UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA
Facultad de Ciencias de la Salud
Grado en Biotecnología
Trabajo Fin de Grado
Curso 2025-2026

YonN como modulador de la expresión génica en el bacteriófago SPβ: Caracterización bioquímica y funcional

Autor

San José Sánchez, Jonathan

Tutor

Dr. Bernat Ponce, Edgar (Tutor interno)

Dr. Marina Moreno, Alberto (Tutor externo)

Valencia, 2026

YonN como modulador de la expresión génica en el bacteriófago SPβ: Caracterización bioquímica y funcional

Trabajo Final de Grado, presentado por:

San José Sánchez, Jonathan

Tutorizado por:

Dr. Bernat Ponce, Edgar (Tutor interno)

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

VALENCIA

CURSO 2025-2026

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han acompañado y apoyado durante este camino, tanto a nivel académico como personal.

En primer lugar, a mi familia, y especialmente a mi madre, por haber estado siempre a mi lado, apoyándome incondicionalmente y ayudándome a afrontar cada reto que se ha presentado a lo largo de mi vida. Gracias por la confianza, el esfuerzo y el cariño constante que me han permitido llegar hasta aquí.

Quiero agradecer también a Alberto Marina y a todo el grupo de investigación de la UCM en el Instituto de Biomedicina de Valencia por haberme abierto las puertas del laboratorio y hacerme sentir uno más desde el primer día. En especial, a Paqui Gallego, por su dedicación, paciencia y cercanía, y por enseñarme no solo técnicas experimentales, sino también cómo es realmente la vida dentro de un laboratorio de investigación.

A mis profesores de la universidad, gracias por acompañarme durante estos años y por enseñarme nuevas formas de pensar, cuestionar y entender la ciencia. De manera especial, quiero agradecer a Cristina García Bonillo, cuyo apoyo constante, orientación y confianza han sido fundamentales a lo largo de este camino.

Por último, pero no menos importante, quiero dar las gracias a Toni, con quien he compartido tanto momentos difíciles como grandes risas, y con quien he tenido la suerte de desarrollar proyectos tanto exigentes como apasionantes, como Bioverse. Gracias también a todas las personas que me han acompañado durante estos cuatro años y que han hecho de esta carrera una experiencia inolvidable llena de aprendizaje, desafíos y buenos recuerdos.

Índice de contenidos

- Portada
- Contraportada
- Agradecimientos I
- Índice de contenidos II
- Índice de figuras y tablas III
- Listado de símbolos y siglas IV
- Resumen y palabras clave ..... V-VI
- INTRODUCCIÓN 1
    - La resistencia a los antibióticos como crisis global de salud pública 1
    - Bacteriófagos como alternativa terapéutica frente a la resistencia antimicrobiana 2
    - Regulación de la decisión lisis-lisogenia mediante el sistema Arbitrium 3
    - Potencial de YonN en la regulación de la interacción fago-bacteria y control génico viral 5
    - Justificación del trabajo 7
    - Hipótesis 7
- OBJETIVOS 8
- METODOLOGÍA 9
    - Análisis bioinformático y predicción estructural 9
    - Cepas bacterianas, medios y reactivos utilizados 9
    - Amplificación de ADN, clonación y construcción de plásmidos 10
        - Diseño y obtención de fragmentos de ADN para los ensayos experimentales 10
        - Purificación de productos de PCR 12
        - Clonación de los genes de interés en el vector de expresión 12
        - Transformación bacteriana, selección de clones y aislamiento de plásmidos 13
    - Expresión heteróloga de proteínas recombinantes 13
    - Purificación de proteínas recombinantes 14
    - Ensayos de interacción proteína-proteína y proteína-ADN 15
    - Ensayo de acetilación in vitro 16
    - Cristalografía de proteínas 16
- RESULTADOS 16
    - Modelado estructural y análisis de similitud proteica 16
    - Clonación, selección de clones y obtención de cepas de expresión 17
    - Expresión y purificación de proteínas recombinantes 18
    - Resultados de cristalización de proteínas recombinantes 21
    - Análisis de la interacción proteína-ADN mediante ensayos EMSA 22
        - Influencia del tipo de ADN en la interacción con YonN 22
        - Comparación de la unión al ADN entre YonN y HBsu 23
        - Ensayos de competencia y especificidad de unión 24
        - Análisis de la interacción de YonN con AimR 24
        - Análisis de la dependencia de la concentración de YonN 25
        - Evaluación de la presencia de ADN co-purificado con YonN 26
        - Evaluación de la acetilación y su efecto en la unión al ADN 27
- DISCUSIÓN 28
- CONCLUSIONES 30
- BIBLIOGRAFÍA 31
- ANEXO 1 40

