomyces* (Petzke and Luzhetskyy, 2009, Horbal *et al.*, 2013). Sin embargo, en ocasiones la replicación del vector que lleva el transposón en la célula diana puede provocar múltiples eventos de inserción en una

célula, y con ello complicar la interpretación del fenotipo resultante (Baltz, 2016).

La librería creada en nuestro laboratorio y que exploramos en esta tesis doctoral se basó en un sistema de transposición desarrollado por Xu *et al.* (2017) también basado en Tn5 (mini-Tn5) y optimizando el sesgo de codones para *Streptomyces*. La unidad transponible mini-Tn5 está flanqueada por dos secuencias repetidas (*mosaic end*) para el reconocimiento y corte de la transposasa Tn5, e incluye un gen de resistencia a apramicina (*aac3 (IV)*) y un origen de replicación *ori-pUC* de *E. coli*. El elemento mini-Tn5 es transportado en el vector pHL734, que incluye un origen *oriT*, un gen *tnp(5)* que codifica una variante de transposasa con cinco mutaciones puntuales (E54K, M56K, L372P, P242A y E345K) para causar una mayor eficiencia de transposición, y un gen de resistencia a ampicilina (*bla*) (figura 9).

La identificación del sitio de inserción de mini-Tn5 en el cromosoma de *Streptomyces* puede hacerse rescatando el elemento transponible mediante digestión de restricción con *ApaI* y religación para producir un plásmido replicativo en *E. coli*, ya que el origen de replicación de *E. coli* se encuentra en el elemento transponible (Xu *et al.*, 2017). Este plásmido se puede secuenciar mediante Sanger y así identificar el sitio de inserción en el cromosoma de *Streptomyces*.

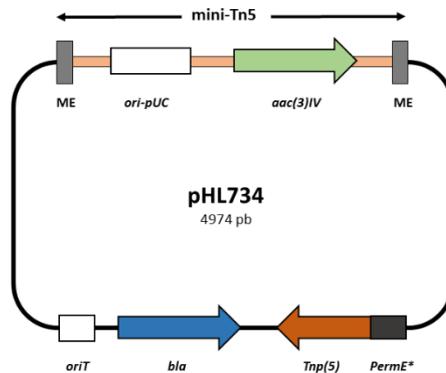


Figura 9. Representación del transposón mini-Tn5 dentro del vector replicativo pHL734 utilizado para mutagénesis aleatoria. Adaptado de Xu *et al.* (2017).

I.4.2. Mutagénesis dirigida

a) Mutagénesis dirigida mediante transposones

Fernández-Martínez *et al.* (2011) utilizaron el transposón Tn5062 (figura 10) para mutar *in vitro* la librería de cósmidos de *S. coelicolor* creada previamente por Bishop *et al.* (2004). Brevemente, realizaron una librería saturada de estos cósmidos con un transposón integrado en un único gen. La librería resultante de cósmidos, con genes interrumpidos por el transposón, puede usarse para hacer mutagénesis sitio-específica, de modo que al transferirlo a *Streptomyces* por conjugación, se sustituye la copia nativa del gen por la mutada (Fernández-Martínez *et al.*, 2011).

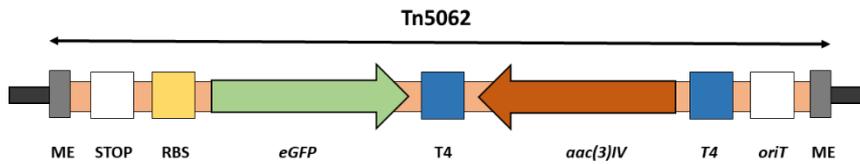


Figura 10. Estructura del transposón Tn5062. Adaptado de Bishop *et al.* (2004). ME: extremos repetidos que flanquean un sitio de unión ribosomal (rbs), un gen de resistencia a apramicina (*aac3(IV)*), una copia sin promotor de *eGFP* y un origen *oriT(RK2)*.

b) Mutagénesis dirigida mediante CRISPR-Cas9

Uno de los sistemas más recientes de mutagénesis dirigida y que más popularidad ha ganado en los últimos años es la tecnología CRISPR-Cas9, un método de edición estudiado por Emmanuelle Charpentier y Jennifer Doudna, premios Nobel de Química en 2020 (Doudna and Charpentier, 2014). Su popularidad se basa esencialmente en su simpleza, ya que el sistema CRISPR-Cas9 incluye dos componentes: un ARN guía (sgRNA) y una nucleasa asociada a CRISPR (Cas9). El ARN guía es una secuencia de ARN específica y complementaria al ADN objetivo para el reconocimiento de la región a eliminar, a la cual se dirige a continuación la endonucleasa Cas9 para producir un corte en la doble cadena. En nuestros estudios, hemos usado un sistema diseñado por Tong *et al.* (2015) para crear mutantes *knockouts* precisos en el genoma de *S. coelicolor* (figura 11). Este sistema deriva de un plásmido termosensible pGM1190 con un gen de resistencia a apramicina, usado como columna vertebral para albergar los dos componentes del sistema CRISPR-Cas9 mencionados anteriormente: la nucleasa Cas9 y el complejo sgRNA. La nucleasa Cas9

INTRODUCCIÓN

está bajo el control del promotor *tipA*, un gen inducible por tioestreptona que está presente en la mayoría de estreptomicetos (Murakami *et al.*, 1989, Yun *et al.*, 2001). Por otra parte, la secuencia objetivo de 20 nucleótidos dentro del andamio del sgRNA se diseñó para insertarse entre los sitios de restricción *NcoI* y *SnaBI*. Finalmente, se habilitó el sitio de restricción *StuI* para insertar la secuencia de recombinación homóloga (*overlap*) encargada de eliminar el gen o producto requerido de forma precisa. Este *overlap* se crea amplificando dos secuencias adyacentes al gen a suprimir mediante PCR, posteriormente unidas mediante PCR de extensión por superposición (OE-PCR) y ligadas al vector (Tong *et al.*, 2015).

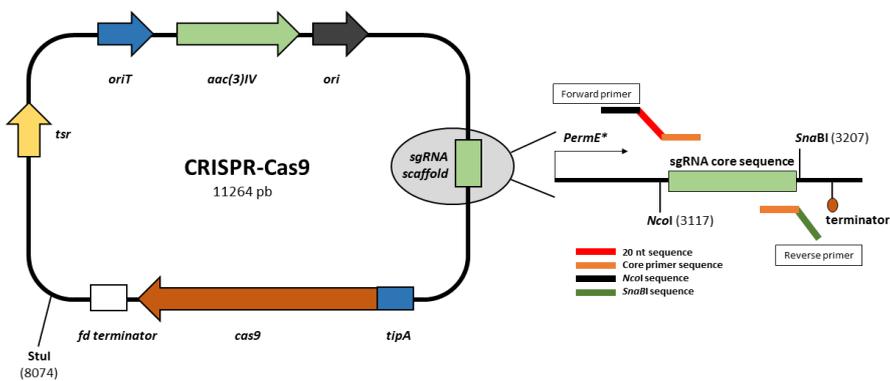


Figura 11. Representación del plásmido CRISPR-Cas9 con el complejo sgRNA ampliado. Adaptado de Tong *et al.* (2015).

I.4.3. Fosfoproteómica

La fosfoproteómica, parte importante de esta tesis doctoral, se enmarca dentro de las llamadas “ómicas”, un neologismo que hace referencia al “estudio de la totalidad o del conjunto de algo”. La proteómica consiste

en el estudio del “proteoma” de las células, un término acuñado por Marc Wilkins en 1994 para describir el conjunto completo de proteínas expresadas por un genoma, célula, tejido u organismo (Wilkins, 2009). Dentro de la proteómica, la fosfoproteómica es la rama que identifica, cataloga y caracteriza las proteínas que contienen un grupo fosfato como una modificación postraduccional.

El estudio del proteoma en *S. coelicolor* ha sido objeto de varios estudios en las últimas décadas (Jayapal *et al.*, 2008, Gubbens *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2019), con una notable aportación por parte de nuestro grupo de investigación (Manteca *et al.*, 2010a, Manteca *et al.*, 2010b, Rioseras *et al.*, 2018).

a) Proteómica clásica

Tradicionalmente, la proteómica se estudió mediante el uso de geles bidimensionales (2D) e identificación de la “huella peptídica”. Dicha estrategia consiste en la separación de las proteínas en geles 2D en función del tamaño y del punto isoelectrico, de modo que cada punto o “spot” se corresponde con una proteína.

Los geles resultantes se analizan para determinar los puntos de interés. Los spots se extirpan y se someten a digestión con tripsina, dando lugar a fragmentos que se analizan mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) separando los fragmentos de la proteína original en función de su masa/carga. Finalmente, las proteínas se identifican cotejando bases de datos que incluyen todos los posibles fragmentos trípticos de cada proteína del organismo analizado (figura 12).

INTRODUCCIÓN

Aunque los geles 2D siguen usándose en estudios a pequeña escala, incluso en organismos como *Streptomyces* (Hesketh *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2016), tienen limitaciones importantes cuando se quieren realizar experimentos a gran escala.

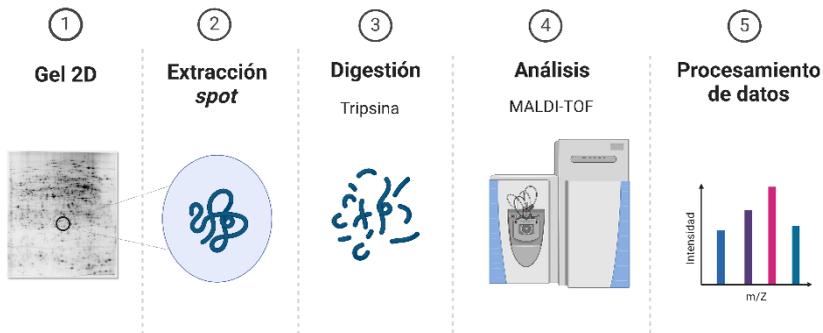


Figura 12. Esquema con los fundamentos de la proteómica clásica. Las proteínas se separan mediante gel bidimensional, se digieren con tripsina, se identifican los pesos moleculares de sus péptidos mediante espectrometría de masas y se identifican usando bases de datos.

b) Proteómica libre de gel (LC-MS/MS)

Los avances en técnicas de cromatografía han llevado a la sustitución de los geles 2D por técnicas de nano-HPLC combinadas con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), permitiendo el análisis de muestras complejas con mayor rapidez.

La técnica se basa en la digestión de proteínas mediante tripsina, fraccionando la muestra en muestras más sencillas, y la separación de los péptidos a través de HPLC. Cada fracción se ioniza usando un electrospray y se introduce en un primer espectrómetro de masas (MS) donde los péptidos son separados en función de su masa/carga. Una vez

separados, los péptidos son fraccionados en una celda de colisión y analizados en un segundo MS, donde se obtiene la secuencia de aminoácidos y la identificación final de las proteínas de partida (figura 13).

En los últimos años, las técnicas de LC-MS/MS han avanzado debido al diseño de instrumentos más potentes con una elevada sensibilidad y resolución, así como mediante el desarrollo de herramientas bioinformáticas capaces de gestionar cantidades ingentes de información.

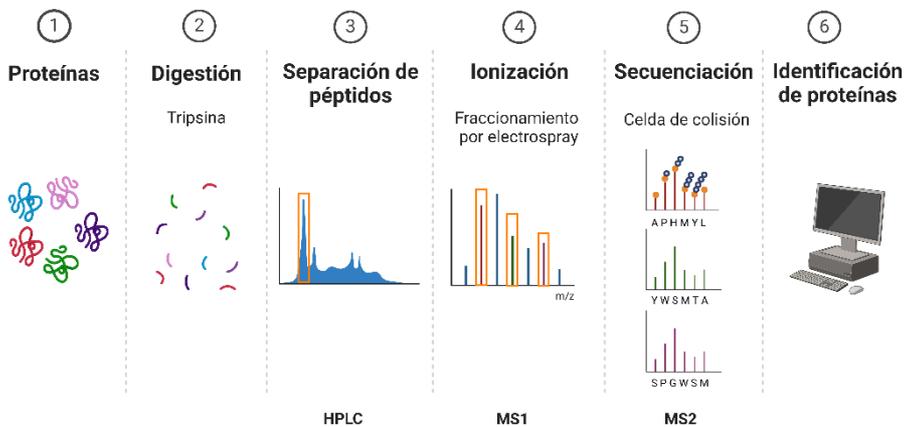


Figura 13. Esquema en el que se representa el fundamento de las técnicas de “proteómica avanzada” libre de gel (LC-MS/MS). Las proteínas de varias muestras se digieren con tripsina, y los péptidos se separan mediante HPLC. Las fracciones de HPLC se analizan en un primer espectrómetro de masas (MS1). Cada péptido del MS1 se fragmenta en la celda de colisión y los fragmentos se “secuencian” en el MS2 al obtener la secuencia aminoacídica de cada polipéptido y poder compararla con las bases de datos.

c) Proteómica cuantitativa

Además de la identificación de proteínas, en ocasiones es útil determinar y comparar la cantidad de proteína presente en una muestra, sea de forma absoluta o relativa.

Una de las técnicas más empleadas consiste en la cuantificación relativa mediante marcaje isobárico. Las etiquetas isobáricas son reactivos que se agregan después de la digestión proteica, codificando diferentes condiciones de muestra, para modificar los péptidos de forma covalente. Consisten en un *mass reporter* (parte que permite diferenciar una molécula de otra por pequeñas diferencias en la masa) y en un *mass normaliser* (parte que compensa las diferencias de masa del *reporter*).

El fundamento consiste en la digestión con tripsina de varias muestras y el marcaje de cada una de ellas con un reactivo de marcaje isobárico diferente. Una vez marcadas, se mezclan y se inyectan en el LC-MS/MS. El primer MS separa los diferentes péptidos, que son llevados a la celda de colisión para su fragmentación. En este paso se rompe el enlace del marcador isobárico y se libera el *mass reporter*. En el segundo MS, además de identificar el péptido, se puede saber qué cantidad de ese péptido procede de cada muestra gracias a los pesos moleculares e intensidades de cada *reporter* (figura 14).

Los marcajes más usados son el iTRAQ (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*) y el TMT (*Tandem Mass Tags*). El primero permite el marcaje de hasta ocho muestras diferentes, mientras que el segundo permite marcar hasta 10 muestras. Sin embargo, el marcaje con TMT requiere espectrómetros de mayor resolución y precisión ya que las

diferencias de masa entre los diferentes isótopos son muy pequeñas (6 mDa) (Chahrour *et al.*, 2015).

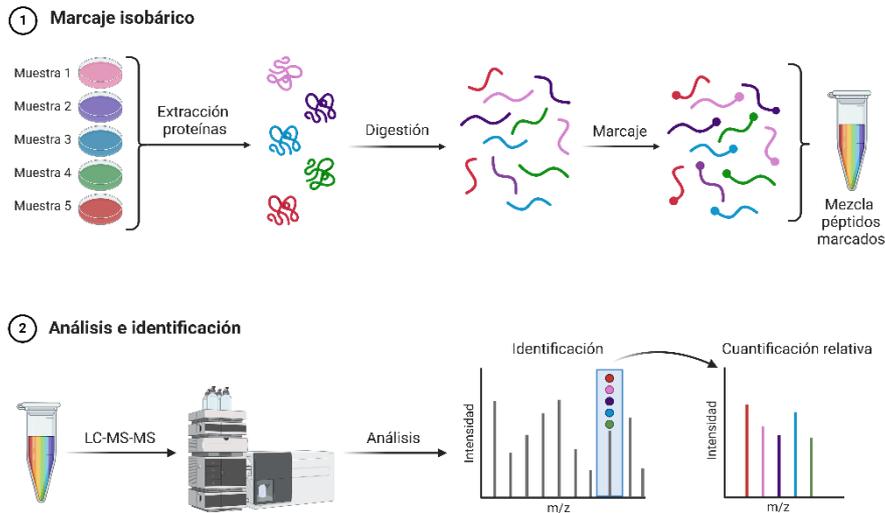


Figura 14. Esquema en el que se representa el fundamento de la técnica de proteómica cuantitativa mediante marcaje isobárico.

d) Fosfoproteómica de *Streptomyces*

Tras su síntesis, las proteínas son objeto de modificaciones postraduccionales (PTMs por sus siglas en inglés) que juegan un papel importante en los procesos celulares. Las más conocidas son la fosforilación, la metilación y la acetilación.

La fosfoproteómica consiste en el estudio de la fosforilación de las proteínas que forman parte de la célula o tejido en un estado determinado. La fosforilación reversible de residuos de serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr) es una modificación postraduccional conocida con funciones reguladoras y de señalización en eucariotas. Sin

INTRODUCCIÓN

embargo, a diferencia de lo que ocurre en eucariotas, donde la fosforilación se produce principalmente en residuos de Ser, Thr y Tyr, en bacterias es más abundante en residuos de histidina (Fuhs and Hunter, 2017). En cambio, el estudio de la fosfohistidina es complicado debido a su vida media reducida en condiciones de pH ácido, usadas en la proteómica estándar y en los análisis de LC-MS/MS (Yagüe *et al.*, 2019).

El estudio del fosfoproteoma requiere el enriquecimiento previo de la muestra con la modificación de interés (en este caso, el grupo fosfato), generalmente después de su digestión. Dos de las principales estrategias usadas son la cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC en inglés) y la cromatografía de afinidad de óxido metálico (MOAC).

El IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) emplea una matriz compuesta de resinas con iones metálicos cargados positivamente, por lo que pueden atrapar grupos fosfato que tienen carga negativa. Las resinas más utilizadas son el ácido iminodiacético (IDA) y el ácido nitrilotriacético (NTA), mientras que los iones más usados son Fe^{3+} (Neville *et al.*, 1997), Ga^{3+} (Posewitz and Tempst, 1999), Ti^{4+} (Zhou *et al.*, 2005), Ti^{4+} (de Graaf *et al.*, 2014) y Zr^{4+} (Diez *et al.*, 2020).

Por otra parte, la matriz de MOAC (*Metal Oxide Affinity Chromatography*) está compuesta de óxidos o hidróxidos metálicos, por lo que no es necesario el anclaje a resinas. La estrategia MOAC más usada emplea dióxido de titanio (TiO_2), con afinidad por los fosfatos orgánicos (Ikeguchi and Nakamura, 1997). Estos óxidos son insolubles en tampones líquidos y están cargados positivamente a pH ácido (Tombácz, 2009). Varios estudios comparando la eficacia de métodos como Fe-IMAC, Ti-IMAC, TiO_2 y ZrO_2 demostraron la complementariedad entre estos enfoques y

que la combinación de varias técnicas puede aumentar la cobertura del fosfoproteoma (Roitinger *et al.*, 2015).

El fosfoproteoma bacteriano es mucho más reducido que el de células eucariotas, lo que convierte la fosfoproteómica en bacterias en un reto (revisado en Yagüe *et al.* (2019)). Concretamente en *Streptomyces* la mayoría de los estudios necesitaban partir de una cantidad elevada de proteína para detectar una baja cantidad de fosfopéptidos (tabla 2). Nuestro grupo de investigación demostró que la combinación de un enriquecimiento previo con fosfato cálcico (CPP) unido al fosfoenriquecimiento con TiO₂ aumenta la cobertura del fosfoproteoma al obtener una elevada identificación de fosfoproteínas (127) partiendo de una baja cantidad de proteína (0,3 mg) (Manteca *et al.*, 2011, Rioseras *et al.*, 2018). Hasta la fecha, el conjunto de estudios sobre el fosfoproteoma de *Streptomyces* había identificado un total de 184 fosfoproteínas únicas (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción general de las fosfoproteínas S/T/Y identificadas en la fosfoproteómica de *Escherichia coli* y *Streptomyces coelicolor*.
Se indica la metodología utilizada, la cantidad de proteína usada en el análisis y el número de fosfoproteínas por µg de proteína usada.

Cepa	Método	pS/pT/pY (%)	Proteína (mg)	Fosfoproteínas	Nº fosfoproteínas/ µg proteína	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	TiO ₂	68/23/9	20	78	0,004	Macek <i>et al.</i> (2008)
	TiO ₂	75,9/16,7/7,4	9,8	135	0,01	Soares <i>et al.</i> (2013)
	TiO ₂	59,6/33,5/3,9	0,05	409	8,18	Semanjski <i>et al.</i> (2018)
	Fe(III)-IMAC	64,7/26,7/8,6	2	781	0,4	Potel <i>et al.</i> (2018)
	Fe(III)-IMAC	62, 9/ 22,5/14,6	-	384	-	Lin <i>et al.</i> (2018)
	TiO ₂	34/52/14	50	40	0,0008	Parker <i>et al.</i> (2010)
<i>Streptomyces coelicolor</i>	TiO ₂	46,8/48/5,2	0,3	127	0,42	Manteca <i>et al.</i> (2011)
	TiO ₂	48/52/0	0,1	48	0,5	Rioseras <i>et al.</i> (2018)
	TiO ₂	51,4/41,7/6,9	-	52	-	Hirakata <i>et al.</i> (2019)

II. OBJETIVOS

El objetivo general de nuestro grupo de investigación es profundizar en el conocimiento sobre la regulación del desarrollo y diferenciación de *Streptomyces*, y en cómo la diferenciación influye en la activación del metabolismo secundario, con el fin último de intentar mejorar la búsqueda y producción de compuestos bioactivos (antibióticos, antitumorales, antifúngicos, etc.) en *Streptomyces*. Los objetivos concretos que hemos abordado en esta tesis doctoral son:

- 1) Buscar y caracterizar mutantes con fenotipos importantes en desarrollo, diferenciación y/o producción de metabolitos secundarios a partir de una librería de mutantes aleatorios creada aplicando la metodología descrita por Xu *et al.* (2017), esperando encontrar nuevos reguladores del desarrollo y de la diferenciación de *Streptomyces*.
- 2) Caracterizar el transcriptoma del mutante *ftsZ* de *S. coelicolor* para identificar y analizar los genes más expresados o reprimidos en comparación con la cepa salvaje. Entre estos genes esperamos encontrar genes importantes de la división celular que palien el déficit de FtsZ.
- 3) Caracterizar el papel del mutante *SCO4439::Tn5062*, previamente creado por nuestro grupo de investigación (Rioseras *et al.*, 2016), en la formación de hifas hinchadas y células sin pared en las fases previas a la esporulación.
- 4) Caracterizar el fosfoproteoma de las fases vegetativa (30h) y esporulante (65h) en la cepa silvestre de *S. coelicolor* mediante cromatografía de afinidad con zirconio (IV) inmovilizado y espectrometría de masas (LC-MS/MS).

OBJETIVOS

III. METODOLOGÍA

III.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

III.1.1. Cepas utilizadas

Todas las cepas de *Streptomyces coelicolor* y *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3. Cepas utilizadas de *E. coli* y *S. coelicolor* A3(2) utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen
DH5α	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
ET12567	<i>dam-13::Tn9, dcm-6, hsdM⁻, hsdR⁻ Cm^R</i>	MacNeil <i>et al.</i> (1992)
ET12567/ pUZ8002	ET12567 que alberga pUZ8002, un plásmido con oriT defectuoso y no transmisible que moviliza plásmidos que contienen oriT por conjugación, Cm ^R , Kan ^R	Flett <i>et al.</i> (1997)
W3110	Variación prototrófica de la cepa <i>E. coli</i> K12	DSM 5911

Tabla 3. Continuación.

<i>Streptomyces coelicolor</i>		
M145	SCP1- SCP2-, cepa modelo	Kieser (2000)
FM145 Ftsz-eGFP	<i>S. coelicolor</i> que alberga <i>ftsZ-eGFP</i>	Willemse and van Wezel (2009)
SCO4439::Tn5062	SCO4439 mutado en <i>S. coelicolor</i> por Tn5062, Amp ^R	Rioseras <i>et al.</i> (2016)
SCO1760::Tn5	SCO1760 mutado en <i>S. coelicolor</i> por Tn5, Apra ^R	Esta tesis
ΔSCO0954	SCO0954 eliminado en <i>S. coelicolor</i> por CRISPR-Cas9, Apra ^R	Esta tesis

III.1.2. Medios de cultivo utilizados para *Escherichia coli*

2xty (2x Yeast Extract Tryptone) (Sambrook and Russell, 2001)

5 g/L	NaCl
15 g/L	Triptona
10 g/L	Extracto de levadura
15 g/L	Agar (solo para medio sólido)

LB (Luria-Bertani) (Miller, 1978)

5 g/L	NaCl
5 g/L	Extracto de levadura
10 g/L	Triptona

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

III.1.3. Medios de cultivo utilizados para *Streptomyces coelicolor*

Los medios de cultivo para el estudio de las células deficientes de pared en *S. coelicolor* fueron suplementados con 0,64M sacarosa antes de esterilizar cuando fue requerido:

GYM (Glucose + Yeast Extract + Malt Extract) (Novella *et al.*, 1992)

5 g/L	Glucosa
4 g/L	Extracto de levadura
5 g/L	Extracto de malta
0,5 g/L	MgSO ₄ ·7H ₂ O
20 g/L	Agar

Suplementar con 0,25 g/L K₂HPO₄ estéril después de esterilizar.

SFM (Soya Flour Mannitol) (Kieser, 2000)

20 g/L	Harina de soja
20 g/L	Manitol
20 g/L	Agar

METODOLOGÍA

R5A sin sacarosa* (Fernández *et al.*, 1998)

0,25 g/L	K ₂ SO ₄
10,12 g/L	MgCl ₂ ·6H ₂ O
10 g/L	Glucosa
0,1 g/L	Difco casaminoácidos
200 µL	Oligoelementos
5 g/L	Extracto de levadura
21 g/L	MOPS
20 g/L	Agar

Ajustar pH a 6,8 con KOH.

*El medio R5A descrito por Fernández *et al.* (1998) lleva 103 g/L sacarosa, que se usa para aumentar la presión osmótica cuando se trabaja con protoplastos, pero no como nutriente, ya que *S. coelicolor* no puede catabolizar este azúcar (Kieser, 2000). En esta tesis hemos usado el medio R5A sin sacarosa.

TSB (Tryptic Soy Broth) (Kieser, 2000)

17 g/L	Peptona de caseína
2,5 g/L	Fosfato de dipotasio
2,5 g/L	Glucosa
5 g/L	Cloruro de sodio
3 g/L	Peptona de soja

III.1.4. Condiciones de cultivo y conservación de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en medio LB o 2xTY a 37°C en medio sólido y a 37°C con agitación de 250 rpm en medio líquido. Cuando fue requerido, los siguientes antibióticos se añadieron al medio para seleccionar cepas mutantes y portadoras de plásmidos: ampicilina (100 µg/mL), apramicina (100 µg/mL), higromicina (100 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL), cloranfenicol (25 µg/mL) y ácido nalidíxico (25 µg/mL).

Para guardar stock de las cepas de *E. coli* creadas, se hicieron cultivos en 5 mL de medio líquido LB o 2xTY con los antibióticos correspondientes durante 16 horas, se centrifugó el pellet, se resuspendió en glicerol 30% y se hicieron alícuotas. Los viales se conservaron a -80°C.

III.1.5. Condiciones de cultivo y conservación de *Streptomyces coelicolor*

Los cultivos en líquido de *S. coelicolor* se prepararon en medio R5A sin sacarosa o TSB y se incubaron a 30°C con agitación de 200 rpm. Las esporas en medio sólido de la cepa silvestre y los mutantes de *S. coelicolor* se recogieron de placas SFM después de crecer a 30°C durante 7 días. La formación de células deficientes de pared inducidas por estrés osmótico se analizó en medio GYM o SFM suplementado con 0,64M sacarosa. Cuando fue necesario, los cultivos se suplementaron con los antibióticos correspondientes: apramicina (25 µg/mL), higromicina (200 µg/ml), kanamicina (50 µg/mL) y tioestreptona (50 µg/mL).

III.1.6. Plásmidos utilizados

Todos los plásmidos utilizados y construidos en esta tesis doctoral y sus características principales están recogidos en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Plásmidos utilizados en esta tesis.

Plásmido	Descripción	Referencia
PCR™-Blunt II-TOPO®	Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit, Kan ^R	Invitrogen
pKMV	Vector de clonación; Kan ^R	BGI Genomics, Hong Kong
pKQLLSP44	Vector de clonación, Kan ^R	BGI Genomics, Hong Kong
pSEVA28c1	Vector de clonación, Kan ^R	García-Gutiérrez <i>et al.</i> (2020)
pMS82	Vector integrativo y conjugativo, Hygro ^R	Gregory <i>et al.</i> (2003)
pNG3	Vector integrativo y conjugativo, Hygro ^R	González-Quiñónez <i>et al.</i> (2016)
pNG4	Vector integrativo y conjugativo, Hygro ^R	González-Quiñónez <i>et al.</i> (2016)
pNG4-SP44	pNG4 modificado con promotor SP44 clonado en <i>NdeI</i> , Hygro ^R	Esta tesis
pRAS	pRA modificado por Antonio Rodríguez y Alberto-Sola-Landa; Apra ^R	Perez-Redondo <i>et al.</i> (2010)
pRASK	pRAS modificado, Apra ^R Kan ^R	Fernández-García <i>et al.</i> (2022)
pCRISPR-Cas9	Plásmido conjugativo y termosensible (contiene la nucleasa Cas9); Apra ^R	Tong <i>et al.</i> (2015)

Tabla 5. Construcciones realizadas para el estudio de los genes *SCO0954*, *SCO1758*, *SCO4439* y *SCO4440*.

Plásmido	Descripción	Referencia
<i>SCO1760-1758</i>		
pNG3-SCO1760	pNG3 que contiene el gen <i>SCO1760</i> , Hygro ^R	Esta tesis
pNG3-SCO1760-59	pNG3 que contiene los genes <i>SCO1760</i> y <i>SCO1759</i> , Hygro ^R	Esta tesis
pNG3-SCO1760-59-58	pNG3 que contiene los genes <i>SCO1760</i> , <i>SCO1759</i> y <i>SCO1758</i> , Hygro ^R	Esta tesis
pNG3-SCO1758mCherry	pNG3 que contiene el gen <i>SCO1758</i> fusionado a mCherry, Hygro ^R	Esta tesis
pRASK-SCO1758mCherry	pRASK que contiene el gen <i>SCO1758</i> fusionado a mCherry, Kan ^R	Esta tesis
pCRISPR-SCO1758a	pCRISPR con la diana <i>SCO1758</i> (guía a) y un fragmento de 2.27 kb usado para crear Δ <i>SCO1758</i> , Apra ^R	Esta tesis
pCRISPR-SCO1758b	pCRISPR con la diana <i>SCO1758</i> (guía b) y un fragmento de 2.55 kb usado para crear Δ <i>SCO1758</i> , Apra ^R	Esta tesis
pCRISPR-SCO1758c	pCRISPR con la diana <i>SCO1758</i> (guía b) y un fragmento de 2.42 kb usado para crear Δ <i>SCO1758</i> , Apra ^R	Esta tesis

Tabla 5. Continuación.

Plásmido	Descripción	Referencia
<i>SCO0954 y mutagénesis dirigida</i>		
pNG4-SCO0954	pNG4 que contiene el gen <i>SCO0954</i> , Hygro ^R	Esta tesis
pNG3-SCO0954mCherry	pNG3 que contiene el gen <i>SCO0954</i> fusionado a mCherry, Hygro ^R	Esta tesis
pCRISPR-SCO0954	pCRISPR con la diana <i>SCO0954</i> y el fragmento de 2.08 kb usado para crear Δ <i>SCO0954</i> , Apra ^R	Esta tesis
pNG4-SCO0837	pNG4 que contiene el gen <i>SCO0837</i> , Hygro ^R	Esta tesis
pNG4-SCO2795	pNG4 que contiene el gen <i>SCO2795</i> , Hygro ^R	Esta tesis
pNG4-SP44-asSCO0698	pNG4/SP44 que contiene el gen <i>SCO0698</i> , Hygro ^R	Esta tesis
<i>SCO4439-40</i>		
pRASK-SCO4439	pRASK que contiene el gen <i>SCO4439</i> , Kan ^R	Esta tesis
pRASK-SCO4440-41-42	pRASK que contiene los genes <i>SCO4440</i> , <i>SCO4441</i> y <i>SCO4442</i> , Kan ^R	Esta tesis
pNG3-SCO4440mCherry	pNG3 que contiene el gen <i>SCO4440</i> fusionado a mCherry, Hygro ^R	Esta tesis
pMS82-SCO4440	pMS82 que contiene el gen <i>SCO4440</i> , Hygro ^R	Rioseras <i>et al.</i> (2016)
pMS82-SCO4439	pMS82 que contiene el gen <i>SCO4439</i> , Hygro ^R	Rioseras <i>et al.</i> (2016)

III.1.7. Cebadores utilizados en las reacciones de PCR

Todos los cebadores utilizados en las reacciones de PCR de esta tesis doctoral y su secuencia se encuentran recogidos en la Tabla 6.

Tabla 6. Cebadores utilizados en esta tesis.

Cebador	Secuencia	Referencia
Cebadores genéricos		
<i>UpS</i>	GAGTTAGCTCACTCATTAGGC	Xu <i>et al.</i> (2017)
<i>DownS</i>	ACTGCTGTGAGCGCTTTGCCTTGGC	Xu <i>et al.</i> (2017)
<i>M13F</i>	CAGGAAACAGCTATGA	Invitrogen
<i>M13R</i>	CTGGCCGTCGTTTTAC	Invitrogen
<i>SCO4848F</i>	CGTCGTATCCCCTCGGTTG	Riostras <i>et al.</i> (2016)
<i>SCO4848R</i>	GAGCCGGGAAAGCTCATTCA	Riostras <i>et al.</i> (2016)
<i>SCO3798intF</i>	CAGCTCGTCCTTGGTGTTC	Fernández-García <i>et al.</i> (2022)
<i>SCO3798intR</i>	TCAGGTCCATGACGTTTCCC	Fernández-García <i>et al.</i> (2022)
<i>SP44F</i>	TTGTGTGGAATTGTGAGCGG	Esta tesis
<i>SP44R</i>	ATCGAGTGTCCGTTTCGAGTG	Esta tesis

Tabla 6. Continuación.

Cebador	Secuencia	Referencia
Cebadores para el estudio de <i>SCO1758</i>		
<i>SCO1760F</i>	AAAACTAGTTGGCACGCACGCTCGCCG	Esta tesis
<i>SCO1760R</i>	GGGGGATATCTCACTTCCCGGCCCGCTTCT	Esta tesis
<i>SCO1759R</i>	GGGGGATATCTCAGCGCCCGGTGAGGCGC	Esta tesis
<i>SCO1758R</i>	GGGGGATATCCGCTTGCCTGTTCCCGCTTCC	Esta tesis
<i>P1-1760intF</i>	GTAGCTGAGGCCGAGCTGT	Esta tesis
<i>P1-1760intR</i>	GACGGGAATCATCGGACA	Esta tesis
<i>P2-1758F</i>	CTCGAGCTTCTTCTTCGCGCCGCG	Esta tesis
<i>P2-1758R</i>	AGATCTACACTTGAGTAGTGGATCACCCG	Esta tesis
<i>sg1758(a)</i>	CATGCCATGGGAGGGTGTCCCACTTGTTGTG TTTTAGAGCTAGAAATAGC	Esta tesis
<i>20nt1758(a)</i>	GAGGGTGTCCCACTTGTTGT	Esta tesis
<i>1758LeftF(a)</i>	AGGCCTGCGACTGCGAGCAGGAG	Esta tesis
<i>1758LeftR(a)</i>	TGAACGAGGTACGGACTTCTGAAGCGGGAAC AGGCAAG	Esta tesis
<i>1758RightF(a)</i>	CTTGCCTGTTCCCGCTTCTGAAGTCCTGACCTC GTTCA	Esta tesis
<i>1758RightR(a)</i>	AGGCCTCCGGACCGATCCGCAC	Esta tesis
<i>1758Fc(a)</i>	CCGGTTAGACCCGGAACC	Esta tesis
<i>1758Rc(a)</i>	GGACAGGCCCTGTGCG	Esta tesis
<i>sg1758(b)</i>	CATGCCATGGAGTGAGGACTTGCCGACGTTG TTTTAGAGCTAGAAATAGC	Esta tesis
<i>20nt1758(b)</i>	AGTGAGGACTTGCCGACGTT	Esta tesis

Tabla 6. Continuación.

<i>1758LeftF(b)</i>	AGGCCTCCAGCACCGTCCTCTTCATC	Esta tesis
<i>1758LeftR(b)</i>	TGAACGAGGTACGGACTTCGAAGCGGGAAC AGGCAAG	Esta tesis
<i>1758RightF(b)</i>	CTTGCCTGTTCCCGCTTCGAAGTCGTACCTC GTTC A	Esta tesis
<i>1758RightR(b)</i>	AGGCCTAGGAAGGTGTCCCCTCGT	Esta tesis
<i>1758Fc(b)</i>	AGTACGTCAGGTCCTTCCGA	Esta tesis
<i>1758Rc(b)</i>	ATCACGTGGTGGATGGTCA	Esta tesis
<i>1758LoopLeftR</i>	TGAACGAGGTACGGACTTCTCGCTCGTCCGG CGG	Esta tesis
<i>1758LoopLeftF</i>	AGGCCTCAGGTCGTCAAGGTCACCGA	Esta tesis
Cebadores para el estudio de <i>SCO4439-40</i>		
<i>4440-mCherryF</i>	CATATGGTCTCGCGGACCGACAGC	Esta tesis
<i>4440-mCherryR</i>	CTCGAGGTGGACCGCCGCCCG	Esta tesis
Cebadores utilizados para mutagénesis dirigida		
<i>SCO0837F</i>	GGGGCATATGGCGTCAGGCGGCGTCGC	Esta tesis
<i>SCO0837R</i>	AAAAACTAGTCGGCTCGGCTGCTCCGTTT	Esta tesis
<i>SCO2795F</i>	GGGGCATATGCGAGCAGCACGCAGAG	Esta tesis
<i>SCO2795R</i>	AAAAACTAGTGGGTGGTCATTCCGGTCACT	Esta tesis
<i>SCOas0698F</i>	ACGCGTTCACACGGCCAGTGACAGGC	Esta tesis
<i>SCOas0698R</i>	ACTAGTGCGTTGAACGCCCGGATCCG	Esta tesis

Tabla 6. Continuación.

Cebador	Secuencia	Referencia
Cebadores para el estudio de <i>SCO0954</i>		
<i>sg0954</i>	CATGCCATGGGCCTACCTCACCCCAACTAGT TTTAGAGCTAGAAATAGC	Esta tesis
<i>20nt0954</i>	GCCTACCTCACCCCAACTA	Esta tesis
<i>sgRNA-R</i>	ACGCCTACGTAAAAAAGCACCGACTCGGTG CC	Tong <i>et al.</i> (2015)
<i>0954Left2F</i>	AGGCCTAACTACACGTCGCCGTTTCAT	Esta tesis
<i>0954Left2R</i>	GCCGGACTGAGCCGGGACGGGCGTGAGTCT GGCAC	Esta tesis
<i>0954RightF</i>	GGCGTGCCAGACTCACGCCCGTCCCGGCTCA GTCCGGC	Esta tesis
<i>0954RightR</i>	AGGCCTCCTCGGCGTGGACTCCTTCTT	Esta tesis
<i>Cas9-1R</i>	GTAGTACGGGATGCGGAAGG	Esta tesis
<i>Cas9-1F</i>	ATTACTGGACCGGATCGGG	Esta tesis
<i>0954Fc</i>	ACCCGACACATAAGGAGTGC	Esta tesis
<i>0954Rc</i>	CCAGGTCTGGAAGGTGATGT	Esta tesis
<i>SCO0954F</i>	GGGGCATATGCTGATCAGGGAAGCCAC	Esta tesis
<i>SCO0954R</i>	AAAACTAGTGACTGAGCCGGGACCTACA	Esta tesis
<i>0954mCherryF</i>	AAAACTAGTATGCTGATCAGGGAAGCCA	Esta tesis
<i>0954mCherryR</i>	GGGGCTCGAGCAGGGCGCGGTGCATG	Esta tesis

Tabla 6. Continuación.

Cebador	Secuencia	Referencia
Cebadores para los experimentos de RT-qPCR		
<i>q1758F2</i>	ATGAACGACCACATCCACCC	Esta tesis
<i>q1758R2</i>	CTCGATGTCGAAGCCCTCTT	Esta tesis
<i>q4849F1</i>	GGTCGTCTTCGTGCTGGTC	Esta tesis
<i>q4849R2</i>	CGGGTGGTGTGCGGG	Esta tesis
<i>q4758F</i>	ATCACCGACCGGATGCCCTT	Li <i>et al.</i> (2015)
<i>q4758R</i>	GCCGAGCCCCGCTTCTTC	Li <i>et al.</i> (2015)

III.2. ANÁLISIS FENOTÍPICO, VALIDACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES ALEATORIOS DE *STREPTOMYCES COELICOLOR* GENERADOS CON EL TRANSPOSÓN MINI-TN5

Previo a la realización de esta tesis, nuestro grupo de investigación obtuvo una librería de mutantes de inserción aleatoria en *S. coelicolor* M145 usando el plásmido pHL734 que contiene el transposón mini-Tn5 (Xu *et al.*, 2017). Este plásmido, brevemente introducido en el apartado I.4.1, carece de origen de replicación en *Streptomyces*, lo que lo convierte en un plásmido suicida. Además, para incrementar la estabilidad de los mutantes adquiridos, el gen *tnp(5)* que codifica para la transposasa se sitúa en una región fuera del propio transposón, lo que impide fenómenos de transposición secundarios (Davison, 2002).

La alta eficiencia del método de mutagénesis aleatoria permitió obtener miles de mutantes aleatorios de los que se aislaron y guardaron 645.

III.2.1. *Screening* fenotípico de mutantes de inserción aleatoria

El alto número de mutantes aleatorios a analizar nos llevó a realizar un primer análisis rápido preliminar de los fenotipos de múltiples mutantes, con el fin de seleccionar los más destacados. Este *screening* se realizó a partir de suspensiones frescas de esporas en agua, obtenidas después de crecer los mutantes y la cepa salvaje como control en placas con medio SFM durante 7 días.

El análisis fenotípico preliminar consistió en:

a) Análisis del ciclo de desarrollo. Para ello se inocularon $3 \cdot 10^7$ esporas frescas en placas de Petri con 25 mL de medio sólido GYM cubierto con discos estériles de celofán y se crecieron en estufa a 30°C a diferentes intervalos de tiempo para ver las diferentes fases del ciclo de vida de *Streptomyces*: germinación (8h), MI (16h), MII temprano o sustrato (24h), MII tardío o aéreo (48h) y esporulación (72h). Las células se tiñeron con SYTO9/IP y se observaron en el microscopio de fluorescencia tal y como se describe en el apartado III.5.1.

b) Producción de antibiótico. Se analizó la producción de los antibióticos undecilprodigiosina (coloración roja) y actinorrodina (coloración azul) mediante observación macroscópica en cultivos líquidos a diferentes intervalos de tiempo. Para ello se inocularon 10^7 esporas/mL en matraces lisos de laboratorio de 100 mL con 20 mL de medio R5A sin sacarosa y se incubaron a 30°C y con agitación de 200 rpm, y se observó su coloración en diferentes momentos.

III.2.2. Identificación del sitio de integración del transposón mini-Tn5

Tras seleccionar aquellos mutantes con un fenotipo llamativo, se identificó el punto de inserción del transposón mini-Tn5 en el cromosoma de los mutantes. Para ello, se extrajo el ADN cromosómico de los mutantes con el kit GenElute™ Bacterial Genome DNA (Sigma) y se digirió 0,5 µg de ADN con *Apal*, un enzima de restricción que corta el genoma de *S. coelicolor* en promedio una vez cada 1,3 kb, pero que no está presente dentro del transposón. La muestra de ADN digerida se purificó usando el kit NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel™), se ligó usando la ligasa T4 DNA Ligase (Invitrogen) y se introdujo en *E. coli* TOP10 mediante transformación química.

A continuación, se aislaron colonias de *E. coli* resistentes a apramicina que contienen el transposón mini-Tn5 con secuencias cromosómicas flanqueantes que habían ligado en sus extremos. Todas las colonias de *E. coli* resistentes a apramicina contienen el mini-Tn5, ya que incluye el gen de resistencia a apramicina y el origen de replicación de *E. coli ori-pUC* (Xu *et al.*, 2017). Los plásmidos recombinantes de cada clon fueron extraídos usando el kit comercial E.Z.N.A.™ Plasmid DNA Mini Kit (Omega Biotek) y secuenciados usando los cebadores *DownS* y *UpS* que se unen a mini-Tn5 para determinar la secuencia cromosómica que flanquea cada lado de mini-Tn5 (Tabla 6).

Del total de mutantes aleatorios cuyo fenotipo preliminar fue analizado en esta tesis, nos centramos en el estudio de uno de ellos, el mutante *SCO1760::Tn5*, cuyo fenotipo se describirá en detalle en el capítulo de Resultados.

III.3. TÉCNICAS GENERALES DE MANIPULACIÓN DEL ADN Y MUTAGÉNESIS

III.3.1. Procedimiento general para clonación de fragmentos de ADN, purificación y conservación de plásmidos

Como método general, las construcciones realizadas en esta tesis doctoral partieron de la obtención de fragmentos de ADN mediante digestión enzimática o amplificados por PCR. Se recortaron en geles de agarosa (0,8% o 2% según el tamaño de banda) y se purificaron usando el kit NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel). Los fragmentos se ligaron en pCR™-Blunt II-TOPO® (Invitrogen), se clonaron mediante transformación química usando células competentes químicas de *E. coli* TOP10 o DH5α y se seleccionaron en placa con medio 2xty suplementado con kanamicina. A continuación, el ADN plasmídico de *E. coli* se obtuvo de colonias aisladas mediante un procedimiento de extracción alcalina (Birnboim and Doly, 1979), se comprobó la secuencia del inserto por secuenciación Sanger empleando los cebadores universales *M13F/M13R* (Tabla 6) y se conservó en viales con agua destilada estéril.

Los fragmentos de ADN fueron transferidos desde el vector pCR™-Blunt II-TOPO® a otros plásmidos mediante digestiones enzimáticas de ambos usando enzimas de restricción adecuados para cada plásmido y construcción. Los insertos y los plásmidos fueron purificados a partir de geles de agarosa y ligados usando la ligasa T4 DNA Ligase (Invitrogen) utilizando 50 ng de vector y 4 veces más concentración molar de inserto que de vector. Se añadieron 0,5 µL de ligasa (de un stock a 5U/µL) en un volumen final de 10 µL. Se hizo transformación química de *E. coli* TOP10 o DH5α seleccionando los transformantes en placas de medio 2xty

suplementado con el antibiótico correspondiente. Finalmente, el ADN plasmídico fue obtenido siguiendo el protocolo de extracción alcalina mencionada en el párrafo anterior, y la secuencia del inserto fue comprobada por secuenciación Sanger usando cebadores específicos. Los plásmidos se conservaron a -20°C en agua destilada estéril.