Índice de Figuras y Tablas

- Figura 1. Evolución del número de países que reportaron datos sobre resistencia a los antimicrobianos (AMR) al sistema GLASS por región de la OMS de 2016 a 2023. 1
- Figura 2. Modelo del mecanismo del sistema Arbitrium para la toma de decisiones de lisis-lisogenia 3
- Figura 3. Regulación de la decisión lisis-lisogenia mediante el sistema Arbitrium en base a la acumulación del péptido AimP 4
- Figura 4. Esquema modelo del sistema toxina-antitoxina MazF/MazE bacteriana 5
- Figura 5. Modelo de la proteína YonN unida a una doble cadena de DNA obtenido mediante AlphaFold 6
- Figura 6. Modelo teórico de la intervención de YonN en el complejo AimR-ADN 6
- Figura 7. Representación estructural de YonN y AimR: (a) dímero de YonN; (b) dímero de AimR; (c) YonN unido a ADN con lisinas conservadas resaltadas; (d) AimR unido a ADN con sitios de unión específicos 16
- Figura 8. Alineamiento de las secuencias de las proteínas HBsu y YonN 17
- Figura 9. Placa de cultivo con colonias de *E. coli DH5α* obtenidas tras la transformación con el vector de expresión de la proteína YfmK 17
- Figura 10. Análisis por PCR de colonias de los transformantes de *E. coli DH5α* para la construcción del vector de expresión de la proteína YfmK 18
- Figura 11. Biomasa celular recogida compactada tras la centrifugación de los cultivos de expresión proteica 18
- Figura 12. Ensayo de estabilidad térmica (Thermofluor) de la proteína YonN 19
- Figura 13. Perfiles de elución y análisis electroforético de la purificación de las proteínas YonN (a.), YfmK (b.) y HBsu (c.) 19
- Figura 14. Gel de poliacrilamida mostrando el proceso de digestión de la proteína HBsu 20
- Figura 15. Seguimiento de la purificación de la proteína HBsu mediante cromatografía de exclusión molecular (FPLC) 20
- Figura 16. Cuantificación de las proteínas YonN y HBsu mediante SDS-PAGE 21
- Figura 17. Micrografías de ensayos de cristalización: (a) proteína en estado de agregación; (b) cristal poliédrico; (c) cristales en forma de agujas unidas; (d) cristales en forma de agujas 21
- Figura 18. Estudio de especificidad de YonN (7 µg) frente a diferentes conformaciones de ADN: No Curvado (NC), Curvado (Cu) y RicA 22
- Figura 19. Ensayo EMSA en gel de agarosa comparando la afinidad del fragmento RicA por las proteínas HBsu (1.5 y 3 µg) y YonN (4 y 8 µg) 23
- Figura 20. Comparativa de unión individual y competitiva de YonN (1.7 µg) y HBsu (1.5 µg) con los sustratos ADN Zenit y ADN RICA 24
- Figura 21. Análisis EMSA de la interacción de YonN (2.2 µg) y AimR (5 µg) con el fragmento de ADN Plus 25
- Figura 22. Titración de la proteína YonN (9 a 54 µg) con el fragmento de ADN RICA 25
- Figura 23. Análisis del efecto de agentes desnaturalizantes (calor y urea 8M) sobre la movilidad de las proteínas YonN y HBsu (4 µg) 26
- Figura 24. Ensayo EMSA evaluando la unión de HBsu (3 µg) al ADN RicA bajo condiciones de modificación (acetilación) y desnaturalización (calor y SDS) 27

- Tabla 1. Composición de los medios de cultivo y buffers empleados en los experimentos de crecimiento bacteriano, expresión y purificación de proteínas recombinantes 10