III.3.2. Procedimiento general de electroporación y conjugación

La transferencia de plásmidos a *Streptomyces* mediante conjugación requiere la transformación previa en células de *E. coli* ET12567/pUZ8002, una cepa mutada en el sistema de metilación del ADN *dam-dcm* (MacNeil *et al.*, 1992) que incluye pUZ8002, un plásmido no transferible pero con las funciones que actúan para movilizar plásmidos que tengan un *oriT* (Paget *et al.*, 1999). La transformación de *E. coli* se llevó a cabo mediante electroporación utilizando cubetas de electroporación de 0,2 cm y el programa Ec1 (1 pulso de 1,8 kV) del electroporador Micropulser (Bio-Rad®) con constante de tiempo esperada entre 3,80 y 5,40 ms. Las células transformadas se añadieron a medio de cultivo líquido, se incubaron a 37°C durante 90 minutos y se plaquearon en medio sólido suplementado con cloranfenicol (mantiene la mutación en la metilasa *dam* de la cepa ET12567), kanamicina (mantiene la selección del plásmido pUZ8002) y el antibiótico correspondiente al plásmido vector. A partir de colonia aislada se inocularon cultivos y las células crecidas se conservaron a -80°C en viales con glicerol al 30%.

La transferencia de los plásmidos desde la cepa de *E. coli* ET12567/pUZ8002 a *S. coelicolor* M145 se realiza mediante conjugación usando el método descrito por Kieser (2000) con modificaciones. Se

parte de un cultivo de 5 mL de la cepa ET12567/pUZ8002 con el plásmido de interés crecido entre 16-20 horas y se lava dos veces con medio de cultivo 2xty fresco para eliminar restos de antibiótico que puedan inhibir *Streptomyces* en un volumen de 0,5 mL. Se resuspenden 10^8 esporas de la cepa receptora de *Streptomyces* en 0,5 mL de medio R5A sin sacarosa, y se le da un choque térmico de 50°C durante 10 minutos. Se añaden los 0,5 mL de células de *E. coli* ET12567/pUZ8002 a los 0,5 mL de esporas, se reparte en placas con medio SFM suplementado con 2,5M $MgCl_2$ y se extiende la muestra con un asa de siembra estéril. Tras incubar a 30°C durante una noche, cada placa se cubre con 1 mL de agua destilada estéril a la que se añade ácido nalidíxico a una concentración de 25 $\mu g/mL$ (para inhibir el crecimiento de *E. coli*) y el antibiótico de selección del plásmido conjugado, y se vuelve a incubar a 30°C.

Los exconjugantes se seleccionan a partir de colonias aisladas de las placas SFM con $MgCl_2$ y se transfieren a sucesivas placas GYM con ácido nalidíxico y el antibiótico de selección. Finalmente, cada exconjugante se transfiere a placa SFM para esporular y se crece durante 7 días para obtener esporas.

III.3.3. Comprobación de los sitios de integración $\phi BT1$ y $\phi C31$ en vectores de integración

Los principales plásmidos integrativos usados en esta tesis doctoral fueron pRAS, pMS82, pNG3 y pNG4 (Tabla 4).

El plásmido pRASK consiste en una modificación del plásmido pRAS (derivado de pRA y cedido por Antonio Rodríguez y Alberto Sola-Landa) con un gen de resistencia a kanamicina. Se integra en el sitio $\phi C31$

localizado en el gen *SCO3798* del genoma de *S. coelicolor* (Combes *et al.*, 2002), y para comprobar la integración correcta en el cromosoma, se diseñaron los cebadores *3798intF* y *3798intR* (Tabla 6), con los que se produce una amplificación de 1122 pb si el vector se ha integrado correctamente.

Por otra parte, el resto de vectores utilizados (pNG3 y pNG4) derivan de pMS82, un plásmido con el sitio de integración Φ BT1 que se integra en el sitio *attB* único localizado en el gen *SCO4848* dentro del genoma de *S. coelicolor* (Gregory *et al.*, 2003). En un trabajo previo, nuestro grupo de investigación comprobó que *SCO4848* se cotranscribe con *SCO4849*, y que la integración de pMS82 afecta a la expresión de *SCO4849*, por lo que se diseñaron otros vectores derivados de pMS82 para restaurar la expresión de *SCO4849* y producir un fenotipo neutral (González-Quiñónes *et al.*, 2016). Estos vectores (pNG3 y pNG4) se integran también en el sitio Φ BT1 y para su comprobación se diseñaron los cebadores *SCO4848F* y *SCO4848R* (Tabla 6), que amplifican un fragmento de 617 pb sólo si el plásmido está correctamente integrado.

Las reacciones de PCR para la comprobación de las integraciones se prepararon siguiendo las indicaciones de la polimerasa Taq DNA Polymerase (EURx) en un volumen final de 20 μ L por muestra. Para el plásmido integrativo en ϕ C31 (pRASK), el ciclo empleado fue el siguiente: desnaturalización inicial de 95 °C durante 2 min; 30 ciclos de: desnaturalización a 95 °C durante 30 seg, anillamiento a 60 °C durante 30 seg, y extensión a 72 °C durante 70 seg.; y una etapa final de extensión a 72 °C durante 10 min. Para los plásmidos integrativos en ϕ BT1, el ciclo empleado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, anillamiento a 62 °C

durante 1 min, y extensión a 72 °C durante 40 seg; y un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min. En ambos casos, como control negativo se utilizó el ADN cromosómico de la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145.

III.3.4. Edición genética mediante Crispr-Cas9

La creación de mutantes *knockout* se realizó siguiendo el método de Tong *et al.* (2015). Dicho método parte con la construcción de una guía (sgRNA), una secuencia diana de 20 nucleótidos (20nt) específica del gen a suprimir. Esta sgRNA se identifica con una versión modificada del software CRISPRy (http://staff.biosustain.dtu.dk/laeb/crispy_scoeli) (Ronda *et al.*, 2014), donde se recopilan todas las secuencias de 20 nucleótidos de cada gen seguidas de la pauta NGG (siendo N cualquier nucleótido). A continuación, se diseña un cebador *forward* (sgRNA-F), que incluye la siguiente secuencia:

CATGCCATGGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGTTTTAGAGCTAGAAATAGC

donde CCATGG es el sitio de corte de la enzima *NcoI* y la secuencia marcada con equis es la guía sgRNA diseñada sin los tres nucleótidos finales NGG.

La sgRNA se amplifica mediante PCR usando los cebadores *sgRNA-F* (específico de cada gen) y *sgRNA-R* (común en todas las reacciones y con un sitio de corte para la enzima *SnaBI*). Como ADN molde se usa el plásmido pCRISPR-Cas9 original, que contiene la guía completa excepto los 20 nucleótidos que determinan el sitio de corte para la nucleasa Cas9 y que es la única parte variable dependiendo de dónde queremos cortar el genoma. Las reacciones de PCR se prepararon de acuerdo a las especificaciones de la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

(Thermo Scientific) con el siguiente programa: desnaturalización inicial de 98 °C durante 30 seg; 30 ciclos de: desnaturalización a 98 °C durante 10 seg, anillamiento con gradiente de temperatura entre 61 y 72 °C durante 30 seg, y extensión a 72 °C durante 4 seg.; y una etapa final de extensión a 72 °C durante 10 min.

El producto de PCR (110 pb) se purifica usando el kit NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel™), se digiere con los enzimas *NcoI* y *SnaBI* y se clona en el vector pCRIPSR-Cas9 digerido con los mismos enzimas, y siguiendo el protocolo general de clonación (véase apartado III.3.1). Para identificar las construcciones correctas hacemos una PCR con un cebador genérico (*Cas9-1R*) y otro específico de cada construcción que consiste en la secuencia de 20nt diferenciales. Las reacciones de PCR se prepararon según las especificaciones de la polimerasa Taq DNA Polymerase (EURx) con el siguiente programa: desnaturalización inicial de 94 °C durante 2 min; 30 ciclos de: desnaturalización a 94 °C durante 30 seg, anillamiento con a 60 °C durante 30 seg, y extensión a 72 °C durante 60 seg.; y una etapa final de extensión a 72 °C durante 5 min. Dicha PCR dará un fragmento de 113 pb en aquéllas que tengan el fragmento correcto. El plásmido con su sgRNA correspondiente se conserva según los estándares descritos en el apartado III.2.1 y se secuencia usando cebadores específicos para descartar errores.

Una vez que tenemos el plásmido con la sgRNA, se introduce el molde (*overlap*) de ADN para que pueda reparar la rotura de doble cadena. Este molde consiste en la unión mediante PCR de extensión por superposición (OE-PCR) de dos regiones adyacentes (5' y 3', también llamadas *left* y *right* respectivamente) a los extremos del gen a suprimir. Para ello se

METODOLOGÍA

hacen dos PCR, una de la región izquierda y otra de la región derecha adyacente al gen en cuestión, cada una de 1 kb aproximadamente.

Los cebadores con los que se llevará a cabo ambas PCR tendrán, además de la zona necesaria para hibridar con el molde, una cola formada por la secuencia inversa y complementaria del cebador con el que se ha de solapar. De esta forma, el *reverse* de la región 5' constará de una zona de hibridación con el molde más la secuencia inversa y complementaria del *forward* de la región 3', mientras que el *forward* de la región 3' tendrá los nucleótidos necesarios para amplificar la región 3' más las 20 bases correspondientes a la secuencia inversa y complementaria del *reverse* de la región 5' (figura 15).

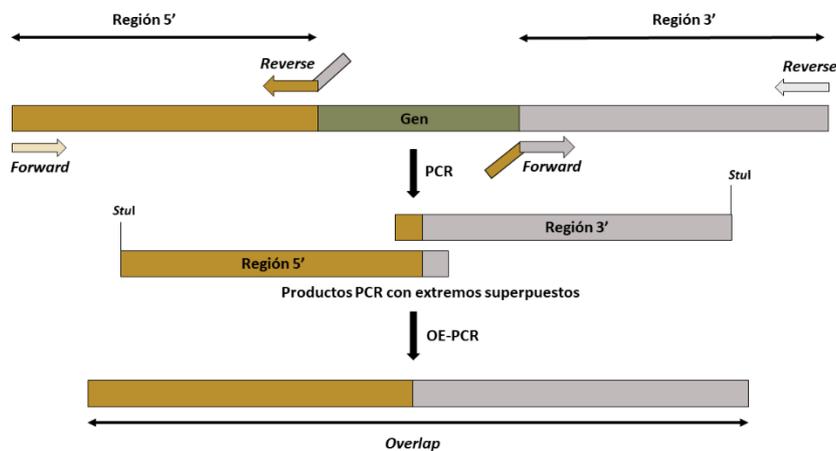


Figura 15. Esquema de construcción del molde (*overlap*) para CRISPR-Cas9.

Tras amplificar por PCR las regiones 5' y 3' por separado, ambos fragmentos se combinan mediante OE-PCR usando los cebadores *forward* de la región 5' y *reverse* de la región 3' y las especificaciones de la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific).

El producto de PCR se purifica, se clona en pCR™-Blunt II-TOPO® (Invitrogen) y se secuencian con los cebadores *M13F* y *M13R* (Tabla 6) para confirmar la ausencia de mutaciones.

A continuación, el inserto se libera de pCR™-Blunt II-TOPO® con *StuI* y se clona en el plásmido pCRISPR-Cas9, también digerido con *StuI*, que contiene la guía. El vector se introduce mediante electroporación en *E. coli* ET12567/pUZ8002 y luego en la cepa salvaje de *S. coelicolor* por conjugación usando un cultivo de 5 mL de la cepa donadora y 10⁸ esporas de la cepa receptora y seleccionando con apramicina y ácido nalidíxico.

Los exconjugantes con el plásmido se seleccionan en placa GYM usando apramicina como resistencia y tioestreptona (concentración de 50 µg/mL) para inducir el promotor *tipA* de la nucleasa Cas9. Tras sembrar parches en placa GYM con ambos antibióticos, y finalmente una placa completa en placas de SFM con los antibióticos de selección, se recogen esporas de cada clon en agua destilada estéril y se siembran diluciones en serie (10⁻⁴ a 10⁻⁶) en placas de SFM sin antibiótico, las cuales se incuban a 40°C durante tres días para eliminar el plásmido, ya que sólo se elimina a temperaturas superiores a 34°C (Tong *et al.*, 2015). Luego se comprueba la pérdida del plásmido sembrando clones en placas GYM con y sin apramicina, de forma que los que hayan perdido el plásmido solo crecen en placas sin antibiótico. Tras realizar nuevos parches en GYM sin antibiótico, se pasan a placa SFM para esporular, se guardan las esporas en glicerol al 30% a -80 °C y se comprueba por PCR la pérdida del plásmido y la delección del gen previa extracción de ADN genómico.

La comprobación de la pérdida de plásmido pCRISPR-Cas9 por PCR se realiza con los cebadores genéricos *Cas9-1F* y *Cas9-1R* (Tabla 6) según las

especificaciones de la polimerasa Taq DNA Polymerase (EURx) y con el siguiente programa: desnaturalización inicial de 94 °C durante 2 min; 30 ciclos de: desnaturalización a 94 °C durante 30 seg, anillamiento a 61,8 °C durante 30 seg, y extensión a 72 °C durante 48 seg.; y una etapa final de extensión a 72 °C durante 5 min. Si no aparece un amplicón de 1450 pb significa que el clon ha perdido el plásmido.

Para la comprobación de la delección de cada gen se usan cebadores específicos y un programa variable según la temperatura de anillamiento óptima para los cebadores y el tiempo de extensión del fragmento a amplificar.

a) Creación del mutante *knockout* en el gen *SCO1758*

Se diseñó una primera guía con los cebadores *sg1758(a)* y *sgRNA-R* (Tabla 6) y se amplificó según lo mencionado en el apartado III.3.4. El producto (110 pb) se digirió con *NcoI* y *SnaBI* y se clonó en el vector pCRISPR-Cas9 entre los sitios *NcoI* y *SnaBI*. Para identificar las construcciones con la sgRNA se realiza una PCR con los cebadores *20nt1758(a)* y *Cas9-1R*.

Para obtener las regiones homólogas que flanquean al gen de interés se diseñaron los cebadores *1758LeftF(a)*, *1758LeftR(a)*, *1758RightF(a)* y *1758RightR(a)* (Tabla 6). Se amplificaron las secuencias flanqueantes 5' (1,11 kb) y 3' (1,14 kb) usando ADN genómico de la cepa salvaje de *S. coelicolor* M145 y la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) con el siguiente programa específico: desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C; 30 ciclos de: desnaturalización de 10 seg a 98 °C, anillamiento con gradiente térmico entre 61 y 72 °C

durante 30 seg, y extensión a 72 °C durante 35 seg.; y una etapa final de extensión de 10 min a 72 °C. A continuación, se realizó una OE-PCR para conseguir el solapamiento de ambas regiones, usando una concentración mínima de 20 ng/μl de ambos productos de PCR purificados y utilizando los cebadores *1758LeftF(a)* y *1758RightR(a)*. Se usó la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) con el siguiente ciclo específico: desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C; 30 ciclos de: desnaturalización de 10 seg a 98 °C, anillamiento con gradiente de temperatura entre 61 y 72 °C durante 30 seg, y extensión a 72 °C durante 1 min 9 seg.; y una etapa final de extensión de 10 min a 72 °C. El producto amplificado (de 2,26 kb) se clonó en PCR™-Blunt II-TOPO®, obteniendo el plásmido “pTOPO overlap1758(a)”, y se comprobó el inserto por secuenciación Sanger. A continuación, el *overlap* se digirió con el enzima *StuI* y se clonó en el plásmido pCRISPR-Cas9 con la guía de *SCO1758*, obteniendo el vector “pCRISPR-SCO1758a” (Tabla 5).

A continuación, se conjuga en la cepa salvaje de *S. coelicolor* y se seleccionan exconjugantes siguiendo el protocolo detallado en el apartado III.3.4. Además de comprobar la pérdida del plásmido con los cebadores generales *Cas9-1F* y *Cas9-1R*, se verificó mediante PCR la delección del gen en los clones positivos con los cebadores específicos *1758Fc(a)* y *1758Rc(a)* (Tabla 6). Para ello, se siguen las indicaciones de la polimerasa Taq DNA Polymerase (EURx) con el siguiente ciclo: desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C; 30 ciclos de: desnaturalización de 30 seg a 95 °C, anillamiento a 64,8 °C durante 30 seg, y extensión de 2 min 20 seg a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C.

La experimentación realizada con la anterior construcción no dio ningún resultado positivo, por lo que se optó por diseñar una segunda

METODOLOGÍA

construcción con una nueva guía y un *overlap* distintos. La nueva guía se amplificó con los cebadores *sg1758(b)* y *sgRNA-R*, siguiendo el protocolo detallado anteriormente, mientras que el *overlap* se amplificó usando los cebadores *1758LeftF(b)*, *1758LeftR(b)*, *1758RightF(b)* y *1758RightR(b)* (Tabla 6). Las nuevas secuencias flanqueantes 5' (1,10 kb) y 3' (1,45 kb) también se amplificaron usando ADN genómico de la cepa salvaje de *S. coelicolor* M145 y la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), pero con un programa específico: desnaturalización de 30 seg a 98 °C; 30 ciclos de: desnaturalización de 10 seg a 98 °C, anillamiento con gradiente de temperatura de 30 seg entre 61 y 72 °C, y extensión a 72 °C durante 35 seg ó 44 seg (5' y 3' respectivamente); y una etapa final de extensión de 10 min a 72 °C. Para crear el *overlap* (2,55 kb) se usó el siguiente ciclo específico: desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C; 30 ciclos de: desnaturalización de 10 seg a 98 °C, anillamiento con gradiente térmico entre 61 y 72 °C durante 30 seg, y extensión a 72 °C durante 1 min 17 seg.; y una extensión final de 10 min a 72 °C.

Al obtener el mismo resultado que con la primera construcción, barajamos la posibilidad de que el proceso de reparación con el *overlap* no se estuviese produciendo debido a la presencia de una región *stem loop* localizada al final del ORF de *SCO1758*. Esta región tiene un 85% de contenido GC y dio problemas a la hora de secuenciar las construcciones anteriores, por lo que decidimos crear una tercera construcción manteniendo la guía de la segunda construcción (hecha con los cebadores *sg1758(b)* y *sgRNA-R*) y cambiando únicamente la región izquierda del *overlap* anterior. Para diseñar el nuevo *overlap* se diseñaron tres nuevos cebadores (*1758LoopLeftF*, *1758LoopLeftR* y *1758LoopRightF*) y se reutilizó el cebador *1758RightR(b)* (Tabla 6). Las

nuevas secuencias flanqueantes 5' (0,97 kb) y 3' (1,45 kb) se amplificaron usando la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) con un programa específico: 30 seg a 98 °C; 30 ciclos de: desnaturalización de 10 seg a 98 °C, anillamiento con gradiente de temperatura de 30 seg entre 61 y 72 °C, y extensión a 72 °C durante 29 seg ó 44 seg (5' y 3' respectivamente); y una extensión final de 10 min a 72 °C. Para crear el *overlap* (2,43 kb) se usó el siguiente ciclo específico: desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C; 30 ciclos de: desnaturalización de 10 seg a 98 °C, anillamiento con gradiente térmico entre 61 y 72 °C durante 30 seg, y extensión a 72 °C durante 1 min 14 seg.; y una extensión final de 10 min a 72 °C. De nuevo no se pudo obtener el mutante, por lo que tal como se discute más adelante, creemos que este gen podría ser esencial.

b) Creación del mutante *knockout* en el gen *SCO0954*

Para realizar el mutante $\Delta SCO0954$, diseñamos una guía con el cebador específico sg0954 y el genérico sgRNA-R (Tabla 6), y se amplificó por PCR. El producto de 110 pb se digirió con *NcoI* y *SnaBI* y se clonó en el vector pCRISPR-Cas9 entre los sitios *NcoI* y *SnaBI*. La identificación del plásmido con la guía se realizó por PCR usando los cebadores *20nt0954* y *Cas9-1R* (Tabla 6).

Las regiones homólogas adyacentes a *SCO0954* se amplificaron por PCR usando los cebadores *0954Left2F*, *0954Left2R*, *0954RightF* y *0954RightR*. Se amplificaron las regiones 5' (1,67 kb) y 3' (1,13 kb) usando ADN genómico de la cepa salvaje de *S. coelicolor* M145 y la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) con el

METODOLOGÍA

siguiente programa específico: desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C; 30 ciclos de: desnaturalización de 10 seg a 98 °C, anillamiento con gradiente térmico entre 61 y 72 °C, y extensión a 72 °C durante 53 seg ó 36 seg (5' y 3' respectivamente); y una extensión final de 10 min a 72 °C.

Luego se realizó una OE-PCR para solapar ambas regiones, usando una concentración mínima de 20 ng/μl de ambos productos de PCR purificados y los cebadores *0954LeftF2* y *0954Right*. Se usó la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) con el siguiente ciclo específico: desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C; 30 ciclos de: desnaturalización de 10 seg a 98 °C, anillamiento con gradiente térmico entre 61 y 72 °C durante 30 seg, y extensión a 72 °C durante 1 min 26 seg.; y una extensión final de 10 min a 72 °C. El producto amplificado (de 2,80 kb) se clonó en PCR™-Blunt II-TOPO®, obteniendo el plásmido “pTOPO-*overlap054*”, y se comprobó el inserto por secuenciación Sanger con los cebadores *M13F* y *M13R* (Tabla 6).

El *overlap* contiene cortes internos *StuI*, por lo que no se pudo usar el enzima para clonar en CRISPR por la técnica habitual. En su lugar, se digirió con *EcoRI* para sacarlo de “pTOPO-*overlap054*” y se usó la nucleasa S1 (Thermo Scientific™) para eliminar los extremos monocatenarios del punto de corte *EcoRI* y generar extremos romos. El inserto digerido se clonó en el plásmido CRISPR con la guía sg0954 digerido con *StuI*, obteniendo el vector “pCRISPR-SCO054” (Tabla 5).

A continuación, se conjugó en la cepa salvaje de *S. coelicolor* y se seleccionaron exconjugantes siguiendo el protocolo detallado en el apartado III.3.4. Además de comprobar la pérdida del plásmido con los cebadores generales *Cas9-1F* y *Cas9-1R*, se verificó mediante PCR la

delección del gen en los clones positivos con los cebadores específicos *0954Fc* y *0954Rc* (Tabla 6). Para ello, se siguieron las indicaciones de la polimerasa Taq DNA Polymerase (EURx) con el siguiente ciclo: desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C; 30 ciclos de: desnaturalización de 30 seg a 95 °C, anillamiento a 58,9 °C durante 30 seg, y extensión de 2 min 32 seg a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C.

III.3.5. Sobreexpresión de los genes *SCO0837*, *SCO0954* y *SCO2795*

Los ORF de *SCO0837*, *SCO0954* y *SCO2795* fueron amplificados mediante PCR usando para cada gen las parejas de cebadores *SCO837F/R*, *SCO0954F/R* y *SCO2795F/R* respectivamente (Tabla 6). Los cebadores incluyen puntos de corte *NdeI* y *SpeI* y se usó ADN cromosómico de la cepa salvaje de *S. coelicolor* M145 como molde. La PCR se preparó según las especificaciones de la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) con el siguiente programa: desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C; 30 ciclos de: desnaturalización de 10 seg a 98 °C, anillamiento con gradiente térmico entre 70 y 72 °C durante 30 seg, y extensión a 72 °C durante 8 seg (para *SCO0837*), 15 seg (para *SCO0954*) y 42 seg (para *SCO2795*).; y una etapa final de extensión de 10 min a 72 °C. Los productos se clonan por separado en el vector PCR™-Blunt II-TOPO® y se obtuvieron los plásmidos “pTOPO-SCO0837”, “pTOPO-SCO054” y “pTOPO-SCO2795”, que fueron comprobados por secuenciación Sanger con los cebadores *M13F* y *M13R*.

A continuación, los genes *SCO0837*, *SCO0954* y *SCO2795* se sacaron de los vectores “pTOPO-SCO0837”, “pTOPO-SCO054” y “pTOPO-SCO2795” mediante digestión con las enzimas *NdeI* y *SpeI* y se clonaron entre los

sitios *NdeI* y *SpeI* del plásmido integrativo pNG4, que incluye el promotor fuerte constitutivo *PerME** (González-Quiñónez *et al.*, 2016). El proceso de clonación siguió el protocolo descrito en el apartado III.3.1, obteniendo las construcciones finales “pNG4-SCO0837”, “pNG4-SCO0954” y “pNG4-SCO2795”.

III.3.6. Reducción de la traducción del gen *SCO0698* mediante la expresión de ARN antisentido

Para el gen *SCO0698* se sobreexpresó el ARN antisentido con el fin de generar mutantes *knockdown*. Se diseñaron cebadores que amplificasen la hebra antisentido. La amplificación por PCR se realizó usando los cebadores *SCOas0698F/R*, que incluyen puntos de corte *MluI* y *SpeI* en los oligos *Forward* y *Reverse* respectivamente, y se siguieron nuevamente las indicaciones de la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) con el siguiente programa: desnaturalización inicial de 30 seg a 98 °C; 30 ciclos de: desnaturalización de 10 seg a 98 °C, anillamiento con gradiente térmico entre 70 y 72 °C durante 30 seg, y extensión a 72 °C durante 12 seg; y una etapa final de extensión de 10 min a 72 °C. El producto se clona en el vector PCR™-Blunt II-TOPO® y se obtuvo el plásmido “pTOPO-asSCO0698”, que fue comprobado por secuenciación Sanger con los cebadores *M13F* y *M13R*.

Después, el gen codificando el ARN antisentido de *SCO0698* se sacó de la construcción “pTOPO-asSCO0698” mediante digestión con las enzimas *MluI* y *SpeI* y se clonó entre los mismos sitios de corte en una modificación de pNG4 que incluye el promotor fuerte y constitutivo SP44. Se subcontrató la síntesis del fragmento *NdeI* – fd-ter terminator –

SP44-RBS SR41 – *XhoI* – *NdeI* a BGI Genomics (Bai *et al.*, 2015). El terminador fd-ter se incluyó aguas arriba del promotor SP44 para prevenir la posible interferencia del promotor PermE* presente en el pNG4 original (Tabla 4). El sitio de unión ribosomal (RBS) SR41 no es necesario para la expresión del ARNm antisentido, pero se incluyó para el posible uso del plásmido en la sobreproducción de proteínas. La secuencia sintetizada se clonó en el punto de corte *NdeI* y su orientación correcta se comprobó mediante secuenciación Sanger usando los cebadores *SP44F* y *SP44R* (Tabla 6).

Tabla 7. Secuencia sintetizada del promotor SP44. En rojo se muestra el punto de corte *NdeI*, en azul la secuencia del terminador fd-ter, en verde la secuencia del promotor SP44, y en naranja la secuencia del sitio de unión ribosomal SR41 (RBS SR41).

SP44: *NdeI* + fd-ter + SP44 + RBS SR41 + *XhoI* + *NdeI*

CATATGCTCTAAAGTTTTGTCGCTTTCCAGACGTTAGTAAATGAATTTTCTG
TATGAGGTTTTGCTAAACAACCTTCAACAGTTTCAGCGGAGTGAGAATAG
AAAGGAACAACCTAAAGGAATTGCGAATAATAATTTTTTACGTTGAAAATC
TCCAAAAAAAAGGGCTCCAAAAGGAGCCTTAATTGTATCGGTTTATCAG
CTTGCTTTCGAGGTGAATTTCTTAAACAGCTTGATACCGATAGTTGCGCCG
ACAATGACAACAACCATCGCCCACGCATAACCGATATATTCGGTCGCTGA
GGCTTGCAGGGAGTCAAAGGCCGCTTTTGCGGGATGTTACATTGGAACC
GTCTCTGCTTTGACAACATGCTGTGCGGTGTTGTAAAGTCTGGTGTATCT
AAGTAAGGAGTAGGCTGCTCGAGCATATG

La integración final de la construcción en *S. coelicolor* se comprobó mediante PCR usando los cebadores *SCO4848F* y *SCO4848R* en las condiciones descritas en el apartado III.3.3. Se analizó su ciclo de desarrollo y la producción de antibiótico de las cinco cepas de sobreexpresión tal y como se detalla en el apartado III.2.1.

Del total de los cuatro mutantes creados, solo la sobreexpresión de *SCO0954* en la cepa salvaje de *S. coelicolor* dio un fenotipo distintivo con la formación de hifas hinchadas y células similares a protoplastos a las 48 horas de desarrollo, que se detallará en la sección de Resultados.

III.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

III.4.1. Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario (ADNc)

La extracción de ARN de las cepas objeto de estudio comenzó con la recolección de micelio a partir de cultivos sólidos en intervalos de tiempo determinados. El micelio se raspa de cultivos sólidos en placas con celofán y se resuspende en RNAProtect™ Bacteria Reagent (QIAGEN), se da un vortex y se deja 5 min a temperatura ambiente antes de centrifugar a 16,000 g durante 5 min y decantar el sobrenadante. El micelio tratado se conserva a -80°C hasta su uso.

El ARN total se extrajo utilizando el kit Direct-zol™ RNA Miniprep Plus (Zymo Research™) incluyendo un tratamiento con fenol ácido. Para eliminar el ADN cromosómico se realizan dos tratamientos: el primero, con DNase I (incluido en el kit anterior), y el segundo, con TURBO DNA-free™ (Invitrogen), aplicado al ARN en solución al finalizar la extracción. La cantidad e integridad de las muestras de ARN se midió con Nanodrop

ND2000 (Thermo Scientific) y 2100 Bioanalyzer (Agilent) respectivamente. Se realizan dos réplicas biológicas por cada muestra.

A continuación, se sintetiza ADNc a partir del ARN usando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™). Las reacciones se preparan en un volumen final de 30 µL usando las siguientes cantidades de producto: 3 µL 10X RT Buffer, 1,2 µL 25X 100 mM dNTP Mix, 3 µL 10X RT Random Primers, 1,5 µL MultiScribe™ Reverse Transcriptase y 1,5 µg de ARN molde, más H₂O para PCR libre de DNasa-RNasa (Sigma-Aldrich) hasta completar volumen. El programa de PCR usado incluye un primer paso de 25°C durante 10 min, un segundo paso de 2 horas a 37°C y un último paso de 5 min a 85°C, siguiendo las indicaciones del kit. El ADNc se guarda a -20°C hasta su uso.

III.4.2. PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR)

Previo a la realización de la RT-qPCR se mide la eficiencia de cada pareja de cebadores a usar creando curvas de cuantificación estándar para el gen de interés. Estas curvas se realizan mediante la amplificación de cantidades conocidas de ADN genómico, el cual se utiliza como molde (Rutledge and Cote, 2003). Para ello se amplifica el producto de interés con los cebadores específicos del gen cuya expresión se va a medir y usando la polimerasa Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). El producto se aísla en un gel de agarosa (2%), se purifica y se cuantifica en un equipo Nanodrop ND2000 (Thermo Scientific). A continuación, se preparan las diluciones correspondientes para realizar la curva estándar del gen en cuestión. Todas las curvas estándar utilizadas tuvieron un coeficiente de correlación lineal superior a 0,99.

METODOLOGÍA

Las RT-qPCR se llevan a cabo en un sistema de detección fluorescente FQD-96A (BIOER). Las reacciones se realizaron por triplicado, utilizando 2 μ L de cDNA, 10 μ L de PowerTrack™ SYBR Green Master Mix (ThermoFisher) y 300 nM de cebadores específicos (ver Tabla 6) en un volumen final de 20 μ L. La contaminación de ARN y la posible formación de dímeros se probaron en controles negativos reemplazando el cDNA con ARN o H₂O para PCR libre de DNAsa-RNasa. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, 40 repeticiones de 15 seg a 95 °C y 1 min a 60 °C.

La significación estadística se determinó comparando la abundancia de transcritos utilizando una prueba t de muestras emparejadas, estableciendo el umbral de significancia en un p-valor menor o igual 0,05.

III.4.3. Análisis de la expresión génica mediante transcriptómica (RNAseq)

Se realizó un análisis transcriptómico (RNAseq) del mutante *ftsZ* de *S. coelicolor* (McCormick *et al.*, 1994), para ver si la mutación en *ftsZ* podría estar afectando genes importantes de la división celular. Comparamos las diferencias en la expresión de genes entre el mutante y la cepa silvestre de *S. coelicolor*. Para ello se partió de una secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing, NGS) de ambas cepas, usando dos réplicas biológicas de cada una. El mutante *ftsZ* fue crecido durante 24h en cultivo sólido GYM, mientras que la cepa salvaje de *S. coelicolor* se cultivó durante 16h y 72h en el mismo medio.

La secuenciación fue llevada a cabo por Stab Vida (Caparica, Portugal). El ARN ribosómico se eliminó con el kit Ribo-Zero Bacterial Kit (Illumina), y

la construcción de la biblioteca de ADNc se llevó a cabo con el kit TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina). El ADN fue secuenciado con el sistema Illumina HiSeq 2500 usando lecturas de secuenciación de extremos emparejado de 100 pb (al menos 20M de lecturas por muestra). El análisis bioinformático se realizó con el sistema operativo Linux usando el siguiente software: FastQC para comprobar la calidad de las secuencias, Cutadapt para recortar secuencias, Bowtie2 para mapear con el genoma de *S. coelicolor* y Cuffdiff para análisis de expresión diferencial (Trapnell *et al.*, 2012).

III.5 TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

III.5.1. Tinción de viabilidad

Para la observación de la viabilidad celular, las células se tiñeron con SYTO9 y yoduro de propidio (IP) usando el *Live/DEAD BacLight Bacterial Viability kit* de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, para cultivos líquidos se mezcló un volumen de cultivo con un volumen de la mezcla de colorantes (al doble de la concentración final recomendada), se incubó 2 minutos a temperatura ambiente y se observó al microscopio. Para cultivos sólidos, se añadió suficiente mezcla de colorante para cubrir las células, sobre celofán recortado y cubierto por el micelio crecido, o sobre micelio recogido con una espátula plana de placas sembradas con celofán. Las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia Nikon eclipse Ci-L equipado con una unidad de iluminación CoolLED pE-300White y una cámara Nikon DS-Fi3 con un filtro FITC-A-Basic000 (Semrock) (excitación 450–490 nm y 505–560 nm de emisión) o en el microscopio láser confocal (Leica TCS-SP8) utilizando

longitudes de onda de 488 nm y 568 nm para la excitación y de 530 nm (verde) o 640 nm (rojo) para la emisión (Manteca *et al.*, 2008).

III.5.2. Construcción y visualización de cepas expresando las proteínas mCherry y eGFP

a) Construcción de una cepa de *S. coelicolor* expresando la proteína SCO1758 unida a proteína fluorescente mCherry

Para analizar la dinámica de SCO1758, decidimos fusionar el ORF de SCO1758 con el ORF de *mCherry* bajo el control de los promotores nativos P1 y P2 descritos en el clúster génico de SCO1760 por Jeong *et al.* (2016). El gen SCO1758 sin el codón de stop, junto con su región 5' que alberga el promotor de este gen (P2), se amplificó con los cebadores P2-1758F y P2-1758R, flanqueados por los sitios de corte BglII y XhoI respectivamente, y se clonó en PCR™-Blunt II-TOPO®. Por otra parte, una región de ADN anterior al ORF de SCO1760, de aproximadamente 600 pb, lo suficientemente larga como para incluir la región promotora P1, se obtuvo digiriendo el plásmido “pNG3-1760” (Tabla 5) con las enzimas SpeI y BglII y se clonó en el vector “pTOPO-P2-1758” digerido con las mismas enzimas, generando el plásmido “pTOPO-P1-P2-1758”. Este vector fue secuenciado con los cebadores M13F y M13R para verificar la ausencia de mutaciones.

A continuación, la secuencia completa (P1-P2-1758) fue cortada con las enzimas SpeI y XhoI y clonada en un plásmido pNG3-mCherry digerido con las mismas enzimas, uniendo el gen en pauta de lectura con mCherry. La secuencia de aminoácidos de mCherry fue tomada del GenBank (n° UFQ89828) adaptando el sesgo de codones a *Streptomyces*,

utilizando para ello la tabla de codones utilizados en 100 cepas de *Streptomyces* reportada en Kieser (2000). mCherry fue sintetizado en BGI Genomics (Hong Kong) para un trabajo previo de nuestro grupo (Fernández-García *et al.*, 2022). Finalmente, la construcción [pNG3 P1-P2-SCO1758-mCherry] se introdujo mediante conjugación en la cepa salvaje de *S. coelicolor*. Además, para estudiar la dinámica de SCO1758 y su posible interacción con FtsZ, conjugamos la construcción anterior en *S. coelicolor* FM145 portando *ftsZ-eGFP*, una cepa de baja autofluorescencia creada por Willemse and van Wezel (2009) que expresa FtsZ-eGFP.

b) Construcción de una cepa de *S. coelicolor* expresando la proteína SCO0954 unida a proteína fluorescente mCherry

De forma similar a lo realizado con el gen *SCO1758*, fusionamos el ORF de *SCO0954* sin el codón de stop con el ORF de *mCherry* para evaluar su dinámica mediante microscopía de fluorescencia. El gen *SCO0954* sin el codón de stop se amplificó con los cebadores *0954-mCherryF* y *0954-mCherryR* (Tabla 6), flanqueados por los sitios de corte *SpeI* y *XhoI* respectivamente, y se clonó en PCR™-Blunt II-TOPO®. La ausencia de mutaciones se comprobó por secuenciación con los cebadores *M13F* y *M13R* (Tabla 6). A continuación, el inserto se liberó del vector “pTOPO-SCO0954” con los enzimas *SpeI* y *XhoI* y se clonó en un plásmido pNG3-mCherry digerido con los mismos enzimas, uniendo el gen en pauta de lectura con mCherry y creando el vector “pNG3-0954mCherry” (Tabla 5). La construcción se introdujo por conjugación en la cepa salvaje de *S. coelicolor*. Al igual que con *SCO1758*, también se conjugó la construcción

anterior en *S. coelicolor* FM145 (Willemse and van Wezel, 2009), para estudiar su posible interacción con *ftsZ*.

c) Construcción de una cepa de *S. coelicolor* expresando la proteína SCO4440 unida a proteína fluorescente mCherry

El gen *SCO4440* sin el codón de stop se amplificó siguiendo la misma técnica descrita en el apartado anterior, mediante amplificación por PCR con los cebadores *4440-mCherryF* y *4440-mCherryR* (Tabla 6) flanqueados por los sitios de corte *SpeI* y *XhoI* respectivamente, y clonación en PCR™-Blunt II-TOPO®. La ausencia de mutaciones se comprobó por secuenciación con los cebadores *M13F* y *M13R* (Tabla 6). A continuación, el inserto se liberó de la construcción “pTOPO-SCO4440” con los enzimas *SpeI* y *XhoI* y se clonó en un plásmido pNG3-mCherry digerido con los mismos enzimas, uniendo el gen en pauta de lectura con mCherry y creando el vector “pNG3-4440mCherry” (Tabla 5). La construcción se introdujo por conjugación en la cepa salvaje de *S. coelicolor* y en la cepa de baja autofluorescencia *S. coelicolor* FM145, creada por Willemse and van Wezel (2009).

d) Visualización de cepas expresando las proteínas mCherry y eGFP

Las cepas expresando las proteínas mCherry y eGFP fusionadas con las proteínas cuya dinámica queremos observar se analizaron al microscopio de fluorescencia Leica DMRXA equipado con filtros para FITC y Texas Red. Las cepas se inocularon en placas SFM suplementado con 0,64M sacarosa y sin celofán y se colocaron cubreobjetos en un ángulo de 45 grados. En los tiempos indicados, se quitaron los cubreobjetos, se

montaron en portaobjetos con agua destilada estéril y se observaron al microscopio. Las imágenes se tomaron con una cámara ORCA-Flash4.0 V3 Digital CMOS acoplada al microscopio de fluorescencia.

Se utilizaron cultivos de la cepa salvaje de *S. coelicolor* que no expresaban eGFP o mCherry como controles negativos para fijar los niveles de autofluorescencia. Las imágenes de microscopía se procesaron (se ajustaron los niveles de intensidad del histograma y se agregó la escala) utilizando el software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012).

III.5.3. Técnicas de *time-lapse*

Los experimentos de *time-lapse* fueron realizados en cultivos sólidos en medio GYM o SFM suplementados con 0,64M sacarosa, al cual se añadió SYTO9 (Thermo) y FM5-95 (Thermo) a unas concentraciones finales de 0,5 $\mu\text{mol/L}$ y 6,98 $\mu\text{mol/mL}$ respectivamente. Se inocularon $3,5 \cdot 10^6$ esporas frescas en placas de Petri de $\varnothing 55$ mm cubiertas con celofán y se incubaron a 30°C el tiempo requerido. Los celofanes se recortaron, se colocaron invertidos en placas de cultivo de 35 mm (Ibidi GmbH) con un disco de medio fresco suplementado con SYTO9 y FM5-95. La tapa se colocó dejando rendijas que permitían la ventilación. Las imágenes del *time-lapse* se tomaron con el microscopio láser confocal Leica TCS-SP8 cada 13-15 minutos durante 17 horas a 30°C utilizando longitudes de onda de 488 nm (SYTO9) y 522 nm (FM5-95) para la excitación y de 530 nm (SYTO9) o 782 nm (FM5-95) para la emisión. Para minimizar la desviación focal, se equilibró la pletina del microscopio y la cámara de imágenes durante 3 horas a 30°C antes de obtener las imágenes.

III.5.4. Tinción de pared celular con aglutinina de germen de trigo (WGA)

Las paredes celulares se tiñeron con aglutinina de germen de trigo (WGA) conjugada con Alexa Fluor® 488 (verde) (Invitrogen), que se une selectivamente a la N-acetilglucosamina y al ácido N-acetilmurámico. Después de crecer cepas de *Streptomyces* en placas con celofán, se raspa el micelio y las células se fijan con PBS (0,14 M NaCl, 2,6 mM KCl, 1,8 mM KH₂PO₄ y 10 mM Na₂HPO₄) suplementado con 2,8% de paraformaldehído y 0,0045% de glutaraldehído durante 15 min a temperatura ambiente, se lavan dos veces con PBS y se incuban durante 1 min en GTE (50 mM glucosa, 20 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA) con 2 mg/mL lisozima.

Las muestras se lavan con PBS y se bloquean con 2% BSA en PBS durante 5 min. El WGA se añade a una concentración de 100 mg/mL en PBS con 2% BSA y se incuba a temperatura ambiente en oscuridad durante 3 horas. Finalmente, se hacen ocho lavados con PBS, se añade FM5-95 (Thermo) en PBS en una concentración de 3,95 µg/mL y se observa al microscopio láser confocal utilizando longitudes de onda de 498 nm (WGA) y 522 nm (FM5-95) para la excitación y de 520 nm (WGA) y 782 nm (FM5-95) para la emisión. Todas las soluciones se suplementaron con 103 g/L sacarosa para preservar la estabilidad de las células sin pared.

III.5.5. Cuantificación del tamaño de células deficientes de pared

Para la medida del tamaño de las células deficientes de pared observadas en los mutantes de *S. coelicolor* se realizó una macro en el programa de análisis de imágenes Fiji (Schindelin *et al.*, 2012). La macro utiliza el *plugin* stardist (Schmidt *et al.*, 2018) para detectar las células en las imágenes obtenidas con el microscopio láser confocal. Una vez detectadas, es

posible eliminar de forma manual aquellas zonas que no sean vesículas. Finalmente, se realiza la medida de los siguientes parámetros para cada vesícula: área, perímetro, forma circular, Feret, Feret Min, Aspect Ratio, Round y Solidity.

III.6. DISEÑO DE LAS CONSTRUCCIONES DE COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES *SCO1760::Tn5* y *SCO4439::Tn5062*

III.6.1. Complementación del mutante *SCO1760::Tn5*

Creamos tres plásmidos para complementar el fenotipo del mutante *SCO1760::Tn5*: el primero alberga solo el gen *SCO1760*; el segundo, los genes *SCO1760* y *SCO1759*; y el tercero, los genes *SCO1760*, *SCO1759* y *SCO1758*. Dichas construcciones albergan también una región 5' lo suficientemente grande como para acomodar el promotor P1 (figura 16).

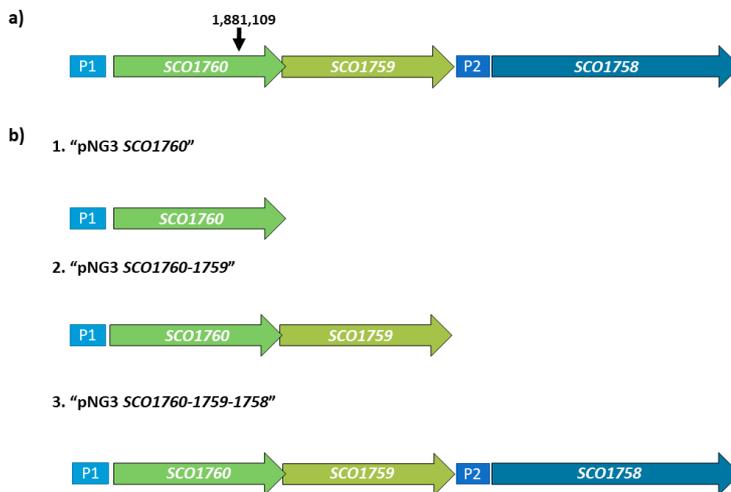


Figura 16. Región génica de *SCO1760* y construcciones de complementación. (a) Esquema representativo de la posición del operón *SCO1760-1758* con el sitio de inserción de *Tn5* y los promotores P1 y P2. (b) Construcciones de complementación del mutante *SCO1760::Tn5*.

a) Construcción “pNG3 SCO1760”

Se amplificó por PCR el ORF de *SCO1760* más una región 5' de 200 pb que incluye el promotor P1 (928 pb en total) usando los cebadores *SCO1760F* y *SCO1760R* (Tabla 6), que incluyen respectivamente secuencias de corte *EcoRV* y *SpeI*. La reacción de PCR incluyó ADN cromosómico de la cepa salvaje de *S. coelicolor* M145 como molde y se preparó siguiendo las especificaciones de la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) con el siguiente programa: desnaturalización inicial de 98 °C durante 30 seg; 30 ciclos de: desnaturalización a 98 °C durante 10 seg, anillamiento con gradiente de temperatura entre 61 y 72 °C durante 30 seg, y extensión a 72 °C durante 27 seg.; y una etapa final de extensión a 72 °C durante 10 min. El producto se clonó en el vector PCR™-Blunt II-TOPO® y se obtuvo el plásmido “pTOPO *SCO1760*”, que fue comprobado por secuenciación con los cebadores *M13F* y *M13R*.

A continuación, el gen *SCO1760* se extrajo de “pTOPO *SCO1760*” mediante digestión con las enzimas *SpeI* y *EcoRV* y se clonó entre los sitios *SpeI* y *EcoRV* de pNG3 siguiendo el proceso de clonación habitual (véase apartado III.3.1), obteniendo la construcción “pNG3 *SCO1760*”.

b) Construcción “pNG3 SCO1760-1759”

Para la segunda construcción de complementación se amplificó el ORF de *SCO1760* y *SCO1759* más la región promotora P1 (1587 pb en total) usando los cebadores *SCO1760F* y *SCO1759R* (Tabla 6), que incluyen las secuencias de corte *EcoRV* y *SpeI* respectivamente. La reacción de PCR sigue los mismos pasos de la construcción anterior con el siguiente programa específico: desnaturalización 10 seg a 98 °C, anillamiento con

gradiente de temperatura entre 61 y 72 °C durante 30 seg, y extensión de 47 seg a 72 °C; y una etapa final de extensión de 10 min a 72 °C. El producto se clonó en el vector PCR™-Blunt II-TOPO® y se obtuvo el plásmido “pTOPO *SCO1760-1759*”, que fue comprobado por secuenciación con los cebadores *M13F* y *M13R*.

A continuación, el ORF *SCO1760-SCO1759* se extrajo de “pTOPO *SCO1760-1759*” mediante digestión con las enzimas *SpeI* y *EcoRV* y se clonó entre los sitios *SpeI* y *EcoRV* de pNG3, obteniendo la construcción “pNG3 *SCO1760-1759*”.

c) Construcción “pNG3 *SCO1760-1759-1758*”

Para la tercera y última construcción de complementación se amplificó el ORF de *SCO1760*, *SCO1759* y *SCO1758*, con las regiones promotoras P1 y P2 (3160 pb en total) usando los cebadores *SCO1760F* y *SCO1758R* (Tabla 6), que incluyen los puntos de corte *EcoRV* y *SpeI* respectivamente. La reacción de PCR sigue los mismos pasos de las construcciones anteriores con el siguiente programa específico: desnaturalización 10 seg a 98 °C, anillamiento con gradiente térmico entre 61 y 72 °C durante 1 min 34 seg, y extensión de 47 seg a 72 °C; y una etapa final de extensión de 10 min a 72 °C. El producto se clonó en el vector PCR™-Blunt II-TOPO® y se obtuvo el plásmido “pTOPO *SCO1760-1759-1758*”, que fue comprobado por secuenciación con los cebadores *M13F* y *M13R*.

A continuación, el ORF *SCO1760-1759-1758* se extrajo de “pTOPO *SCO1760-1759-1758*” mediante digestión con las enzimas *SpeI* y *EcoRV* y se clonó entre los sitios *SpeI* y *EcoRV* de pNG3, obteniendo la construcción “pNG3 *SCO1760-1759-1758*”.

III.6.2. Complementación del mutante *SCO4439::Tn5062*

a) Diseño de “pRASK *SCO4439*”

La secuencia de *SCO4439* con su promotor (3,11 kb) se digirió con las enzimas *EcoRV* y *SpeI* del vector “pTOPO *SCO4439*” (realizado anteriormente por nuestro grupo de investigación) (Rioseras *et al.*, 2016) y se clonó en el plásmido pRASK digerido con las mismas enzimas, obteniendo la construcción “pRASK *SCO4439*”.

b) Diseño de “pRASK *SCO4440-4441-4442*”

La secuencia de *SCO4440*, *SCO4441* y *SCO4442* (2,71 kb) se extrajo mediante digestión enzimática con *EcoRV* y *SpeI* de “pTOPO *SCO4440-41-42*” (también creado anteriormente por nuestro grupo) (Rioseras *et al.*, 2016) y se clonó en pRASK digerido con las mismas enzimas, obteniendo la construcción “pRASK *SCO4440-41-42*”.

III.7. ESTUDIO DE LA PARED CELULAR

III.7.1. Extracción del peptidoglicano y tratamiento con FDNB

El protocolo descrito por Atrih *et al.* (1996) para analizar el *cross-linking* del PG en las esporas de *B. subtilis* fue adaptado en un trabajo previo de nuestro grupo para esporas de *S. coelicolor* (Rioseras *et al.*, 2016). Este protocolo permite el análisis del PG en las esporas de *Streptomyces*, pero no en el micelio, quizás debido a la dificultad para homogeneizar los densos gránulos del micelio, lo que hace que el PG sea poco accesible a la extracción y al tratamiento con FDNB.

Para nuestro trabajo, se recogieron esporas de placas SFM en agua destilada estéril y se incubó una concentración de 3 mg de peso seco por mL de buffer de extracción (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 4% [wt/vol] SDS, 30 mM ditioneitol, 2 mM EDTA) a 100°C durante 16 min. Las esporas extraídas se lavaron cinco veces en agua destilada caliente (37°C), se centrifugaron (14,000 g, 8 min) y resuspendieron para eliminar restos de SDS. A continuación, se incubaron durante 6 min a 90°C con 5% (vol/vol) ácido tricloroacético, se lavaron una vez y se incubaron en 6 mL de 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) con pronasa (2 mg/mL, autodigerida a 37°C durante 1 hora) a 60 °C durante 90 min. Luego, se incubaron en un buffer de extracción (a pH 7.0) a 100°C durante 16 min y se volvieron a lavar como se describió anteriormente. Finalmente, la pared extraída se resuspendió en agua destilada estéril y se guardó a -20°C.

El tratamiento con FDNB se realizó usando 200 µL de la pared extraída (6 mg/mL) siguiendo el protocolo de Margot *et al.* (1991) con modificaciones. Para 200 µL de muestra se añadieron 300 µL NaHCO₃, 125 µL bórax 5% y 62,5 µL FDNB (130 µL del stock diluido en 10 mL etanol 100%) y se incuban a 60°C durante 30 min con agitación. En las muestras de pared sin tratar se sustituye el FDNB por etanol 100%. A continuación, las muestras se lavan 3 veces con agua destilada, se centrifugan (14,000 g durante 8 min) y se hidrolizan mediante incubación a 110 °C durante 16 horas con 200 µL HCL 4N. El sobrenadante se recoge y se seca al vacío.

III.7.2. Cuantificación del *cross-linking* y de metionina del peptidoglicano

El índice *cross-linking* definido en el protocolo de Atrih *et al.* (1996) está basado en la diferencia entre los valores de ácido diaminopimérico (Dpm) medidos en las muestras tratadas y no tratadas con FDNB para *B. subtilis*. El tratamiento con FDNB se realiza antes de la hidrólisis del PG y bloquea los grupos NH de los residuos de Dpm que no han formado enlaces cruzados. Estos grupos NH bloqueados con FDNB no pueden reaccionar con el orto-ftalaldehído (OPA) utilizado para la detección en el HPLC.

En el caso de *S. coelicolor*, el *cross-linking* en el PG está formado por residuos de glicina (Gly) en lugar de Dpm (Hugonnet *et al.*, 2014). Debido a ello, el índice de *cross-linking* para este trabajo se calculó como la relación entre la Gly unida (detectada en las muestras tratadas con FDNB) y la Gly total (detectada en las muestras no tratadas). Se usó el Dpm para normalizar las mediciones de glicina (expresadas como una proporción de Dpm). Gly, Dpm y Met se midieron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando derivatización previa a la columna con OPA y detección UV a 338 nm.

El equipo de cromatografía usado fue un sistema Agilent 1260 Infinity LC equipado con una columna analítica RP-18 HPLC (250 × 4.0 mm, Pursuit® XRs, 5 µm, Agilent Technologies). El equipo de cromatografía se acopló a un detector DAD ajustado a 338 nm. La fase móvil se compuso del buffer A (10 mM fosfato de sodio dibásico dihidrato, 10 mM tetraborato de sodio y 5 mM azida sódica), filtrado (0,45 µm) antes de su uso, y del buffer B (metanol:acetonitrilo:agua; 45:45:10, v/v/v). Las muestras se eluyeron usando el siguiente programa: 0–2.67 min (5% B), 2.67–22.67 min (5–72% B), 22.67–28 min (72% B), 28–29 min (72–5%) y 29–32 min

(5%). La temperatura de la columna se mantuvo a 40°C, el caudal a 1,5 mL/min y el volumen de carga se fijó en 30 µL. Los datos se analizaron utilizando el programa Compass DataAnalysis 4.3 (Bruker). Se procesaron tres réplicas biológicas por cepa.

La significación estadística se determinó comparando los resultados obtenidos mediante una prueba t. Las diferencias se consideraron significativas si tienen un p-valor (bilateral) igual o inferior a 0,05 y al menos un 15% de variación respecto a la cepa de referencia. Como patrones se utilizaron Gly, Dpm, Met, Met sulfóxido, Met sulfona y Met sulfoximina puras (Sigma-Aldrich).

III.7.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de vancomicina

Se estudió la resistencia de varios mutantes de *S. coelicolor* y la cepa salvaje frente a la vancomicina, un antibiótico que inhibe la biosíntesis de la pared celular al unirse a la D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala) terminal de la cadena lateral de aminoácidos del peptidoglicano, impidiendo con ello que la transpeptidasa forme enlaces cruzados en el peptidoglicano (Reynolds, 1989). Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC en inglés) de la vancomicina (Sigma-Aldrich V1130) en cultivos sólidos en GYM añadiendo concentraciones crecientes de vancomicina. Se inocularon 10^5 esporas/placa y se incubaron a 30°C hasta la observación de colonias. La MIC se determinó como la concentración más baja del antibiótico que inhibe el crecimiento visible de *S. coelicolor* en tres réplicas biológicas. Los experimentos fueron muy reproducibles, con una variación de cero.

III.8. FOSFOPROTEÓMICA

III.8.1. Extracción proteica

El análisis del fosfoproteoma de *S. coelicolor* se realizó en dos etapas claves de su ciclo de desarrollo: la fase de sustrato vegetativo (30h) y la fase de micelio aéreo esporulante (65h). El crecimiento de *S. coelicolor* se realizó en medio sólido GYM siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.1.5, y en los tiempos mencionados se recogió el micelio con una espátula plana. En el caso de *E. coli*, se utilizó la cepa W3110 y se creció a 37°C con agitación en medio mínimo líquido M9, que consta de sales M9 (6 g/L Na₂HPO₄, 3 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L NaCl, 1 g/L NH₄Cl) suplementado con 0,5% (p/v) de glucosa, 1 mM MgSO₄ y 0,1 mM CaCl₂. Las células se recogieron mediante centrifugación en fase estacionaria (OD₆₀₀ = 1,0) y se lavaron tres veces con PBS frío.

La extracción proteica se realizó siguiendo el protocolo descrito por Potel *et al.* (2018) para *E. coli* con modificaciones. El micelio recogido se lavó tres veces con PBS frío (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 2 mM y Na₂HPO₄ 10 mM pH 7,4) y se centrifugó a 13,000 g a 4°C antes de resuspender el pellet en 8 mL de buffer de lisis, que contiene 100 mM Tris-HCl pH 8.5 (Acros-Organics), 8M urea (Acros Organics), 1,5% sodio desoxicolato (SDC, Sigma-Aldrich), 5 mM clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, Sigma-Aldrich), 30 mM 2-cloroacetamida (CAA, Acros Organics), 10 U/mL DNasa I (Invitrogen), 1 mM ortovanadato de sodio (Sigma-Aldrich), 100 mM ácido okadaico, complete mini EDTA free (Roche) + phosSTOP (Roche).

Luego se rompió con un sonicador (MSE Sonirep 150) en un baño de hielo durante 45 min en ciclos de 20 seg de potencia y 40 seg de descanso (tiempo total aproximado: 2 h 20 min). Los restos celulares se eliminaron

mediante centrifugación a 18,000 g durante 1h a 4°C y el sobrenadante se diluyó tres veces usando buffer de dilución, que contiene 100 mM Tris-HCl, 5 mM TCEP, 30 mM CAA, 1 mM cloruro de magnesio (Acros Organics) e inhibidores de proteasas y de fosfatasas. A continuación, se agregó 1% benzonasa (Merck Millipore) y se incubó 2h a temperatura ambiente. Una alícuota se separó para determinar la concentración de proteína mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Las proteínas se separaron mediante precipitación con cloroformo/metanol. Una parte de muestra se mezcló con cuatro partes de metanol (VWR), una parte de cloroformo (Acros Organics) y tres partes de agua destilada, se centrifugaron durante 10 min a 5000 rpm a temperatura ambiente y se descartó la fase superior (metanol y agua). La fase inferior se mezcló con tres partes de metanol, se sonicó 10 min y se centrifugó otra vez. Se eliminó el disolvente, el pellet se dejó secar al aire y se resuspendió en buffer de digestión, que contiene 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 1% SDC, 5 mM TCEP y 30 mM CAA.

III.8.2. Digestión, desalado y cuantificación de proteína

La concentración de proteína se estimó usando el kit Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Las proteínas se digirieron a temperatura ambiente con 5% (W/W) tripsina (Promega) y 1% (W/W) Lys-C (Wako). Tras la digestión, el SDC se precipitó acidificando a pH 3,5 con 10% ácido fórmico (Sigma Aldrich) y centrifugando a 14,000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se desaló en un cartucho tC18 Sep-Pak (Waters) previamente acondicionado con 95% acetonitrilo (MeCN, Sigma Aldrich) y luego equilibrado con 0,1% FA. La columna se

lavó dos veces con 0,1% FA y los péptidos se eluyeron con 30% MeCN. La carga, el lavado y la elución se realizaron con reactivos enfriados en hielo. Una pequeña alícuota de 25 μ L de la fracción de elución se separó antes de liofilizar, se resuspendió en 25 μ L de agua destilada para medir la concentración de proteína en un NanoPhotometer® N60/N50 (Implen).

III.8.3. Precipitación de fosfopéptidos con fosfato cálcico (CPP)

En estudios previos se observó que la precipitación con fosfato cálcico (CPP) mejoraba el enriquecimiento de fosfopéptidos con TiO₂ (Manteca *et al.*, 2011, Rioseras *et al.*, 2018). Para probar si ocurría lo mismo en nuestro estudio, se comparó el enriquecimiento de Zr-(IV)-IMAC con y sin tratamiento previo con CPP. Para ello se siguió el protocolo de Zhang *et al.* (2007). Para cada réplica, se añade 100 μ L de H₂O mQ por cada 50 μ g de muestra y se ajusta el pH a 9-10 con 2 M NH₄OH (Sigma-Aldrich). Se añadió 8 μ L de 0.5 M Na₂PO₄ (Sigma-Aldrich), de 2 M NH₄OH y de 2M CaCl₂ (Sigma-Aldrich) por cada 100 μ L de muestra, se mezcló durante 1 min y se centrifugó a 20,000 g durante 10 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, que contiene péptidos no fosforilados, se resuspende en 120 μ L de 80 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich) por cada 100 μ L de muestra y se centrifuga a 20,000 g durante 5 min. El paso de lavado se repite una vez más, y el pellet se disuelve en 40 μ L de 5% FA frío por cada 100 μ L de muestra. Los fosfopéptidos se desalaron nuevamente utilizando cartuchos tC18 Sep-Park (Waters) tal y como se describió en el apartado anterior.

III.8.4. Enriquecimiento con Zr(IV)-IMAC

El protocolo de enriquecimiento con Zr(IV)-IMAC fue adaptado de Arribas Diez *et al.* (2021) y realizado en un sistema KingFisher™ Duo Prime (Thermo Scientific). Todos los solventes utilizados se mantuvieron en frío. Las muestras liofilizadas se redisolviéron en agua a una concentración de 4 µg/µL y se llevaron a un volumen final de 250 µL con *buffer* de unión, formado por 80% MeCN, 5% ácido trifluoroacético (TFA, Sigma-Aldrich) y 0,1M ácido glicólico (GA, Sigma-Aldrich). Las micropartículas magnéticas con iones metálicos Zr (MagReSyn® Zr-IMAC HP, Resyn Biosciences) fueron equilibradas durante 1 min en 500 µL de *buffer* de unión, antes de incubar con la solución de péptidos durante 5 min.

Las micropartículas fueron lavadas tres veces durante 2 min, primero en *buffer* de unión y luego en *buffer* de lavado 1 (80% MeCN y 1% TFA) y *buffer* de lavado 2 (10% MeCN y 0,2% TFA), y los fosfopéptidos fueron finalmente eluidos usando una solución de 1,25M NH₄OH (pH 10-11). La fracción de elución se liofilizó antes del análisis mediante LC-MS/MS.

III.8.5. Análisis por LC-MS/MS

Las muestras liofilizadas se resuspendieron en 2% MeCN y se analizaron en un sistema de cromatografía Dionex Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific) acoplado en línea a un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion Lumos Tribrid (Thermo Scientific). Los péptidos inyectados se desalaron en línea usando una columna de separación PepMap™ 100 C18 (300 µm I.D. x 5 mm, 5 µm, 100 Å, Thermo Scientific) con 2% MeCN y 0,1% FA durante 2 min. Los péptidos fueron eluidos y

separados en una columna de 75 μm I.D. x 18 cm empaquetada internamente con partículas ReproSil-Pur 120 C18-AQ 3 μm (Dr. Maisch) (Kovalchuk *et al.*, 2019) a un caudal de 250 nL/min con un gradiente lineal de 90 min de 2–34% de solvente B (95% MeCN + 0,1% FA) frente a solvente A (100% H₂O + 0,1% FA). El espectrómetro de masas se configuró en modo de adquisición dependiente de datos. Los espectros de iones precursores (MS) se adquirieron desde una relación m/z de 375 a 1600 en modo *profile* (resolución de masa: 60.000 a m/z 400). Durante un ciclo de 3 seg, los iones precursores más intensos fueron seleccionados automáticamente para la fragmentación con la técnica de disociación por alta energía de colisión (HCD), y los fragmentos fueron analizados en el Orbitrap a una resolución de masa de 30.000 a m/z 400 (*centroid mode*).

III.8.6. Análisis bioinformático de los datos

Los archivos *raw* fueron analizados utilizando el software Proteome Discoverer 2.5 (Thermo Scientific) y contrastados con bases de datos de proteínas (SwissProt filtrada para la taxonomía de *S. coelicolor*) usando Mascot 2.6 (Matrix Science). Los parámetros de búsqueda utilizados incluyeron una tolerancia de la masa del ión precursor de 5 ppm y en los fragmentos de 0,05 Da con un límite de 2 escisiones trípticas omitidas. Además, se utilizó la S-carbamidometilación de residuos de Cys como modificación fija, y la fosforilación de residuos de Ser, Tyr y Thr, la oxidación de Met y la desamidación de Asn como modificaciones variables. Los péptidos de baja confianza se excluyeron usando un umbral de puntuación en Mascot de ≥ 18 y una tasa de descubrimientos falsos de ≤ 0.01 utilizando Percolator (Käll *et al.*, 2007).

Los sitios de fosforilación se asignaron utilizando ptmRS para calcular las probabilidades de localización de la fosforilación, aceptando puntuaciones iguales o superiores a 95 (Taus *et al.*, 2011). Los fosfopéptidos duplicados (aquellos que albergan el mismo fosfositio; es decir, fosfopéptidos con digestiones parciales, oxidaciones de metionina, carbamidometilación de cisteína, desamidación de glutamina) también fueron filtrados, manteniendo el fosfopéptido con menor q-valor.

La importancia de las abundancias de fosfopéptidos estimadas con Proteome Discoverer 2.5 fueron analizadas usando el software MetaboAnalyst 5.0 (Institute of Parasitology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada) (Pang *et al.*, 2020). Los parámetros de MetaboAnalyst fueron los siguientes: los valores faltantes se estimaron como 1/5 del valor positivo mínimo de cada variable; se hizo transformación logarítmica de los valores de abundancia y se realizó escalado Pareto. Las diferencias en la abundancia de fosfopéptidos se consideraron significativas si el q-valor era igual o inferior a 0,05 y la relación $\log_2 65h/30h$ era mayor de 1 o menor de -1.

La abundancia de las proteínas fosforiladas se corrigió mediante la resta de aquéllas descubiertas como diferencialmente fosforiladas en estudios previos de proteómica cuantitativa (Rioseras *et al.*, 2018). De esta forma, descartamos fosfopéptidos que se originan a partir de proteínas que exhiben diferencias significativas de abundancia similares (es decir, tanto fosfopéptidos como proteínas reguladas al alza o a la baja).

Se mantuvieron fosfopéptidos de proteínas que exhiben cambios de abundancia no significativos a las 30 y 65 horas, además de fosfopéptidos que muestran tendencias opuestas en comparación con la proteína

METODOLOGÍA

relacionada (es decir, fosfopéptidos regulados al alza, proteínas reguladas a la baja y viceversa). Los fosfopéptidos que mostraron cambios significativos en los valores de abundancia se agruparon de acuerdo con sus perfiles de abundancia temporal aplicando una transformación de Z-score de las abundancias de proteínas y un algoritmo de distancia euclidiana.

Se buscaron también motivos de fosforilación mediante el software MoMo usando el algoritmo motif-x, un valor umbral de p-valor de 0,001 y el proteoma de *S. coelicolor* como contexto (Cheng *et al.*, 2019). Las proteínas se clasificaron en categorías funcionales según sus funciones anotadas en la base de datos de Gene Bank, en publicaciones y por homología según las bases de datos Gene Ontology (Ashburner *et al.*, 2000), Conserved Domain (Marchler-Bauer *et al.*, 2005) y KEGG Pathway (Zhang *et al.*, 2021). Por otra parte, la longitud de los fosfopéptidos detectados, así como el contenido de residuos de aminoácidos hidrofóbicos, básicos, ácidos y neutros, se analizó con el software Peptide 2.0 (https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity_hydrophilicity.php), y la significancia estadística se analizó mediante prueba t de Student (p-valor igual o inferior a 0,01).

IV. RESULTADOS

IV.1. BÚSQUEDA DE MUTANTES CON LA DIVISIÓN CELULAR ALTERADA

IV.1.1. *Screening* de mutantes de inserción aleatoria por transposición

Esta tesis comenzó buscando mutantes con un fenotipo destacable y diferencial respecto a la cepa salvaje de *S. coelicolor* en una librería de mutantes aleatorios. Dicha librería fue creada por nuestro grupo de investigación usando el sistema de mutagénesis diseñado por Xu *et al.* (2017), el cual consiste en el uso del transposón mini-Tn5 dentro de un plásmido pHL734 suicida que puede replicarse en *E. coli* pero no en *Streptomyces* (detallado en Metodología, apartado III.2).

De casi un millar de mutantes generados por mutagénesis aleatoria en *S. coelicolor*, analizamos un total de 84 haciendo un *screening* rápido basado en dos aspectos: el análisis del aspecto macroscópico (formación de micelio sustrato, aéreo y esporulación) y microscópico (germinación, tabicación de las hifas y MCP) de los cultivos en medio sólido. La producción de antibiótico en medio líquido (undecilprodigiosina y actinorrodina; rojo y violeta respectivamente) también se analizó macroscópicamente (apartado III.2.1). Si bien más de un tercio de los mutantes (31) no manifestaron un fenotipo diferente de la cepa salvaje, otros sí presentaron retrasos o adelantos visibles en las fases de germinación o de esporulación, variaciones en la fase de transición MI/MII o cambios en la producción de antibiótico (tabla 8).

RESULTADOS

Tabla 8. Número de mutantes aleatorios estudiados en esta tesis y fenotipo destacable. Se identificó el sitio de inserción del transposón en 5 de los mutantes con los fenotipos más destacables (Tabla suplementaria 1).

Fenotipo	Número de mutantes
Germinación	4
Esporulación	1
Engrosamiento de micelio	3
Cambios en la producción de antibiótico	12
Retraso en la producción de antibiótico y de la esporulación	5
Retraso en la producción de antibiótico y de la germinación	6
Retraso en la producción de antibiótico y adelanto de la germinación	10
Adelanto en la producción de antibiótico y retraso de la germinación	4
Adelanto de la germinación	8
Sin fenotipo	31
Total	84

La inserción exacta del transposón se identificó para los mutantes con los fenotipos más destacables (Tabla suplementaria 1). Entre los mutantes analizados destacó el mutante *SCO1760::Tn5*, que presenta un fenotipo caracterizado por la formación de hifas y células hinchadas con morfología similar a la de protoplastos en cultivos sólidos en medio GYM a las 48 horas de cultivo (figura 17). El estudio detallado de este mutante se muestra en el apartado IV.2.3.

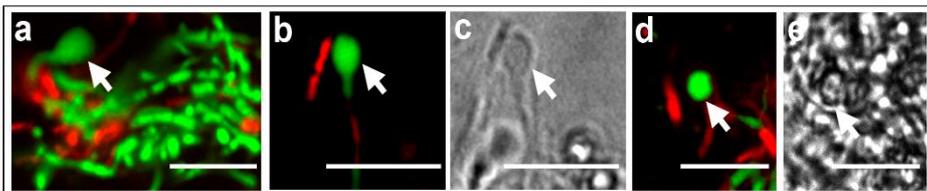


Figura 17. Fenotipo del mutante *SCO1760::Tn5*. (a-e) Células hinchadas con apariencia de protoplastos (indicadas con flechas) en cultivos de GYM a las 48 horas de desarrollo. Las barras de escala indican 8 μm .

IV.1.2. Análisis transcriptómico (RNAseq) del mutante en el gen *ftsZ* y estudio de la función de los genes diferencialmente expresados en comparación con la cepa salvaje

a) Comparación de los transcriptomas de la cepa salvaje de *Streptomyces coelicolor* y del mutante *ftsZ*

Nos planteamos la hipótesis de que la mutación del gen de división *ftsZ* (McCormick *et al.*, 1994) podría estar afectando la expresión de otros genes importantes de la división celular que paliaran, en la medida de lo posible, el déficit de FtsZ. Debido a ello, se realizó un análisis transcriptómico del mutante *ftsZ* y de la cepa silvestre de *S. coelicolor*

RESULTADOS

para comparar el transcriptoma en distintos tiempos del ciclo de desarrollo (16 y 72 horas) en cultivos en medio sólido GYM.

Al comparar las abundancias promedio de genes en ambas cepas, se observaron diferencias notables en la expresión de varios genes, seleccionando cuatro para su estudio (Tabla 9). Tres de ellos (*SCO0837*, *SCO0954* y *SCO2795*) estaban regulados al alza hasta 4 veces en el mutante *ftsZ* en comparación con la cepa de tipo salvaje, mientras que *SCO0698* estaba regulado a la baja (3 veces). En el caso particular de *SCO0837*, no se observó expresión del gen en la cepa salvaje.

Tabla 9. Datos cuantitativos del transcriptoma del mutante *ftsZ* (recogida en cultivo sólido GYM de 24h) en comparación con cepa salvaje (Wt) recogida a las 16 y 72h en cultivo GYM. Las abundancias promedio (de dos réplicas biológicas) se muestran como el \log_2 (*ftsZ*/Wt).

SCO	Abundancia <i>ftsZ</i>	Abundancia Wt	Log2 (<i>ftsZ</i> /wt)	Valor q
<i>ftsZ</i> (16h) / Wt (16h)				
<i>SCO0954</i>	392,0	104,9	1,9	0,04
<i>SCO0837</i>	20,4	0	NA	0,04
<i>SCO2795</i>	139,2	33,4	2,0	0,03
<i>SCO0698</i>	18,6	249,1	-3,7	0,02
<i>ftsZ</i> (72h) / Wt (72h)				
<i>SCO0954</i>	605,3	180,4	1,7	0,02
<i>SCO0837</i>	32,6	0	NA	0,01
<i>SCO2795</i>	171,6	57,4	1,5	0,04
<i>SCO0698</i>	66,0	429,9	-2,7	0,02

b) Fenotipo de *S. coelicolor* sobreexpresando o reprimiendo los genes cuya expresión está alterada en el mutante *ftsZ*

El siguiente paso fue diseñar construcciones para sobreexpresar en la cepa salvaje de *S. coelicolor* los genes regulados al alza en el mutante *ftsZ*: *SCO0837*, *SCO0954* y *SCO2795* (apartado III.3.5). Por otra parte, la traducción del gen regulado a la baja en el mutante *ftsZ* (*SCO0698*) se disminuyó en la cepa salvaje mediante expresión de un ARN antisentido de este gen (apartado III.3.6). El objetivo era imitar, en la cepa salvaje, la sobreexpresión o represión observada en el mutante *ftsZ*.

El estudio de la sobreexpresión de los genes *SCO0837* y *SCO2795*, así como el bloqueo de la traducción del gen *SCO0698* mediante la expresión de ARN antisentido, no reveló ningún fenotipo diferencial cuando se comparó con la cepa silvestre. Sin embargo, la sobreexpresión del gen *SCO0954* mostró un fenotipo similar al encontrado en el mutante *SCO1760::Tn5*, consistente en la formación de hifas hinchadas y células similares a protoplastos en cultivo sólido GYM a las 48 horas de desarrollo (figura 18 a-d). El estudio detallado de esta cepa sobreexpresando el gen *SCO0954*, y otras cepas mostrando fenotipos similares, se detalla en el apartado siguiente.

RESULTADOS

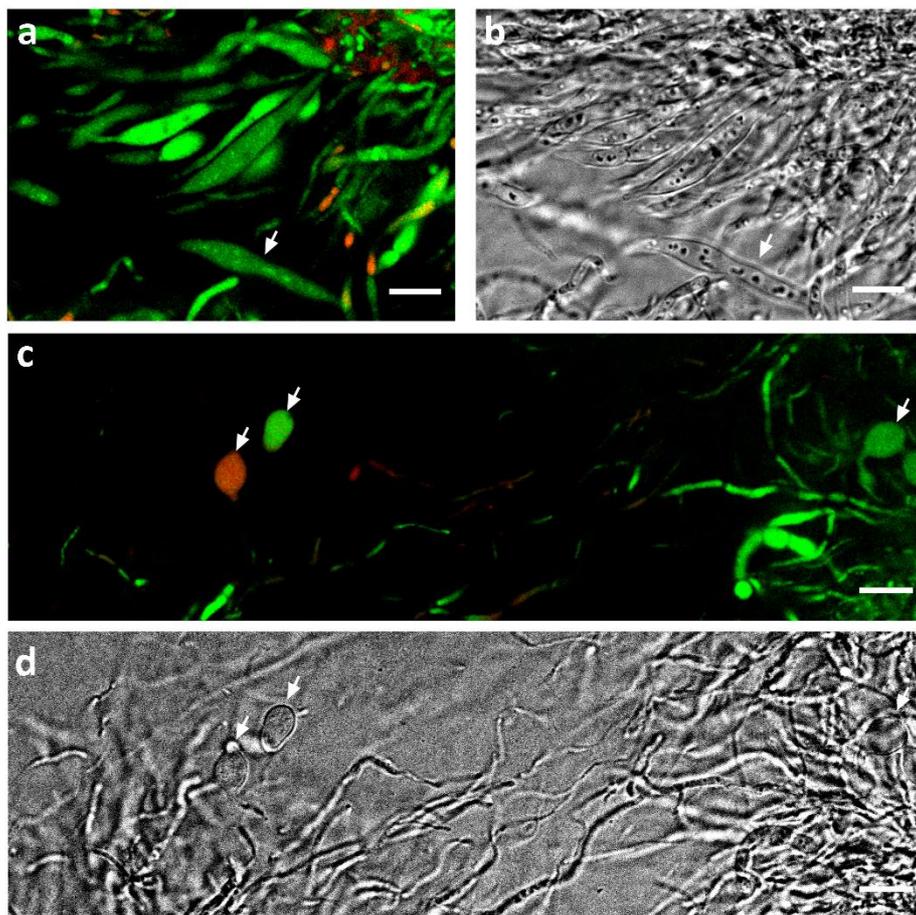


Figura 18. Hifas hinchadas y células con apariencia de protoplastos en *Streptomyces coelicolor* sobreexpresando *SCO0954* y creciendo en medio GYM sin sacarosa a las 48 horas de cultivo. Se muestran imágenes realizadas con microscopía de fluorescencia láser confocal y teñidas con SYTO9/IP. Las flechas indican hifas hinchadas y células con apariencia de protoplastos. Las barras de escala indican 8 μm .

IV.2. LA MUTACIÓN DE LOS GENES *SCO0954*, *SCO1758* Y *SCO4439/40* CONDUCE A LA FORMACIÓN DE HIFAS Y CÉLULAS HINCHADAS DEFICIENTES DE PARED BAJO ESTRÉS OSMÓTICO EN *STREPTOMYCES COELICOLOR*

IV.2.1. Fenotipo de la cepa de *S. coelicolor* sobreexpresando el gen *SCO0954*

Tal como se indicó en el apartado anterior, la cepa de *S. coelicolor* sobreexpresando *SCO0954* se caracteriza por la formación de hifas y células hinchadas con morfología similar a la de protoplastos en cultivos sólidos en medio GYM a las 48 horas de cultivo (figura 18 a-d). Este tiempo se corresponde con el inicio de la esporulación. Estas hifas y células hinchadas no son muy abundantes y son difíciles de observar, pero están presentes sistemáticamente en los cultivos de este mutante y no se observaron nunca en la cepa salvaje de *S. coelicolor* (figura 18 a-d).

Estas células similares a protoplastos se asemejan a las células S inducidas por estrés osmótico y sin pared celular descritas por Ramijan *et al.* (2018) en *Kitasatospora viridifaciens* y otros actinomicetos, las cuales crecen en cultivos suplementados con altas concentraciones de sacarosa (0,64M) (Ramijan *et al.*, 2018). Debido a ello, exploramos la posibilidad de que las células similares a protoplastos observadas en nuestro mutante pudieran inducirse por estrés osmótico y suplementamos el medio GYM con sacarosa 0,64M.

Bajo estas condiciones, las hifas hinchadas y las células similares a protoplastos se hicieron muy abundantes y pudimos observarlas con facilidad en el mutante (figura 19). Del mismo modo, estas estructuras no se observaron nunca en la cepa silvestre de *S. coelicolor* en medio

RESULTADOS

GYM suplementado con 0,64M de sacarosa (figura 19 a-d). Por lo tanto, estos hinchamientos y células similares a protoplastos se ven claramente potenciados/as por el estrés osmótico y las células similares a protoplastos son inducidas por estrés osmótico, por lo que considerarse células S.

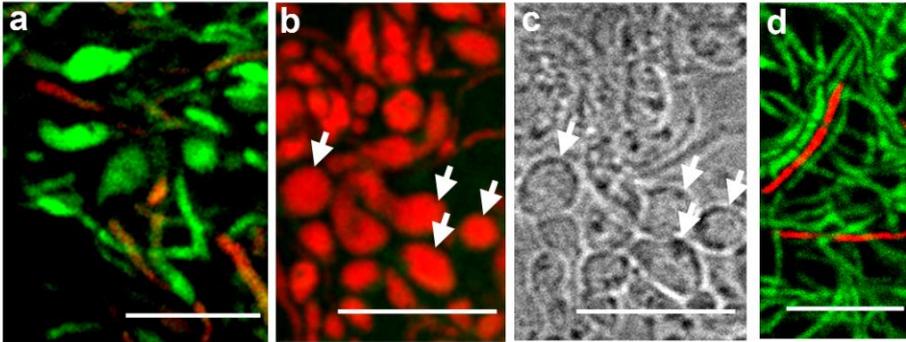


Figura 19. Células con deficiencia de pared inducida por estrés osmótico en la cepa sobreexpresando *SCO0954*. (a-c) Cepa salvaje sobreexpresando *SCO0954*. (d) Cepa salvaje que alberga el plásmido de sobreexpresión pNG4 usado como control. Se muestran imágenes representativas de al menos tres réplicas biológicas realizadas con fluorescencia confocal y teñidas con SYTO9/IP. Los cultivos corresponden a 48 horas en placas de GYM suplementadas con 0,64M de sacarosa. Las barras de escala indican 8 μm .

El área promedio de estas vesículas formadas en *S. coelicolor* sobreexpresando el gen *SCO0954* creciendo en medio GYM suplementado con 0,64M de sacarosa fue de $6,2 \pm 2,5 \mu\text{m}^2$ (figura 20 a). Estas vesículas nunca se encontraron en la cepa salvaje (figura 20 b).

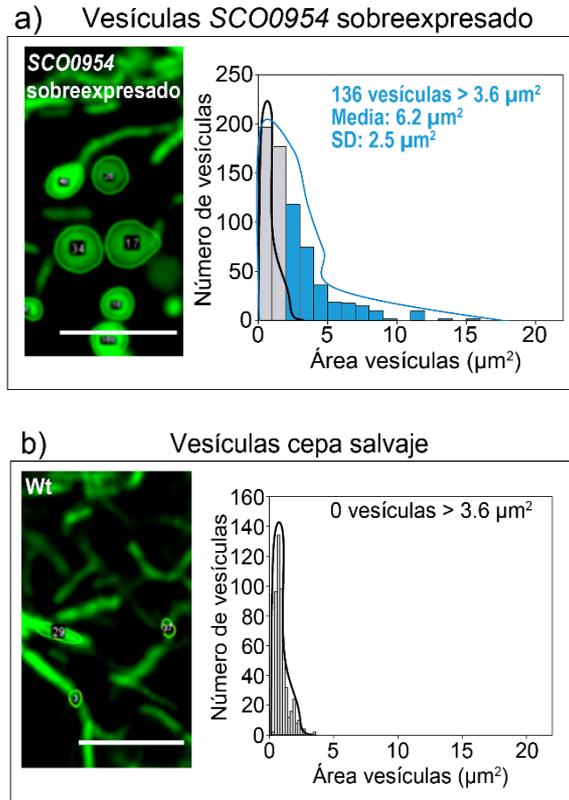


Figura 20. Cuantificación del área de las vesículas membranosas formadas en la cepa salvaje de *S. coelicolor* sobreexpresando el gen *SCO0954*. (a) *S. coelicolor* sobreexpresando *SCO0954*. (b) Cepa salvaje de *S. coelicolor*. Se muestran imágenes tomadas en cultivos teñidos con SYTO9/PI y SYTO9/FM5-95 en las que las vesículas y sus áreas fueron identificadas y cuantificadas automáticamente por la macro del programa Fiji (véase apartado III.5.5). Se usaron imágenes de la cepa salvaje para fijar el umbral de medida que no corresponde a vesículas, sino a pequeños engrosamientos en las hifas. Este umbral se fijó en $3.6 \mu\text{m}^2$. En gris se muestran las medidas por debajo del umbral de $3.6 \mu\text{m}^2$; en azul se muestran las vesículas con áreas por encima de este umbral. En todos los casos se cuantificaron al menos 100 vesículas en al menos tres réplicas biológicas. Las barras de escala indican $8 \mu\text{m}$.

IV.2.2. Fenotipo del mutante *SCO0954 knockout* de *S. coelicolor*

Construimos el mutante *knockout* en el gen *SCO0954* (Δ *SCO0954*) mediante CRISPR-Cas9 (Tong *et al.*, 2015). Observamos el mutante a las 48 horas de ciclo de desarrollo en medio GYM suplementado con 0,64M sacarosa y, de forma idéntica a lo ocurrido con la cepa sobreexpresada, también forma hifas hinchadas y células similares a protoplastos (figura 21 a). El área promedio de estas vesículas formadas en el mutante *knockout* de *SCO0954* creciendo en medio GYM suplementado con 0,64M de sacarosa fue de $8,3 \pm 5,8 \mu\text{m}^2$ (figura 21 b).

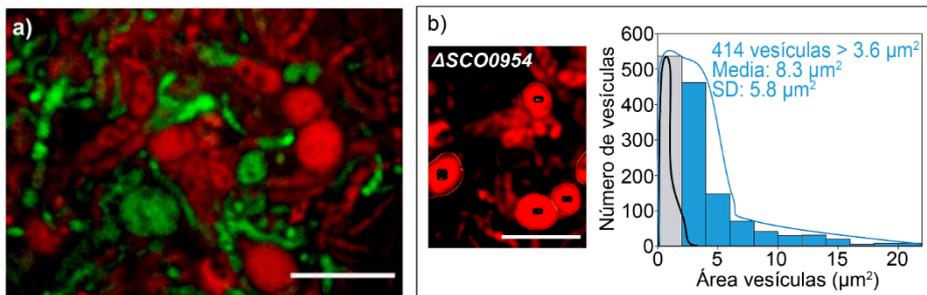


Figura 21. Células con deficiencia de pared inducida por estrés osmótico y cuantificación del área de las vesículas en el mutante *knockout* de *SCO0954*. (a) Células deficientes de pared en el *knockout* de *SCO0954*. Se muestra imagen representativa de al menos tres réplicas biológicas realizadas con fluorescencia confocal y teñidas con SYTO9/IP. El cultivo corresponde a 48 horas en placas de GYM suplementadas con 0,64M de sacarosa La barra de escala indica $8 \mu\text{m}$. b) Cuantificación del área de las vesículas en el mutante *knockout* de *SCO0954*. La gráfica en negro y las barras en gris indican engrosamientos con tamaños similares a los observados en la cepa salvaje (figura 20b). Imágenes, gráficas y escala como en la figura 20.

IV.2.3. Caracterización del mutante *SCO1760::Tn5*

a) Fenotipo del mutante *SCO1760::Tn5*

El mutante *SCO1760::Tn5*, al igual que la sobreexpresión del gen *SCO0954* y el *knockout* Δ *SCO0954*, se caracteriza por la formación de hifas y células/vesículas hinchadas con morfología similar a la de protoplastos en cultivos sólidos en medio GYM a las 48 horas de cultivo (figura 17 a-e). La formación de estas vesículas está potenciada por la suplementación del medio de cultivo con 0,64M sacarosa y en estas condiciones es muy reproducible (figura 22 a-d).

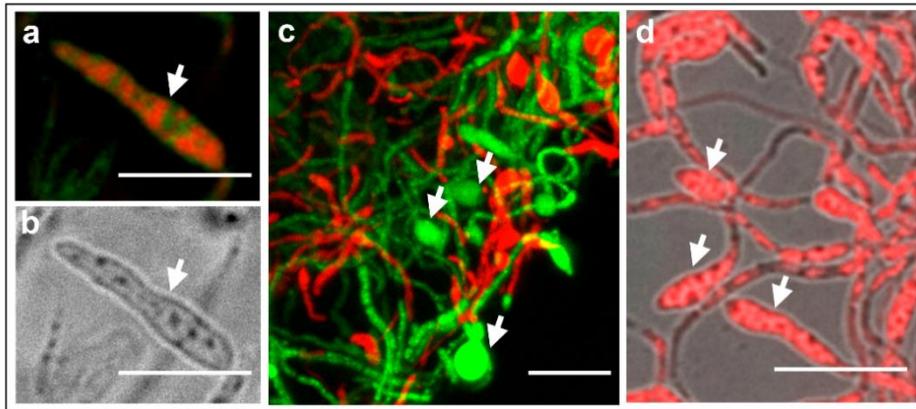


Figura 22. Fenotipo del mutante *SCO1760::Tn5* en medio GYM suplementado con 0,64M sacarosa a las 48 horas de cultivo. (a-d) Células similares a protoplastos e hifas hinchadas (indicadas con flechas). Se muestran imágenes representativas de al menos tres réplicas biológicas realizadas con microscopía de fluorescencia láser confocal y teñidas con SYTO9/IP. También se muestran imágenes de contraste de fases. Las barras de escala indican 8 μ m.

El área promedio de estas vesículas formadas en el *SCO1760::Tn5* creciendo en medio GYM suplementado con 0,64M de sacarosa fue de $8,3 \pm 5,8 \mu\text{m}^2$ (figura 23).

RESULTADOS

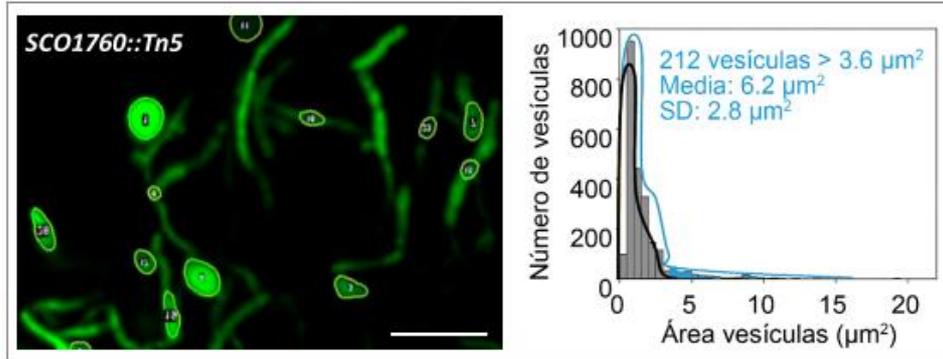


Figura 23. Cuantificación del área de las vesículas en la cepa *SCO1760::Tn5*. Imágenes, gráficas y escala como en las figuras 20 y 21.

b) Complementación del mutante *SCO1760::Tn5*

La inserción del transposón Tn5 en el mutante *SCO1760::Tn5* se localizó en la posición 1,881,109 del cromosoma, que se corresponde con el final del ORF de *SCO1760*, una hipotética citidilato quinasa que catalizaría la transferencia de grupos fosfato dentro del metabolismo de la pirimidinas (ilustrada con una flecha en la figura 16 en la sección Metodología).

Jeong *et al.* (2016) revelaron la existencia de al menos dos promotores en esta región cromosómica, situados en las posiciones cromosómicas 1,881,810 y 1,880,358 (nombrados como P1 y P2 en la figura 16 de la sección Metodología). Además, los ORF de *SCO1760* y *SCO1759* se superponen en tres nucleótidos, lo que hace que su cotranscripción desde un promotor situado aguas arriba del ORF de *SCO1760* sea muy probable, y con ello que la interrupción del ORF de *SCO1760* afecte también a genes situados aguas abajo.

En vista de la organización de los genes situados aguas abajo de *SCO1760*, realizamos tres construcciones para complementar el fenotipo del

mutante: el primero albergó solo el gen *SCO1760*; el segundo los genes *SCO1760* y *SCO1759*; y el tercero, los genes *SCO1760*, *SCO1759* y *SCO1758*. Todas ellas albergan una región 5' lo suficientemente grande para acomodar el promotor P1. Analizados los mutantes complementados a microscopía de fluorescencia láser confocal (tinción con SYTO9/PI), observamos que el fenotipo de la cepa salvaje (ausencia de células S) solo se restaura con la última construcción, que alberga el ORF de *SCO1758* (cepa *SCO1760::Tn5* [pNG3 *SCO1760-1759-1758*]) (figura 24 e), lo que indica que la alteración de la expresión de *SCO1758* es la responsable de la formación de células sin pared inducidas por estrés osmótico en el mutante *SCO1760::Tn5*.

c) Expresión génica del gen *SCO1758* en la cepa salvaje de *Streptomyces coelicolor* y el mutante *SCO1760::Tn5*

Para comprobar si la inserción de Tn5 en *SCO1760* está afectando realmente a la expresión de *SCO1758*, medimos la abundancia del transcrito *SCO1758* en el mutante *SCO1760::Tn5* y en la cepa complementada (*SCO1760::Tn5* [pNG3 *SCO1760-59-58*]), así como en la cepa salvaje control (cepa Wt).

Para ello, se extrajo ARN total a partir de muestras de cultivos de 48h. La extracción de ARN y la síntesis de ADNc se hizo siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.4.1. Para la RT-qPCR, se usó el ciclo descrito en el mismo apartado con los cebadores *q1758-F2* y *q1758-R2*, que hibridan en las posiciones 1 y 117 de la ORF de *SCO1758* (tabla 6). Se realizaron tres réplicas biológicas por gen.

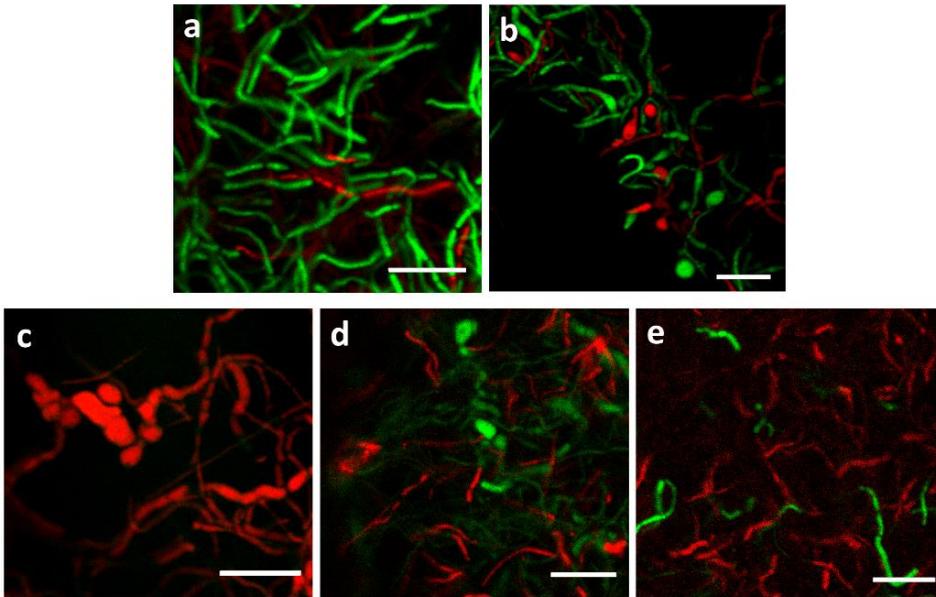


Figura 24. Complementación del fenotipo del mutante *SCO1760::Tn5*. (a) Cepa silvestre de *S. coelicolor*. (b) Mutante *SCO1760::Tn5*. (c) Mutante complementado con copia del gen *SCO1760* (cepa *SCO1760::Tn5* [pNG3 *SCO1760*]). (d) Mutante complementado con copia de los genes *SCO1760* y *SCO1759* (cepa *SCO1760::Tn5* [pNG3 *SCO1760-1759*]) (e) Mutante complementado con copia de los genes *SCO1760*, *SCO1759* y *SCO1758* (cepa *SCO1760::Tn5* [pNG3 *SCO1760-1759-1758*]). Se muestran imágenes representativas de al menos tres réplicas biológicas realizadas con fluorescencia confocal y teñidas con SYTO9/IP. Las barras de escala indican 8 μm .