- Tabla 2. Secuencias de los fragmentos sintéticos de ADN (gBlocks Gene Fragments) diseñados para los ensayos de interacción proteína-ADN 11

Listado de símbolos y siglas

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- AimP: Péptido señal del sistema Arbitrium.
- AimR: Receptor y regulador transcripcional del sistema Arbitrium.
- AimX: Gen regulado por el sistema Arbitrium implicado en el ciclo lítico.
- AIZY: Medio de cultivo de autoinducción.
- ALBA: Sincrotrón ALBA.
- AMR: Resistencia a los antimicrobianos (Antimicrobial Resistance).
- BSA: Albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumin).
- DSF / ThermoFluor: Fluorimetría de barrido diferencial (Differential Scanning Fluorimetry).
- ECDC: Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades.
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
- EMSA: Ensayo de desplazamiento electroforético en gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay).
- FPLC: Cromatografía líquida de proteínas de alta resolución (Fast Protein Liquid Chromatography).
- GLASS: Sistema Global de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos y de su Uso.
- HBsu: Proteína asociada al nucleoide de *Bacillus subtilis*.
- His-tag: Etiqueta de polihistidinas utilizada para purificación por afinidad.
- IMAC: Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (Immobilized Metal Affinity Chromatography).
- LB: Medio de cultivo Luria-Bertani.
- OD_{600}: Densidad óptica medida a 600 nm.
- OMS / WHO: Organización Mundial de la Salud.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).
- pLDDT: Índice de confianza local predicho (predicted Local Distance Difference Test).
- SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis).
- TCEP: Tris(2-carboxietil)fosfina.
- TEV: Proteasa del virus del grabado del tabaco (Tobacco Etch Virus protease).
- Tm: Temperatura de fusión o desnaturali zación térmica (melting temperature).
- YonN: Proteína del bacteriófago SPβ objeto de estudio.
- YfmK: Acetiltransferasa de *Bacillus subtilis* estudiada en este trabajo.
- HU-like proteins: Proteínas bacterianas asociadas al nucleoide tipo HU (familia estructural de compactación de ADN).

Resumen y palabras clave

Ante la crisis global de salud pública provocada por la resistencia a los antibióticos, los bacteriófagos han surgido como una alternativa terapéutica prometedora. Sin embargo, su aplicación eficaz requiere un conocimiento profundo de los mecanismos moleculares que regulan su ciclo de vida, incluyendo novedosos sistemas de comunicación viral como Arbitrium en el fago SPβ.

En el presente trabajo se ha abordado la caracterización estructural, bioquímica y funcional de la proteína YonN del fago SPβ, una proteína de tipo HU-like cuya función en la organización del ADN viral no había sido previamente descrita en detalle. Para ello, se integraron aproximaciones de modelado estructural mediante AlphaFold, técnicas de clonación molecular, expresión heteróloga en *Escherichia coli* y purificación proteica mediante cromatografía de afinidad (IMAC) y exclusión molecular (FPLC), junto con el análisis de la interacción proteína–ADN mediante ensayos de desplazamiento electroforético (EMSA) bajo distintas condiciones topológicas y de concentración.

Los resultados obtenidos muestran que YonN presenta una elevada afinidad por el ADN, evidenciada por la co-purificación de ADN endógeno del hospedador durante los procesos de purificación, lo que sugiere una interacción estable y persistente con material genético. Los ensayos EMSA indican que YonN es capaz de interaccionar con distintas conformaciones de ADN sin una preferencia marcada por la topología, generando desplazamientos en todos los sustratos analizados, aunque acompañados de patrones de unión difusos y formación de complejos heterogéneos. En comparación con su homólogo bacteriano HU-like HBsu, YonN presenta un comportamiento menos definido y dependiente de la concentración en términos de formación de complejos discretos.

En conjunto, estos resultados permiten establecer que YonN es una proteína con una fuerte capacidad de interacción con el ADN, aunque con un comportamiento de unión complejo y heterogéneo, posiblemente influido por la presencia de ADN co-purificado y por la naturaleza intrínseca de sus interacciones. Este trabajo amplía el conocimiento sobre proteínas HU-like codificadas por fagos y contribuye a la comprensión de los mecanismos de organización del genoma viral, aportando información relevante para el estudio de sistemas fágicos y su potencial aplicación en el desarrollo de estrategias biotecnológicas frente a infecciones bacterianas resistentes.