Observamos que la abundancia del transcrito de *SCO1758* (medida en número de copias de transcrito por μg de cDNA) en el mutante se redujo en un 85% en comparación con la cepa silvestre, y que vuelve a aumentar hasta niveles similares a la cepa silvestre en el mutante complementado con los tres genes (cepa *SCO1760::Tn5* [pNG3 *SCO1760-1759-1758*]) (figura 25).

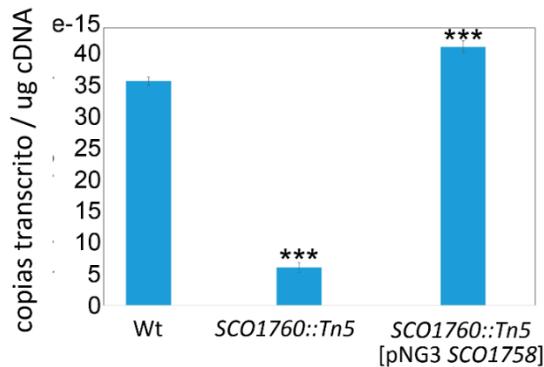


Figura 25. Expresión del gen *SCO1758* en cultivo sólido de GYM a las 48 horas. Los asteriscos indican diferencias significativas al compararlo con la cepa silvestre. * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** < 0.001 .

d) Intento de creación de un mutante *knockout* en el gen *SCO1758*

Dado que la inserción del transposón Tn5 en *SCO1760* afecta a la expresión del gen *SCO1758*, pero no la elimina, intentamos crear el mutante *knockout* de *SCO1758* (Δ *SCO1758*) mediante CRISPR Cas9, para ver la función que provoca la ausencia completa del gen. Sin embargo, a pesar de realizar varios intentos usando varias guías y distintos *overlap*, no fuimos capaces de eliminar el ORF de *SCO1758* del genoma de *S. coelicolor*. Dado que la metodología utilizada sí nos permitió crear otros *knockout* en el mismo organismo (véase el apartado IV.2.2), barajamos la posibilidad de que *SCO1758* podría ser un gen esencial y que podría participar en procesos biológicos que sean vitales para *S. coelicolor*, más allá de la formación de células S y formas L.

IV.2.4. La mutación en *SCO4439-40* conduce a la formación de hifas y células hinchadas sin pared celular bajo estrés osmótico en *Streptomyces coelicolor*

La obtención de tres mutantes capaces de formar hifas y células hinchadas bajo estrés osmótico (*SCO1760::Tn5* y la sobreexpresión/delección de *SCO0954*) nos hizo reevaluar el mutante *SCO4439::Tn5062*, creado con anterioridad por nuestro grupo de investigación (Rioseras *et al.*, 2016). Este mutante demostró que la proteína *SCO4439* tiene una actividad D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa que libera D-Ala del peptidoglicano y reduce el sustrato D-Ala-D-Ala disponible para la transpeptidación en el peptidoglicano. La mutación de *SCO4439* en el mutante aumenta dicho sustrato al disminuir la actividad D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa y con ello aumenta el *cross-linking* en el peptidoglicano (Rioseras *et al.*, 2016). Este aumento del *cross-linking* desencadena un aumento dramático del tamaño/hinchamiento de las esporas durante la germinación (Rioseras *et al.*, 2016). Este fenotipo nos llevó a plantear la posibilidad de que existiera también un hinchamiento en las hifas en tiempos más tardíos del ciclo de desarrollo y observamos que, efectivamente, a las 48 horas también produce hifas hinchadas y células similares a protoplastos en cultivos GYM suplementados con 0,64M sacarosa (figura 26 a-d).

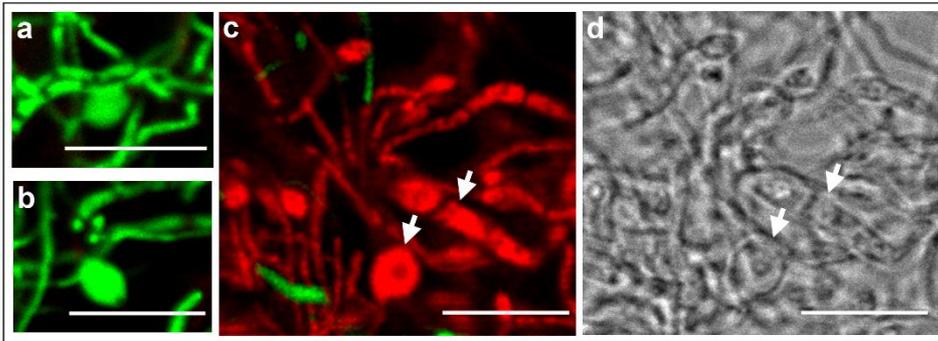


Figura 26. Fenotipo del mutante *SCO4439::Tn5062* en medio GYM suplementado con 0,64M sacarosa a las 48 horas de cultivo. Se muestran imágenes representativas de al menos tres réplicas biológicas realizadas con fluorescencia confocal y teñidas con SYTO9/IP o a imágenes de contraste de fases. Las barras de escala indican 8 μm .

El área promedio de estas vesículas formadas en el mutante *SCO4439::Tn5062* creciendo en medio GYM suplementado con 0,64M de sacarosa fue de $8,3 \pm 5,8 \mu\text{m}^2$ (figura 27).

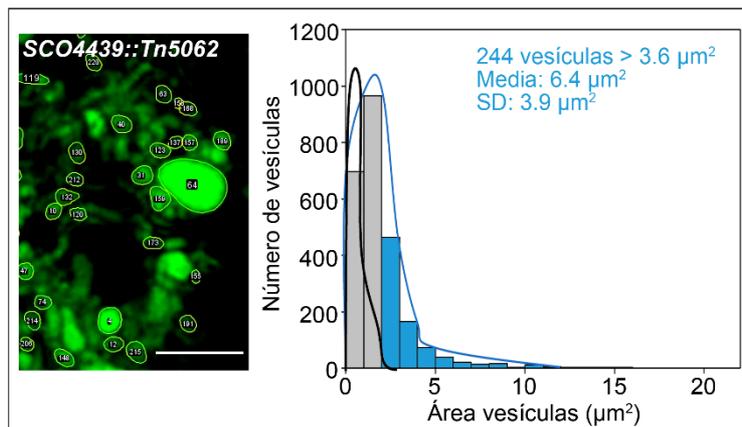


Figura 27. Cuantificación del área de las vesículas en el mutante *SCO4439-40::Tn5062*. Imágenes, gráficas y escala como en las figuras 20 y 21.

RESULTADOS

Previo a nuestro estudio, se demostró que el mutante *SCO4439::Tn5062* tiene afectada la expresión de los genes *SCO4439* y *SCO4440*, debido a que la inserción del transposón *Tn5062* generó una delección que afectó a las regiones promotoras de ambos genes (Rioseras *et al.*, 2016) (figura 28).

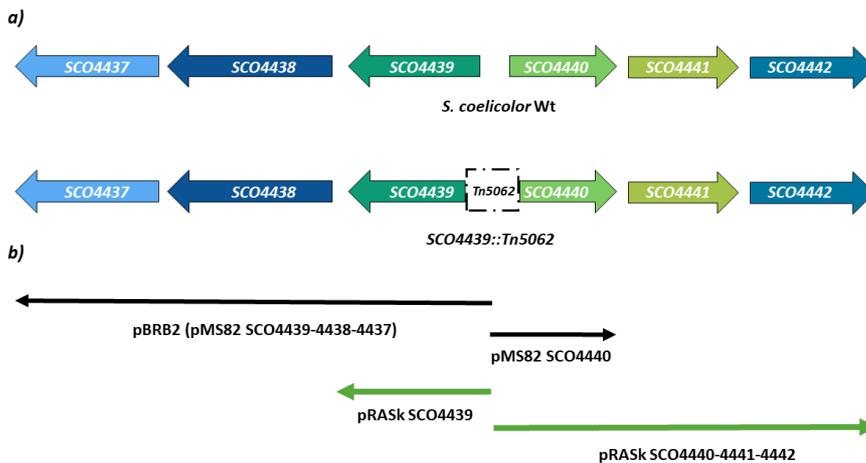


Figura 28. Esquema de la región comprendida entre los genes *SCO4437* y *SCO4442*. a) Esquema de la región en la cepa de tipo salvaje y en el mutante *SCO4439::Tn5062* (adaptado de Rioseras *et al.* (2016)). b) Construcciones usadas en la complementación del mutante. En verde se representan las construcciones realizadas en esta tesis.

En dicho estudio, el gen *SCO4439* fue capaz por sí solo de restaurar el aumento en el tamaño de las esporas y el aumento en el índice *cross-linking*. Sin embargo, la introducción de una copia nativa de *SCO4439* en el mutante (cepa *SCO4439::Tn5062* [pRASK *SCO4439*]) no es suficiente para restaurar la formación de células S. Este fenotipo solo se restableció cuando se introdujeron copias nativas de los genes *SCO4439* y *SCO4440* en el mutante (cepa *SCO4439::Tn5062* [pRASK *SCO4439*] [pMS82 *SCO4440*]) (figura 29). Este resultado indica que la formación de células

S depende de ambos genes, por lo que en adelante nombraremos al mutante como *SCO4439/40::Tn5062*.

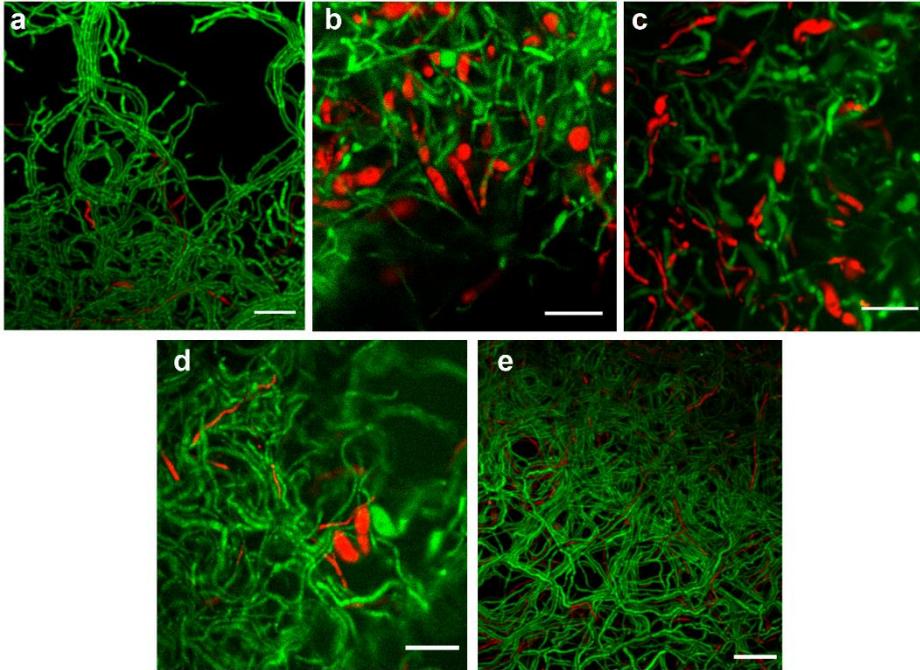


Figura 29. Complementación del mutante *SCO4439-40::Tn5062*. (a) Cepa silvestre de *S. coelicolor*. (b) Mutante *SCO4439-40::Tn5062* (c) Mutante *SCO4439-40::Tn5062* complementado con copia del gen *SCO4439* (cepa *SCO4439-40::Tn5062* [pRASK *SCO4439*]) (d) Mutante *SCO4439-40::Tn5062* complementado con copia del gen *SCO4440* (cepa *SCO4439-40::Tn5062* [pMS82 *SCO4440*]) (e) Mutante *SCO4439-40::Tn5062* complementado con copia de los genes *SCO4439* y *SCO4440* (cepa *SCO4439-40::Tn5062* [pRASK *SCO4439*] [pMS82 *SCO4440*]). Se muestran imágenes representativas de al menos tres réplicas biológicas realizadas con fluorescencia confocal y teñidas con SYTO9/IP o a imágenes de contraste de fases. Las barras de escala indican 8 μm .

IV.3. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y DINÁMICA DE FORMACIÓN DE LAS CÉLULAS DEFICIENTES DE PARED

IV.3.1. Experimentos de *time-lapse* de los mutantes *SCO1760::Tn5*, *SCO4439-40::Tn5062*, *SCO0954* sobreexpresado y Δ *SCO0954* en medio GYM suplementado con 0,64M sacarosa

Los cuatro mutantes analizados (*SCO1760::Tn5*, *SCO4439-40::Tn5062*, la sobreexpresión de *SCO0954* en la cepa salvaje de *S. coelicolor*, y el *knockout* de *SCO0954*) demostraron tener un fenotipo similar con la formación de hifas hinchadas y células similares a protoplastos a las 48 horas del ciclo de desarrollo cuando se someten a condiciones de estrés osmótico en medio GYM suplementado con 0,64M sacarosa. A continuación, decidimos analizar la dinámica de las hifas hinchadas en el conjunto de los mutantes mediante experimentos de *time-lapse* y microscopía de fluorescencia láser-confocal.

Comenzamos las observaciones de *time-lapse* en cultivos de GYM suplementados con 0,64M sacarosa a las 48 horas, siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.5.3 de la Metodología. Las muestras fueron teñidas con SYTO-9 (verde, tinción de ADN) y FM5-95 (rojo, tinción de membrana).

En el mutante *SCO1760::Tn5* se observaron células con aparente capacidad móvil y de división, que se asemejarían a las formas L descritas por Ramijan *et al.* en *Kitasatospora viridifaciens* (video suplementario 1a). Según el autor, las células S y las formas L son inducidas por estrés osmótico, si bien las formas L pueden dividirse mientras que las células S no pueden (Ramijan *et al.*, 2018).

Además, observamos que las hifas del mutante *SCO1760::Tn5* parecen lisarse al final del *time-lapse*, dado que la fluorescencia de SYTO-9 (tinción de ADN) se pierde por completo, dejando solo la fluorescencia roja del colorante de membrana FM5-95 (figura 30, video suplementario 1b).

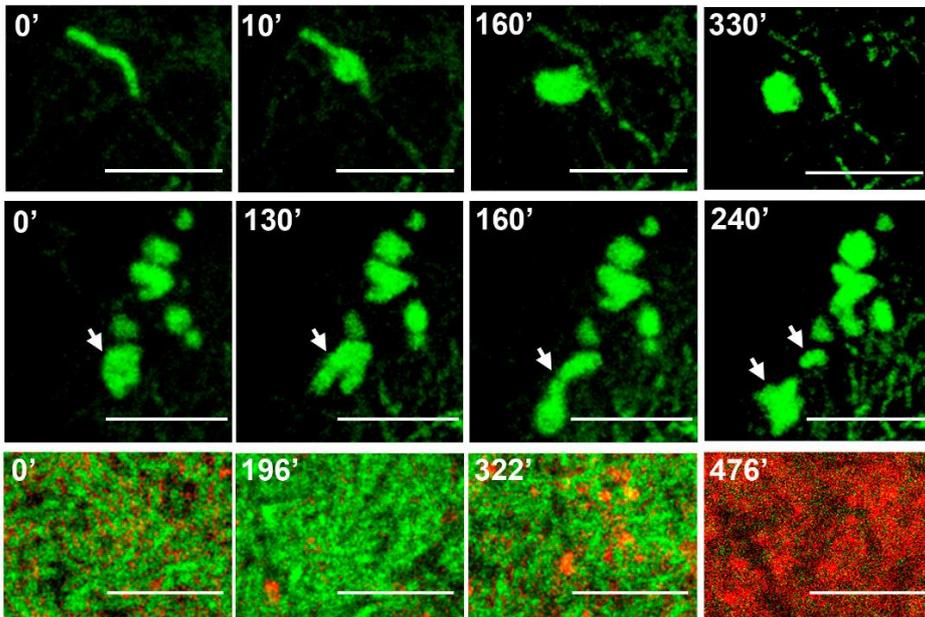


Figura 30. Dinámica de las hifas hinchadas y células inducidas por estrés osmótico del mutante *SCO1760::Tn5*. Los *time-lapse* se iniciaron en cultivos en placa GYM suplementados con 0,64M sacarosa a las 48 horas y se tiñeron con SYTO-9 y FM5-95. Las flechas indican células deficientes de pared. Se indican los puntos de tiempo de incubación en minutos (0 corresponde al inicio del *time-lapse*, es decir, a las 48 horas del cultivo). Las barras de escala indican 8 μ m.

RESULTADOS

Estas formas móviles con capacidad de división no se observaron ni en el mutante *SCO4439-40::Tn5062* ni en los dos mutantes relacionados con el gen *SCO0954* (*knockout* y sobreexpresado). Estos tres mutantes forman aparentes células S que son estables en el tiempo, ya que la mayor parte de la fluorescencia de SYTO-9 (tinción de ADN) permanece estable durante los experimentos de *time-lapse* (figura 31a, videos suplementarios 2, 3 y 4). En el caso del *knockout* Δ *SCO0954*, las células emiten una fluorescencia roja (FM5-95, tinción de membrana) muy intensa, lo que indicaría una alta densidad de membrana (flechas en la figura 31b, video suplementario 4). En el mutante *SCO4439-40::Tn5062*, algunas de las células S se lisan con el tiempo (véase la célula indicada con una flecha en la figura 32).

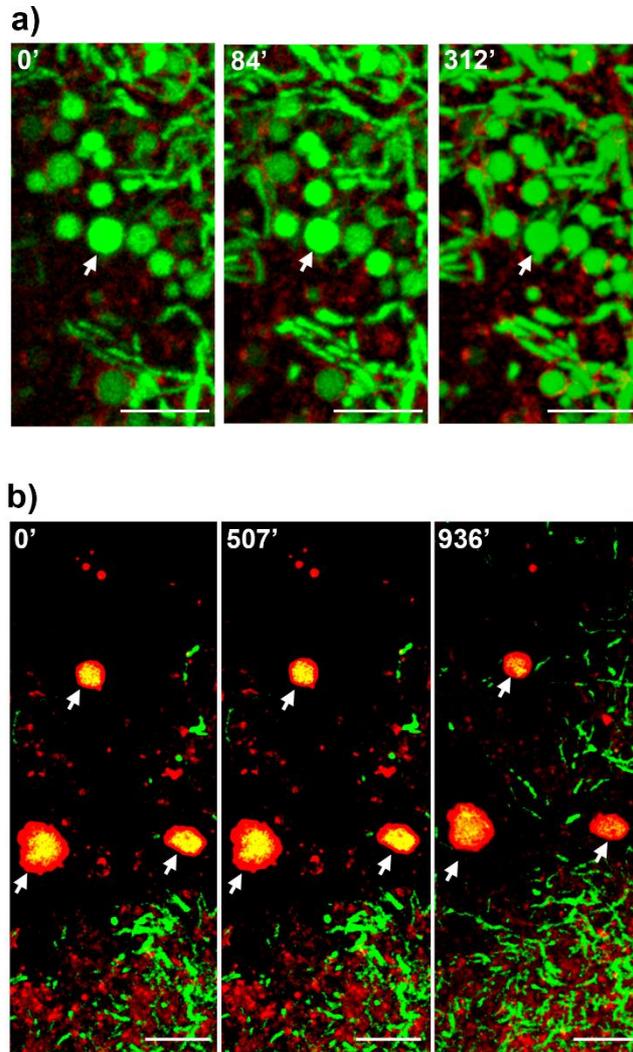


Figura 31. Dinámica de las hifas hinchadas y células inducidas por estrés osmótico en los mutantes sobreexpresante y *knockout* de *SCO0954*. a) *SCO0954* sobreexpresado en la cepa salvaje de *S. coelicolor*. b) *Knockout* Δ *SCO0954*. Los *time-lapse* se iniciaron en cultivos en placa GYM suplementados con 0,64M sacarosa a las 48 horas y se tiñeron con SYTO-9 y FM5-95. Las flechas abajo indican células deficientes de pared con alta densidad de membrana (alta fluorescencia FM5-95). Se indican los puntos de tiempo de incubación en minutos (0 corresponde al inicio del *time-lapse*, es decir, a las 48 horas del cultivo). Las barras de escala indican 8 μ m.

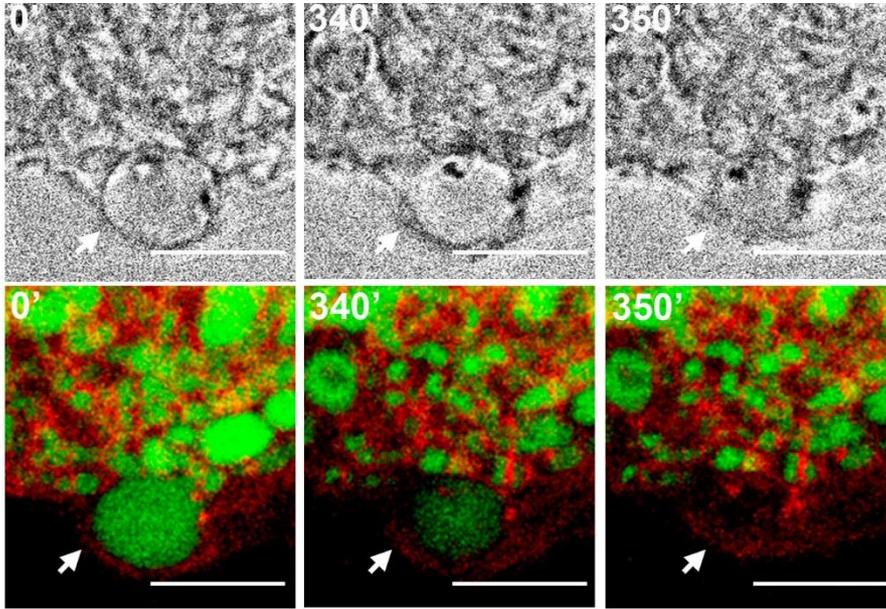


Figura 32. Dinámica de las hifas hinchadas y células inducidas por estrés osmótico del mutante *SCO4439-40::Tn5062* en medio GYM. Los *time-lapse* se iniciaron en cultivos en placa GYM suplementados con 0,64M sacarosa a las 48 horas y se tiñeron con SYTO-9 y FM5-95. Las flechas indica una célula deficiente de pared que pierde fluorescencia SYTO-9 con el tiempo. Se indican los puntos de tiempo de incubación en minutos (0 corresponde al inicio del *time-lapse*, es decir, a las 48 horas del cultivo). Las barras de escala indican 8 μ m.

IV.3.2. Los efectos de *SCO0954* y *SCO4439-40* en la formación de células sin pared son acumulativos, mientras que la mutación de *SCO1758* prevalece sobre la sobreexpresión de *SCO0954*

a) Sobreexpresión de *SCO0954* en el mutante *SCO4439-40::Tn5062*

A continuación, combinamos la sobreexpresión del gen *SCO0954* en el mutante *SCO4439-40::Tn5062* (figura 33). Como se indicó en el apartado IV.3.1, la sobreexpresión de *SCO0954* en la cepa salvaje de *S. coelicolor* y el mutante *SCO4439-40::Tn5062* formaron células S estables cuando se

crecieron en cultivos GYM suplementados con 0,64M sacarosa (figura 31a y figura 32). Cuando se sobreexpresa *SCO0954* en el mutante *SCO4439-40::Tn602* (cepa *SCO4439-40::Tn5062* [pNG4 *SCO0954*]), los efectos de las dos mutaciones parecen aditivos, ya que la formación de células S es más abundante que en los mutantes por separado, y estas células S se vuelven más inestables, ya que se lisan al final de los experimentos de *time-lapse* (figura 33, video suplementario 10).

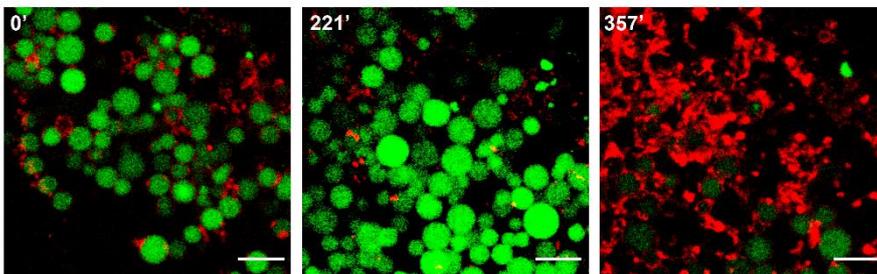


Figura 33. Efecto de la sobreexpresión de *SCO0954* en el mutante *SCO4439-40::Tn5062*. Sobreexpresión de *SCO0954* en el mutante *SCO4439-40::Tn5062* (cepa *SCO4439-40::Tn5062* [pNG4 *SCO0954*]). Se muestran *time-lapse* realizados en cultivos GYM suplementados con 0,64M sacarosa. Los cultivos se tiñeron con SYTO-9 (verde, tinción de ADN) y FM5-95 (rojo, tinción de membrana). Se indican los puntos de tiempo de incubación en minutos (0 corresponde al inicio del *time-lapse*, es decir, a un cultivo de 48 horas). Las barras de escala indican 8 μm .

b) Sobreexpresión de *SCO0954* en el mutante *SCO1760::Tn5*

Cuando el gen *SCO0954* se sobreexpresó en el mutante *SCO1760::Tn5* (cepa *SCO1760::Tn5* [pNG4 *SCO0954*]), el fenotipo observado fue similar al del mutante *SCO1760::Tn5*: las células S son más difíciles de encontrar y, por tanto, menos abundantes que en el mutante que sobreexpresa *SCO0954*. Además, como el mutante *SCO1760::Tn5*, las hifas se lisan al

RESULTADOS

final del *time-lapse* (compárese el fenotipo de *SCO1760::Tn5* en la figura 31 con la combinación de ambos en la figura 34, video suplementario 11).

Este resultado parece indicar que el fenotipo de *SCO1760::Tn5* prevalece sobre el fenotipo de la mutación de *SCO0954*.

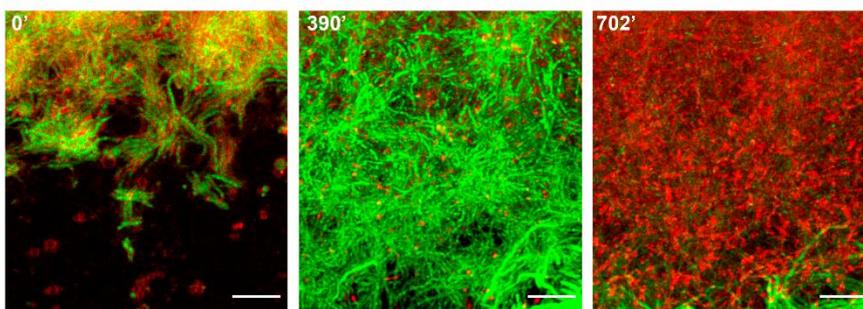


Figura 34. Efecto de la sobreexpresión de *SCO0954* en el mutante *SCO1760::Tn5*.

Sobreexpresión de *SCO0954* en el mutante *SCO1760::Tn5* (cepa *SCO1760::Tn5* [pNG4 *SCO0954*]). Se muestran *time-lapse* realizados en cultivos GYM suplementados con 0,64M sacarosa. Los cultivos se tiñeron con SYTO-9 (verde, tinción de ADN) y FM5-95 (rojo, tinción de membrana). Se indican los puntos de tiempo de incubación en minutos (0 corresponde al inicio del *time-lapse*, es decir, a un cultivo de 48 horas). Las barras de escala indican 8 μ m.

IV.3.3. Formación de células sin pared en medio SFM suplementado con 0,64M de sacarosa

A diferencia de lo que ocurre en cultivos en medio GYM suplementados con sacarosa, observamos que la cepa salvaje de *S. coelicolor* sí es capaz de formar células similares a protoplastos en cultivos SFM de 48 horas suplementados con 0,64 M sacarosa (Figura 35 a). Estas células similares a protoplastos son capaces de moverse e incluso de dividirse, asemejándose a las formas L (figura 35a y video suplementario 5).

El mutante que sobreexpresa *SCO0954* también puede formar células similares a protoplastos en cultivos de SFM suplementados con sacarosa capaces de deformarse y moverse (Figura 35 b y video suplementario 6), pero no observamos que fueran capaces de dividirse.

Por otra parte, los mutantes *knockout ΔSCO0954* (figura 35c y video suplementario 7), *SCO4439/40::Tn5062* (figura 35d y video suplementario 8) y *SCO1760::Tn5* (figura 35e y video suplementario 9) forman células S estables e incapaces de deformarse, moverse o dividirse cuando crecían en cultivos SFM suplementados con 0,64M sacarosa. Curiosamente, algunas de las células similares a protoplastos del mutante *SCO1760::Tn5* mostraron una acumulación notoria de membrana (tinción FM5-95) (Figura 35e y video suplementario 9), similar a lo que ocurría con el *knockout ΔSCO0954* en la cepa de tipo salvaje en medio GYM con 0,64M sacarosa (figura 31b y video suplementario 4).

RESULTADOS

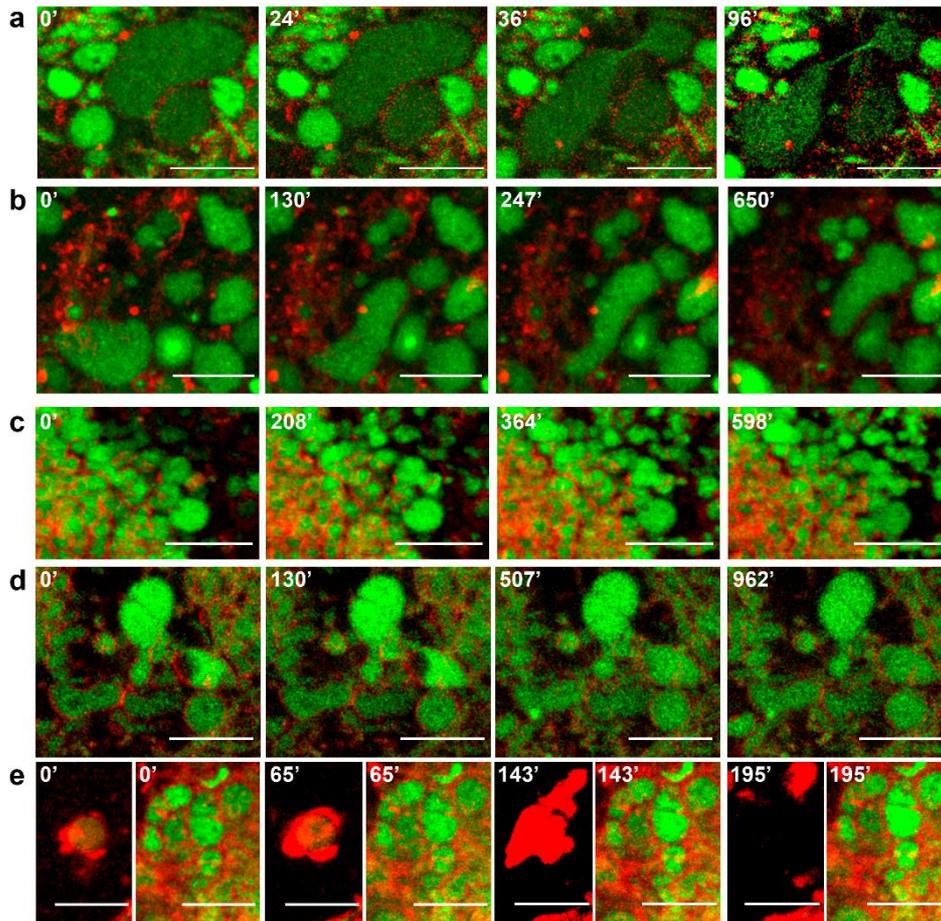


Figura 35. Formación de células S y formas L en medio SFM suplementado con 0,64M sacarosa. (a) Cepa de tipo salvaje de *S. coelicolor*. (b) Sobreexpresión de *SCO0954* en cepa salvaje. (c) Mutante *knockout* de *SCO0954*. (d) Mutante *SCO4439-40::Tn5062*. (e) Mutante *SCO1760::Tn5*. Los *time-lapse* se iniciaron en cultivos en placa SFM suplementados con 0,64M sacarosa a las 48 horas y se tiñeron con SYTO-9 y FM5-95. Se indican los puntos de tiempo de incubación en minutos (0 corresponde al inicio del *time-lapse*, es decir, a un cultivo de 48 horas). Las barras de escala indican 8 μm .

IV.3.4. Tamaño y abundancia de células sin pared en medio GYM suplementado con 0,64M sacarosa

Tal y como hemos detallado en el apartado IV.3.1, todos los mutantes estudiados (*SCO1760::Tn5*, *SCO4439-40::Tn5062* y los mutantes de sobreexpresión/delección de *SCO0954*) forman células deficientes de pared en medio GYM suplementado con 0,64M sacarosa a las 48 horas del ciclo de desarrollo, mientras que la cepa silvestre de *S. coelicolor* no los forma.

Dentro de los propios mutantes, la formación de células deficientes de pared se ve afectada tanto en tamaño como en abundancia (cuantificada como el porcentaje entre el área de las vesículas cuantificadas y el área total de hifas teñidas analizado).

Las células S formadas por el *knockout* Δ *SCO0954* tienen un tamaño significativamente mayor que el resto de mutantes, alcanzando áreas de entre 4 y 19 μm^2 (figura 36 a). El resto de mutantes forman células deficientes de pared con tamaños similares entre sí y ligeramente inferiores a las formadas por el *knockout* Δ *SCO0954* (figura 36 a). Además, la abundancia de vesículas/células S es también mucho mayor en el *knockout* Δ *SCO0954* en comparación con el resto de mutantes (figura 36 b).

RESULTADOS

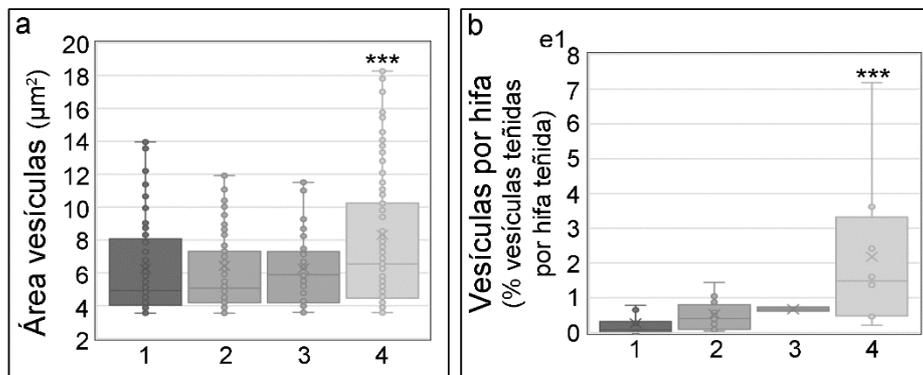


Figura 36. Gráfica de cajas y bigotes del tamaño y abundancia de vesículas (células sin pared) entre los mutantes *SCO1760::Tn5*, *SCO4439-40::Tn5062*, *SCO0954* sobreexpresado y *SCO0954* *knockout* en medio GYM suplementado con 0,64M de sacarosa. (a) Tamaño de las vesículas (cuantificado en μm^2). (b) Número de vesículas por hifa cuantificado como el porcentaje entre el área de las vesículas cuantificadas y el área total de hifas teñidas analizado (véanse detalles en Metodología). Relación de cepas: 1) Mutante *SCO1760::Tn5*, 2) Mutante *SCO4439/40::Tn5062*, 3) *SCO0954* sobreexpresado en la cepa salvaje de *S. coelicolor*; 4) Mutante *knockout* *SCO0954*. * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, * < 0.001 .**

IV.3.5. Tamaño y abundancia de células sin pared en medio SFM suplementado con 0,64M sacarosa

Tal como se indicó en el apartado IV.3.3, la cepa salvaje de *S. coelicolor* es capaz de producir células sin pared en medio SFM suplementado con 0,64M de sacarosa, a diferencia de lo que ocurre en medio GYM. Interesantemente, los mutantes *SCO1760::Tn5*, *SCO4439-40::Tn5062* y *SCO0954* sobreexpresado y *knockout* afectan al tamaño y la abundancia de estas células sin pared, indicando que las características de estas células están reguladas genéticamente: las células sin pared de los mutantes *SCO1760::Tn5* y *SCO4439-40::Tn5062* tienen tamaños significativamente menores que el resto de cepas (figura 37a). Por otra parte, la formación de estas células está muy reducida en el mutante

SCO1760::Tn5, mientras que es cercana al 100% en los mutantes *SCO0954* sobreexpresado y *knockout* (figura 37b).

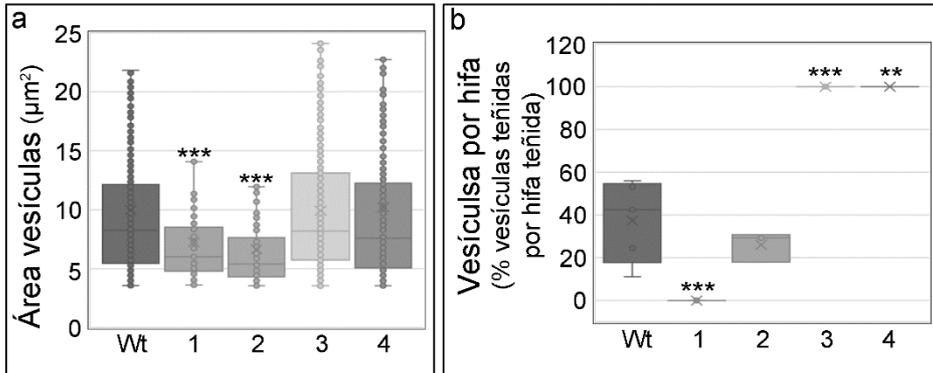


Figura 37. Gráfica de cajas y bigotes del tamaño y abundancia de vesículas (células sin pared) entre los mutantes *SCO1760::Tn5*, *SCO4439-40::Tn5062*, *SCO0954* sobreexpresado y *SCO0954* *knockout* en medio SFM suplementado con 0,64M de sacarosa. (a) Tamaño de las vesículas (cuantificado en μm^2). (b) Número de vesículas por hifa cuantificado como el porcentaje entre el área de las vesículas cuantificadas y el área total de hifas teñidas analizado (véanse detalles en material y métodos). Relación de cepas: Wt) Cepa salvaje de *S. coelicolor* 1) Mutante *SCO1760::Tn5*, 2) Mutante *SCO4439/40::Tn5062*, 3) *SCO0954* sobreexpresado en la cepa salvaje de *S. coelicolor*; 4) Mutante *knockout* *SCO0954*. * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, * < 0.001 .**

IV.3.6. Las células similares a protoplastos formadas en los mutantes *SCO1760::Tn5*, *SCO4439-40::Tn5062* y *SCO0954* carecen de pared celular

Las células similares a protoplastos descritas en los apartados anteriores se asemejan a las células deficientes de pared (células S y formas L) descritas en *Kitasatospora viridifaciens*, ya que son inducidas por estrés osmótico S (Ultee *et al.*, 2021). A continuación, investigamos si las células observadas en este trabajo carecen de pared celular, al igual que ocurre con las células S y las formas L.

RESULTADOS

Para ello combinamos la tinción verde de pared celular Alexa Fluor 48 – WGA con tinción roja de membrana (FM5-95), siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.5.4. Al crecer las cepas en medio SFM suplementado con 0,64M sacarosa, observamos hifas hinchadas y células similares a protoplastos con membrana (tinción roja) y sin pared celular (tinción verde) en todos los mutantes, así como en la cepa de tipo salvaje de *S. coelicolor* (figura 38, las puntas de flecha indican células sin pared celular detectable).

Curiosamente, también detectamos células similares a protoplastos con paredes muy delgadas (señalizadas con asteriscos en la figura 38) y con paredes gruesas (indicadas con flechas en la figura 38). Algunas de las células mostraron puntos densos (indicados con cuadrados en la figura 38) en la pared celular. Será necesario seguir trabajando para discernir si estos parches de pared celular son partes de la pared originaria que permanecen después de la formación de células S y formas L, o si, por el contrario, son puntos en los que el peptidoglicano está comenzando a regenerarse tras la formación de las células sin pared.

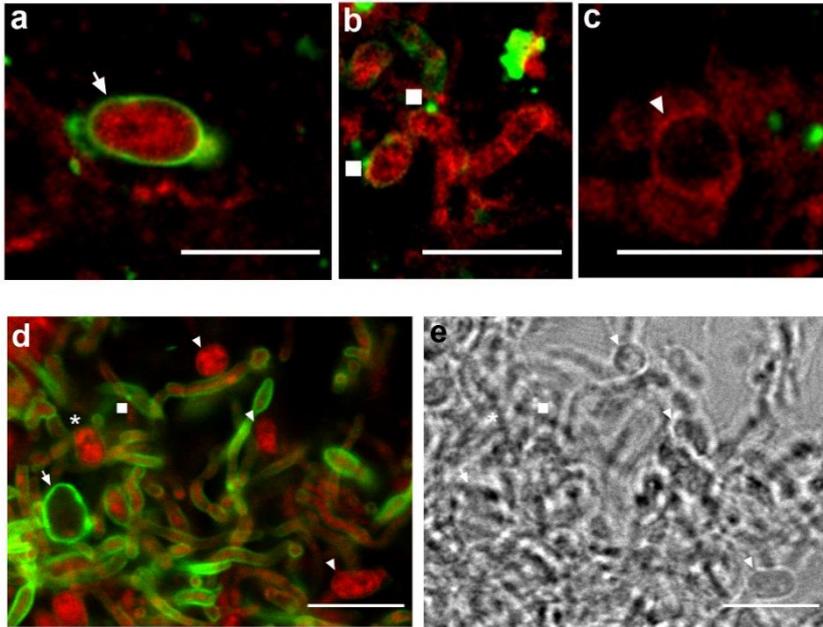


Figura 38. Tinción de membrana y de pared celular de las células S en la cepa salvaje de *S. coelicolor* y el mutante *SCO4439-40::Tn5062*. Los cultivos se tiñeron con Alexa Fluor 48 - WGA (tinción de pared celular verde) y FM5-95 (tinción de membrana roja) y se observaron a microscopía confocal. (a-c) Cepa de tipo salvaje que crece en cultivos SFM suplementados con sacarosa 0,64 M. (d-e) Mutante *SCO4439/40::Tn5062* que crecen en cultivos GYM suplementados con sacarosa 0,64 M. Se obtuvieron imágenes similares en los otros mutantes. Las puntas de flecha indican células sin paredes celulares detectables; los asteriscos indican células similares a protoplastos con paredes celulares muy delgadas; las flechas indican células con paredes gruesas de peptidoglicano; los cuadrados indican células con parches de pared celular. Se muestran imágenes representativas de al menos tres réplicas biológicas. Las barras de escala indican 8 μm .

IV.4. LAS PROTEÍNAS SCO0954, SCO1758, SCO4439 Y SCO4440 ESTÁN ALTAMENTE CONSERVADAS EN *STREPTOMYCES COELICOLOR*

Para tratar de discernir las funciones y la relevancia de las proteínas SCO0954, SCO1758, SCO4439 y SCO4440, analizamos sus homologías y su conservación en seis cepas modelo de *Streptomyces* (*S. lividans*, *S. avermitilis*, *S. venezuelae*, *S. scabies*, *S. griseus* y *S. clavuligerus*).

IV.4.1. Conservación y homologías de SCO1758

SCO1758 alberga un hipotético dominio EngA GTPasa (número de acceso en *Conserved Domain Database*, TIGR03594) altamente conservado (98% de similitud promedio en las cepas modelo de *Streptomyces* analizadas). Las GTPasas comprenden una superfamilia de proteínas altamente conservadas que modulan un elevado número de procesos celulares (Caldon *et al.*, 2001). Concretamente, la familia EngA participa en la segregación cromosómica, la división celular, el control del ciclo celular y la estabilidad ribosomal en *E. coli* (Bharat and Brown, 2014, Robinson *et al.*, 2002), si bien es posible que tengan otras funciones biológicas desconocidas.

El dominio EngA GTPasa se caracteriza por la presencia de dos dominios de unión a GTP dispuestos en tándem (van Doorn *et al.*, 1997, Caldón and March, 2003) que incluyen tres motivos (G-1, G-3 y G-4) definidos en las GTPasas EngA prototipo de *Campylobacter jejuni*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma genitalium* y *Mycobacterium leprae* (van Doorn *et al.*, 1997). Estos motivos están también presentes en la GTPasa EngA SCO1758 (figura 39). El motivo G-1 corresponde a un bucle flexible presente en muchas proteínas de unión a ATP/GTP, que se

describió que interactúa con grupos fosfato (número de acceso en Prosite: PS00017).

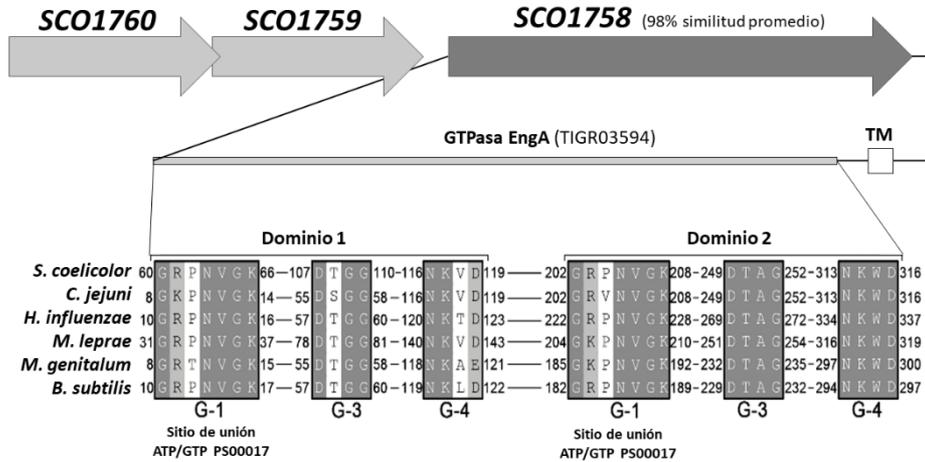


Figura 39. Homologías y conservación de SCO1758 en *Streptomyces*. Alineación de SCO1758 con el prototipo de GTPasas EngA bacterianas que muestra los dos dominios de unión a GTP, los motivos G-1, G-3, G-4 y el bucle P que caracteriza a las GTPasas EngA. Se muestran los números de acceso a la base de datos de dominios conservados, así como la similitud promedio entre los ortólogos de proteínas de seis *Streptomyces* modelo: *S. lividans*, *S. avermitilis*, *S. venezuelae*, *S. scabies*, *S. griseus* y *S. clavuligerus*.

IV.4.2. Conservación y homologías de SCO0954

El gen *SCO0954* codifica una proteína pequeña de 160 aminoácidos de longitud, moderadamente conservada en *Streptomyces* (75% de similitud promedio), que alberga un dominio YncA (número de acceso en *Conserved Domain Database*, COG1247) (figura 40). YncA corresponde a una subfamilia de las N-acetiltransferasas (GNAT) relacionadas con GCN5, cuyo prototipo se caracterizó en *Salmonella enterica* (Hentchel and Escalante-Semerena, 2015). Los GNAT bacterianos pueden acetilar

RESULTADOS

una amplia variedad de moléculas, incluidos aminoácidos, poliaminas y antibióticos, entre otros, regulando con ello una amplia variedad de vías celulares (Burckhardt and Escalante-Semerena, 2020). YncA en *Salmonella enterica* acetila específicamente los derivados oxidativos de la metionina, bloqueando su transporte al interior celular y previniendo su toxicidad (Hentchel and Escalante-Semerena, 2015).

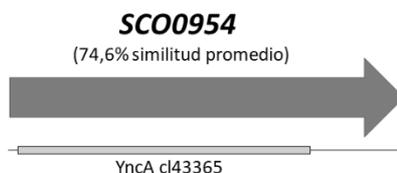


Figura 40. Homologías y conservación de SCO0954 en *Streptomyces*. Dominio conservado de SCO0954 y conservación de proteínas. Se muestran los números de acceso a la base de datos de dominios conservados.

IV.4.3. Conservación y homologías de SCO4439 y SCO4440

La proteína SCO4439, caracterizada con anterioridad en un trabajo de nuestro grupo de investigación (Rioseras *et al.*, 2016), alberga una D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa (70% de similitud promedio) y un posible dominio regulador transcripcional (44% de similitud promedio), separados por un dominio transmembrana. SCO4440 está altamente conservada y muestra una similitud promedio del 93% entre los estreptomicetos modelo analizados (figura 41).

Por su parte, SCO4440 alberga un dominio de fosfoproteína 3 de Golgi (GOLPH3), también conocido como GPP34 (número de acceso en *Conserved Domain Database*, pfam05719). Las proteínas GOLPH3 en eucariotas están altamente conservadas y forman parte de la llamada red

trans-Golgi, una vía secretora que clasifica las proteínas recién sintetizadas en diferentes vesículas de transporte (Sechi *et al.*, 2015). Hasta donde sabemos, no se han descrito proteínas GOLPH3 anteriormente en procariotas. El prototipo de proteína GOLPH3 de *Homo sapiens* (número de acceso NCBI: NP_071413.1) muestra una identidad proteica superior al 64% en comparación con otros GOLPH3 animales y una identidad proteica del 39,73% en comparación con *Saccharomyces cerevisiae* (Sechi *et al.*, 2015). La GOLPH3 de *S. coelicolor* solo muestra una identidad proteica del 27% con la de *H. sapiens*. Curiosamente, la sintenia *SCO4439-SCO4440* está conservada en los seis estreptomicetos modelo analizados (figura 41).

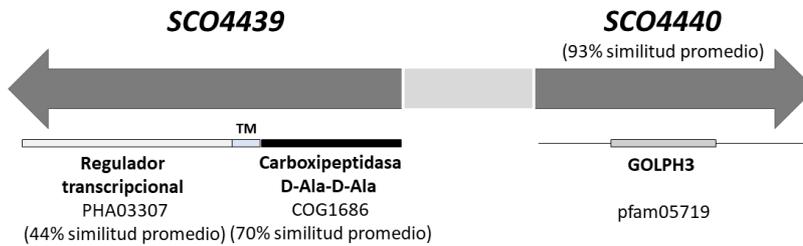


Figura 41. Homologías y conservación de *SCO4439* y *SCO4440* en *Streptomyces*. Dominios conservados de *SCO4439* y *SCO4440* y conservación de proteínas. Se muestran los números de acceso a la base de datos de dominios conservados.

IV.5. ESTUDIO DE LA PARED CELULAR DE LOS MUTANTES *SCO1760::Tn5*, *SCO4439-40::Tn5062*, *SCO0954* SOBREEXPRESADO Y *SCO0954 KNOCKOUT*

IV.5.1. *Cross-linking* del peptidoglicano de los mutantes *SCO1760::Tn5*, *SCO4439-40::Tn5062*, *SCO0954* sobreexpresado y *SCO0954 knockout*

Tal y como se introdujo en el apartado IV.2.4, la carboxipeptidasa D-Ala D-Ala (*SCO4439*) rompe los enlaces D-Ala-D-Ala, reduciendo el sustrato para la formación del *cross-linking* en el peptidoglicano (Rioseras *et al.*, 2016). A raíz de esta observación, barajamos la hipótesis de que la alteración del peptidoglicano podría estar implicada en la formación de células S y formas L en el mutante *SCO4439-40::Tn5062*, y quizás también en los otros tres mutantes.

Para probar esta hipótesis, cuantificamos el *cross-linking* del peptidoglicano mediante un método de bloqueo de extremos amino libres con 1-fluoro-2,4-dinitrobenzono (FNDB) acoplado a la extracción e hidrólisis del PG y a la derivatización con orto-ftalaldehído (OPA), descrito originalmente para *Bacillus subtilis* (Atrih *et al.*, 1996) y adaptado posteriormente para *Streptomyces* (Rioseras *et al.*, 2016). En términos generales, este método se basa en el tratamiento del peptidoglicano con 1-fluoro-2, 4-dinitrobenceno (FDNB), un compuesto que bloquea los extremos amino libres de la glicina (es decir, aquellos que no forman enlaces cruzados), evitando la unión posterior del OPA en los aminoácidos liberados tras el proceso de hidrólisis ácida. El cociente entre la glicina cuantificada en muestras tratadas y sin tratar con FDNB después de la derivatización con OPA (índice *cross-linking*) indican el nivel de entrecruzamiento en el peptidoglicano: un índice *cross-linking* elevado sería indicativo de más cantidad de glicina unida en enlaces

cruzados y, por tanto, no bloqueada por FDNB antes de la hidrólisis (figura 42).

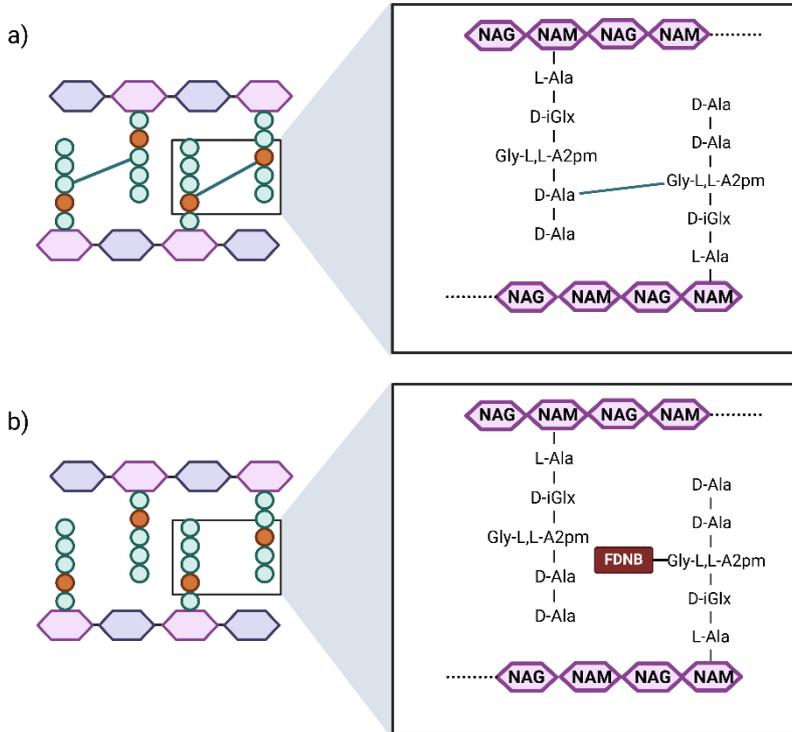


Figura 42. Representación del *cross-linking* en un fragmento de peptidoglicano de la pared celular. (a) Peptidoglicano con entrecruzamiento entre residuo de Gly y de D-Ala; el residuo de Gly no tiene extremo NH₃ libre y por tanto no se puede unir el FDNB. (b) Peptidoglicano sin *cross-linking*: el extremo NH₃ libre de la Gly quedaría bloqueado en el tratamiento con FDNB. NAG: N-acetilglucosamina. NAM: ácido N-acetilmurámico. D-Ala: D-Alanina, Gly: glicina. D-iGlx: D-iso-glutamina o ácido D-iso-glutámico. LL-A2pm: ácido 2,6-Diaminopimérico.

RESULTADOS

Lo primero que hicimos fue medir el índice de *cross-linking* en la cepa salvaje de *S. coelicolor* con y sin los plásmidos integrativos Φ BT1 (pMS82, pNG3 y pNG4) y Φ C31 (pRASK) utilizados para la complementación del fenotipo de los mutantes. Pese a que se observan pequeñas diferencias en el índice de *cross-linking* cuantificado en estas cepas, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (figura 43a). Por tanto, concluimos que los plásmidos utilizados no están afectando significativamente al *cross-linking*.

Tal y como se detalló con anterioridad (véase apartado IV.2.4), nuestro grupo de investigación observó en un estudio previo que la mutación de la carboxipeptidasa SCO4439 aumenta ligeramente el índice *cross-linking* en el mutante *SCO4439-40::Tn5062* (Rioseras *et al.*, 2016). A pesar de que en nuestro análisis el mutante también tiene un índice *cross-linking* incrementado con respecto a la cepa de tipo salvaje, dicho aumento no fue estadísticamente significativo (figura 43 b).

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la cepa salvaje de *S. coelicolor* y los mutantes *SCO0954 knockout* (Δ SCO0954) y sobreexpresante (cepa Wt [pNG4 SCO0954]) (figura 43c), del mismo modo que tampoco observamos diferencias entre la cepa salvaje y el mutante *SCO1760::Tn5* y su cepa de complementación (cepa *SCO1760::Tn5* [pNG3 SCO1760-59-58]) (figura 43d).

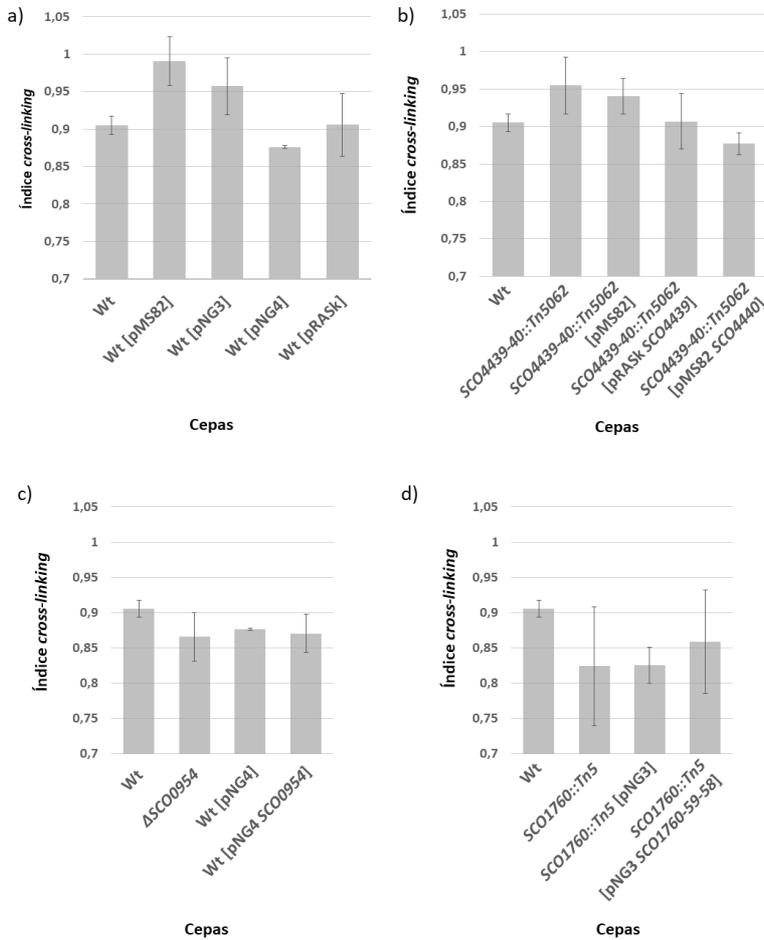


Figura 43. Comparativa del índice *cross-linking* del peptidoglicano entre la cepa salvaje de *S. coelicolor* (Wt) y los mutantes estudiados. a) Índice *cross-linking* de la cepa salvaje (Wt) y la cepa salvaje con los plásmidos pMS82, pNG3 y pNG4 usados en construcciones de complementación y sobreexpresión. b) *Cross-linking* en el mutante *SCO4439-40::Tn5062* y sus cepas de complementación. c) *Cross-linking* en los mutantes *SCO0954 knockout* (Δ *SCO0954*) y sobreexpresante (cepa Wt [pNG4 *SCO0954*]). d) *Cross-linking* en el mutante *SCO1760::Tn5* y en la cepa de complementación (cepa *SCO1760::Tn5* [pNG3 *SCO1760-59-58*]).

IV.5.2. Niveles de metionina oxidada y no oxidada del peptidoglicano de los mutantes *SCO1760::Tn5*, *SCO4439-40::Tn5062*, *SCO0954* sobreexpresado y *SCO0954 knockout*

Tal como se indicó en el apartado IV.4.2, la proteína SCO0954 tiene una homología clara con la YncA N-acetiltransferasa de *Salmonella enterica* que está implicada en la acetilación de metionina oxidada lo que bloquea su transporte al citosol y por tanto incrementa los niveles de metionina oxidada en la pared celular, protegiendo así el citosol de la oxidación (Hentchel and Escalante-Semerena, 2015). Por ello, también cuantificamos la metionina y la metionina oxidada del peptidoglicano de todos los mutantes.

Si bien el pentapéptido principal del peptidoglicano en *S. coelicolor* carece de metionina, las sortasas pueden unir péptidos al peptidoglicano formando estructuras laterales ligadas al muropéptido que se conocen como puentes interpeptídicos (Schneewind and Missiakas, 2012). La composición de estos puentes interpeptídicos varían entre especies (Rohrer and Berger-Bachi, 2003), y pueden tener metioninas que pueden oxidarse o acetilarse cuando tienen extremos amino libres (figura 44). La metionina total (oxidada y no oxidada) cuantificada sería un reflejo de la cantidad de péptidos del PG, mientras que la cantidad de metionina oxidada reflejaría el estado de oxidación de la pared celular.

Cuantificamos los tres tipos de metionina oxidada (metionina sulfóxido, metionina sulfona y metionina sulfoximina), pero solo se detectó metionina sulfóxido en el peptidoglicano de *S. coelicolor*.

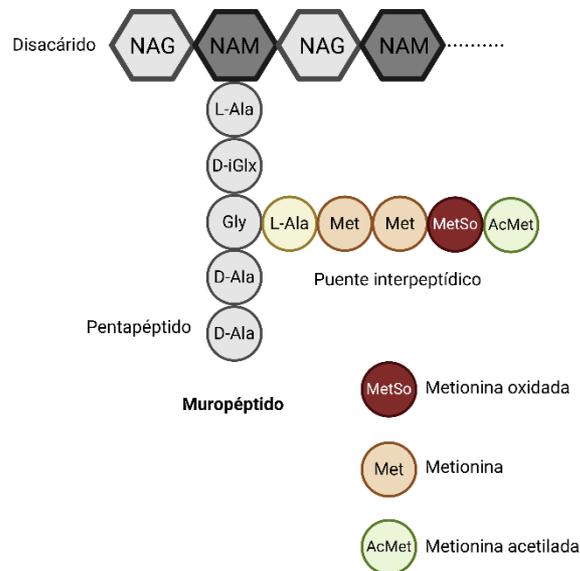


Figura 44. Representación de la estructura de un muropéptido monomérico con un puente interpeptídico. El puente interpeptídico está integrado por residuos de metionina (Met), metionina sulfóxido (MetSo) y metionina acetilada (AcMet). La metionina se acetila en el extremo amino, por lo que la metionina acetilada sólo puede estar en el extremo del puente interpeptídico, es decir, en los péptidos unidos por las sortasas a la pared celular.

a) Metionina oxidada y no oxidada en el peptidoglicano de *Streptomyces coelicolor* con y sin los plásmidos utilizados para complementar los mutantes

Descubrimos que los plásmidos integrativos Φ BT1 utilizados para la complementación (pMS82 y pNG3) y para la sobreexpresión de genes (pNG4) afectaron a los niveles de metionina oxidada y total del peptidoglicano: el plásmido pMS82 (cepa Wt [pMS82]) aumentó significativamente la metionina sulfóxido u oxidada (barras azules en la figura 44), la metionina no oxidada (barras verdes en la figura 45a) y la metionina total (barras naranjas en la figura 45c). La cepa de tipo salvaje

RESULTADOS

que alberga pNG3 (cepa Wt [pNG3]) no mostró diferencias significativas en comparación con la cepa de tipo salvaje, mientras que el plásmido pNG4 (cepa Wt [pNG4]) generó una reducción en los niveles de metionina no oxidada (barras verdes en la figura 45a) y en la metionina total (barras naranjas en la figura 45c). Tampoco se observaron diferencias significativas en la metionina oxidada (figura 45b) ni en la metionina total (figura 45d) entre la cepa de tipo salvaje con y sin el plásmido integrativo Φ C31 pRASK que se utilizó para complementar el fenotipo del mutante *SCO4439-40::Tn5062*.

Los plásmidos Φ BT1 se integran en *SCO4848* afectando a la expresión de *SCO4848* y *SCO4849* (González-Quióné et al., 2016). *SCO4849* alberga un dominio EpsH de exosortasa (número de acceso en *Conserved Domain Database*: pfam09721), que podría estar actuando como una exosortasa. Las exosortasas son enzimas que liberan péptidos del peptidoglicano (Haft et al., 2006a, Craig et al., 2011a). Estas observaciones nos llevaron a cuantificar la transcripción de *SCO4849* en la cepa de tipo salvaje (Wt) con y sin estos tres plásmidos (cepas Wt [pMS82], Wt [pNG3] y Wt [pNG4]). Para analizar la transcripción de *SCO4849*, se extrajo ARN total de cultivos en medio sólido GYM a las 24 horas de desarrollo siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.4.1. Para realizar la RT-qPCR se siguió el ciclo descrito en el mismo apartado utilizando los cebadores *q4849F1* y *q4849R2*, que hibridan en las posiciones 6 y 98 de la ORF de *SCO4849* (tabla 6).

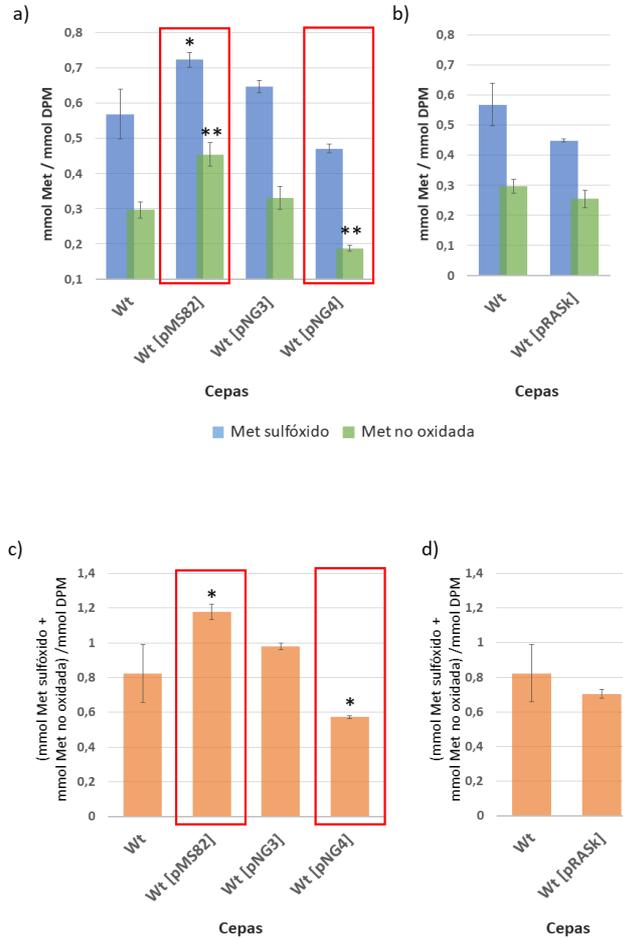


Figura 45. Metionina sulfóxido, metionina no oxidada y metionina total en la cepa de tipo salvaje de *S. coelicolor* y en las cepas de tipo salvaje con los plásmidos pMS82, pNG3, pNG4 y pRASK. a) Metionina sulfóxido y metionina no oxidada en la cepa salvaje de *S. coelicolor* con y sin plásmidos integrativos ΦBT1. b) Metionina sulfóxido y metionina no oxidada en la cepa salvaje de *S. coelicolor* con y sin el plásmido integrativo ΦC31. c) Metionina total en la cepa salvaje de *S. coelicolor* con y sin plásmidos integrativos ΦBT1. d) Metionina total en la cepa salvaje de *S. coelicolor* con y sin el plásmido integrativo ΦC31 pRASK. Se rodean en rojo las cepas mostrando diferencias significativas en comparación con la cepa de tipo salvaje o el mutante portando el plásmido de complementación: * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** < 0.001 .

RESULTADOS

Observamos que la metionina total cuantificada (figura 45c) es inversamente proporcional a la expresión de *SCO4849* (figura 46), lo que nos llevó a concluir que *SCO4849* actúa como una exosortasa, disminuyendo la cantidad de metionina total. Como se describe en los siguientes párrafos, y para evitar interpretaciones erróneas de los análisis de peptidoglicano debido al efecto de los plásmidos, analizamos el efecto de los plásmidos pMS82 y pNG3 en los mutantes *SCO4439-40::Tn5062* y *SCO1760::Tn5* respectivamente, y comparamos el efecto de los plásmidos vacíos con los plásmidos portando los genes de complementación.

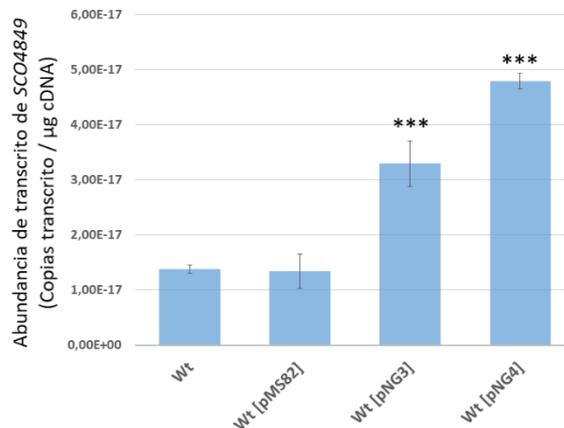


Figura 46. Abundancia de transcrito de *SCO4849*. Abundancia de transcrito de *SCO4849* en la cepa de tipo salvaje de *S. coelicolor* y en las cepas de tipo salvaje que albergan los plásmidos pMS82 (cepa Wt [pMS82]), pNG3 (cepa Wt [pNG3]) y pNG4 (cepa Wt [pNG4]). Se procesaron tres replicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con la cepa de tipo salvaje: * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** < 0.001 .

b) Metionina oxidada y no oxidada en el peptidoglicano del mutante *SCO4439-40::Tn5062* y sus cepas complementadas

Observamos que la metionina no oxidada disminuye significativamente en el mutante *SCO4439-40::Tn5062* (figura 47a).

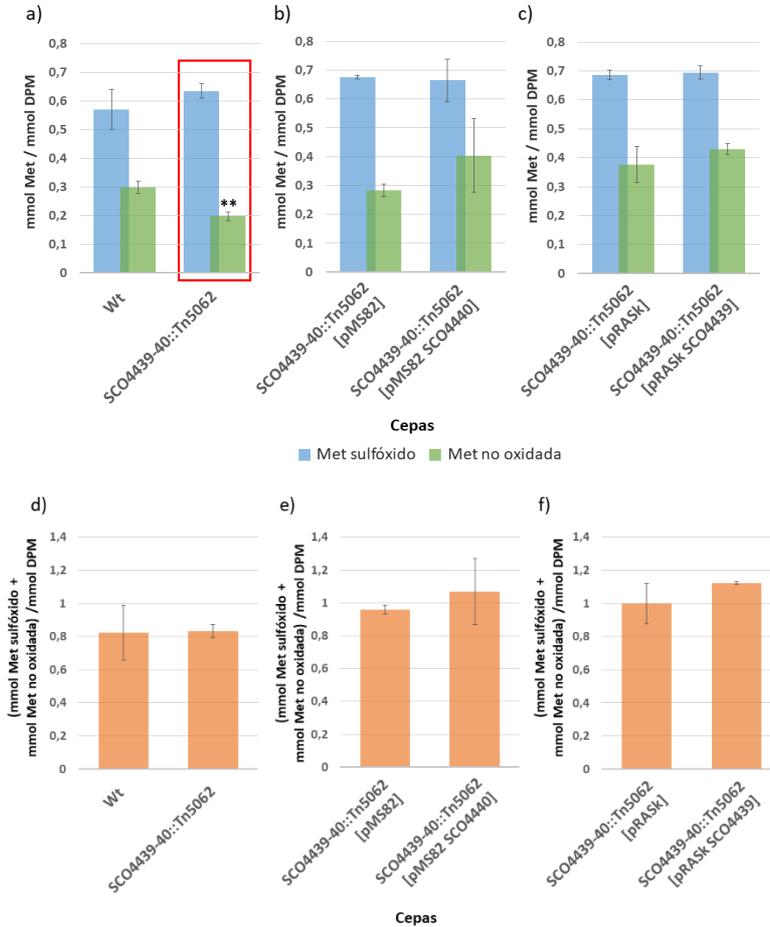


Figura 47. Metionina sulfóxido, metionina no oxidada y metionina total en el mutante *SCO4439-40::Tn5062* y cepas complementadas. a) Metionina sulfóxido y no oxidada en el mutante *SCO4439-40::Tn5062* comparado con la cepa salvaje de *S. coelicolor*. b) Metionina sulfóxido y no oxidada en el mutante *SCO4439-40::Tn5062* complementado con *SCO4440* comparado con el mutante portando el plásmido pMS82. c) Metionina sulfóxido y no oxidada en el mutante *SCO4439-40::Tn5062* complementado con *SCO4439* comparado con el mutante portando el plásmido pRASK. d) Metionina total en el mutante *SCO4439-40::Tn5062* comparado

RESULTADOS

con la cepa salvaje de *S. coelicolor*. e) Metionina total en el mutante *SCO4439-40::Tn5062* complementado con *SCO4440* comparado con el mutante portando el plásmido pMS82. f) Metionina total en el mutante *SCO4439-40::Tn5062* complementado con *SCO4439* comparado con el mutante portando el plásmido pRASK. Se rodean en rojo las cepas mostrando diferencias Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con la cepa de tipo salvaje o el mutante portando el plásmido de complementación: * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** < 0.001 .

c) Metionina oxidada y no oxidada en el peptidoglicano del mutante *knockout* Δ SCO0954 y el mutante sobreexpresando *SCO0954*

El mutante *knockout* Δ SCO0954 mostró unos niveles tanto de metionina no oxidada (barras verdes) como de metionina sulfóxido (barras azules) reducidos cuando se compara con la cepa silvestre de *S. coelicolor* (figura 48a). Por el contrario, no encontramos diferencias significativas entre los niveles de metionina oxidada y no oxidada en *S. coelicolor* sobreexpresando *SCO0954* o *S. coelicolor* con el vector de sobreexpresión pNG4. Los niveles de metionina total no mostraron diferencias significativas en ninguno de los mutantes comparados con la cepa salvaje (figuras 48c y 48d).

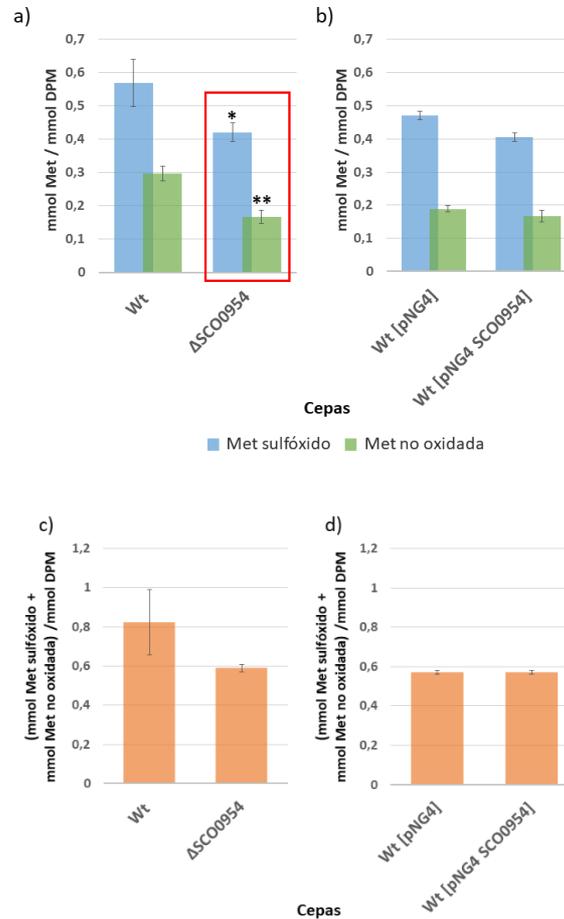


Figura 48. Metionina sulfóxido, metionina no oxidada y metionina total en los mutantes *SCO0954* knockout ($\Delta SCO0954$) y sobreexpresado (cepa Wt [pNG4 *SCO0954*]). a) Metionina sulfóxido y no oxidada en el mutante *knockout* $\Delta SCO0954$ comparado con la cepa salvaje de *S. coelicolor*. b) Metionina sulfóxido y no oxidada en el mutante *SCO0954* sobreexpresado comparado con el mutante portando el plásmido pNG4. c) Metionina total en el mutante *knockout* $\Delta SCO0954$ comparado con la cepa salvaje de *S. coelicolor*. d) Metionina total en el mutante *SCO0954* sobreexpresado comparado con el mutante portando el plásmido pNG4. Se rodean en rojo las cepas mostrando diferencias significativas en comparación con la cepa de tipo salvaje o el mutante portando el plásmido de complementación: * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** < 0.001 .

RESULTADOS

d) Metionina oxidada y no oxidada en el peptidoglicano del mutante *SCO1760::Tn5*

Observamos que el mutante *SCO1760::Tn5* tiene una cantidad reducida de metionina no oxidada en comparación con la cepa de tipo salvaje (barras verdes en figura 49a).

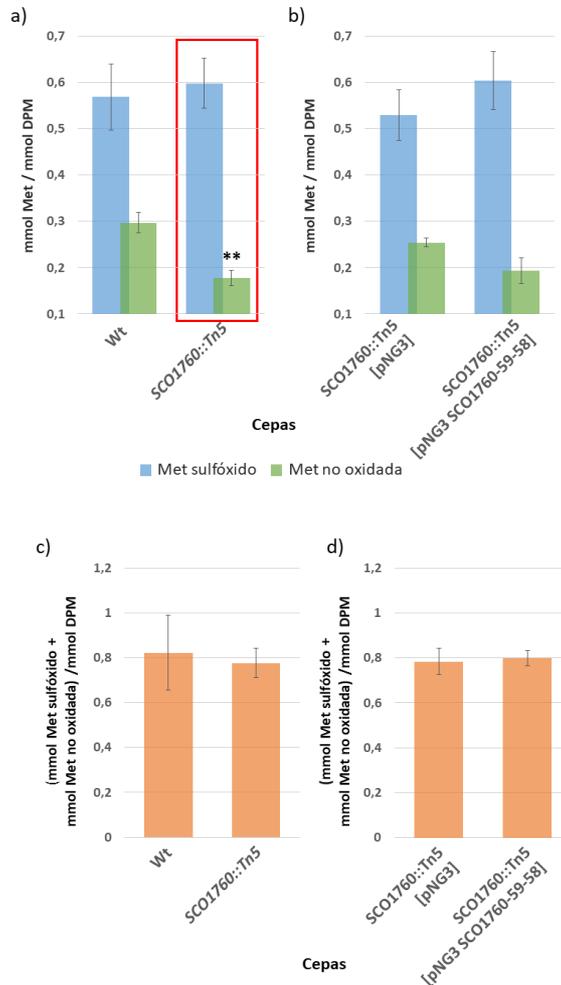


Figura 49. Metionina sulfóxido, metionina no oxidada y metionina total en el mutante *SCO1760::Tn5* y en la cepa complementada (cepa *SCO1760::Tn5* [pNG3 *SCO1760-59-58*]). a) Metionina sulfóxido y no oxidada en el mutante *SCO1760::Tn5* comparado con la cepa salvaje de *S. coelicolor*. b) Metionina sulfóxido y no oxidada en el mutante *SCO1760::Tn5* complementado con *SCO1760-59-58* comparado con

el mutante portando el plásmido pNG3. c) Metionina total en el mutante *SCO1760::Tn5* comparado con la cepa salvaje de *S. coelicolor*. d) Metionina total en el mutante *SCO1760::Tn5* complementado con *SCO1760-59-58* comparado con el mutante portando el plásmido pNG3. Se rodean en rojo las cepas mostrando diferencias significativas en comparación con la cepa de tipo salvaje o el mutante portando el plásmido de complementación: * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** < 0.001 .

IV.5.3. Efecto del potencial redox extracelular en la formación de células sin pared en los mutantes *SCO0954* sobreexpresado y *SCO0954 knockout*

Tal como se indicó arriba (apartado IV.4.2), *SCO0954* tiene un dominio YnCA que se corresponde con una N-acetiltransferasa cuyo prototipo en *Salmonella enterica* acetila metionina oxidada impidiendo su transporte intracelular y aumentando su cantidad en el peptidoglicano (Hentchel and Escalante-Semerena, 2015). El mutante *knockout* en el gen *SCO0954* es en efecto el único que tiene disminuida la cantidad de metionina oxidada en el peptidoglicano.

Por ello, quisimos determinar si un agente reductor fuerte como el ditiotreitól (DTT) afecta a la formación de células S en los mutantes *knockout* y sobreexpresado del gen *SCO0954* en cultivos de GYM con 0,64M sacarosa y con 5 mM DTT. Observamos que la adición de DTT al medio de cultivo no tuvo efecto ni en la cepa de tipo salvaje ni en la que alberga el plásmido de sobreexpresión (cepa Wt [pNG4]); en cambio, sí fue capaz de bloquear la formación de células S en el mutante que sobreexpresa el gen *SCO0954* (cepa Wt [pNG4 *SCO0954*]), pero no en el *knockout* Δ *SCO0954* (figura 50).

RESULTADOS

Los cultivos suplementados con DTT no tuvieron ningún efecto sobre el resto de mutantes.

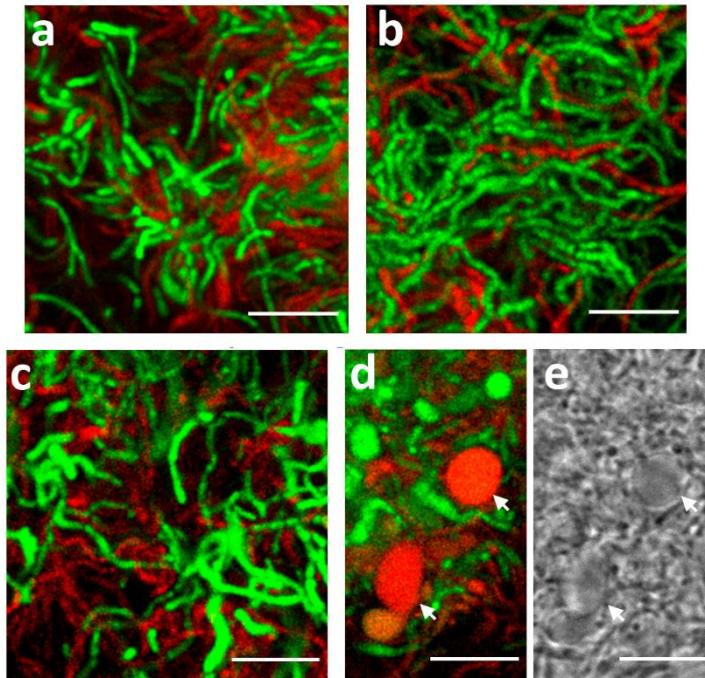


Figura 50. Formación de células S en medio GYM suplementado con 0,64M sacarosa y 5 mM DTT. (a) Cepa de tipo salvaje de *S. coelicolor*. (b) Cepa de tipo salvaje que alberga plásmido pNG4 (cepa Wt [pNG4]). (c) Mutante que sobreexpresa el gen *SCO0954* (cepa Wt [pNG4 *SCO0954*]). (d) Mutante *knockout* Δ *SCO0954*. Las flechas indican células S. Se muestran imágenes representativas de al menos tres réplicas biológicas. Las barras de escala indican 8 μ m.

IV.5.4. La resistencia a la vancomicina está ligeramente disminuida en el mutante *SCO1760::Tn5*

Los dipéptidos terminales D-Ala-D-Ala del peptidoglicano son el objetivo molecular de los antibióticos glicopeptídicos (Cooper and Williams, 1999). En consecuencia, la sensibilidad bacteriana a este tipo de

antibióticos puede verse afectada por cambios en el peptidoglicano. En un estudio anterior se había observado que la resistencia del micelio al glicopéptido vancomicina se reducía en el mutante *SCO4439-40::Tn5062* (concentración mínima inhibitoria de 110 µg/mL) con respecto a la cepa de tipo salvaje de *S. coelicolor* (Rioseras *et al.*, 2016). Aquí analizamos la resistencia a la vancomicina de los mutantes *SCO1760::Tn5* y las cepas *knockout* y sobreexpresante de *SCO0954*, observando una reducción de la concentración mínima inhibitoria a 100 µg/mL en el mutante *SCO1760::Tn5* (figura 51). La resistencia a la vancomicina no se vio afectada por la eliminación o sobreexpresión de *SCO0954* en la cepa de tipo salvaje.

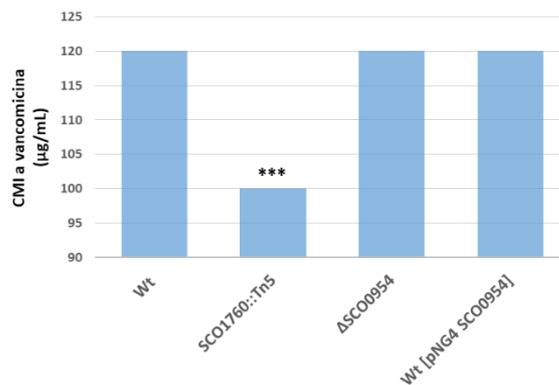


Figura 51. Concentración mínima inhibitoria de vancomicina en los mutantes *SCO1760::Tn5* y *knockout/sobreexpresante de SCO0954*. Se realizaron tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas en comparación con la cepa de tipo salvaje: * $p < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $< 0,001$.

IV.6. DINÁMICA DE LAS PROTEÍNAS SCO1758, SCO4440 Y SCO0954 FUSIONADAS CON LA PROTEÍNA MCHERRY

IV.6.1. Dinámica de SCO1758-mCherry en medio SFM suplementado con 0,64M sacarosa

Una de las GTPasas más estudiadas en *Streptomyces* es la proteína FtsZ, clave en la división celular (den Blaauwen *et al.*, 2017). FtsZ forma distintivas escaleras o anillos Z, separados por 1 μm , durante la esporulación (Grantcharova *et al.*, 2005). Una de nuestras hipótesis es que SCO1758, una GTPasa con dominio EngA, pudiese también estar involucrada en la división celular. Para estudiar la dinámica de SCO1758 y su supuesta interacción con FtsZ, fusionamos el ORF *SCO1758* con el ORF de *mCherry* bajo el control de los promotores nativos P1 y P2, tal y como se indicó en el apartado III.5.2.

Seguimos SCO1758-mCherry (rojo) y FtsZ-eGFP (verde) durante el desarrollo de *S. coelicolor* en cultivos SFM suplementados con 0,64M sacarosa a microscopía de fluorescencia y a microscopía confocal (usamos el medio de cultivo SFM porque la cepa salvaje de *S. coelicolor* no forma células S en GYM). Observamos que SCO1758-mCherry forma puntos rojos distintivos regularmente espaciados que se encuentran a los lados de las hifas, cerca de la membrana (figura 52 a-c). *S. coelicolor* no llega a esporular en cultivos suplementados con 0,64M sacarosa, y los *z-ladders* (anillos de FtsZ-eGFP separados por 1 μm) típicos de la esporulación no se observaron en estas condiciones. Sin embargo, pudimos visualizar puntos discretos de FtsZ-eGFP (figura 52 g, h) que en ningún momento colocalizaron con los puntos SCO1758-mCherry (figura 52 e-i).

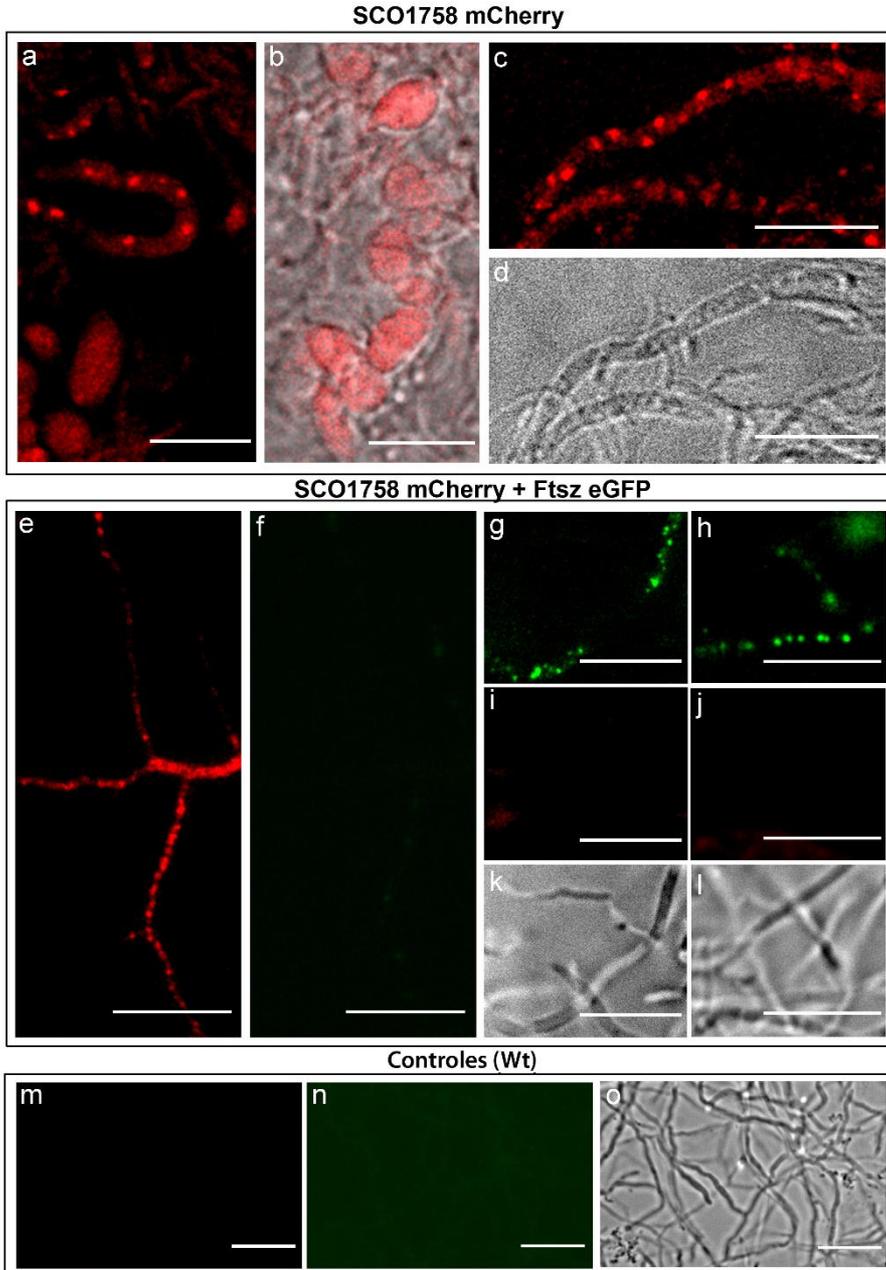


Figura 52. Dinámica de SCO1758-mCherry en cultivos de 48h en SFM suplementado con 0,64M sacarosa. (a-d) Localización celular de SCO1758-mCherry (rojo) en la cepa de tipo salvaje de *S. coelicolor*. (e-l) SCO1758-mCherry (rojo) y FtsZ-eGFP (verde) en la cepa de tipo salvaje de *S. coelicolor*. (m-o) Controles sin SCO1758-mCherry ni FtsZ-eGFP mostrando la ausencia de autofluorescencia bajo la configuración utilizada del microscopio de fluorescencia en la cepa de *S. coelicolor*

RESULTADOS

portando el plásmido pNG3 vacío. Se muestran imágenes representativas de al menos tres réplicas biológicas de microscopía de fluorescencia y contraste de fases. Barras de escala de 8 μm .

IV.6.2. Dinámica de SCO4440-mCherry en medio SFM suplementado con 0,64M sacarosa

Cuando analizamos la dinámica del gen SCO4440-mCherry controlado por su promotor nativo, también observamos la formación de puntos rojos en alguna hifa a las 48h en cultivos de SFM suplementado con 0,64M sacarosa (figura 51). En este caso, los puntos observados llenan la hifa y no están localizados, como en el caso de SCO1758 en los lados de las hifas (compárese figura 53 a-b con figura 52). Tampoco encontramos nunca el solapamiento de los puntos SCO4440-mCherry con FtsZ-eGFP.

IV.6.3. Dinámica de SCO0954-mCherry en medio SFM suplementado con 0,64M sacarosa

Cuando analizamos la dinámica de SCO0954-mCherry controlada por su promotor nativo, también observamos la formación de puntos en alguna hifa a las 48h en cultivos de SFM suplementado con 0,64M sacarosa (figura 53 c-d). Los puntos observados llenan la hifa, y tampoco encontramos nunca el solapamiento con FtsZ-eGFP.