Palabras clave: YonN, bacteriófagos, sistema Arbitrium, proteínas HU-like, interacción proteína–ADN, regulación viral, SPβ, resistencia a antibióticos.

Abstract and keywords

In the context of the global public health crisis driven by antibiotic resistance, bacteriophages have emerged as a promising therapeutic alternative. However, their effective application requires a deep understanding of the molecular mechanisms regulating their life cycle, including novel viral communication systems such as the Arbitrium system in phage SPβ.

This work focuses on the structural, biochemical, and functional characterization of the SPβ-encoded protein YonN, a HU-like protein whose role in viral genome organization has not previously been described in detail. To this end, structural modeling using AlphaFold, molecular cloning, heterologous expression in *Escherichia coli*, and protein purification by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and size-exclusion chromatography (FPLC) were combined with protein–DNA interaction analysis using electrophoretic mobility shift assays (EMSA) under different topological and concentration conditions.

The results show that YonN exhibits a high affinity for DNA, as evidenced by the persistent co-purification of host-derived endogenous DNA during purification processes, suggesting a stable and sustained interaction with genetic material. EMSA assays indicate that YonN is able to interact with different DNA conformations without a strong topological preference, producing shifts across all tested substrates, although accompanied by diffuse binding patterns and the formation of heterogeneous complexes. In comparison with its bacterial HU-like homolog HBsu, YonN displayed a less defined and less concentration-dependent behavior in terms of discrete complex formation.

Overall, these findings indicate that YonN is a protein with strong DNA-binding capacity, although its interaction behavior appears complex and heterogeneous, possibly influenced by co-purified DNA and the intrinsic nature of its binding properties. This work expands the current understanding of phage-encoded HU-like proteins and contributes to elucidating mechanisms of viral genome organization, providing relevant insights for the study of phage systems and their potential biotechnological applications against antibiotic-resistant bacterial infections.

Keywords: YonN, bacteriophages, Arbitrium system, HU-like proteins, protein–DNA interaction, viral regulation, SPβ, antibiotic resistance.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La resistencia a los antibióticos como crisis global de salud pública

La resistencia a los antibióticos se ha consolidado en las últimas décadas como una de las amenazas más graves para la salud pública global en el siglo XXI (European Centre for Disease Prevention and Control, 2022; GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2024; Matee, 2026). Lo que en un principio se percibió como un fenómeno limitado a algunas infecciones bacterianas se ha convertido en un problema estructural, donde cada vez más microorganismos son capaces de sobrevivir a tratamientos que anteriormente resultaban eficaces y seguros (World Health Organization, 2025; Zavaleta-Monestel et al., 2025). Este fenómeno, conocido como resistencia a los antimicrobianos (AMR) (Abraham & Chain, 1940), reduce progresivamente las opciones terapéuticas disponibles y compromete la seguridad de intervenciones médicas esenciales, desde procedimientos quirúrgicos rutinarios hasta tratamientos oncológicos intensivos (Flynn & Guarner, 2023; Sora et al., 2026).

Los datos epidemiológicos más recientes subrayan la magnitud de esta crisis sanitaria (Flynn & Guarner, 2023). A nivel mundial, la importancia de esta crisis ha sido documentada por organismos de referencia como la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de su sistema GLASS, los cuáles han mostrado que una proporción cada vez mayor de infecciones bacterianas confirmadas en laboratorio presentan resistencia a tratamientos antibióticos convencionales antes efectivos, con tendencias al alza en múltiples regiones del planeta, principalmente Europa y África y una tasa de crecimiento interanual que aumenta entre el 5% y el 15%, alcanzando cifras preocupantes (Salam et al., 2023; World Health Organization, 2025).

Según estimaciones preliminares publicadas en 2025, más del 17% de las infecciones bacterianas comunes en humanos presentó resistencia a tratamientos antibióticos básicos en el año 2023 (World Health Organization, 2025), lo que pone de manifiesto no solo el incremento cuantitativo de la resistencia antimicrobiana, sino también su progresiva consolidación como un problema de alcance global. Esta tendencia se ve reforzada por los datos de vigilancia internacional, donde se observa un aumento sostenido en el número de países que participan en los sistemas globales de monitorización de la resistencia antimicrobiana a lo largo de los últimos años (European Centre for Disease Prevention and Control, 2022).