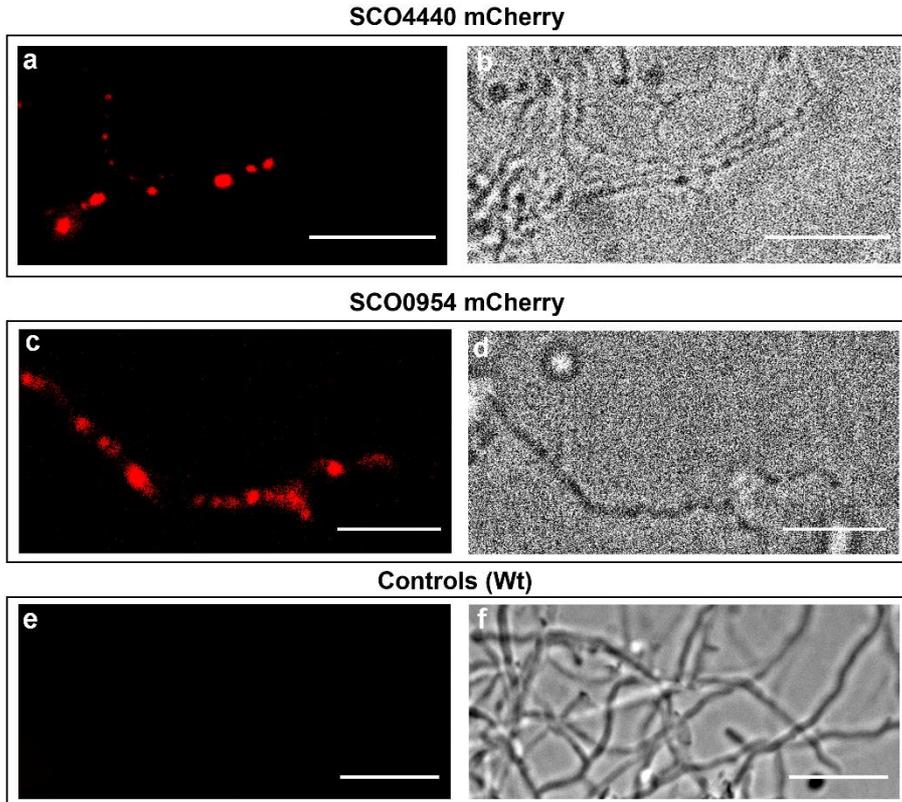


Figura 53. Dinámica de SCO4440-mCherry y SCO0954-Cherry en cultivos de 48h en SFM suplementado con 0,64M sacarosa. (a, b) Localización celular de SCO4440-mCherry. (c, d) Localización celular de SCO0954-mCherry. (e, f) Control mostrando la ausencia de autofluorescencia bajo la configuración utilizada del microscopio de fluorescencia en la cepa salvaje de *S. coelicolor* portando el plásmido pNG3. Se muestran imágenes representativas de al menos tres réplicas biológicas de microscopía de fluorescencia y contraste de fases. Barras de escala de 8 μm .

IV.7. FOSFOPROTEÓMICA

IV.7.1. Enriquecimiento de fosfopéptidos por Zr(IV)-IMAC en *Escherichia coli*

En esta tesis doctoral desarrollamos un protocolo de enriquecimiento de fosfopéptidos mediante micropartículas de Zr(IV)-IMAC para el estudio del fosfoproteoma bacteriano, primero en *Escherichia coli* y después en *Streptomyces coelicolor*. En dos estudios previos, nuestro grupo de investigación observó que la precipitación de fosfopéptidos con fosfato cálcico (CPP) mejoraba el enriquecimiento de fosfopéptidos con TiO₂ (Manteca *et al.*, 2011, Rioseñas *et al.*, 2018). Para probar si éste era también el caso para Zr(IV)-IMAC, comparamos el enriquecimiento de fosfopéptidos con y sin tratamiento previo con CPP. Sorprendentemente, el tratamiento con CPP redujo el número de fosfopéptidos identificados en *E. coli* (figura 54a).

A continuación, probamos diferentes cantidades iniciales de péptido (200 y 800 µg) y diferentes proporciones de micropartículas/péptido (1:2 y 2:1). El flujo de trabajo más eficiente, en términos de números de fosfopéptidos identificados y de selectividad de fosfopéptidos, fue utilizar 200 µg de proteína digerida y una relación 2:1 de micropartículas/péptidos (figura 54b).

Para las muestras de *E. coli*, conseguimos identificar 340 sitios de fosforilación (71.2% pS, 20.6% pT, 8.2% pY) en 339 fosfopéptidos derivados de 223 fosfoproteínas mediante el uso de Zr(IV)-IMAC y LC-MS/MS (tabla suplementaria 2).

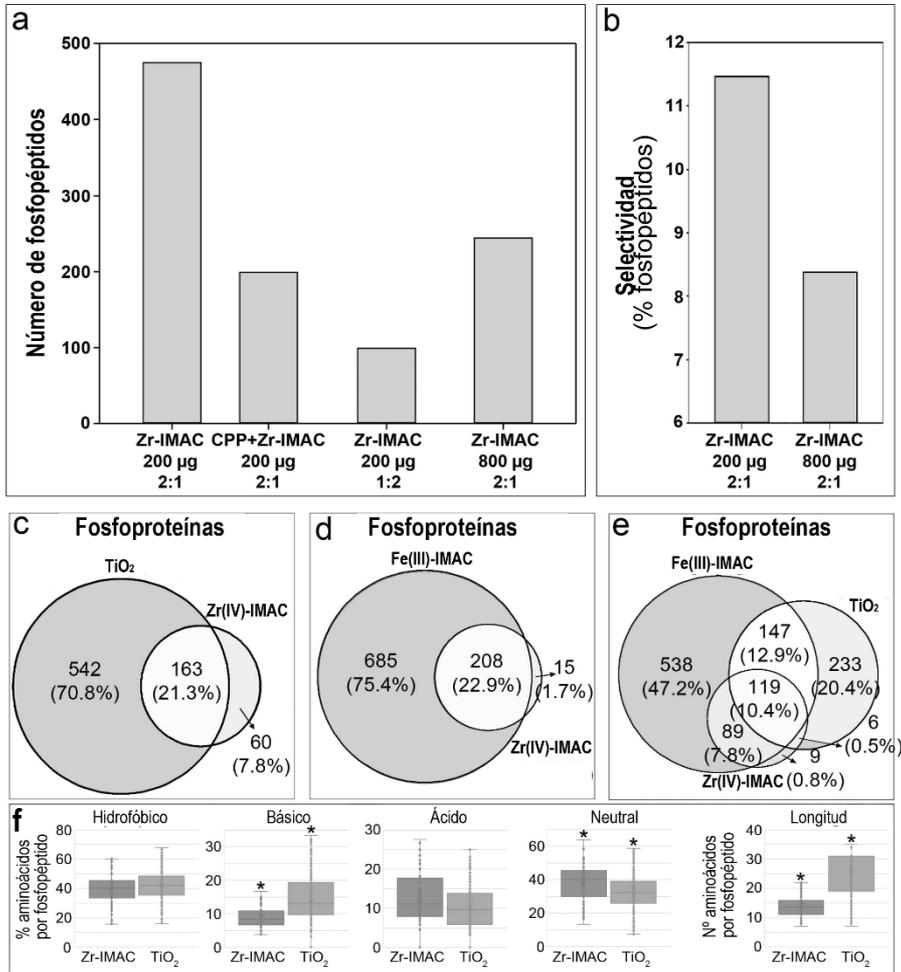


Figura 54. Fosfoproteómica de *E. coli* usando Zr(IV)-IMAC. (a) Número de fosfopéptidos identificados usando Zr(IV)-IMAC con y sin pre-enriquecimiento con CPP y usando diferentes proporciones de micropartículas/péptidos. (b) Selectividad del Zr(IV)-IMAC usando diferentes cantidades iniciales de proteína. (c-e) Comparación de las fosfoproteínas de *E. coli* identificadas usando Zr(IV)-IMAC (este trabajo), TiO₂ (Macek *et al.*, 2008, Soares *et al.*, 2013, Semanjski *et al.*, 2018) y Fe(III)-IMAC (Potel *et al.*, 2018, Lin *et al.*, 2018).

IV.7.2. Estudio del fosfoproteoma de *Streptomyces coelicolor* mediante Zr(IV)-IMAC

A continuación, estudiamos el papel de la fosforilación de proteínas en relación con la activación del metabolismo secundario de *Streptomyces*. Como en *E. coli*, probamos el protocolo de enriquecimiento de fosfopéptidos de Zr(IV)-IMAC en *S. coelicolor* con y sin tratamiento previo con CPP. De forma similar a lo ocurrido en *E. coli*, el tratamiento con CPP redujo la eficiencia del método para recuperar fosfopéptidos en las muestras de *Streptomyces* (figura 55a). Concluimos que el método CPP es innecesario cuando se usa Zr(IV)-IMAC para enriquecer fosfopéptidos tanto en *E. coli* como en *S. coelicolor*.

Realizamos un enriquecimiento de fosfopéptidos mediante Zr(IV)-IMAC y un análisis de espectrometría de masas cuantitativa *label-free* en dos etapas de desarrollo de *S. coelicolor*: micelio vegetativo no productor de antibióticos (30 horas en medio sólido GYM) y micelio aéreo esporulado (65 horas en medio sólido GYM) (Yagüe *et al.*, 2013b), etapas del desarrollo en las que se conoce que la fosforilación de S/T/Y es más abundante (Manteca *et al.*, 2011, Rioseras *et al.*, 2018). Se procesaron y analizaron tres réplicas biológicas mediante Zr(IV)-IMAC y LC-MS/MS para secuenciar, identificar y cuantificar fosfopéptidos (figura 55b).

Identificamos 361 sitios de fosforilación (41% pS, 56,2% pT, 2,8% pY) en 351 fosfopéptidos derivados de 186 fosfoproteínas de *S. coelicolor* (figura 53 c) (Tabla suplementaria 3). Un 40% de los sitios de fosforilación y de los fosfopéptidos fueron más abundantes en las muestras de 30h que en las de 65h. En torno al 20% de los sitios de fosforilación mostraron el comportamiento contrario, mientras que el grado de fosforilación

estuvo en un nivel similar en ambos tiempos en aproximadamente el 40% de los casos (figura 55c) (Tabla suplementaria 3).

Estudios previos de fosfoproteómica de *S. coelicolor* que utilizaron enriquecimiento por afinidad de TiO₂ y LC-MS/MS reportaron 184 fosfoproteínas de *Streptomyces* (Parker *et al.*, 2010, Manteca *et al.*, 2011, Rioseras *et al.*, 2018, Hirakata *et al.*, 2019) con poca superposición con los conjuntos de proteínas identificados en este estudio (Figura 55d) (Tabla suplementaria 3). En este trabajo, identificamos 154 fosfoproteínas nuevas, es decir, no identificadas en trabajos previos sobre el fosfoproteoma de *Streptomyces*, que representan un gran avance en cuanto al conocimiento del fosfoproteoma de *S. coelicolor*. Por lo tanto, actualmente se conoce un total de 338 fosfoproteínas en *S. coelicolor*, de las cuales 154 han sido identificadas en esta tesis utilizando Zr(IV)-IMAC como técnica de enriquecimiento de fosfopéptidos (figura 55e, Tabla suplementaria 3).

RESULTADOS

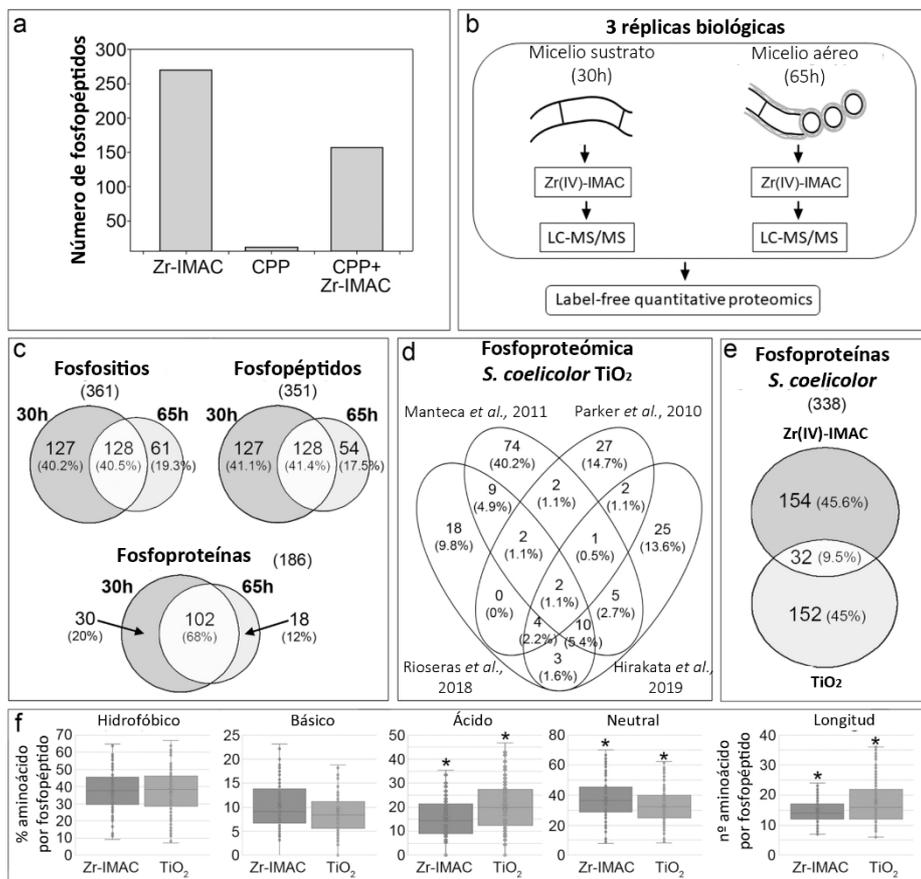


Figura 55. Caracterización de la fosfoproteómica de *S. coelicolor* mediante Zr(IV)-IMAC y espectrometría de masas. (a) Número de fosfopéptidos identificados utilizando Zr(IV)-IMAC con y sin enriquecimiento previo con CPP. (b) Flujo de trabajo del estudio de fosfoproteómica en *S. coelicolor*. (c) Número de sitios de fosforilación, fosfopéptidos y fosfoproteínas de *S. coelicolor* identificados. (d) Número de fosfoproteínas de *S. coelicolor* identificadas en estudios fosfoproteómicos de enriquecimiento de fosfopéptidos basados en TiO₂ (Parker et al., 2010, Manteca et al., 2011, Rioeras et al., 2018, Hirakata et al., 2019). (e) Número de fosfoproteínas de *S. coelicolor* identificadas usando Zr(IV)-IMAC (este trabajo) y TiO₂ (Parker et al., 2010, Manteca et al., 2011, Rioeras et al., 2018, Hirakata et al., 2019). (f) Diagramas de caja y bigotes que ilustran el porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, básicos, ácidos y neutros en las 154 y 152 fosfoproteínas identificadas por métodos de enriquecimiento de fosfopéptidos con TiO₂ y Zr(IV)-

IMAC respectivamente. También se muestra la longitud del fosfopéptido. Los asteriscos indican diferencias significativas (valor de $p < 0,01$).

IV.7.3. Análisis de los sitios y motivos de fosforilación

Identificamos 361 sitios de fosforilación en *S. coelicolor* con una distribución de 41% pS, 56,2% pT y 2,8% pY, lo que concuerda con estudios previos de fosfoproteoma de *Streptomyces* (Tabla 2). Utilizamos el software MoMo (Cheng *et al.*, 2019) para identificar 4 posibles motivos de secuencia de fosforilación en treonina: “Kxxxx(pT)xxxxK”, presente en 4 fosfopéptidos; “DxE(pT)”, presente en 7 fosfopéptidos; “D(pT)” presente en 22 fosfopéptidos; y “Exxxx(pT)” presente en 17 fosfopéptidos (figura 56).

La base de datos STRING (Jensen *et al.*, 2009) nos permitió identificar posibles grupos de interacción funcional entre la mayoría de las proteínas que albergan los motivos de fosforilación identificados (figura 56), lo que parece indicar que la fosforilación de Thr podría estar regulando procesos celulares distintivos: la síntesis de proteínas (FusA, factor G de elongación peptídica) y su plegamiento (chaperoninas GroEL1 y GroEL) en el caso de “Kxxxx(pT)xxxxK”; síntesis de proteínas (RpsD), síntesis de ADN (topoisomerasa TopA) y estrés oxidativo (SodF1) en el caso de “DxE(pT)”; síntesis de proteínas (RpsO), plegamiento de proteínas (DnaN, DnaK), síntesis de aminoácidos (AlaS, CarB) y fosforilación de proteínas (PkaB) en el caso de “DxE(pT)”; plegamiento de proteínas (DnaK, GroEL1), peptidoglicano (DapF) y síntesis de membrana (YidC) en el caso de “Exxxx(pT)”. En particular, más de la mitad (28 fosfopéptidos) de los 50 fosfopéptidos que albergan los motivos de fosforilación de pT se fosforilaron diferencialmente en el

RESULTADOS

micelio sustrato y en el aéreo. Dos proteínas, PkaB y DasR, se encontraron fosforiladas en el micelio aéreo (65h) mientras que las 26 proteínas restantes se encontraron fosforiladas en el micelio sustrato (30h) (Tabla suplementaria 3).

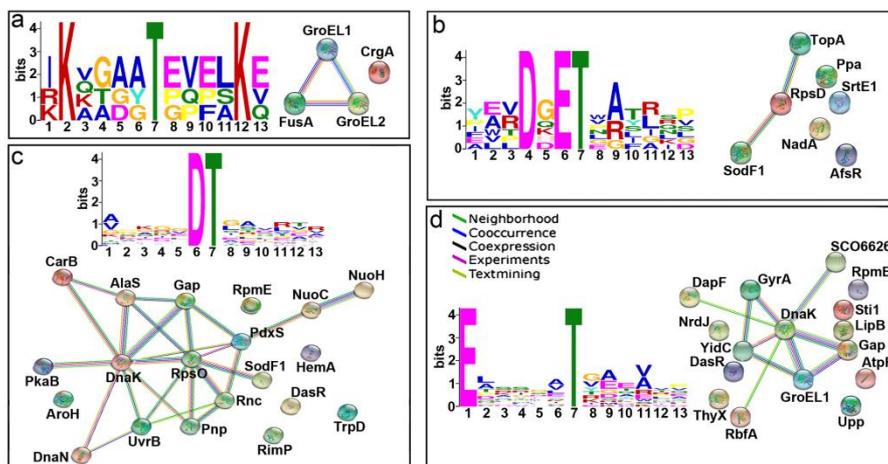


Figura 56. Motivos de fosfotreonina (pT) y posibles clústeres funcionales de proteínas. Se muestran los logos de secuencias de los motivos proteicos y los supuestos grupos de proteínas de interacción funcional encontrados en la base de datos STRING. (a) Motivo “Kxxxx(pT)xxxxK”, 4 fosfopéptidos. (b) motivo “DxE(pT)”, 7 fosfopéptidos. (c) motivo “D(pT)”, 22 fosfopéptidos. (d) motivo “Exxxxx(pT)”, 17 fosfopéptidos.

IV.7.4. Diferencias en los fosfoproteomas del micelio sustrato y aéreo

a) Fosfopéptidos diferencialmente fosforilados en el micelio sustrato y aéreo agrupados por clústeres de expresión

El análisis comparativo de las dos etapas de desarrollo analizadas (micelio sustrato y aéreo) reveló diferencias significativas en la abundancia de 181 fosfopéptidos entre los cultivos de 30 h y 65h. La mayoría, 127 fosfopéptidos, mostraron bajos grados de fosforilación a

las 65h, mientras que 54 fosfopéptidos exhibieron una fosforilación mayor a las 65h (figura 57a, Tabla suplementaria 3).

Los 181 fosfopéptidos que mostraron variaciones de abundancia significativas se agruparon de acuerdo con sus perfiles de abundancia temporal (figura 57b, tabla suplementaria 3). Los fosfopéptidos de las proteínas del metabolismo primario estaban presentes principalmente en los clústeres 1 y 2 (altamente fosforilados a las 30h), mientras que las proteínas reguladoras estaban presentes principalmente en el clúster 3 (altamente fosforilados a las 65h). Los mapas de calor mostrados en la figura 56b ilustran la buena reproducibilidad entre las tres réplicas biológicas analizadas en cada momento del desarrollo.

RESULTADOS

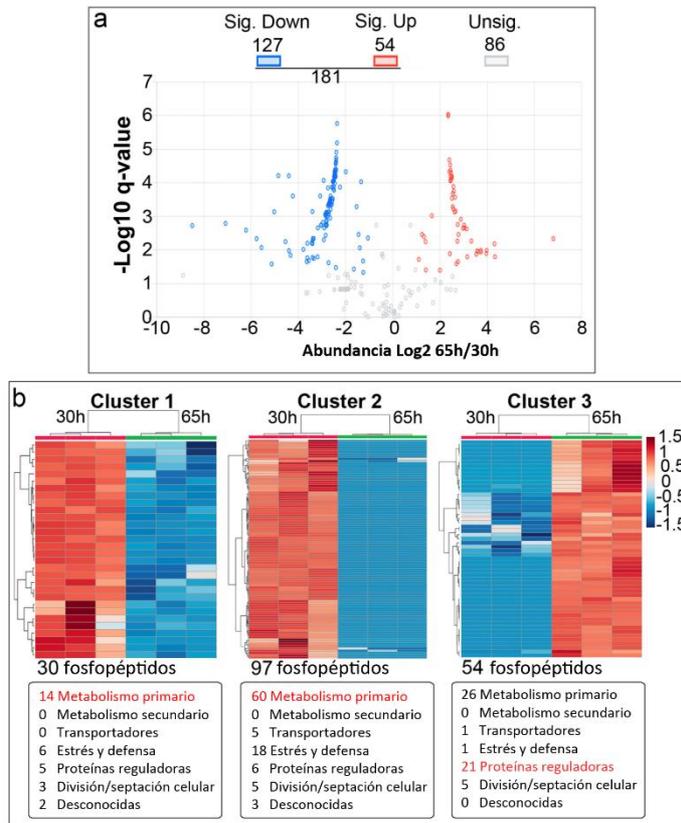


Figura 57. Abundancias cuantitativas de fosfopéptidos en cultivos de 30 y 65 h. (a) *Volcano plot* de las abundancias y valores q de los fosfopéptidos identificados. Se indican fosfopéptidos significativamente más (rojo) y menos (azul) abundantes (valor $q < 0,05$, relación $\log_2 65\text{ h}/30\text{ h} > 1$ o inferior a -1 ; abundancias de proteínas y fosfopéptidos significativamente diferentes). (b) Mapas de calor que muestran la abundancia de fosfopéptidos que presentan diferencias significativas. Se muestra el número de fosfopéptidos que pertenecen a diferentes categorías funcionales en cada grupo de abundancia. Se resaltan en rojo las categorías funcionales más abundantes.

b) Proteínas diferencialmente fosforiladas en el micelio sustrato y aéreo agrupadas por sus funciones

La figura 58 muestra las abundancias de los 181 fosfopéptidos de 109 fosfoproteínas que muestran variaciones de abundancia significativas. 100 de los fosfopéptidos se obtuvieron de 71 proteínas relacionadas con el metabolismo primario (replicación/transcripción del ADN, metabolismo de nucleótidos, glucólisis y gluconeogénesis, vía de las pentosas fosfato, producción de energía aeróbica y metabolismo de aminoácidos); 32 fosfopéptidos están relacionados con 15 proteínas reguladoras, incluidos los reguladores transcripcionales ArgR, AfsR, CutR, HrcA y DasR (Servant and Mazodier, 2001, Rigali *et al.*, 2008, Lu *et al.*, 2017, Botas *et al.*, 2018, Jin *et al.*, 2021) y las quinasas PkaA/B y AfsK (Sawai *et al.*, 2004, Tomono *et al.*, 2006); 25 fosfopéptidos de 7 proteínas de estrés y defensa (chaperonas, superóxido, dismutasas, catalasas y sistemas de restricción de fagos); 6 fosfopéptidos de la proteína translocasa SecA, la proteína de membrana insertasa YidC y el transportador de potasio ATPasa SCO3717; y finalmente 13 fosfopéptidos de 9 proteínas de división y tabicación celular (DnaA, MurG, CrgA, FtsK y SepF2) (Del Sol *et al.*, 2006, Vogelmann *et al.*, 2011, Gupta *et al.*, 2015, den Blaauwen *et al.*, 2017) (figura 58) (Tabla suplementaria 3). También se detectaron cinco fosfopéptidos de 4 proteínas con función desconocida (no se muestran en la figura 57) (Tabla suplementaria 3).

Las proteínas del metabolismo primario, de estrés y de defensa como SecA, YidC y SCO3717 se encontraron fosforiladas principalmente a las 30h (micelio sustrato) (figura 58a y 58c). Los reguladores transcripcionales y las quinasas se encontraron fosforiladas

RESULTADOS

principalmente a las 65h (micelio aéreo) (figura 58b). Las proteínas de septación y división celular se fosforilaron diferencialmente en el micelio vegetativo y aéreo (figura 58e). Todos estos resultados sugieren un papel de la fosforilación de S/T/Y en la regulación del metabolismo primario y secundario, así como en la regulación de las divisiones celulares vegetativas y de esporulación.

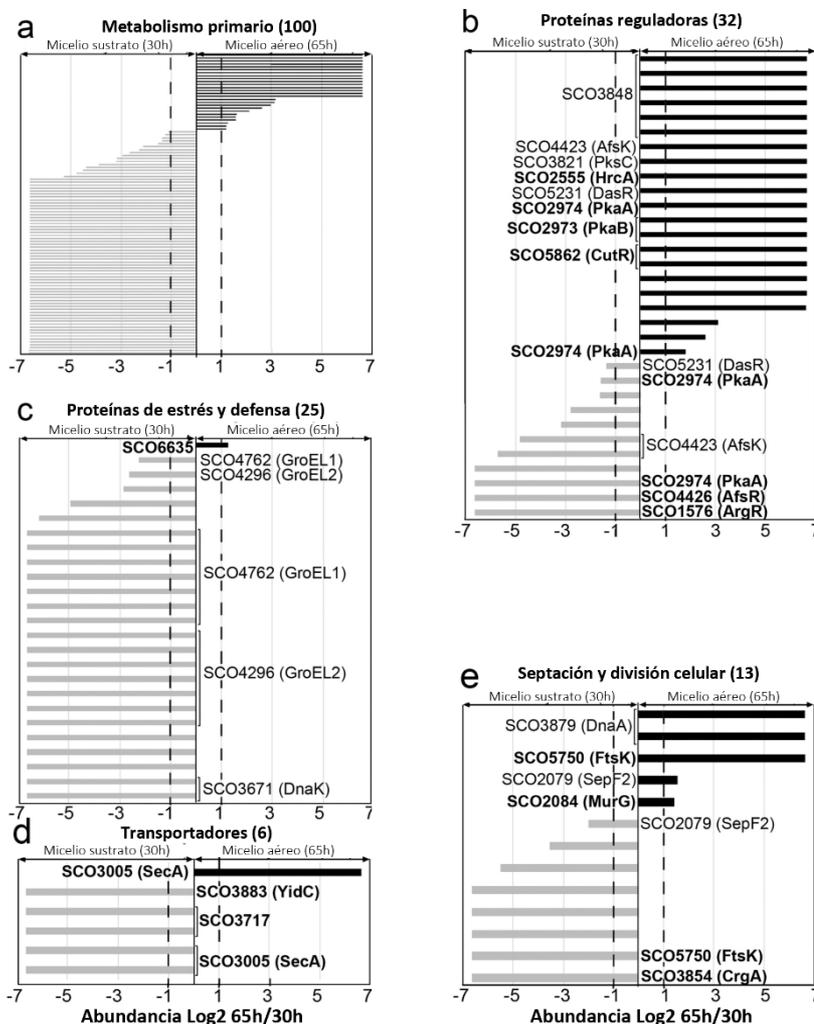


Figura 58. Abundancias de fosfopéptidos agrupadas por función. Se muestran las abundancias relativas (log₂ 65 h/30 h) de fosfopéptidos de proteínas implicadas en el metabolismo primario, el estrés y la defensa, el transporte, la septación/división

celular y la regulación (reguladores transcripcionales, quinasas). Todas las abundancias de proteínas y fosfopéptidos mostradas son significativamente diferentes entre las muestras de 30 y 65 h (valor $q < 0,05$, relación $\log_2 65 \text{ h}/30 \text{ h} > 1$ o inferior a -1). Se indican los números SCO de proteínas clave analizadas en el manuscrito. Las líneas discontinuas indican el umbral de abundancia doble. Las nuevas fosfoproteínas no identificadas en trabajos anteriores están resaltadas en negrita.

c) Proteínas fosforiladas sin diferencias en el micelio sustrato y aéreo agrupadas por sus funciones

Hay 128 sitios de fosforilación en 128 fosfopéptidos derivados de 88 fosfoproteínas que no muestran variaciones significativas en su nivel de fosforilación entre 30 y 65 h (Tabla suplementaria 3). Estos incluyen 82 fosfopéptidos de proteínas del metabolismo primario (principalmente proteínas ribosómicas pero también enzimas biosintéticas de nucleótidos y aminoácidos); 6 fosfopéptidos del transportador SCO5084 presentes en el grupo biosintético de actinorrodina; 15 fosfopéptidos de proteínas de estrés y defensa (principalmente chaperonas); 12 fosfopéptidos de proteínas reguladoras (quinasas reguladoras transcripcionales); y 7 fosfopéptidos de proteínas de división celular (sortasa StrE1, proteína de unión al ADN HU, SepF3) (Tabla suplementaria 3).

La abundancia de 45 sitios de fosforilación en 42 fosfopéptidos de 38 fosfoproteínas no se pudo cuantificar con precisión debido a su baja abundancia (Tabla suplementaria 3). Estos incluyen 24 fosfopéptidos de proteínas del metabolismo primario (principalmente enzimas biosintéticas); 1 fosfopéptido de SCO5087, una proteína presente en el

grupo biosintético de actinorrodina; 4 fosfopéptidos del aparato secretor de proteínas (SecA, SecE, SecF); 7 fosfopéptidos de proteínas de estrés y defensa (chaperonas); 4 fosfopéptidos de quinasas y reguladores transcripcionales; un fosfopéptido de la translocasa de ADN FtsK; y un fosfopéptido de la supuesta peptidasa SCO0575 con función desconocida (Tabla suplementaria 3).

IV.7.5. La distribución de los sitios de fosforilación de S/T identificados no es aleatoria ya que están ubicados en regiones proteicas estructurales

A continuación, analizamos los sitios de fosforilación de proteínas cuya función se demostró experimentalmente que estaba modulada por la fosforilación S/T, concretamente DnaA y AfsK (Tomono *et al.*, 2006, Saxena *et al.*, 2013), así como proteínas cuya estructura y dominios funcionales se conocen, como DasR y FtsK (Vogelmann *et al.*, 2011, Fillenberg *et al.*, 2016). La figura 58 muestra las estructuras predichas por AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021) de estas proteínas con los sitios de fosforilación identificados en este estudio anotados.

Se demostró que la proteína DnaA de replicación del ADN cromosómico está fosforilada en T486 (Lebkowski *et al.*, 2020). Esta fosforilación altera la disposición mutua de los dominios III (unión de ATP) y IV (unión de ADN) y afecta a la actividad de DnaA (Saxena *et al.*, 2013, Lebkowski *et al.*, 2020). En esta tesis doctoral, identificamos fosforilaciones en S108 y T294, ambas ubicadas al comienzo del largo dominio no globular II, con un conector flexible que interactúa con el dominio I (Saxena *et al.*, 2013) (figura 59a). Esta fosforilación podría modular las interacciones con otras proteínas y la flexibilidad del dominio DnaA II (figura 59a).

También se describió que la quinasa de Ser/Thr AfsK de *S. coelicolor* se autoactiva mediante autofosforilación en T168 (Tomono *et al.*, 2006). En esta tesis doctoral, identificamos 6 fosforilaciones adicionales de AfsK cercanas a T168, incluidas T170 y S163, que podrían mejorar la autoactivación de T168 (figura 59b).

En un trabajo reciente se ha descrito la estructura cristalina del regulador transcripcional global DasR de *S. coelicolor* (Fillenberg *et al.*, 2016). DasR está formado por dos dominios globulares, el dominio de unión al ADN (que interactúa con el ADN) y el dominio de unión efector (que interactúa con los azúcares) (Fillenberg *et al.*, 2016).

En el extremo N terminal, DasR forma una cola lineal de aminoácidos cuya función es desconocida. La conformación de esta región tampoco se dilucida en la estructura cristalina DasR (número de acceso de PDB: PDB-ID 4ZS8) y la confianza de la predicción de AlphaFold para esta cola fue muy baja (resaltado en naranja en la figura 59c), lo que indica que podría corresponder a una región desordenada que puede cambiar de conformación tras la fosforilación. Demostramos que esta cola N-terminal estaba fosforilada en tres residuos de treonina (figura 59c). La función biológica de estas fosforilaciones sigue siendo desconocida, pero podrían alterar la conformación de DasR y modular la función de los dominios de unión al ADN y/o efectores. Dos de los sitios de fosforilación de DasR pertenecían a los motivos de fosforilación “D (pT)” y “Exxxxx (pT)” identificados en este trabajo (figura 56).

Finalmente, la proteína de división celular FtsK de *S. coelicolor* (implicada en la translocación del ADN) alberga un dominio de interacción del ADN de hélice-giro-hélice *winged* (WHTH), una extensión del grupo hélice-

RESULTADOS

grupo-hélice que se caracteriza por la presencia de una tercera hélice α y un plegamiento β adyacente que se consideran componentes del motivo de unión al ADN (aminoácidos 849-915) (Vogelmann *et al.*, 2011). Identificamos dos fosforilaciones de FtsK en S305 y T407, ubicadas lejos del dominio wHTH (figura 59c), que probablemente no modifican la capacidad de unión de FtsK al ADN, pero que podrían modular la actividad translocadora de ADN de FtsK.

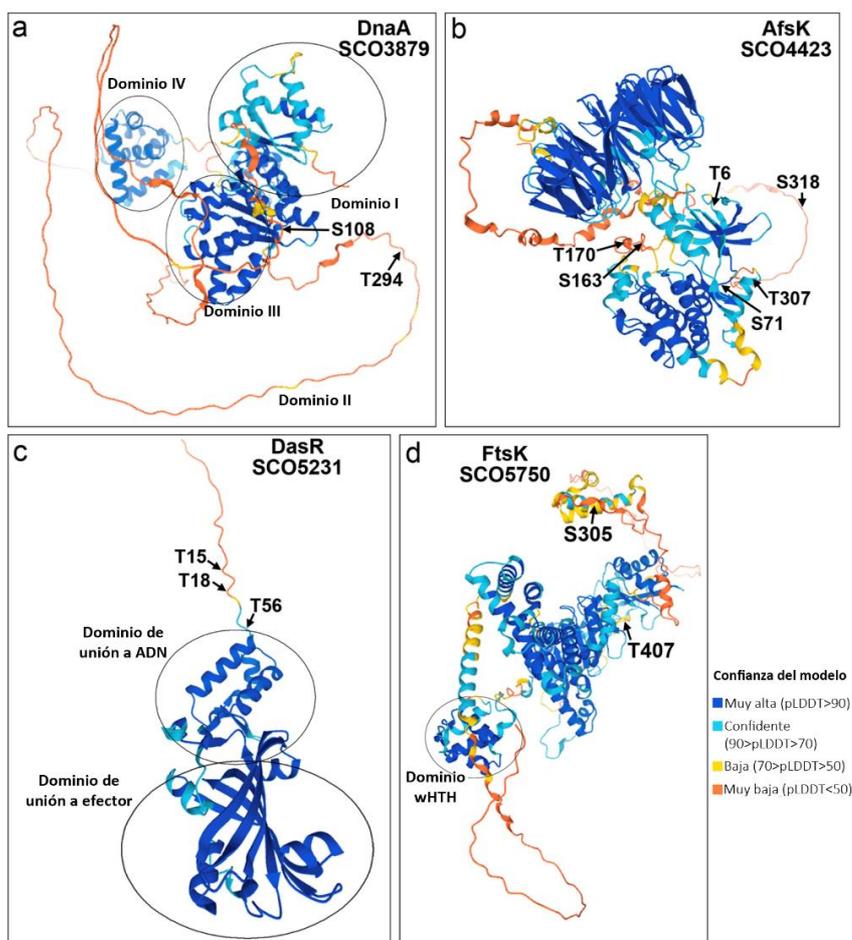


Figura 59. Estructuras predichas mediante AlphaFold de proteínas seleccionadas de *S. coelicolor* y sus sitios de fosforilación determinados experimentalmente. Predicción de estructuras por AlphaFold. Los sitios de fosforilación identificados en este estudio están señalados. Se indican los dominios funcionales de DnaA, DasR y FtsK.

V. DISCUSIÓN

V.1. FORMACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES Y CÉLULAS SIN PARED (CÉLULAS S Y FORMAS L) EN ACTINOMICETOS

La formación de vesículas extracelulares membranosas sin pared celular y sin capacidad de división fue descrita recientemente en *Streptomyces* (Schrempf *et al.*, 2011, Faddetta *et al.*, 2022a, Faddetta *et al.*, 2022b). Estas vesículas pueden contener proteínas, metabolitos (antibióticos y otros) o ácidos nucleicos (Schrempf *et al.*, 2011, Faddetta *et al.*, 2022a, Faddetta *et al.*, 2022b). Algunas vesículas no contienen ADN, mientras otras pueden contener el cromosoma completo (Faddetta *et al.*, 2022b). También se ha demostrado la existencia de vesículas membranosas asociadas a la MCP (Yagüe *et al.*, 2016, Casu *et al.*, 2023) y a la división celular (Celler *et al.*, 2016).

Recientemente, Ramijan *et al.* (2018) demostraron la existencia de células sin pared inducidas por estrés osmótico (células S y formas L) en *Kitasatospora viridifaciens* y otros actinomicetos, y describieron que algunos *Streptomyces*, como *S. coelicolor*, no son capaces de producir este tipo de células (Ramijan *et al.*, 2018). La relación, si es que existe, entre vesículas membranosas y células S y formas L aún no está clara.

El mecanismo biomolecular de formación de células S y formas L, así como la formación de vesículas extracelulares en *Streptomyces*, es prácticamente desconocido. De hecho, hay autores que consideran que la formación de este tipo de estructuras es un mecanismo pasivo debido a un exceso de formación de membranas en este tipo de células, tal como se describió en *Escherichia coli* (Siddiqui *et al.*, 2006), *Listeria monocytogenes* (Briers *et al.*, 2012) o *Bacillus subtilis* (Mercier *et al.*, 2013).

Tal y como se discutirá a continuación, nuestros resultados amplían el conocimiento actual sobre la división celular de *Streptomyces*, contribuyendo a una mayor comprensión de los complejos mecanismos bioquímicos que regulan la formación de vesículas extracelulares, las células S y las formas L en *Streptomyces* y en bacterias en general.

V.1.1 La cepa salvaje de *Streptomyces coelicolor* es capaz de formar células S y formas L en medio SFM suplementado con 0,64M sacarosa

Hasta la fecha, se había descrito la formación de células S y formas L en varios actinomicetos, pero curiosamente, las cepas de *Streptomyces* mejor caracterizadas desde el punto de vista de su biología y genética, como *S. coelicolor*, *S. griseus* o *S. lividans*, eran incapaces de producir este tipo de células (Ramijan *et al.*, 2018). Los mecanismos biomoleculares que controlan la formación de este tipo de células en actinomicetos han sido caracterizados en otras cepas como *K. viridifaciens* y *S. venezuelae* (Ramijan *et al.*, 2018).

En esta tesis doctoral hemos sido capaces de descubrir que la cepa salvaje de *S. coelicolor* es capaz de producir células S y formas L en medio SFM suplementado con 0,64M de sacarosa, pero no en otros medios de cultivo como GYM. *S. coelicolor* no es capaz de esporular en medio SFM suplementado con 0,64M de sacarosa, pero las células S y las formas L sólo se producen a las 48 horas, lo que sugiere una conexión entre la diferenciación de las hifas y la formación de células deficientes de pared.

La formación de células S y formas L se induce por alto estrés osmótico (0,64M de sacarosa) en actinomicetos (Ramijan *et al.*, 2018). Estas concentraciones de sacarosa son más que suficiente para prevenir la lisis

osmótica de células sin pared, como es el caso de los protoplastos (células sin pared obtenidas por tratamiento de las hifas con lisozima). De hecho, 0,64M es más del doble de la concentración de sacarosa que se usa en los medios de cultivo de *Streptomyces* destinados a la preservación de protoplastos, que es 10,3%, equivalente a 0,3 M (Okanishi *et al.*, 1974). Esto nos hizo preguntarnos si la formación de células sin pared y el hinchamiento de las hifas que observamos en medio SFM con altos niveles de sacarosa podría ser simplemente un reflejo de células que se formaban igualmente sin sacarosa, pero que se mantenían estables, y por tanto visibles, al añadir sacarosa. Interesantemente, en medios con 0,3 M de sacarosa no había formación de células sin pared ni hinchamiento de las hifas (datos no mostrados), lo que indica que la formación de células sin pared es un proceso activo que sólo se desencadena con concentraciones de sacarosa de 0,64 M, más del doble de lo que sería necesario para mantener la estructura de un protoplasto.

La función natural de las células sin pared no está del todo clara. Se sabe que algunas bacterias patógenas son capaces de producir formas L cuando infectan tejidos vegetales o animales (Allan *et al.*, 2009, Amijee *et al.*, 1992). Al respecto, los actinomicetos están presentes en el suelo, pero también se pueden encontrar como endófitos en las plantas (Van der Meij *et al.*, 2017). La savia de las plantas contiene altos niveles de osmolitos que son suficientes para sostener las células en un estado de pared deficiente e incluso permitir que subsistan dentro de las plantas (Paton and Innes, 1991). En consecuencia, la capacidad natural de los actinomicetos para formar células deficientes de pared podría permitir que estos organismos formen estas células al entrar en la planta. SFM es un medio complejo que incluye un 2% de harina de soja que podría

contener alguna señal vegetal necesaria para desencadenar la formación de células S y formas L.

En definitiva, nuestros resultados demuestran que el estrés osmótico no es el único factor que desencadena la formación de células S y formas L en *S. coelicolor*: además de un gran estrés osmótico (0,64M de sacarosa), y un estado de diferenciación que sólo se alcanza a las 48 horas, hace falta algún tipo de señal desconocida que está presente en el medio SFM y no en otros medios.

V.1.2. La mutación de los genes *SCO0954*, *SCO1758*, *SCO4439* Y *SCO4440* induce la formación de células deficientes de pared (células S y formas L) en *Streptomyces coelicolor* en cultivos sólidos en medio GYM y altera la formación de este tipo de células en medio SFM

Las cepas de *S. coelicolor* mutadas en los genes *SCO0954*, *SCO1758*, *SCO4439* Y *SCO4440* y la cepa sobreexpresando el gen *SCO0954* son capaces de formar células sin pared en *S. coelicolor* en medio GYM. El tamaño y la cantidad de este tipo de células en medio SFM también estaba afectado comparado con las células sin pared producidas en la cepa salvaje en este medio (figura 37).

Tal y como se introdujo en el apartado I.3.7, una de las primeras proteínas que ha podido relacionarse con la formación de células sin pared en actinomicetos es la proteína citoesquelética FilP, cuya delección en el genoma de *K. viridifaciens* limita la extrusión de células S (Ultee *et al.*, 2021). Otro sistema relacionado con la formación de vesículas membranosas es el sistema de inyección contráctil (CIS^{Sc}) de *S. coelicolor*,

que media la MCP en respuesta al estrés, y está regulado por los genes *SCO4256*, *SCO4257* y *SCO4258* (Casu *et al.*, 2023).

Un estudio transcriptómico previo realizado por nuestro grupo de investigación reveló que la expresión de los genes *SCO0954* y *SCO4440* aumentó mucho (9,5 y 24,9 veces respectivamente, ambos en comparación con la etapa vegetativa) a las 48 horas en cultivos GYM, lo que tal vez indique una conexión entre la esporulación y la formación de células deficientes de pared (Yagüe *et al.*, 2013). Por el contrario, la expresión de *SCO1758* y *SCO4439* no mostró variaciones significativas durante el desarrollo, lo que quizás indique su participación en procesos biológicos distintos a la formación de estas células (Yagüe *et al.*, 2013). De hecho, se demostró que la D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa *SCO4439* participa en un aumento del tamaño de las esporas durante la germinación (Rioseras *et al.*, 2016).

a) Homologías y posibles funciones de *SCO0954*

SCO0954 alberga un dominio YncA (número de acceso en *Conserved Domain Database*: COG1247) (figura 40). Proponemos que, de manera similar al prototipo de N-acetiltransferasa YncA de *Salmonella enterica* (Hentchel and Escalante-Semerena, 2015), *SCO0954* acetila metionina oxidada extracelular, bloqueando su transporte hacia el citosol celular y previniendo el estrés oxidativo. Según este modelo, la metionina periplásmica oxidada libre no se acetilaría en el mutante *knockout SCO0954* y se transportaría al interior de la célula, reduciendo así la cantidad de metionina oxidada en el periplasma y en los muropéptidos del PG, ya que existiría un equilibrio entre el potencial redox de las

DISCUSIÓN

metioninas del PG libres y las metioninas ligadas a muropéptidos. Por el contrario, el aumento de la actividad N-acetiltransferasa en el mutante que sobreexpresa *SCO0954* acetilaría toda la metionina libre oxidada, lo que llevaría a una cantidad ligeramente mayor de metionina oxidada en el PG con respecto a la cepa de tipo salvaje (figura 60), cuya magnitud no fue lo suficientemente grande como para ser cuantificada por nuestra metodología, pero sí para aumentar el potencial redox del PG.

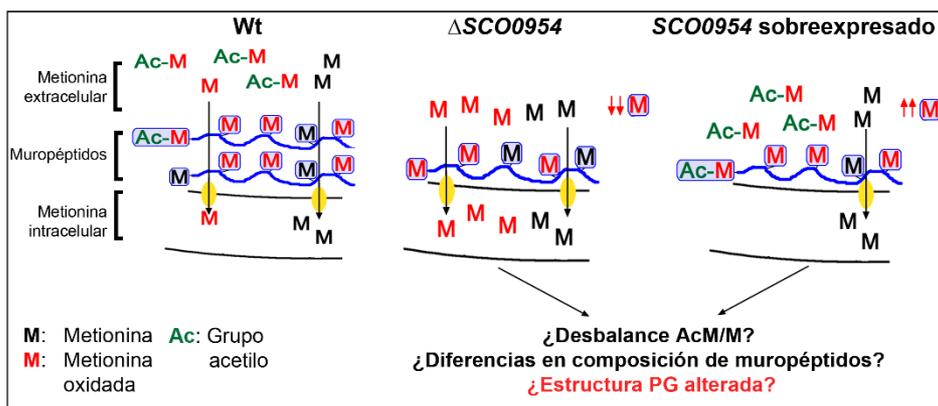


Figura 60. Modelo que describe el papel de *SCO0954* en la reorganización del peptidoglicano y la formación de células S y L. Esquema que ilustra las diferencias en la oxidación de metionina entre la cepa de tipo salvaje de *S. coelicolor* y los mutantes *knockout* y sobreexpresante de *SCO0954*.

La hipótesis anterior de que la alteración del potencial redox del PG podría ser el responsable de la formación de células S y formas L en el mutante *knockout* en *SCO0954* y en la cepa sobreexpresando este gen, nos llevó a probar el efecto de un agente reductor fuerte como el DTT en estas dos cepas. La adición de DTT al medio de cultivo bloquea la formación de células S en el mutante que sobreexpresa *SCO0954* (figura 50c), lo que es consistente con una mayor cantidad de metionina oxidada

acetilada en el PG de este mutante que es contrarrestada por el DTT. Por el contrario, el DTT no afectó a la formación de células S en el mutante *knockout SCO0954* (figura 50d), lo que también es consistente con una menor oxidación en la metionina de este mutante comparado con la cepa salvaje, que aún se acrecienta más por la ausencia de la metilación de la metionina oxidada debido a la ausencia de *SCO0954*.