Desde 2016, la participación internacional se ha incrementado de forma notable (Figura 1), multiplicándose el número de países implicados, lo que refleja un mayor compromiso global frente a esta amenaza (World Health Organization, 2025). No obstante, este avance no es homogéneo, ya que persisten brechas significativas en regiones del continente americano (Américas) y el Pacífico Occidental, lo que sugiere una subestimación del problema en determinadas áreas y refuerza la necesidad de estrategias coordinadas y globales para abordar eficazmente la resistencia a los antibióticos (World Health Organization, 2025).

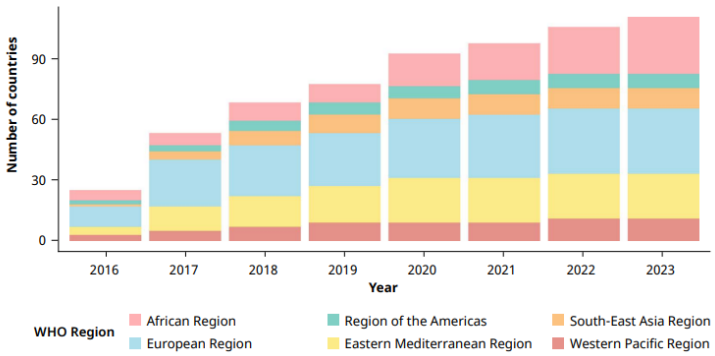


Figura 1. Evolución del número de países que reportaron datos sobre resistencia a los antimicrobianos (AMR) al sistema GLASS por región de la OMS de 2016 a 2023 (World Health Organization, 2025).

En Europa, la situación no es menos crítica. Los datos del European Centre for Disease Prevention and Control (2022) indican que más de 35 000 muertes son atribuibles cada año en el espacio paneuropeo a infecciones causadas por bacterias resistentes, una cifra comparable en magnitud a otras grandes enfermedades infecciosas como la tuberculosis o el VIH y que supone un desafío persistente para los sistemas de salud de los estados miembros (European Centre for Disease Prevention and Control, 2022). Este incremento de la resistencia bacteriana no solo se traduce en un mayor número de muertes, sino también en un aumento considerable de la carga económica y social (Ahmad & Khan, 2019; World Bank, 2017).

En España, la resistencia antimicrobiana también ha tenido un impacto notable. Informes recientes asocian miles de muertes anuales a infecciones resistentes, y estimaciones proyectan un aumento significativo de este número si no se implementan adecuadamente estrategias de vigilancia, uso racional de antibióticos y desarrollo de nuevas terapias (Murray et al., 2022; O'Neill, 2016; Peñalva et al., 2025). La pérdida de eficacia terapéutica de medicamentos que han sido piedra angular de la medicina moderna implica mayores costes sanitarios, prolongación de hospitalizaciones, necesidad de terapias más costosas o tóxicas, y un incremento de la mortalidad asociada a infecciones que en otras épocas eran fácilmente tratables (Friedman et al., 2016).

La resistencia a los antibióticos ha dejado de ser una preocupación localizada o sectorial para constituirse en una crisis abierta de alcance global, con implicaciones médicas, sociales, económicas y científicas que requieren estrategias integradas y multidisciplinarias (Robinson et al., 2016). La identificación de nuevas alternativas terapéuticas, el desarrollo de estrategias de prevención y la investigación básica y aplicada en biotecnología y microbiología se convierten en pilares fundamentales para mitigar esta amenaza creciente y preservar la eficacia de los tratamientos antibióticos para futuras generaciones.

1.2. Bacteriófagos como alternativa terapéutica frente a la resistencia antimicrobiana

Ante el avance sostenido de la resistencia a los antibióticos y la disminución progresiva de opciones terapéuticas eficaces, la comunidad científica y los sistemas de salud han intensificado la búsqueda de alternativas antimicrobianas innovadoras. En este contexto, el uso de bacteriófagos ha resurgido como una estrategia prometedora para el control de infecciones causadas por bacterias multirresistentes (Furfaro et al., 2018; Liu et al., 2024).

Los bacteriófagos, son virus que infectan de manera específica a bacterias y representan las entidades biológicas más abundantes del planeta, con presencia en prácticamente todos los ecosistemas (Dion et al., 2020). Están formados por un genoma de ADN o ARN encapsidado en una estructura proteica y dependen completamente de la maquinaria celular bacteriana para su replicación (Garza Velasco et al., 2024). Tras reconocer receptores específicos en la superficie bacteriana, los fagos inyectan su material genético en la célula hospedadora y pueden seguir dos estrategias principales: un ciclo lítico, que culmina con la producción de nuevas partículas virales y la lisis de la bacteria, o un ciclo lisogénico, en el que el genoma fágico se integra en el cromosoma bacteriano y se replica de forma pasiva junto a él (Brady et al., 2021a; Venturini et al., 2022). Esta capacidad para interactuar de manera selectiva y regulada con sus hospedadores bacterianos ha convertido a los bacteriófagos en modelos de estudio fundamentales para comprender procesos de regulación génica, evolución microbiana e interacciones huésped–patógeno (Lavelle et al., 2023).

Los bacteriófagos presentan una serie de características que los convierten en prometedores candidatos para ser agentes terapéuticos. En primer lugar, su alta especificidad permite atacar cepas bacterianas concretas sin afectar de forma significativa a la microbiota beneficiosa del hospedador, a diferencia de los antibióticos de amplio espectro (Sulakvelidze et al., 2001). Esta propiedad reduce el riesgo de disbiosis y de aparición de infecciones secundarias, un problema frecuente asociado al uso prolongado de antibióticos convencionales (Duan et al., 2019; Kabwe et al., 2022). Por otra parte, los fagos poseen una capacidad de replicación dependiente del huésped, lo que implica que su acción se amplifica únicamente en presencia de la bacteria diana (Abedon et al., 2021). Este comportamiento autorregulado contrasta con la farmacocinética de los antibióticos clásicos y permite, en teoría, mantener concentraciones terapéuticas efectivas de manera localizada (Loc-Carrillo & Abedon, 2011).

Desde el punto de vista de la sostenibilidad, el uso de bacteriófagos se alinea con estrategias de control antimicrobiano más respetuosas con el medio ambiente. Los bacteriófagos son entidades biológicas naturales, ampliamente distribuidas en ecosistemas acuáticos y terrestres, y su producción puede realizarse con un impacto ambiental reducido en comparación con la síntesis y el uso masivo de antibióticos químicos (Dion et al., 2020).

No obstante, la implementación generalizada de la terapia con bacteriófagos plantea importantes desafíos científicos y técnicos. Entre ellos se encuentran la necesidad de comprender en profundidad los mecanismos moleculares que regulan el ciclo de vida de los fagos, su interacción con la bacteria hospedadora y la expresión génica viral durante la infección. La eficacia y seguridad de los bacteriófagos como agentes terapéuticos dependen, en gran medida, de una regulación precisa de estos procesos, lo que subraya la importancia de la investigación básica en biología molecular y virología bacteriana.

1.3. Regulación de la decisión lisis–lisogenia mediante el sistema Arbitrium

El sistema Arbitrium representa uno de los mecanismos reguladores más reveladores descritos en bacteriófagos en los últimos años, al introducir un modelo de comunicación viral dependiente de la densidad de infección. Este sistema fue identificado inicialmente en bacteriófagos que infectan bacterias del género *Bacillus* y supuso un cambio conceptual en la comprensión de cómo los fagos toman decisiones colectivas respecto a su ciclo de vida (Erez et al., 2017).

A nivel molecular, el sistema Arbitrium está compuesto por tres elementos principales: el péptido señal AimP, el receptor y regulador transcripcional AimR, y el gen regulado AimX (Figura 2). Durante la infección, el fago expresa AimP, que es procesado y secretado al medio extracelular. La acumulación progresiva de este péptido en el entorno refleja el número de infecciones previas en la población bacteriana, así como el número de células portadoras del bacteriófago, actuando como una señal indirecta de la densidad viral (Brady et al., 2021b; Gallego Del Sol et al., 2019, 2022).