Tal como se detalla en el apartado V.1.3, será necesario seguir trabajando para determinar si la N-acetiltransferasa YncA *SCO0954* efectivamente acetila la metionina oxidada tal y como hace su ortólogo en *Salmonella enterica*, y para comprender cómo los cambios en el *cross-linking*, en la metonina oxidada y en la metionina total del PG modulan la formación de células S y formas L.

b) Homologías y posibles funciones de *SCO1758*

Con respecto a *SCO1758*, observamos que tiene un dominio EngA GTPasa (número de acceso en *Conserved Domain Database*: TIGR03594) (figura 39). Diferentes familias de GTPasas interactúan con diferentes proteínas modulando importantes procesos celulares: algunas GTPasas están involucradas en la biosíntesis de PG en *Bacillus subtilis* (CpgA GTPasa) (Absalon *et al.*, 2008) o *E. coli* (FtsZ) (Bisson-Filho *et al.*, 2017), mientras que otras GTPasas interactúan con los ribosomas (Shajani *et al.*, 2011). La FtsZ GTPasa, por ejemplo, orquesta la localización de las proteínas de división celular en el divisoma (Barrows and Goley, 2021). No fuimos capaces de eliminar el ORF completo de *SCO1758* mediante la técnica de CRISPR-Cas9, lo que podría indicar que *SCO1758* es un gen esencial, como ocurre con varias proteínas de unión a GTP en *Bacillus subtilis*, incluida la

DISCUSIÓN

proteína clave de la división celular FtsZ (Morimoto *et al.*, 2002). En consecuencia, *SCO1758* podría participar en procesos biológicos y esenciales distintos a la formación de células S o formas L.

En el mutante *SCO1760::Tn5*, la expresión de *SCO1758* está reducida comparada con la cepa salvaje de *S. coelicolor* (figura 25) y la estructura del peptidoglicano está alterada, ya que la cantidad de metionina no oxidada está disminuida en comparación con la cepa salvaje (figura 49a). Además, *SCO1758* forma acúmulos regularmente espaciados y asociados a la pared celular a las 48 horas el ciclo de desarrollo; es decir, el momento en que se forman las células S y formas L (figura 52). Proponemos que, al igual que sucede con otras GTPasas, como por ejemplo FtsZ y la formación del divisoma (Barrows and Goley, 2021), la EngA GTPasa *SCO1758* podría estar interaccionando con enzimas que modulan la remodelación del PG de forma específica en las hifas destinadas a formar células S y formas L (esquemático en la figura 61).

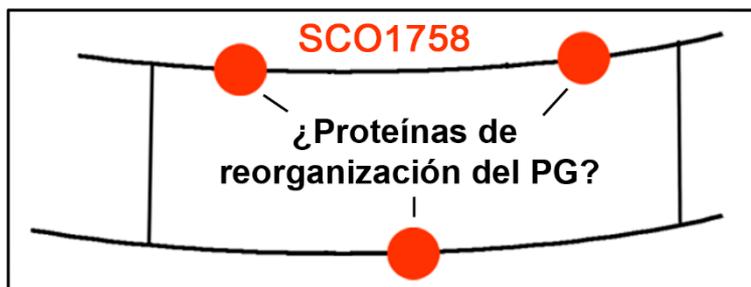


Figura 61. Modelo del papel de *SCO1758* en la reorganización del peptidoglicano y la formación de células S y formas L. Esquema que ilustra la función putativa de *SCO1758* EngA GTPasa, enzimas principales que modulan la reorganización de PG en hifas destinadas a formar células S y formas L.

Cuando el gen *SCO0954* se sobreexpresa en el mutante *SCO1760::Tn5*, el fenotipo de este mutante prevalece sobre el fenotipo del mutante de sobreexpresión *SCO0954* (figura 34), lo que sugiere algún tipo de interacción entre *SCO1758* y *SCO0954*. La alteración en la estructura del PG en el mutante *SCO1760::Tn5* también se demuestra por la disminución de la resistencia a la vancomicina (figura 51). Como se mencionó anteriormente, *SCO1758* parece ser un gen esencial, lo que podría convertir esta proteína en una posible diana en la búsqueda de nuevos antibióticos que interfieran con la reorganización bacteriana de PG. Será necesario seguir trabajando para discernir el mecanismo por el cual *SCO1758* modula la estructura del PG.

c) Homologías y función de *SCO4439*

En un estudio previo, nuestro grupo de investigación demostró que la mutación en la carboxipeptidasa D-alanil-D-alanina *SCO4439* aumenta el *cross-linking* del PG, lo cual nos dio la primera pista sobre el posible papel de la estructura del PG en la formación de células S y formas L (Rioseras *et al.*, 2016).

En este trabajo, descubrimos que el mutante *SCO4439::Tn5062*, creado con anterioridad por nuestro grupo de investigación (Rioseras *et al.*, 2016) y que afecta la expresión de *SCO4439* y de *SCO4440*, es capaz de producir células sin pared (figura 32). Además, descubrimos que este fenotipo sólo se complementa cuando ambos genes son introducidos en el mutante.

DISCUSIÓN

Tal como se indicó arriba, la función de la carboxipeptidasa SCO4439 en la modulación *del cross-linking* del PG ha sido bien caracterizada (Rioseras *et al.*, 2016).

d) Homologías y posibles funciones de SCO4440

A diferencia de *SCO4439*, la función de *SCO4440* es desconocida. *SCO4440* porta un dominio de fosfoproteína 3 de Golgi (GOLPH3), también conocido como GPP34 (número de acceso en *Conserved Domain Database*, pfam05719) (figura 41). Las proteínas GOLPH3 en eucariotas están altamente conservadas y forman parte de la llamada red trans-Golgi, una vía secretora que clasifica las proteínas recién sintetizadas en diferentes vesículas de transporte (Sechi *et al.*, 2015).

Hasta donde sabemos, no se han descrito proteínas GOLPH3 anteriormente en procariontes. Una búsqueda en la base de datos de genes del NCBI de proteínas bacterianas que albergan dominios GOLPH3 (realizada el 15 de febrero de 2023) reportó que solo 218 especies bacterianas albergaban proteínas con dominios GOLPH3, de las cuales 129 eran actinomicetos (tabla suplementaria 4). Esto sugiere que las proteínas GOLPH3 podrían ser importantes en los actinomicetos, tal vez formando parte de una supuesta red de vías secretoras, parecida a la red eucariótica trans-Golgi (Sechi *et al.*, 2015, Buschman *et al.*, 2015), en la que GOLPH3 uniría las proteínas de la membrana con el citoesqueleto (esquemático en la figura 62). La mutación en *SCO4440* podría desequilibrar esta supuesta vía secretora, contribuyendo a la alteración del PG y a la formación de células S y formas L.

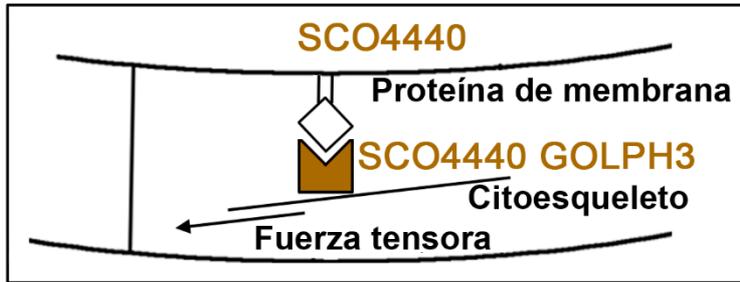


Figura 62. Modelo que describe el papel de *SCO4440* en la reorganización del peptidoglicano y la formación de células S y L. Esquema que ilustra el posible efecto de la proteína *SCO4440 GOLPH3* que forma parte de una posible red de vías secretoras similar a la red eucariótica trans-Golgi (Sechi *et al.*, 2015, Buschman *et al.*, 2015). *GOLPH3* uniría las proteínas de la membrana con el citoesqueleto.

Curiosamente, la única proteína conocida hasta ahora que participa en la formación de células sin pared en actinomicetos es la proteína citoesquelética FilP de *Kitasatospora viridifaciens* (Ultee *et al.*, 2021), mientras que el sistema de inyección contráctil (CIS^{Sc}) regulado por *SCO4256-SCO4258* en *S. coelicolor* aparece ligado a la formación de vesículas membranosas (Casu *et al.*, 2023). Tanto FilP como el sistema de inyección *SCO4256-SCO4258* son proteínas que interactúan con el citoesqueleto. Será necesario seguir trabajando para comprender completamente el papel de *SCO4440* en la reorganización del PG y cómo interactúa con *SCO4439*, ya que el fenotipo en la formación de células S solo se revierte cuando ambos genes se introducen juntos en el doble mutante *SCO4439/40::Tn5062* (figura 25).

e) La exosortasa SCO4849 participa en la eliminación de péptidos del PG

Tal como se indicó en el apartado IV.5.2.a, el uso de los plásmidos integrativos Φ BT1 (pMS82, pNG3 y pNG4) afecta a la expresión tanto de *SCO4848* como de *SCO4849* (González-Quiñónez *et al.*, 2016). El análisis de la transcripción de *SCO4849* (figura 46) nos permitió descubrir que la proteína SCO4849, la cual porta un dominio EpsH de exosortasa (número de acceso en *Conserved Domain Database*: pfam09721), actúa reduciendo la cantidad de metionina (figura 45), y con ello, la cantidad de péptidos unidos al PG.

Las sortasas unen péptidos al PG, mientras que las exosortasas liberan péptidos del PG (Haft *et al.*, 2006b, Craig *et al.*, 2011b). Hasta donde sabemos, SCO4849 es la única exosortasa presente en *S. coelicolor*. El genoma de *S. coelicolor* codifica para dos sortasas (SrtE1 y SrtE2; *SCO3850* y *SCO3849* respectivamente) y al menos otras cinco supuestas sortasas (*SCO0935*, *SCO2480*, *SCO2841*, *SCO3737* y *SCO7450*). Esta alta diversidad de sortasas y la existencia de una exosortasa parecen indicar una compleja regulación en la unión y liberación de péptidos del PG.

f) Las proteínas SCO0954, SCO1758, SCO4439, SCO4440 y SCO4849 participan en la remodelación del peptidoglicano

En resumen, en esta tesis doctoral hemos sido capaces de identificar que las proteínas SCO0954, SCO1758, SCO4439, SCO4440 y SCO4849 participan en la remodelación del peptidoglicano. SCO0954, SCO1758 y SCO4439/40 participan en la formación de células sin pared, mientras

que SCO4849 aparentemente no tiene relación con la formación de este tipo de células.

La carboxipeptidasa SCO4439 y la exosortasa SCO4849 participan directamente en la modulación del *cross-linking* y de la cantidad de péptidos unidos al PG, respectivamente, mientras que la carboxipeptidasa SCO4439, la fosfoproteína de tipo 3 (GOLPH3) SCO4440, la N-acetiltransferasa YncA SCO0954 y la GTPasa EngA SCO1758 modulan directa (en el caso de SCO0954) o indirectamente la cantidad de metionina y metionina asociada al PG (esquemático en la figura 63).

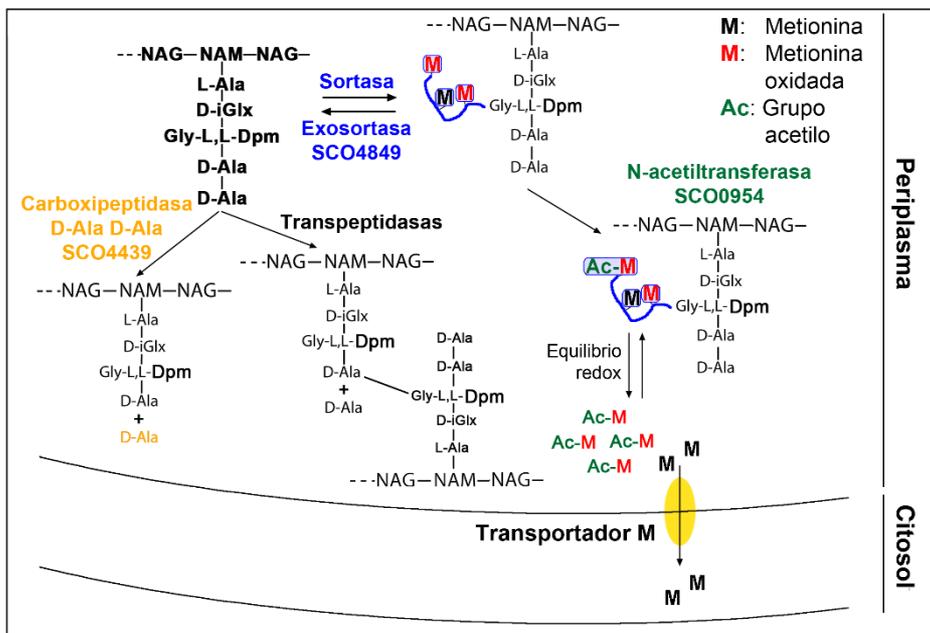


Figura 63. Modelo que describe el papel de SCO0954, SCO4439 y SCO4849 en la reorganización del PG. Esquema que ilustra la actividad de la N-acetiltransferasa SCO0954, la D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa SCO4439 y la exosortasa SCO4849.

DISCUSIÓN

Parece claro es que las alteraciones del *cross-linking*, la metionina total y la metionina oxidada del PG pueden afectar la estructura del PG: el *cross-linking* es fundamental para controlar la resistencia del PG, mientras que las diferencias en la metionina del PG reflejan diferencias en la cantidad y/o en la identidad de dichos muropéptidos (diferentes muropéptidos pueden tener diferentes contenidos de metionina), lo que podría afectar a la organización del PG. Además, la oxidación de la metionina es una modificación postraduccional (PTM) comparable a la fosforilación o acetilación que influye en gran medida en la estructura y función de las proteínas (Boschi-Muller *et al.*, 2005), por lo que la modificación del balance de acetilación/no-acetilación en los muropéptidos de los mutantes *SCO0954* también podría modificar la estructura del PG (figura 60).

Todos estos parámetros pueden contribuir a la formación de células S, pero las alteraciones de estos parámetros del PG no siempre se correlacionan con la formación de células S. Por ejemplo, tal y como se mencionó en el apartado anterior, la cepa salvaje de *S. coelicolor* que alberga pMS82 (cepa Wt [pMS82]) tiene un incremento del *cross-linking* y de los niveles de metionina oxidada, no oxidada y total, mientras que la cepa salvaje de *S. coelicolor* que alberga pNG4 (cepa Wt [pNG4]) tiene disminuida la metionina no oxidada y la total (figuras 45a y 45c), y ninguna de las dos producen células S (se muestra como ejemplo el plásmido pNG4 en la cepa salvaje de *S. coelicolor* en la figura 19d).

g) Las proteínas SCO0954, SCO1758, SCO4439 y SCO4440 participan en la formación de células sin pared en *Streptomyces coelicolor*

En resumen, en este capítulo de la tesis descubrimos que los genes *SCO0954* (N-acetiltransferasa), *SCO1758* (EngA GTPasa), *SCO4439* (D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa) y *SCO4440* (proteína similar a GOLPH3) participan activamente en la formación de células deficientes de pared inducidas por estrés osmótico, ya que su mutación afecta a la formación, tamaño y número de este tipo de células en *S. coelicolor* (figuras 36 y 37). Demostramos que la alteración del *cross-linking* y de los niveles de metionina oxidada del PG contribuyen a desencadenar la formación de este tipo de células. Esta es la primera vez que la alteración de la pared celular se correlaciona con la formación de células S inducidas por estrés osmótico (incapaces de dividirse) y de formas L (capaces de dividirse) en estreptomicetos, y la primera vez que este tipo de células se describen en *S. coelicolor*.

V.1.3. Experimentos futuros para caracterizar mejor las alteraciones de pared generadas por las mutaciones de los genes *SCO0954*, *SCO1758*, *SCO4439* y *SCO4440*

Teniendo en cuenta los datos anteriores, estamos llevando a cabo una serie de experimentos que nos permitan aumentar el conocimiento sobre cómo las proteínas *SCO0954*, *SCO1758*, *SCO4439* y *SCO4440* modulan el PG contribuyendo a la formación de células S y formas L:

DISCUSIÓN

1. Dado que los plásmidos integrativos Φ BT1 (pMS82, pNG3 y pNG4) afectan a la expresión de la exosortasa SCO4849 y modifican el PG, estamos realizando las complementaciones de los mutantes *SCO1760::Tn5* y *SCO4439-40::Tn5062* utilizando el plásmido pRASK. La sobreexpresión de *SCO0954* en la cepa salvaje de *S. coelicolor* se está realizando utilizando el mismo plásmido más el promotor *PerME**. pRASK es un plásmido que se integra en el sitio ϕ C31 (*SCO3798*) en el genoma de *S. coelicolor* (Combes *et al.*, 2002), y que había sido utilizado previamente en otras complementaciones cuando el sitio de integración Φ BT1 ya estaba ocupado. Tal y como se avanzó en los apartados IV.5.1 y IV.5.2 de la sección Resultados, pRASK en la cepa salvaje de *S. coelicolor* no genera ninguna variación significativa ni en el índice *cross-linking* (figura 43a) ni en los niveles de metionina oxidada o total (figuras 45b y 45d), lo que lo convierte en un candidato ideal para evitar interferencias de los plásmidos en los resultados obtenidos.
2. A fin de ampliar el conocimiento sobre la alteración de la pared celular en nuestros mutantes, estamos evaluando la composición de los muropéptidos del PG en los mutantes mediante espectrometría de masas de alta resolución, adaptando el protocolo clásico de Glauner (1988) a nuestras muestras. Brevemente, el protocolo consiste en digerir la estructura principal del PG con mutanolisina y lisozima y hacer un tratamiento alcalino para producir N-lactoil-péptidos, consistentes en un ácido láctico y un resto de aminoácidos unidos por un enlace peptídico. Estos N-lactoil-péptidos son analizados mediante espectrometría de masas (LC-MS) y su composición y abundancia se deducen calculando las masas

monoisotópicas y áreas de todas las posibles combinaciones de monómeros y multímeros (Arbeloa *et al.*, 2004). La abundancia de cada uno nos permite determinar la composición de muropéptidos del PG, y el porcentaje obtenido de los diferentes monómeros y multímeros nos permite calcular el grado de *cross-linking* siguiendo la fórmula definida por Glauner (1988).

3. Con el fin de comprobar si la hipótesis de que la N-acetiltransferasa YncA SCO0954 acetila la metionina oxidada, estamos diseñando, en colaboración con el grupo de Cromatografía y Técnicas Afines Área Analítica (CyTARA) de la Universidad de Salamanca, un protocolo para medir aminoácidos sin derivatizar mediante cromatografía líquida hidrofílica y espectrometría de masas (HILIC LC-MS). La metionina se acetila en el extremo amino, que es donde se une el OPA en el método de cromatografía descrito en el apartado III.7.2, por lo que no sirve para medir metionina acetilada.

V.2. LA FOSFOPROTEÓMICA UTILIZANDO EL ENRIQUECIMIENTO DE FOSFOPÉPTIDOS CON ZR(IV)-IMAC HA PERMITIDO CASI DUPLICAR EL FOSFOPROTEOMA CONOCIDO DE *STREPTOMYCES COELICOLOR*

V.2.1. El enriquecimiento de fosfopéptidos con Zr(IV)-IMAC ha permitido casi duplicar el fosfoproteoma conocido de *Streptomyces coelicolor*

El estudio del fosfoproteoma bacteriano supone un gran desafío porque la estequiometría de la fosforilación de Ser/Thr/Tyr es muy baja en bacterias en comparación con eucariotas (Yagüe *et al.*, 2019). La mayoría de los estudios de fosfoproteoma bacteriano realizados hasta la fecha

DISCUSIÓN

utilizaron cantidades relativamente grandes de proteína (>1 mg) y métodos de enriquecimiento de fosfopéptidos basados en TiO₂ para identificar relativamente pocos fosfopéptidos, generalmente del orden de 50 a 150 sitios de fosforilación (Yagüe *et al.*, 2019) (Tabla suplementaria 2). Recientemente, se utilizó Fe(III)-IMAC en estudios de *E. coli* para identificar nuevas fosfoproteínas (Potel *et al.*, 2018).

En esta tesis doctoral, trabajamos por primera vez con Zr(IV)-IMAC como método de enriquecimiento de fosfopéptidos para *E. coli* y *S. coelicolor*. Optimizamos la técnica de enriquecimiento de fosfopéptidos con Zr(IV)-IMAC en *E. coli*, identificando 340 sitios de fosforilación en 339 fosfopéptidos de 223 fosfoproteínas, incluidas 9 nuevas fosfoproteínas (tabla suplementaria 2). Luego aplicamos el flujo de trabajo de Zr(IV)-IMAC y LC-MS/MS para analizar y comparar los fosfoproteomas de las fases vegetativa (30 horas) y esporulante (65 horas) de *S. coelicolor*.

Identificamos 361 sitios de fosforilación en 351 fosfopéptidos derivados de 186 fosfoproteínas. Identificamos 154 nuevas fosfoproteínas, casi duplicando el número de fosfoproteínas detectadas experimentalmente en *S. coelicolor*. Los sitios de fosforilación de Thr son altamente prevalentes en *Streptomyces* en comparación con *E. coli* (50% frente al 20% respectivamente, Tabla 2), pero son consistentes con los observados en otros estudios de fosfoproteoma de *Streptomyces* (Tabla 2).

V.2.2. La técnica de enriquecimiento de fosfopéptidos con Zr(IV)-IMAC reporta fosfopéptidos diferentes a la técnica de enriquecimiento con TiO₂

La superposición entre nuestro estudio basado en Zr(IV)-IMAC y análisis fosfoproteómicos previos basados en TiO₂ fue baja para *E. coli* (20,7%) (Macek *et al.*, 2008, Soares *et al.*, 2013, Semanjski *et al.*, 2018) (figura 54c) e incluso menor para *S. coelicolor* (9,5%) (figura 54e) (Parker *et al.*, 2010, Manteca *et al.*, 2011, Rioseras *et al.*, 2018, Hirakata *et al.*, 2019). Esta superposición fue mucho menor que la observada en estudios similares de muestras eucariotas, donde hay hasta un 44% de superposición entre Zr(IV)-IMAC y TiO₂ (Arribas Diez *et al.*, 2021). Esto podría estar relacionado con el bajo nivel de fosforilación de S/T/Y en bacterias en comparación con eucariotas (Yagüe *et al.*, 2019), lo que hace que el enriquecimiento de fosfopéptidos sea un reto. De hecho, la selectividad de enriquecimiento de fosfopéptidos con Zr(IV)-IMAC fue baja en *E. coli* (<12%) (figura 54b) y en *S. coelicolor* (18,1%), lo que contrasta con las muestras eucariotas donde la selectividad de enriquecimiento de fosfopéptidos está a menudo por encima del 90% (Arribas Diez *et al.*, 2021).

Curiosamente, 208 de las fosfoproteínas de *E. coli* identificadas aquí mediante Zr(IV)-IMAC y LC-MS/MS (92,4% del total) se identificaron en estudios recientes utilizando Fe(III)-IMAC (Potel *et al.*, 2018, Lin *et al.*, 2018), lo que indica que Zr(IV)- y Fe(III)-IMAC tienen una afinidad por fosfopéptidos similar, como ya se observó en eucariotas (Arribas Diez *et al.*, 2021).

Claramente, el método de enriquecimiento de fosfopéptidos elegido (TiO₂, Zr(IV)- o Fe(III)-IMAC) influye en el resultado del estudio.

Curiosamente, los fosfopéptidos identificados únicamente mediante enriquecimiento con Zr(IV)-IMAC son más cortos y tienen más aminoácidos neutros en comparación con los identificados solo por TiO₂, tanto en *S. coelicolor* como en *E. coli* (figura 54f y 55f). El TiO₂ es el método de enriquecimiento de fosfopéptidos utilizado en la mayoría de los estudios de fosfoproteomas bacterianos (Yagüe *et al.*, 2019) (Tabla 2), por lo que volver a analizar dichos fosfoproteomas utilizando métodos alternativos de enriquecimiento como Zr(IV)-IMAC mejoraría nuestro conocimiento sobre los fosfoproteomas bacterianos.

V.2.3. Los sitios de fosforilación identificados se localizan en dominios estructurales y funcionales de las proteínas fosforiladas

El mapeo de los sitios de fosforilación observados en estructuras 3D de proteínas predichas computacionalmente mediante el algoritmo *AlphaFold* muestra que estos sitios de fosforilación se ubican en dominios estructurales y funcionales discretos (Tomono *et al.*, 2006, Vogelmann *et al.*, 2011, Saxena *et al.*, 2013, Fillenberg *et al.*, 2016, Jin and Gräter, 2021, Kliche and Ivarsson, 2022) (figura 59). Además, muchos de los sitios de fosforilación identificados están ubicados en regiones con una baja puntuación predictiva *AlphaFold* (Jumper *et al.*, 2021), posiblemente correspondientes a regiones intrínsecamente desordenadas que pueden cambiar su conformación tras la fosforilación (figura 59). Por lo tanto, los sitios de fosforilación S/T/Y identificados podrían modular las conformaciones, interacciones y actividades de importantes proteínas reguladores de *S. coelicolor*.

V.2.4. Variaciones en el fosfoproteoma de *Streptomyces coelicolor* en el micelio sustrato y el micelio aéreo

La figura 64 resume las proteínas clave que se fosforilaron diferencialmente en cultivos de *S. coelicolor* de 30 y 65 horas (etapas de micelio vegetativo y aéreo respectivamente). Aproximadamente la mitad de las fosforilaciones identificadas no se habían descrito con anterioridad (resaltadas en rojo en la figura 64). Las proteínas del metabolismo primario, principalmente proteínas ribosómicas y enzimas anabólicas, se fosforilaron principalmente en el micelio vegetativo (cultivos de 30 horas), mientras que los reguladores clave del metabolismo secundario (CutR, HrcA, DasR) (Chang *et al.*, 1996, Käll *et al.*, 2007, Rigali *et al.*, 2008) se fosforilaron en el micelio aéreo (cultivos de 65 horas) (figura 58). En consecuencia, tanto el metabolismo primario como el secundario parecen estar modulados, al menos en parte, por la fosforilación de S/T/Y.

Trabajos de otros autores demostraron que la fosforilación de proteínas ribosómicas influye en la asociación de subunidades y mejora la tasa de traducción de *S. coelicolor* (Mikulik *et al.*, 2011). Por lo tanto, la fosforilación de proteínas ribosómicas aquí detectada podría modular la tasa de síntesis de proteínas durante las etapas vegetativa y reproductiva. Una de las diferencias morfológicas más claras entre las hifas del micelio aéreo y sustrato es la baja ramificación de las hifas aéreas (Wildermuth, 1970), que podría estar influenciada por la fosforilación de la quinasa AfsK S/T, un regulador clave de la ramificación de las hifas (Hempel *et al.*, 2012) que se fosforila diferencialmente a las 30 y 65 horas (figuras 58 y 64).

DISCUSIÓN

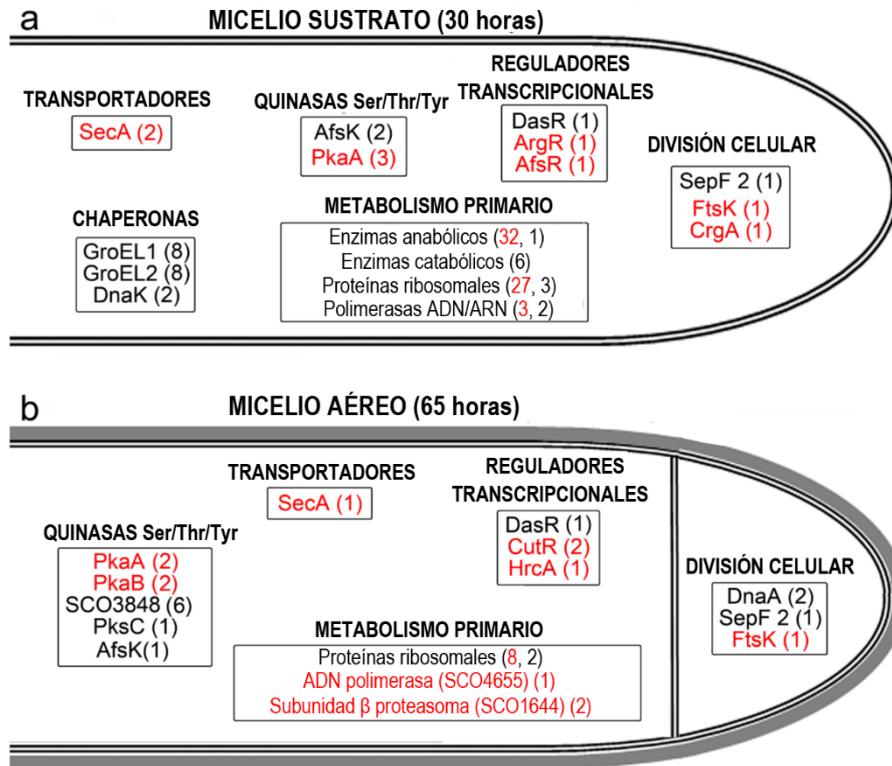


Figura 64. Variaciones del fosfoproteoma durante el desarrollo de *S. coelicolor* en el micelio sustrato (30 horas) y en micelio aéreo esporulado (65 horas). Las proteínas clave que se discuten en el texto se muestran en la etapa de desarrollo en la que muestran una regulación positiva significativa. Entre paréntesis se indica el número de fosfopéptidos identificados para cada proteína. Las nuevas fosfoproteínas no identificadas en trabajos anteriores se resaltan en rojo.

Las divisiones celulares vegetativas y de esporulación son complejas y están regulada de manera diferencial (Jakimowicz and van Wezel, 2012). Las proteínas clave de la división celular, como SepF2, un parálogo de SepF implicado en el anclaje del anillo Z a la membrana (Hamoen *et al.*, 2006), y las proteínas de esporulación FtsK/CrgA (Del Sol *et al.*, 2006, Dedrick *et al.*, 2009), se fosforilan diferencialmente en el micelio

vegetativo y aéreo, lo que indica que la fosforilación de proteínas está involucrada en la regulación de la división celular de *Streptomyces*.

Aún no se han caracterizado las funciones de los nuevos sitios de fosforilación de proteínas identificados en este trabajo, así como las de la mayoría de las fosfoproteínas previamente reportadas en *S. coelicolor*. Como se mencionó en el apartado IV.7.5, sólo hay 7 proteínas de *S. coelicolor* en las que se haya demostrado que su actividad está dirigida y modulada por la fosforilación de S/T/Y: DivIVA y AfsK, que controlan el crecimiento polar y la ramificación de las hifas (Hempel *et al.*, 2012); AfsR, que controla el metabolismo secundario (Sawai *et al.*, 2004); DnaA, que controla la replicación del ADN (Lebkowski *et al.*, 2020); y MreC y Pbp2, que controlan la síntesis de PG (Ladwig *et al.*, 2015). Será necesario seguir trabajando para comprender completamente el papel biológico de la fosforilación de S/T/Y en *S. coelicolor*, incluida la mutagénesis de los sitios de fosforilación que imitan la fosforilación/no-fosforilación, el análisis de mutantes de quinasas S/T/Y, la comparación de la estructura 3D de las proteínas fosforiladas/no-fosforiladas, etc. Aun así, el conocimiento del fosfoproteoma de *S. coelicolor* contribuye a mejorar nuestra apreciación de las posibles características reguladoras moleculares de *Streptomyces*.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

1. Las proteínas SCO0954 (N-acetiltransferasa con dominio YncA), SCO4439 (carboxipeptidasa D-alanil-D-alanina), SCO4440 (proteína similar a GOLPH3) y SCO1758 (GTPasa EngA) están altamente conservadas en el género *Streptomyces* y participan en la formación de células deficientes de pared (células S y formas L) en *Streptomyces coelicolor* mediante la modulación del *cross-linking* en el PG y cambios en la abundancia de metionina oxidada y no oxidada en el PG.
2. La N-acetiltransferasa SCO0954 acetila metionina oxidada extracelular, bloqueando su transporte hacia el citosol celular y previniendo el estrés oxidativo, de forma similar a su ortólogo en *Salmonella enterica*.
3. La GTPasa SCO1758 forma acúmulos regularmente espaciados y asociados a la pared celular a las 48 horas el ciclo de desarrollo y podría estar interaccionando con enzimas que modulan la remodelación del PG en las hifas destinadas a formar células S y formas L.
4. La proteína SCO4440 contiene un dominio GOLPH3 típico de células eucariotas muy inusual en bacterias. Este dominio podría indicar la existencia de una red secretora en *Streptomyces* con analogías a la red secretora del aparato de Golgi eucariota.
5. La exosortasa SCO4849 participa en la eliminación de péptidos del PG, pero no en la formación de células S o formas L.

CONCLUSIONES

6. La cepa de salvaje de *Streptomyces coelicolor* es capaz de formar células S y formas L en condiciones de alto estrés osmótico en medio SFM.

7. La formación de células S y formas L en *Streptomyces coelicolor* es un proceso activo que sólo se produce en tiempos previos a la esporulación y con concentraciones de sacarosa (0,64 M) mucho más altas que las necesarias para preservar la estabilidad de células sin pared (0,3 M), además de estar regulado genéticamente.

8. El Zr(IV)-IMAC es un método eficiente y sensible alternativo al TiO₂ para el enriquecimiento de fosfopéptidos que permite identificar nuevos sitios de fosforilación en *Streptomyces* y otras bacterias.

9. El fosfoproteoma de Ser/Thr/Tyr de los micelios sustrato y aéreo de *Streptomyces* es muy diferente, y la fosforilación podría estar modulando la activación del metabolismo secundario.

1. The SCO0954 (N-acetyltransferase with YncA domain), SCO4439 (D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase), SCO4440 (GOLPH3-like protein) and SCO1758 (GTPase EngA) proteins are highly conserved in the genus *Streptomyces* and participate in the formation of wall-deficient cells (S-cells and L-forms) in *Streptomyces coelicolor* by modulating cross-linking in the PG and changes in the abundance of oxidized and non-oxidized methionine in the PG.
2. The N-acetyltransferase SCO0954 acetylates extracellular oxidized methionine, blocking its transport into the cellular cytosol and preventing oxidative stress, similar to its ortholog in *Salmonella enterica*.
3. The GTPase SCO1758 forms regularly spaced accumulations associated with the cell wall at 48 hours of the development cycle and could be interacting with enzymes that modulate PG remodeling in hyphae destined to form S-cells and L-forms.
4. The SCO4440 protein contains a GOLPH3 domain typical of eukaryotic cells that is very unusual in bacteria. This domain could indicate the existence of a secretory network in *Streptomyces* with analogies to the secretory network of the eukaryotic Golgi apparatus.
5. The exosortase SCO4849 is involved in the removal of peptides from the PG, but not in the formation of S-cells or L-forms.

CONCLUSIONS

6. The wild strain of *Streptomyces coelicolor* is capable of forming S-cells and L-forms under conditions of high osmotic stress in SFM medium.
7. In addition to being genetically regulated, The formation of S-cells and L-forms in *Streptomyces coelicolor* is an active process that only occurs in times prior to sporulation and with sucrose concentrations (0.64 M) much higher than those necessary to preserve the stability of cells without a wall (0.3 M).
8. Zr(IV)-IMAC is an efficient and sensitive alternative method to TiO₂ for the enrichment of phosphopeptides that allows the identification of new phosphorylation sites in *Streptomyces* and other bacteria.
9. The Ser/Thr/Tyr phosphoproteome of *Streptomyces* aerial and substrate mycelia is very different, and phosphorylation could be modulating the activation of secondary metabolism.

VII. REFERENCIAS

-
- ABSALON, C., HAMZE, K., BLANOT, D., FREHEL, C., CARBALLIDO-LOPEZ, R., HOLLAND, B. I., VAN HEIJENOORT, J. & SEROR, S. J. 2008. The GTPase CpgA is implicated in the deposition of the peptidoglycan sacculus in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 190, 3786-90.
- ALLAN, E., AMIJEE, F., TYSON, R., STRANG, J., INNES, C. & PATON, A. 1993. Growth and physiological characteristics of *Bacillus subtilis* L-forms. *The Journal of applied bacteriology*, 74, 588-594.
- ALLAN, E., HOISCHEN, C. & GUMPERT, J. 2009. Bacterial L-forms. *Advances in applied microbiology*, 68, 1-39.
- ARBELOA, A., HUGONNET, J.-E., SENTILHES, A.-C., JOSSEAUME, N., DUBOST, L., MONSEMPES, C., BLANOT, D., BROUARD, J.-P. & ARTHUR, M. 2004. Synthesis of mosaic peptidoglycan cross-bridges by hybrid peptidoglycan assembly pathways in gram-positive bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 41546-41556.
- ARRIBAS DIEZ, I., GOVENDER, I., NAICKER, P., STOYCHEV, S., JORDAAN, J. & JENSEN, O. N. 2021. Zirconium(IV)-IMAC Revisited: Improved Performance and Phosphoproteome Coverage by Magnetic Microparticles for Phosphopeptide Affinity Enrichment. *J Proteome Res*, 20, 453-462.
- ASHBURNER, M., BALL, C. A., BLAKE, J. A., BOTSTEIN, D., BUTLER, H., CHERRY, J. M., DAVIS, A. P., DOLINSKI, K., DWIGHT, S. S. & EPPIG, J. T. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, 25, 25-29.
- ATRIH, A., ZOLLNER, P., ALLMAIER, G. & FOSTER, S. J. 1996. Structural analysis of *Bacillus subtilis* 168 endospore peptidoglycan and its role during differentiation. *J Bacteriol*, 178, 6173-83.

REFERENCIAS

- BAGCHI, S., TOMENIUS, H., BELOVA, L. M. & AUSMEES, N. 2008. Intermediate filament-like proteins in bacteria and a cytoskeletal function in *Streptomyces*. *Molecular microbiology*, 70, 1037-1050.
- BAI, C., ZHANG, Y., ZHAO, X., HU, Y., XIANG, S., MIAO, J., LOU, C. & ZHANG, L. 2015. Exploiting a precise design of universal synthetic modular regulatory elements to unlock the microbial natural products in *Streptomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 12181-12186.
- BALTZ, R. H. 2016. Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43, 343-370.
- BARKA, E. A., VATSA, P., SANCHEZ, L., GAVEAU-VAILLANT, N., JACQUARD, C., MEIER-KOLTHOFF, J. P., KLENK, H. P., CLEMENT, C., OUHDOUCH, Y. & VAN WEZEL, G. P. 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 80, 1-43.
- BARREIRO, C. & MARTINEZ-CASTRO, M. 2019. Regulation of the phosphate metabolism in *Streptomyces* genus: impact on the secondary metabolites. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103, 1643-1658.
- BARROWS, J. M. & GOLEY, E. D. 2021. FtsZ dynamics in bacterial division: What, how, and why? *Curr Opin Cell Biol*, 68, 163-172.
- BATTISTUZZI, F. U., FEIJAO, A. & HEDGES, S. B. 2004. A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land. *BMC evolutionary biology*, 4, 1-14.

-
- BAUMGARTEN, T., SPERLING, S., SEIFERT, J., VON BERGEN, M., STEINIGER, F., WICK, L. Y. & HEIPIEPER, H. J. 2012. Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, 78, 6217-6224.
- BENTLEY, S. D., CHATER, K. F., CERDEÑO-TÁRRAGA, A.-M., CHALLIS, G. L., THOMSON, N., JAMES, K. D., HARRIS, D. E., QUAIL, M. A., KIESER, H. & HARPER, D. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *nature*, 417, 141-147.
- BEROIGUI, O. & ERRACHIDI, F. 2023. *Streptomyces* at the Heart of Several Sectors to Support Practical and Sustainable Applications: A Review. *Progress In Microbes & Molecular Biology*, 6.
- BHARAT, A. & BROWN, E. D. 2014. Phenotypic investigations of the depletion of EngA in *Escherichia coli* are consistent with a role in ribosome biogenesis. *FEMS Microbiol Lett*, 353, 26-32.
- BHOWMICK, S., SHENOUDA, M. L. & TSCHOWRI, N. 2023. Osmotic stress responses and the biology of the second messenger c-di-AMP in *Streptomyces*. *MicroLife*, uqad020.
- BIBERSTEIN, E. & CHUNG ZEE, Y. 1994. Tratado de microbiología veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- BIRNBOIM, H. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7, 1513-1523.
- BISHOP, A., FIELDING, S., DYSON, P. & HERRON, P. 2004. Systematic insertional mutagenesis of a streptomycete genome: a link

REFERENCIAS

- between osmoadaptation and antibiotic production. *Genome Res*, 14, 893-900.
- BISSON-FILHO, A. W., HSU, Y. P., SQUYRES, G. R., KURU, E., WU, F., JUKES, C., SUN, Y., DEKKER, C., HOLDEN, S., VANNIEUWENHZE, M. S., BRUN, Y. V. & GARNER, E. C. 2017. Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science*, 355, 739-743.
- BOBEK, J., HALADA, P., ANGELIS, J., VOHRADSKÝ, J. & MIKULÍK, K. 2004. Activation and expression of proteins during synchronous germination of aerial spores of *Streptomyces granaticolor*. *Proteomics*, 4, 3864-3880.
- BOBEK, J., SMIDOVA, K. & CIHAK, M. 2017. A Waking Review: Old and Novel Insights into the Spore Germination in *Streptomyces*. *Front Microbiol*, 8, 2205.
- BOSCHI-MULLER, S., OLRÝ, A., ANTOINE, M. & BRANLANT, G. 2005. The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1703, 231-238.
- BOTAS, A., PEREZ-REDONDO, R., RODRIGUEZ-GARCÍA, A., ALVAREZ-ALVAREZ, R., YAGÜE, P., MANTECA, A. & LIRAS, P. 2018. ArgR of *Streptomyces coelicolor* Is a Pleiotropic Transcriptional Regulator: Effect on the Transcriptome, Antibiotic Production, and Differentiation in Liquid Cultures. *Front Microbiol*, 9, 361.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRANA, A. F., MENDEZ, C., DIAZ, L. A., MANZANAL, M. B. & HARDISSON, C. 1986. Glycogen and trehalose accumulation during colony

- development in *Streptomyces antibioticus*. *J Gen Microbiol*, 132, 1319-26.
- BRIERS, Y., WALDE, P., SCHUPPLER, M. & LOESSNER, M. J. 2012. How did bacterial ancestors reproduce? Lessons from L-form cells and giant lipid vesicles: multiplication similarities between lipid vesicles and L-form bacteria. *Bioessays*, 34, 1078-1084.
- BUCCA, G., FERINA, G., PUGLIA, A. M. & SMITH, C. P. 1995. The dnaK operon of *Streptomyces coelicolor* encodes a novel heat-shock protein which binds to the promoter region of the operon. *Molecular microbiology*, 17, 663-674.
- BUCHANAN, R. 1918. Studies in the classification and nomenclature of the bacteria viii. The subgroups and genera of the actinomycetales. *Journal of Bacteriology*, 3, 403-406.
- BURCKHARDT, R. M. & ESCALANTE-SEMERENA, J. C. 2020. Small-Molecule Acetylation by GCN5-Related N-Acetyltransferases in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 84.
- BUSCHMAN, M. D., XING, M. & FIELD, S. J. 2015. The GOLPH3 pathway regulates Golgi shape and function and is activated by DNA damage. *Front Neurosci*, 9, 362.
- CALDON, C. E. & MARCH, P. E. 2003. Function of the universally conserved bacterial GTPases. *Curr Opin Microbiol*, 6, 135-9.
- CALDON, C. E., YOONG, P. & MARCH, P. E. 2001. Evolution of a molecular switch: universal bacterial GTPases regulate ribosome function. *Mol Microbiol*, 41, 289-97.
- CASU, B., SALLMEN, J. W., SCHLIMPERT, S. & PILHOFER, M. 2023. Cytoplasmic contractile injection systems mediate cell death in *Streptomyces*. *Nat Microbiol*.

REFERENCIAS

- CELLER, K., KONING, R. I., WILLEMSE, J., KOSTER, A. J. & VAN WEZEL, G. P. 2016. Cross-membranes orchestrate compartmentalization and morphogenesis in *Streptomyces*. *Nat Commun*, 7, ncomms11836.
- CHAHROUR, O., COBICE, D. & MALONE, J. 2015. Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 113, 2-20.
- CHANG, H. M., CHEN, M. Y., SHIEH, Y. T., BIBB, M. J. & CHEN, C. W. 1996. The cutRS signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin. *Mol Microbiol*, 21, 1075-85.
- CHATER, K. F. 1984. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Microbial development*, 89-116.
- CHATER, K. F. 2015. The smell of soil. *Microbiology Today*, 42, 66-69.
- CHATTERJEE, I., NEUMAYER, D. & HERRMANN, M. 2010. Senescence of staphylococci: using functional genomics to unravel the roles of ClpC ATPase during late stationary phase. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 130-136.
- CHEN, Q., ZHU, J., LI, X. & WEN, Y. 2022. Transcriptional Regulator DasR Represses Daptomycin Production through Both Direct and Cascade Mechanisms in *Streptomyces roseosporus*. *Antibiotics (Basel)*, 11.
- CHENG, A., GRANT, C. E., NOBLE, W. S. & BAILEY, T. L. 2019. MoMo: discovery of statistically significant post-translational modification motifs. *Bioinformatics*, 35, 2774-2782.
- CHOPRA, I., HESSE, L. & O'NEILL, A. 2002. Exploiting current understanding of antibiotic action for discovery of new drugs. *Journal of applied microbiology*, 92, 4S-15S.

-
- CLAESSEN, D., DE JONG, W., DIJKHUIZEN, L. & WOSTEN, H. A. 2006. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol*, 14, 313-9.
- CLAESSEN, D., EMMINS, R., HAMOEN, L. W., DANIEL, R. A., ERRINGTON, J. & EDWARDS, D. H. 2008. Control of the cell elongation–division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 68, 1029-1046.
- CLAESSEN, D. & ERRINGTON, J. 2019. Cell wall deficiency as a coping strategy for stress. *Trends in microbiology*, 27, 1025-1033.
- CLAESSEN, D., RINK, R., DE JONG, W., SIEBRING, J., DE VREUGD, P., BOERSMA, F. H., DIJKHUIZEN, L. & WÖSTEN, H. A. 2003. A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes & development*, 17, 1714-1726.
- COHN, F. 1875. *Untersuchungen Über Bacterien: I*, JU Kern.
- COMBES, P., TILL, R., BEE, S. & SMITH, M. C. 2002. The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-attB sites for the (phi)C31-encoded site-specific recombination system. *J Bacteriol*, 184, 5746-52.
- COMPTON, C. L., FERNANDOPULLE, M. S., NAGARI, R. T. & SELLO, J. K. 2015. Genetic and Proteomic Analyses of Pupylation in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 197, 2747-53.
- COOPER, M. A. & WILLIAMS, D. H. 1999. Binding of glycopeptide antibiotics to a model of a vancomycin-resistant bacterium. *Chem Biol*, 6, 891-9.
- CRAIG, J. W., CHERRY, M. A. & BRADY, S. F. 2011a. Long-chain N-acyl amino acid synthases are linked to the putative PEP-

REFERENCIAS

- CTERM/exosortase protein-sorting system in Gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, 193, 5707-15.
- CRAIG, J. W., CHERRY, M. A. & BRADY, S. F. 2011b. Long-chain N-acyl amino acid synthases are linked to the putative PEP-CTERM/exosortase protein-sorting system in Gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*, 193, 5707-5715.
- DANIEL, T. M., BATES, J. H. & DOWNES, K. A. 1994. History of tuberculosis. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*, 13-24.
- DAVISON, J. 2002. Genetic tools for pseudomonads, rhizobia, and other gram-negative bacteria. *Biotechniques*, 32, 386-401.
- DE GRAAF, E. L., GIANSANTI, P., ALTELAAR, A. M. & HECK, A. J. 2014. Single-step enrichment by Ti⁴⁺-IMAC and label-free quantitation enables in-depth monitoring of phosphorylation dynamics with high reproducibility and temporal resolution. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13, 2426-2434.
- DE JONG, W., MANTECA, A., SANCHEZ, J., BUCCA, G., SMITH, C. P., DIJKHUIZEN, L., CLAESSEN, D. & WOSTEN, H. A. 2009. NepA is a structural cell wall protein involved in maintenance of spore dormancy in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 71, 1591-603.
- DE JONG, W., VIJGENBOOM, E., DIJKHUIZEN, L., WÖSTEN, H. A. & CLAESSEN, D. 2012. SapB and the rodlinins are required for development of *Streptomyces coelicolor* in high osmolarity media. *FEMS microbiology letters*, 329, 154-159.
- DEDRICK, R. M., WILDSCHUTTE, H. & MCCORMICK, J. R. 2009. Genetic interactions of smc, ftsK, and parB genes in *Streptomyces coelicolor* and their developmental genome segregation phenotypes. *J Bacteriol*, 191, 320-32.

-
- DEL SOL, R., MULLINS, J. G., GRANTCHAROVA, N., FLARDH, K. & DYSON, P. 2006. Influence of CrgA on assembly of the cell division protein FtsZ during development of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 188, 1540-50.
- DELL'ERA, S., BUCHRIESER, C., COUVÉ, E., SCHNELL, B., BRIERS, Y., SCHUPPLER, M. & LOESSNER, M. J. 2009. Listeria monocytogenes-forms respond to cell wall deficiency by modifying gene expression and the mode of division. *Molecular microbiology*, 73, 306-322.
- DEN BLAAUWEN, T., HAMOEN, L. W. & LEVIN, P. A. 2017. The divisome at 25: the road ahead. *Curr Opin Microbiol*, 36, 85-94.
- DIEZ, I. A., GOVENDER, I., NAICKER, P., STOYCHEV, S., JORDAAN, J. & JENSEN, O. N. 2020. Zirconium (IV)-IMAC for phosphopeptide enrichment in phosphoproteomics. *BioRxiv*, 2020.04. 13.038810.
- DOMINGUE SR, G. J. & WOODY, H. B. 1997. Bacterial persistence and expression of disease. *Clinical microbiology reviews*, 10, 320-344.
- DOUDNA, J. A. & CHARPENTIER, E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, 1258096.
- DUGGAR, B. M. 1948. Aureomycin-a New Antibiotic. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 51, 177-342.
- EHRlich, J., GOTTLIEB, D., BURKHOLDER, P. R., ANDERSON, L. E. & PRIDHAM, T. 1948. *Streptomyces venezuelae*, n. sp., the source of chloromycetin. *Journal of bacteriology*, 56, 467-477.
- EISENSTEIN, B. I., OLESON JR, F. B. & BALTZ, R. H. 2010. Daptomycin: from the mountain to the clinic, with essential help from Francis Tally, MD. *Clinical Infectious Diseases*, 50, S10-S15.

REFERENCIAS

- ENGELBERG-KULKA, H., AMITAI, S., KOLODKIN-GAL, I. & HAZAN, R. 2006. Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria. *PLoS genetics*, 2, e135.
- ERRINGTON, J. 2013. L-form bacteria, cell walls and the origins of life. *Open biology*, 3, 120143.
- ERRINGTON, J., MICKIEWICZ, K., KAWAI, Y. & WU, L. J. 2016. L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371, 20150494.
- FADDETTA, T., RENZONE, G., VASSALLO, A., RIMINI, E., NASILLO, G., BUSCARINO, G., AGNELLO, S., LICCIARDI, M., BOTTA, L., SCALONI, A., PALUMBO PICCIONELLO, A., PUGLIA, A. M. & GALLO, G. 2022. *Streptomyces coelicolor* Vesicles: Many Molecules To Be Delivered. *Appl Environ Microbiol*, 88, e0188121.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, G., GONZÁLEZ-QUIÑÓNEZ, N., RIOSEAS, B., ALONSO-FERNÁNDEZ, S., FERNÁNDEZ, J., LOMBO, F. & MANTECA, A. 2022. The SCO2102 Protein Harboring a DnaA II Protein-Interaction Domain Is Essential for the SCO2103 Methylene-tetrahydrofolate Reductase Positioning at *Streptomyces* Sporulating Hyphae, Enhancing DNA Replication during Sporulation. *Int J Mol Sci*, 23.
- FERNÁNDEZ-MARTINEZ, L. T., DEL SOL, R., EVANS, M. C., FIELDING, S., HERRON, P. R., CHANDRA, G. & DYSON, P. J. 2011. A transposon insertion single-gene knockout library and new ordered cosmid library for the model organism *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99, 515-22.
- FERNÁNDEZ, E., WEISSBACH, U., SANCHEZ REILLO, C., BRANA, A. F., MENDEZ, C., ROHR, J. & SALAS, J. A. 1998. Identification of two

- genes from *Streptomyces argillaceus* encoding glycosyltransferases involved in transfer of a disaccharide during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin. *J Bacteriol*, 180, 4929-37.
- FILIPPOVA, S. & VINOGRADOVA, K. 2017. Programmed cell death as one of the stages of streptomycete differentiation. *Microbiology*, 86, 439-454.
- FILLENBERG, S. B., FRIESS, M. D., KORNER, S., BOCKMANN, R. A. & MULLER, Y. A. 2016. Crystal Structures of the Global Regulator DasR from *Streptomyces coelicolor*: Implications for the Allosteric Regulation of GntR/HutC Repressors. *PLoS One*, 11, e0157691.
- FLARDH, K. 2003. Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol*, 49, 1523-36.
- FLÄRDH, K. & BUTTNER, M. J. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 36-49.
- FLETT, F., MERSINIAS, V. & SMITH, C. P. 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett*, 155, 223-9.
- FROJD, M. J. & FLARDH, K. 2019. Extrusion of extracellular membrane vesicles from hyphal tips of *Streptomyces venezuelae* coupled to cell-wall stress. *Microbiology (Reading)*, 165, 1295-1305.
- FRÖJD, M. J. & FLÄRDH, K. 2019a. Apical assemblies of intermediate filament-like protein FilP are highly dynamic and affect polar growth determinant DivIVA in *Streptomyces venezuelae*. *Molecular Microbiology*, 112, 47-61.

REFERENCIAS

- FRÖJD, M. J. & FLÄRDH, K. 2019b. Extrusion of extracellular membrane vesicles from hyphal tips of *Streptomyces venezuelae* coupled to cell-wall stress. *Microbiology (United Kingdom)*, 165, 1295-1305.
- FUCHINO, K., FLÄRDH, K., DYSON, P. & AUSMEES, N. 2017. Cell-biological studies of osmotic shock response in *Streptomyces* spp. *Journal of bacteriology*, 199, 10.1128/jb.00465-16.
- FUHS, S. R. & HUNTER, T. 2017. pHisphorylation: the emergence of histidine phosphorylation as a reversible regulatory modification. *Current opinion in cell biology*, 45, 8-16.
- GALLUZZI, L., PEDRO, B.-S., VITALE, I., AARONSON, S., ABRAMS, J., ADAM, D., ALNEMRI, E., ALTUCCI, L., ANDREWS, D. & ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M. 2015. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death & Differentiation*, 22, 58-73.
- GARCÍA-GUTIÉRREZ, C., APARICIO, T., TORRES-SÁNCHEZ, L., MARTÍNEZ-GARCÍA, E., DE LORENZO, V., VILLAR, C. J. & LOMBÓ, F. 2020. Multifunctional SEVA shuttle vectors for actinomycetes and Gram-negative bacteria. *Microbiologyopen*, 9, 1135-1149.
- GLAUNER, B. 1988. Separation and quantification of muropeptides with high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 172, 451-64.
- GONZÁLEZ-QUIÑÓNEZ, N., CORTE-RODRIGUEZ, M., ALVAREZ-FERNÁNDEZ-GARCÍA, R., RIOSERAS, B., LOPEZ-GARCÍA, M. T., FERNÁNDEZ-GARCÍA, G., MONTES-BAYON, M., MANTECA, A. & YAGÜE, P. 2019. Cytosolic copper is a major modulator of germination, development and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Sci Rep*, 9, 4214.

-
- GONZÁLEZ-QUIÑÓNEZ, N., GUTIÉRREZ-DEL-RÍO, I., GARCÍA-CANCELA, P., FERNÁNDEZ-GARCÍA, G., ALONSO-FERNÁNDEZ, S., YAGÜE, P., PÉREZ-VALERO, Á., MONTES-BAYÓN, M., LOMBÓ, F. & MANTECA, Á. 2021. The Modulation of SCO2730/31 Copper Chaperone/Transporter Orthologue Expression Enhances Secondary Metabolism in Streptomyces. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 10143.
- GONZÁLEZ-QUIÑÓNEZ, N., LOPEZ-GARCÍA, M. T., YAGÜE, P., RIOSERAS, B., PISCIOTTA, A., ALDUINA, R. & MANTECA, A. 2016. New PhiBT1 site-specific integrative vectors with neutral phenotype in Streptomyces. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100, 2797-808.
- GRANTCHAROVA, N., LUSTIG, U. & FLARDH, K. 2005. Dynamics of FtsZ assembly during sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol*, 187, 3227-37.
- GRAY, A. & SHARARA, F. 2022. Global and regional sepsis and infectious syndrome mortality in 2019: a systematic analysis. *The Lancet Global Health*, 10, S2.
- GREGORY, M. A., TILL, R. & SMITH, M. C. 2003. Integration site for *Streptomyces* phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors. *J Bacteriol*, 185, 5320-3.
- GUIRAL, S., MITCHELL, T. J., MARTIN, B. & CLAVERYS, J.-P. 2005. Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 68.
- GUMPERT, J. 1982. Growth characteristics and ultrastructure of protoplast type L-forms from streptomyces. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 22, 617-627.

REFERENCIAS

- GUPTA, R. S. 2011. Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100, 171-182.
- GUPTA, S., BANERJEE, S. K., CHATTERJEE, A., SHARMA, A. K., KUNDU, M. & BASU, J. 2015. Essential protein SepF of mycobacteria interacts with FtsZ and MurG to regulate cell growth and division. *Microbiology (Reading)*, 161, 1627-1638.
- HAFT, D. H., PAULSEN, I. T., WARD, N. & SELENGUT, J. D. 2006a. Exopolysaccharide-associated protein sorting in environmental organisms: the PEP-CTERM/EpsH system. Application of a novel phylogenetic profiling heuristic. *BMC Biol*, 4, 29.
- HAFT, D. H., PAULSEN, I. T., WARD, N. & SELENGUT, J. D. 2006b. Exopolysaccharide-associated protein sorting in environmental organisms: the PEP-CTERM/EpsH system. Application of a novel phylogenetic profiling heuristic. *BMC biology*, 4, 1-16.
- HAISER, H. J., YOUSEF, M. R. & ELLIOT, M. A. 2009. Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 191, 6501-6512.
- HAMED, J., POORINMOHAMMAD, N. & WINK, J. 2017. The role of actinobacteria in biotechnology. *Biology and biotechnology of actinobacteria*, 269-328.
- HAMID, M. E. 2011. Variable antibiotic susceptibility patterns among *Streptomyces* species causing actinomycetoma in man and animals. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 10, 1-5.

-
- HAMOEN, L. W., MEILE, J. C., DE JONG, W., NOIROT, P. & ERRINGTON, J. 2006. SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. *Mol Microbiol*, 59, 989-99.
- HARDISSON, C., MANZANAL, M. B., SALAS, J. A. & SUAREZ, J. E. 1978. Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *J Gen Microbiol*, 105, 203-14.
- HE, X., LI, H., PAN, Y., WANG, L., TAN, H. & LIU, G. 2018. SCO3129, a TetR family regulator, is responsible for osmotic stress in *Streptomyces coelicolor*. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3, 261-267.
- HEICHLINGER, A., AMMELBURG, M., KLEINSCHNITZ, E. M., LATUS, A., MALDENER, I., FLARDH, K., WOHLLEBEN, W. & MUTH, G. 2011. The MreB-like protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis. *J Bacteriol*, 193, 1533-42.
- HEMPEL, A. M., CANTLAY, S., MOLLE, V., WANG, S.-B., NALDRETT, M. J., PARKER, J. L., RICHARDS, D. M., JUNG, Y.-G., BUTTNER, M. J. & FLÄRDH, K. 2012. The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria *Streptomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, E2371-E2379.
- HENTCHEL, K. L. & ESCALANTE-SEMERENA, J. C. 2015. In *Salmonella enterica*, the Gcn5-related acetyltransferase MddA (formerly YncA) acetylates methionine sulfoximine and methionine sulfone, blocking their toxic effects. *J Bacteriol*, 197, 314-25.
- HESKETH, A., BUCCA, G., LAING, E., FLETT, F., HOTCHKISS, G., SMITH, C. P. & CHATER, K. F. 2007. New pleiotropic effects of eliminating a rare tRNA from *Streptomyces coelicolor*, revealed by combined

REFERENCIAS

- proteomic and transcriptomic analysis of liquid cultures. *BMC genomics*, 8, 1-22.
- HIRAKATA, T., URABE, H. & SUGITA, T. 2019. Phosphoproteomic and proteomic profiling of serine/threonine protein kinase PkaE of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its role in secondary metabolism and morphogenesis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 83, 1843-1850.
- HODGSON, D. A. Differentiation in actinomycetes. SYMPOSIA-SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, 1992. Cambridge University Press, 407-407.
- HOPWOOD, D. A. 2007. *Streptomyces in nature and medicine : the antibiotic makers*, New York ; Oxford, Oxford University Press.
- HORBAL, L., FEDORENKO, V., BECHTHOLD, A. & LUZHETSKYY, A. 2013. A transposon-based strategy to identify the regulatory gene network responsible for landomycin E biosynthesis. *FEMS microbiology letters*, 342, 138-146.
- HORINOUCI, S. 2002. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Front Biosci*, 7, 2045-2057.
- HUGONNET, J. E., HADDACHE, N., VECKERLE, C., DUBOST, L., MARIE, A., SHIKURA, N., MAINARDI, J. L., RICE, L. B. & ARTHUR, M. 2014. Peptidoglycan cross-linking in glycopeptide-resistant Actinomycetales. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 1749-56.
- IKEGUCHI, Y. & NAKAMURA, H. 1997. Determination of organic phosphates by column-switching high performance anion-exchange chromatography using on-line preconcentration on titanania. *Analytical sciences*, 13, 479-483.

-
- JAKIMOWICZ, D. & VAN WEZEL, G. P. 2012. Cell division and DNA segregation in *Streptomyces*: how to build a septum in the middle of nowhere? *Mol Microbiol*, 85, 393-404.
- JENSEN, L. J., KUHN, M., STARK, M., CHAFFRON, S., CREEVEY, C., MULLER, J., DOERKS, T., JULIEN, P., ROTH, A., SIMONOVIC, M., BORK, P. & VON MERING, C. 2009. STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res*, 37, D412-6.
- JEONG, Y., KIM, J. N., KIM, M. W., BUCCA, G., CHO, S., YOON, Y. J., KIM, B. G., ROE, J. H., KIM, S. C., SMITH, C. P. & CHO, B. K. 2016. The dynamic transcriptional and translational landscape of the model antibiotic producer *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nat Commun*, 7, 11605.
- JIN, F. & GRÄTER, F. 2021. How multisite phosphorylation impacts the conformations of intrinsically disordered proteins. *PLoS computational biology*, 17, e1008939.
- JIN, Q., LIAO, H., DOU, Y., SHEN, N., WU, Z., YANG, Y. & JIN, Z. 2021. Functional investigation of AfsKRS regulatory system for pristinamycin biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*. *3 Biotech*, 11, 418.
- JONES, S. E., HO, L., REES, C. A., HILL, J. E., NODWELL, J. R. & ELLIOT, M. A. 2017. *Streptomyces* exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals. *Elife*, 6, e21738.
- JUMPER, J., EVANS, R., PRITZEL, A., GREEN, T., FIGURNOV, M., RONNEBERGER, O., TUNYASUVUNAKOOL, K., BATES, R., ZIDEK, A., POTAPENKO, A., BRIDGLAND, A., MEYER, C., KOHL, S. A. A., BALLARD, A. J., COWIE, A., ROMERA-PAREDES, B., NIKOLOV, S., JAIN, R., ADLER, J., BACK, T., PETERSEN, S., REIMAN, D., CLANCY,

REFERENCIAS

- E., ZIELINSKI, M., STEINEGGER, M., PACHOLSKA, M., BERGHAMMER, T., BODENSTEIN, S., SILVER, D., VINYALS, O., SENIOR, A. W., KAVUKCUOGLU, K., KOHLI, P. & HASSABIS, D. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596, 583-589.
- KÄLL, L., CANTERBURY, J. D., WESTON, J., NOBLE, W. S. & MACCOSS, M. J. 2007. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nature methods*, 4, 923-925.
- KAWAI, Y., MICKIEWICZ, K. & ERRINGTON, J. 2018. Lysozyme counteracts β -lactam antibiotics by promoting the emergence of L-form bacteria. *Cell*, 172, 1038-1049. e10.
- KHATRI, B. B., TEGG, R. S., BROWN, P. H. & WILSON, C. R. 2010. Infection of potato tubers with the common scab pathogen *Streptomyces scabiei* in a soil-less system. *Journal of phytopathology*, 158, 453-455.
- KIESER, T. 2000. *Practical Streptomyces genetics*, Norwich, John Innes Foundation.
- KIM, B., AL-TAI, A. M., KIM, S. B., SOMASUNDARAM, P. & GOODFELLOW, M. 2000a. *Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endo-xylanase-producing streptomycete. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50, 505-509.
- KIM, H.-J., CALCUTT, M. J., SCHMIDT, F. J. & CHATER, K. F. 2000b. Partitioning of the linear chromosome during sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) involves an oriC-linked parAB locus. *Journal of bacteriology*, 182, 1313-1320.
- KIM, J. H., LEE, J., PARK, J. & GHO, Y. S. Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Seminars in cell & developmental biology*, 2015. Elsevier, 97-104.

-
- KIM, J. S., LEE, H. N., KIM, P., LEE, H. S. & KIM, E. S. 2012. Negative role of *wblA* in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 22, 736-741.
- KINGSTON, W. 2004. Streptomycin, Schatz v. Waksman, and the balance of credit for discovery. *Journal of the history of medicine and allied sciences*, 59, 441-462.
- KLICHE, J. & IVARSSON, Y. 2022. Orchestrating serine/threonine phosphorylation and elucidating downstream effects by short linear motifs. *Biochem J*, 479, 1-22.
- KLIENEBERGER, E. 1936. Further studies on *Streptobacillus moniliformis* and its symbiont. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 42, 587-598.
- KOMAKI, H. 2023. Recent Progress of Reclassification of the Genus *Streptomyces*. *Microorganisms*, 11, 831.
- KOVALCHUK, S. I., JENSEN, O. N. & ROGOWSKA-WRZESINSKA, A. 2019. FlashPack: Fast and Simple Preparation of Ultrahigh-performance Capillary Columns for LC-MS. *Mol Cell Proteomics*, 18, 383-390.
- KULP, A. & KUEHN, M. J. 2010. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual review of microbiology*, 64, 163-184.
- LADWIG, N., FRANZ-WACHTEL, M., HEZEL, F., SOUFI, B., MACEK, B., WOHLLEBEN, W. & MUTH, G. 2015. Control of Morphological Differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by Phosphorylation of MreC and PBP2. *PLoS One*, 10, e0125425.
- LEAVER, M., DOMINGUEZ-CUEVAS, P., COXHEAD, J., DANIEL, R. & ERRINGTON, J. 2009. Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis*. *Nature*, 457, 849-853.

REFERENCIAS

- LEBKOWSKI, T., WOLANSKI, M., OLDZIEJ, S., FLARDH, K. & ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J. 2020. AfsK-Mediated Site-Specific Phosphorylation Regulates DnaA Initiator Protein Activity in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 202.
- LEWIN, G. R., CARLOS, C., CHEVRETTE, M. G., HORN, H. A., MCDONALD, B. R., STANKEY, R. J., FOX, B. G. & CURRIE, C. R. 2016. Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. *Annual review of microbiology*, 70, 235-254.
- LEZHAVA, A., MIZUKAMI, T., KAJITANI, T., KAMEOKA, D., REDENBACH, M., SHINKAWA, H., NIMI, O. & KINASHI, H. 1995. Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *Journal of bacteriology*, 177, 6492-6498.
- LI, S., WANG, W., LI, X., FAN, K. & YANG, K. 2015. Genome-wide identification and characterization of reference genes with different transcript abundances for *Streptomyces coelicolor*. *Sci Rep*, 5, 15840.
- LIBERATI, N. T., URBACH, J. M., MIYATA, S., LEE, D. G., DRENKARD, E., WU, G., VILLANUEVA, J., WEI, T. & AUSUBEL, F. M. 2006. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 2833-2838.
- LIN, M. H., POTEL, C. M., TEHRANI, K., HECK, A. J. R., MARTIN, N. I. & LEMEER, S. 2018. A New Tool to Reveal Bacterial Signaling Mechanisms in Antibiotic Treatment and Resistance. *Mol Cell Proteomics*, 17, 2496-2507.
- LU, F., HOU, Y., ZHANG, H., CHU, Y., XIA, H. & TIAN, Y. 2017. Regulatory genes and their roles for improvement of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *3 Biotech*, 7, 250.

-
- LU, T., WANG, Q., CAO, Q., XIA, Y., XUN, L. & LIU, H. 2023. The Pleiotropic Regulator AdpA Regulates the Removal of Excessive Sulfane Sulfur in *Streptomyces coelicolor*. *Antioxidants (Basel)*, 12.
- LU, X., LIU, X., CHEN, Z., LI, J., VAN WEZEL, G. P., CHEN, W. & WEN, Y. 2020. The ROK-family regulator Rok7B7 directly controls carbon catabolite repression, antibiotic biosynthesis, and morphological development in *Streptomyces avermitilis*. *Environ Microbiol*, 22, 5090-5108.
- MACDONALD, I. A. & KUEHN, M. J. 2013. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 195, 2971-2981.
- MACEK, B., GNAD, F., SOUFI, B., KUMAR, C., OLSEN, J. V., MIJAKOVIC, I. & MANN, M. 2008. Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation. *Mol Cell Proteomics*, 7, 299-307.
- MACNEIL, D. J., GEWAIN, K. M., RUBY, C. L., DEZENY, G., GIBBONS, P. H. & MACNEIL, T. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, 111, 61-8.
- MANTECA, A., ALVAREZ, R., SALAZAR, N., YAGÜE, P. & SANCHEZ, J. 2008. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 74, 3877-86.
- MANTECA, A., CLAESSEN, D., LOPEZ-IGLESIAS, C. & SANCHEZ, J. 2007. Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS microbiology letters*, 274, 118-125.

REFERENCIAS

- MANTECA, A., FERNANDEZ, M. & SANCHEZ, J. 2006a. Cytological and biochemical evidence for an early cell dismantling event in surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Res Microbiol*, 157, 143-52.
- MANTECA, A., FERNÁNDEZ, M. & SANCHEZ, J. 2005a. A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology (Reading)*, 151, 3689-3697.
- MANTECA, A., FERNÁNDEZ, M. & SANCHEZ, J. 2005b. Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves. *BMC Microbiol*, 5, 51.
- MANTECA, A., JUNG, H. R., SCHWAMMLE, V., JENSEN, O. N. & SANCHEZ, J. 2010a. Quantitative proteome analysis of *Streptomyces coelicolor* nonsporulating liquid cultures demonstrates a complex differentiation process comparable to that occurring in sporulating solid cultures. *Journal of proteome research*, 9, 4801-4811.
- MANTECA, A., MÄDER, U., CONNOLLY, B. A. & SANCHEZ, J. 2006b. A proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* programmed cell death. *Proteomics*, 6, 6008-6022.
- MANTECA, A. & SANCHEZ, J. 2009. *Streptomyces* development in colonies and soils. *Applied and environmental microbiology*, 75, 2920-2924.
- MANTECA, A., SANCHEZ, J., JUNG, H. R., SCHWAMMLE, V. & JENSEN, O. N. 2010b. Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary

- metabolism coincides with hypha differentiation. *Mol Cell Proteomics*, 9, 1423-36.
- MANTECA, A., YE, J., SANCHEZ, J. & JENSEN, O. N. 2011. Phosphoproteome analysis of *Streptomyces* development reveals extensive protein phosphorylation accompanying bacterial differentiation. *J Proteome Res*, 10, 5481-92.
- MARCHLER-BAUER, A., ANDERSON, J. B., CHERUKURI, P. F., DEWEESE-SCOTT, C., GEER, L. Y., GWADZ, M., HE, S., HURWITZ, D. I., JACKSON, J. D. & KE, Z. 2005. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic acids research*, 33, D192-D196.
- MARGOT, P., ROTEN, C.-A. H. & KARAMATA, D. 1991. N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase assay based on specific radioactive labeling of mucopeptide L-alanine: quantitation of the enzyme activity in the autolysin deficient *Bacillus subtilis* 168, flad strain. *Analytical biochemistry*, 198, 15-18.
- MARTENS, E. & DEMAÏN, A. L. 2011. Platensimycin and platencin: promising antibiotics for future application in human medicine. *The Journal of antibiotics*, 64, 705-710.
- MASON, D., DIETZ, A. & DEBOER, C. 1962. Lincomycin, a new antibiotic. I. Discovery and biological properties. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1962, 554-559.
- MCCORMICK, J. R. & FLÄRDH, K. 2012. Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS microbiology reviews*, 36, 206-231.
- MCCORMICK, J. R., SU, E. P., DRIKS, A. & LOSICK, R. 1994. Growth and viability of *Streptomyces coelicolor* mutant for the cell division gene *ftsZ*. *Mol Microbiol*, 14, 243-54.

REFERENCIAS

- MCCORMICK, M. H., MCGUIRE, J. M., PITTENGER, G., PITTENGER, R. & STARK, W. 1955. Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biologic properties. *Antibiotics annual*, 3, 606-611.
- MCGUIRE, J., BUNCH, R., ANDERSON, R., BOAZ, H., FLYNN, E., POWELL, H. & SMITH, J. 1952. Ilotycin (Erythromycin-Lilly). *Antibiotics & Chemother.*, 2, 281.
- MIGUÉLEZ, E. M., HARDISSON, C. & MANZANAL, M. B. 1999. Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *The Journal of cell biology*, 145, 515-525.
- MIKULIK, K., BOBEK, J., ZIKOVA, A., SMETAKOVA, M. & BEZOUSKOVA, S. 2011. Phosphorylation of ribosomal proteins influences subunit association and translation of poly (U) in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Biosyst*, 7, 817-23.
- MILLER, J. 1978. H.(1972) Experiments in molecular genetics. *ColdSpring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY*, 328-330.
- MORIMOTO, T., LOH, P. C., HIRAI, T., ASAI, K., KOBAYASHI, K., MORIYA, S. & OGASAWARA, N. 2002. Six GTP-binding proteins of the Era/Obg family are essential for cell growth in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (Reading)*, 148, 3539-3552.
- MURAKAMI, T., HOLT, T. & THOMPSON, C. 1989. Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *Journal of bacteriology*, 171, 1459-1466.
- NEVILLE, D. C., TOWNSEND, R. R., ROZANAS, C. R., VERKMAN, A., PRICE, E. M. & GRUIS, D. B. 1997. Evidence for phosphorylation of serine 753 in CFTR using a novel metal-ion affinity resin and matrix-

-
- assisted laser desorption mass spectrometry. *Protein Science*, 6, 2436-2445.
- NICIEZA, R. G., HUERGO, J., CONNOLLY, B. A. & SANCHEZ, J. 1999. Purification, characterization, and role of nucleases and serine proteases in *Streptomyces* differentiation: analogies with the biochemical processes described in late steps of eukaryotic apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 20366-20375.
- NOENS, E. E., MERSINIAS, V., TRAAG, B. A., SMITH, C. P., KOERTEN, H. K. & VAN WEZEL, G. P. 2005. SsgA-like proteins determine the fate of peptidoglycan during sporulation of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.*, 58, 929-944.
- NOENS, E. E., MERSINIAS, V., WILLEMSE, J., TRAAG, B. A., LAING, E., CHATER, K. F., SMITH, C. P., KOERTEN, H. K. & VAN WEZEL, G. P. 2007. Loss of the controlled localization of growth stage-specific cell-wall synthesis pleiotropically affects developmental gene expression in an ssgA mutant of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 64, 1244-59.
- NOVELLA, I. S., BARBES, C. & SANCHEZ, J. 1992. Sporulation of *Streptomyces antibioticus* ETHZ 7451 in submerged culture. *Can J Microbiol*, 38, 769-73.
- OKANISHI, M., SUZUKI, K. & UMEZAWA, H. 1974. Formation and reversion of Streptomyces protoplasts: cultural condition and morphological study. *Microbiology*, 80, 389-400.
- ONGENAE, V., MABROUK, A. S., CROOIJMANS, M., ROZEN, D., BRIEGEL, A. & CLAESSEN, D. 2022. Reversible bacteriophage resistance by shedding the bacterial cell wall. *Open Biology*, 12, 210379.
- PAGET, M. S., CHAMBERLIN, L., ATRI, A., FOSTER, S. J. & BUTTNER, M. J. 1999. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor

REFERENCIAS

- çE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of bacteriology*, 181, 204-211.
- PANDZA, K., PFALZER, G., CULLUM, J. & HRANUELI, D. 1997. Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. *Microbiology*, 143, 1493-1501.
- PANG, Z., CHONG, J., LI, S. & XIA, J. 2020. MetaboAnalystR 3.0: Toward an Optimized Workflow for Global Metabolomics. *Metabolites*, 10.
- PARADKAR, A., TREFZER, A., CHAKRABURTTY, R. & STASSI, D. 2003. *Streptomyces* genetics: a genomic perspective. *Critical reviews in biotechnology*, 23, 1-27.
- PARKER, J. L., JONES, A. M., SERAZETDINOVA, L., SAALBACH, G., BIBB, M. J. & NALDRETT, M. J. 2010. Analysis of the phosphoproteome of the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2) by protein/peptide fractionation, phosphopeptide enrichment and high-accuracy mass spectrometry. *Proteomics*, 10, 2486-97.
- PEREZ-REDONDO, R., SANTAMARTA, I., BOVENBERG, R., MARTIN, J. F. & LIRAS, P. 2010. The enigmatic lack of glucose utilization in *Streptomyces clavuligerus* is due to inefficient expression of the glucose permease gene. *Microbiology (Reading)*, 156, 1527-1537.
- PETZKE, L. & LUZHETSKYY, A. 2009. In vivo Tn 5-based transposon mutagenesis of Streptomycetes. *Applied microbiology and biotechnology*, 83, 979-986.
- POSEWITZ, M. C. & TEMPST, P. 1999. Immobilized gallium (III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Analytical chemistry*, 71, 2883-2892.

-
- POTEL, C. M., LIN, M. H., HECK, A. J. R. & LEMEER, S. 2018. Widespread bacterial protein histidine phosphorylation revealed by mass spectrometry-based proteomics. *Nat Methods*, 15, 187-190.
- PROCÓPIO, R. E. D. L., SILVA, I. R. D., MARTINS, M. K., AZEVEDO, J. L. D. & ARAÚJO, J. M. D. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16, 466-471.
- PUGLIA, A. M., VOHRADSKY, J. & THOMPSON, C. J. 1995. Developmental control of the heat-shock stress regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 17, 737-746.
- QUINN, G. A., BANAT, A. M., ABDELHAMEED, A. M. & BANAT, I. M. 2020. *Streptomyces* from traditional medicine: Sources of new innovations in antibiotic discovery. *Journal of medical microbiology*, 69, 1040.
- RAMIJAN, K., ULTEE, E., WILLEMSE, J., ZHANG, Z., WONDERGEM, J. A. J., VAN DER MEIJ, A., HEINRICH, D., BRIEGEL, A., VAN WEZEL, G. P. & CLAESSEN, D. 2018. Stress-induced formation of cell wall-deficient cells in filamentous actinomycetes. *Nat Commun*, 9, 5164.
- REDENBACH, M., KIESER, H. M., DENAPAITE, D., EICHNER, A., CULLUM, J., KINASHI, H. & HOPWOOD, D. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3 (2) chromosome. *Molecular microbiology*, 21, 77-96.
- REYNOLDS, P. E. 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8, 943-950.
- RIGALI, S., TITGEMEYER, F., BARENDIS, S., MULDER, S., THOMAE, A. W., HOPWOOD, D. A. & VAN WEZEL, G. P. 2008. Feast or famine: the

REFERENCIAS

- global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep*, 9, 670-5.
- RIOSEAS, B., LOPEZ-GARCÍA, M. T., YAGÜE, P., SANCHEZ, J. & MANTECA, A. 2014. Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production. *Bioresour Technol*, 151, 191-8.
- RIOSEAS, B., SHLIAHA, P. V., GORSHKOV, V., YAGÜE, P., LOPEZ-GARCÍA, M. T., GONZÁLEZ-QUIÑÓNEZ, N., KOVALCHUK, S., ROGOWSKA-WRZESINSKA, A., JENSEN, O. N. & MANTECA, A. 2018. Quantitative Proteome and Phosphoproteome Analyses of *Streptomyces coelicolor* Reveal Proteins and Phosphoproteins Modulating Differentiation and Secondary Metabolism. *Mol Cell Proteomics*, 17, 1591-1611.
- RIOSEAS, B., YAGÜE, P., LOPEZ-GARCÍA, M. T., GONZÁLEZ-QUIÑÓNEZ, N., BINDA, E., MARINELLI, F. & MANTECA, A. 2016. Characterization of SCO4439, a D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase involved in spore cell wall maturation, resistance, and germination in *Streptomyces coelicolor*. *Sci Rep*, 6, 21659.
- ROBINSON, V. L., HWANG, J., FOX, E., INOUE, M. & STOCK, A. M. 2002. Domain arrangement of Der, a switch protein containing two GTPase domains. *Structure*, 10, 1649-58.
- ROHRER, S. & BERGER-BACHI, B. 2003. FemABX peptidyl transferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and β -lactam resistance in gram-positive cocci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47, 837-846.

-
- ROITINGER, E., HOFER, M., KÖCHER, T., PICHLER, P., NOVATCHKOVA, M., YANG, J., SCHLÖGELHOFER, P. & MECHTLER, K. 2015. Quantitative phosphoproteomics of the ataxia telangiectasia-mutated (ATM) and ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) dependent DNA damage response in *Arabidopsis thaliana**[S]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14, 556-571.
- RONDA, C., PEDERSEN, L. E., HANSEN, H. G., KALLEHAUGE, T. B., BETENBAUGH, M. J., NIELSEN, A. T. & KILDEGAARD, H. F. 2014. Accelerating genome editing in CHO cells using CRISPR Cas9 and CRISPy, a web-based target finding tool. *Biotechnology and bioengineering*, 111, 1604-1616.
- RUBAN-OSMIĄŁOWSKA, B., JAKIMOWICZ, D., SMULCZYK-KRAWCZYSZYN, A., CHATER, K. F. & ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J. 2006. Replisome localization in vegetative and aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 188, 7311-7316.
- RUTLEDGE, R. G. & COTE, C. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res*, 31, e93.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANTAMARIA, R. I., SEVILLANO, L., MARTIN, J., GENILLOUD, O., GONZALEZ, I. & DIAZ, M. 2018. The XRE-DUF397 Protein Pair, Scr1 and Scr2, Acts as a Strong Positive Regulator of Antibiotic Production in *Streptomyces*. *Front Microbiol*, 9, 2791.
- SANTOS-BENEIT, F., ROBERTS, D. M., CANTLAY, S., MCCORMICK, J. R. & ERRINGTON, J. 2017. A mechanism for FtsZ-independent proliferation in *Streptomyces*. *Nature communications*, 8, 1378.

REFERENCIAS

- SAWAI, R., SUZUKI, A., TAKANO, Y., LEE, P. C. & HORINOUCI, S. 2004. Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene*, 334, 53-61.
- SAXENA, R., FINGLAND, N., PATIL, D., SHARMA, A. K. & CROOKE, E. 2013. Crosstalk between DnaA Protein, the Initiator of Escherichia coli Chromosomal Replication, and Acidic Phospholipids Present in Bacterial Membranes. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 8517-8537.
- SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., PREIBISCH, S., RUEDEN, C., SAALFELD, S., SCHMID, B., TINEVEZ, J. Y., WHITE, D. J., HARTENSTEIN, V., ELICEIRI, K., TOMANCAK, P. & CARDONA, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9, 676-82.
- SCHLIMPERT, S. & ELLIOT, M. A. 2023. The Best of Both Worlds—*Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces venezuelae* as Model Species for Studying Antibiotic Production and Bacterial Multicellular Development. *Journal of Bacteriology*, e00153-23.
- SCHMIDT, U., WEIGERT, M., BROADDUS, C. & MYERS, G. Cell detection with star-convex polygons. Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention—MICCAI 2018: 21st International Conference, Granada, Spain, September 16-20, 2018, Proceedings, Part II 11, 2018. Springer, 265-273.
- SCHNEEWIND, O. & MISSIAKAS, D. M. 2012. Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367, 1123-39.

-
- SCHREMPF, H., KOEBSCH, I., WALTER, S., ENGELHARDT, H. & MESCHKE, H. 2011. Extracellular *Streptomyces* vesicles: amphorae for survival and defence. *Microb Biotechnol*, 4, 286-99.
- SECHI, S., FRAPPAOLO, A., BELLONI, G., COLOTTI, G. & GIANSAANTI, M. G. 2015. The multiple cellular functions of the oncoprotein Golgi phosphoprotein 3. *Oncotarget*, 6, 3493-506.
- SEMANJSKI, M., GERMAIN, E., BRATL, K., KIESSLING, A., GERDES, K. & MACEK, B. 2018. The kinases HipA and HipA7 phosphorylate different substrate pools in *Escherichia coli* to promote multidrug tolerance. *Sci Signal*, 11.
- SERVANT, P. & MAZODIER, P. 2001. Negative regulation of the heat shock response in *Streptomyces*. *Arch Microbiol*, 176, 237-42.
- SEVCIKOVA, B. & KORMANEC, J. 2003. The *ssgB* gene, encoding a member of the regulon of stress-response sigma factor σ H, is essential for aerial mycelium septation in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Archives of microbiology*, 180, 380-384.
- SEVCIKOVA, B., REZUCHOVA, B., HOMEROVA, D. & KORMANEC, J. 2010. The anti-anti-sigma factor BldG is involved in activation of the stress response sigma factor σ H in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of bacteriology*, 192, 5674-5681.
- SHAJANI, Z., SYKES, M. T. & WILLIAMSON, J. R. 2011. Assembly of bacterial ribosomes. *Annu Rev Biochem*, 80, 501-26.
- SOARES, N. C., SPAT, P., KRUG, K. & MACEK, B. 2013. Global dynamics of the *Escherichia coli* proteome and phosphoproteome during growth in minimal medium. *J Proteome Res*, 12, 2611-21.
- SØGAARD-ANDERSEN, L. & YANG, Z. 2008. Programmed cell death: role for MazF and MrpC in *Myxococcus* multicellular development. *Current Biology*, 18, R337-R339.

REFERENCIAS

- STARR, M. P., STOLP, H., TRÜPER, H. G., BALOWS, A. & SCHLEGEL, H. G. 2013. *The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*, Springer Science & Business Media.
- STRAKOVA, E., BOBEK, J., ZIKOVA, A., REHULKA, P., BENADA, O., REHULKOVA, H., KOFRONOVA, O. & VOHRADSKY, J. 2013. Systems insight into the spore germination of *Streptomyces coelicolor*. *J Proteome Res*, 12, 525-36.
- TAUS, T., KÖCHER, T., PICHLER, P., PASCHKE, C., SCHMIDT, A., HENRICH, C. & MECHTLER, K. 2011. Universal and confident phosphorylation site localization using phosphoRS. *Journal of proteome research*, 10, 5354-5362.
- THEVELEIN, J. 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiological reviews*, 48, 42-59.
- TOMBÁCZ, E. 2009. pH-dependent surface charging of metal oxides. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 53, 77-86.
- TOMONO, A., MASHIKO, M., SHIMAZU, T., INOUE, H., NAGASAWA, H., YOSHIDA, M., OHNISHI, Y. & HORINOUCI, S. 2006. Self-activation of serine/threonine kinase AfsK on autophosphorylation at threonine-168. *J Antibiot (Tokyo)*, 59, 117-23.
- TONG, Y., CHARUSANTI, P., ZHANG, L., WEBER, T. & LEE, S. Y. 2015. CRISPR-Cas9 Based Engineering of Actinomycetal Genomes. *ACS Synth Biol*, 4, 1020-9.
- TYPAS, A., BANZHAF, M., GROSS, C. A. & VOLLMER, W. 2012. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 123-136.
- ULTEE, E., ZHONG, X., SHITUT, S., BRIEGEL, A. & CLAESSEN, D. 2021. Formation of wall-less cells in *Kitasatospora viridifaciens* requires

- cytoskeletal protein FilP in oxygen-limiting conditions. *Mol Microbiol*, 115, 1181-1190.
- VAN DOORN, L. J., GIESENDORF, B. A., BAX, R., VAN DER ZEIJST, B. A., VANDAMME, P. & QUINT, W. G. 1997. Molecular discrimination between *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis* by polymerase chain reaction based on a novel putative GTPase gene. *Mol Cell Probes*, 11, 177-85.
- VAN WEZEL, G. P. & MCDOWALL, K. J. 2011. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Nat Prod Rep*, 28, 1311-33.
- VIOLLIER, P. H., KELEMEN, G. H., DALE, G. E., NGUYEN, K. T., BUTTNER, M. J. & THOMPSON, C. J. 2003. Specialized osmotic stress response systems involve multiple SigB-like sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular microbiology*, 47, 699-714.
- VOGELMANN, J., AMMELBURG, M., FINGER, C., GUEZGUEZ, J., LINKE, D., FLOTENMEYER, M., STIERHOF, Y. D., WOHLLEBEN, W. & MUTH, G. 2011. Conjugal plasmid transfer in *Streptomyces* resembles bacterial chromosome segregation by FtsK/SpoIIIE. *EMBO J*, 30, 2246-54.
- WAKSMAN, S. A. 1953. Streptomycin: background, isolation, properties, and utilization. *Science*, 118, 259-266.
- WAKSMAN, S. A. & HENRICI, A. T. 1943. The nomenclature and classification of the actinomycetes. *Journal of bacteriology*, 46, 337-341.
- WANG, S.-L., FAN, K.-Q., YANG, X., LIN, Z.-X., XU, X.-P. & YANG, K.-Q. 2008. CabC, an EF-hand calcium-binding protein, is involved in Ca²⁺-mediated regulation of spore germination and aerial hypha

REFERENCIAS

- formation in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of bacteriology*, 190, 4061-4068.
- WILDERMUTH, H. 1970. Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol*, 60, 43-50.
- WILKINS, M. 2009. Proteomics data mining. *Expert review of proteomics*, 6, 599-603.
- WILLEMSE, J. & VAN WEZEL, G. P. 2009. Imaging of *Streptomyces coelicolor* A3(2) with reduced autofluorescence reveals a novel stage of FtsZ localization. *PLoS One*, 4, e4242.
- WOHLFARTH, J. C., FELDMÜLLER, M., SCHNELLER, A., KILCHER, S., BURKOLTER, M., MEILE, S., PILHOFER, M., SCHUPPLER, M. & LOESSNER, M. J. 2023. L-form conversion in Gram-positive bacteria enables escape from phage infection. *Nature Microbiology*, 8, 387-399.
- WU, G., ZHI, W., HU, Y., LIANG, M. & YANG, W. 2016. Comparative proteomic analysis of *Streptomyces aureochromogenes* under different carbon sources and insights into polyoxin production. *Applied biochemistry and biotechnology*, 180, 491-503.
- XU, Z., WANG, Y., CHATER, K. F., OU, H. Y., XU, H. H., DENG, Z. & TAO, M. 2017. Large-Scale Transposition Mutagenesis of *Streptomyces coelicolor* Identifies Hundreds of Genes Influencing Antibiotic Biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 83.
- YAGÜE, P., GONZÁLEZ-QUIÑÓNEZ, N., FERNÁNDEZ-GARCÍA, G., ALONSO-FERNÁNDEZ, S. & MANTECA, A. 2019. Goals and Challenges in Bacterial Phosphoproteomics. *Int J Mol Sci*, 20.
- YAGÜE, P., LOPEZ-GARCÍA, M. T., RIOSERAS, B., SANCHEZ, J. & MANTECA, A. 2013a. Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation:

- state-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiol Lett*, 342, 79-88.
- YAGÜE, P., MANTECA, A., SIMON, A., DIAZ-GARCÍA, M. E. & SANCHEZ, J. 2010. New method for monitoring programmed cell death and differentiation in submerged *Streptomyces* cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3401-3404.
- YAGÜE, P., RODRIGUEZ-GARCÍA, A., LOPEZ-GARCÍA, M. T., MARTIN, J. F., RIOSERAS, B., SANCHEZ, J. & MANTECA, A. 2013b. Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: first compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PLoS One*, 8, e60665.
- YAGÜE, P., RODRIGUEZ-GARCÍA, A., LOPEZ-GARCÍA, M. T., RIOSERAS, B., MARTIN, J. F., SANCHEZ, J. & MANTECA, A. 2014. Transcriptomic analysis of liquid non-sporulating *Streptomyces coelicolor* cultures demonstrates the existence of a complex differentiation comparable to that occurring in solid sporulating cultures. *PLoS One*, 9, e86296.
- YAGÜE, P., WILLEMSE, J., KONING, R. I., RIOSERAS, B., LOPEZ-GARCÍA, M. T., GONZÁLEZ-QUIÑÓNEZ, N., LOPEZ-IGLESIAS, C., SHLIAHA, P. V., ROGOWSKA-WRZESINSKA, A., KOSTER, A. J., JENSEN, O. N., VAN WEZEL, G. P. & MANTECA, A. 2016. Subcompartmentalization by cross-membranes during early growth of *Streptomyces* hyphae. *Nat Commun*, 7, 12467.
- YUN, B.-S., HIDAKA, T., KUZUYAMA, T. & SETO, H. 2001. Thiopeptide non-producing *Streptomyces* species carry the *tipA* gene: a clue to its function. *The Journal of antibiotics*, 54, 375-378.

REFERENCIAS

- ZAKRZEWSKA-CZERWIŃSKA, J. & SCHREMPF, H. 1992. Characterization of an autonomously replicating region from the *Streptomyces lividans* chromosome. *Journal of bacteriology*, 174, 2688-2693.
- ZHANG, X., YE, J., JENSEN, O. N. & ROEPSTORFF, P. 2007. Highly efficient phosphopeptide enrichment by calcium phosphate precipitation combined with subsequent IMAC enrichment. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6, 2032-2042.
- ZHANG, Y.-H., ZENG, T., CHEN, L., HUANG, T. & CAI, Y.-D. 2021. Determining protein-protein functional associations by functional rules based on gene ontology and KEGG pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1869, 140621.
- ZHOU, S., BAILEY, M. J., DUNN, M. J., PREEDY, V. R. & EMERY, P. W. 2005. A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure. *Proteomics*, 5, 2739-2747.
- ZHU, Y., LU, T., ZHANG, J., ZHANG, P., TAO, M. & PANG, X. 2020. A novel XRE family regulator that controls antibiotic production and development in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 104, 10075-10089.