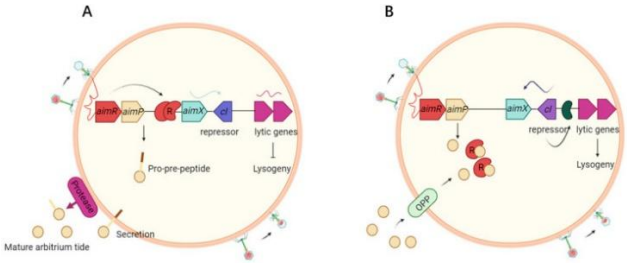


Figura 2. Modelo del mecanismo del sistema Arbitrium para la toma de decisiones de lisis-lisogenia (Shang et al., 2025).

Una vez internalizado por nuevas bacterias infectadas, AimP interacciona directamente con AimR, provocando un cambio conformacional que altera su capacidad de unión al ADN. En ausencia del péptido señal, AimR se encuentra en una conformación activa que le permite unirse a secuencias específicas del ADN y activar la transcripción del gen AimX. La expresión de AimX se ha asociado con la promoción del ciclo lítico, favoreciendo la replicación viral y la lisis de la célula hospedadora (Guan et al., 2019; Kohm et al., 2025).

Por el contrario, cuando la concentración intracelular de AimP es elevada, su unión a AimR inhibe la interacción de este con el ADN, reprimiendo la expresión de AimX y favoreciendo la entrada en el ciclo lisogénico (Shang et al., 2025). De este modo, el sistema Arbitrium permite al fago integrar información sobre infecciones previas y ajustar su estrategia replicativa de forma coordinada a nivel poblacional (Figura 3). Este mecanismo evita la explotación excesiva del hospedador cuando la densidad de fagos es alta, contribuyendo a la estabilidad a largo plazo de la población viral (Kohm et al., 2025).

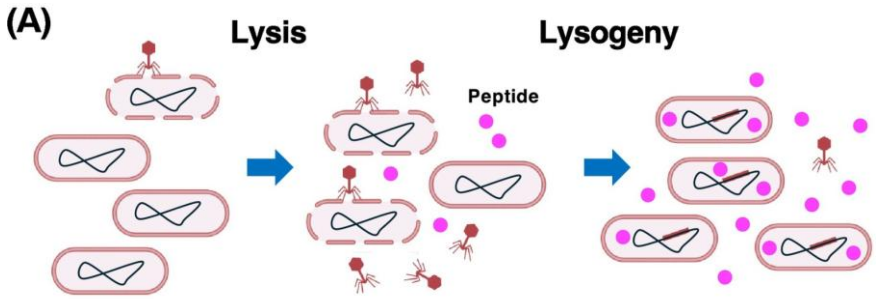


Figura 3. Regulación de la decisión lisis-lisogenia mediante el sistema *Arbitrium* en base a la acumulación del péptido AimP (Kohm et al., 2025).

La interpretación más clásica establece que desde un punto de vista regulador, el sistema Arbitrium constituye un circuito genético relativamente simple, pero altamente eficiente, en el que un único factor de transcripción central, AimR, actúa como nodo regulador (Brady et al., 2023). No obstante, la visión actual del sistema Arbitrium apunta hacia un modelo regulador más complejo, en el que la actividad de AimR no depende exclusivamente de su interacción con el operador canónico del promotor de AimX (Gallego Del Sol et al., 2019). Diversos estudios han puesto de manifiesto que, a medida que se profundiza en su análisis, el sistema Arbitrium presenta un nivel de complejidad considerablemente mayor del inicialmente descrito.

Lejos de constituir un mecanismo regulador simple y lineal, los bacteriófagos parecen integrar de forma coordinada múltiples señales adicionales durante el proceso de infección, relacionadas tanto con el estado metabólico de la bacteria hospedadora como con la actividad de distintos sistemas regulatorios celulares. Entre estos destacan los módulos toxina/antitoxina, como MazE/MazF (Figura 4), que han sido implicados en la modulación de la respuesta celular al estrés y en la toma de decisiones relacionadas con la supervivencia bacteriana (Cui et al., 2022). En este contexto, el sistema Arbitrium debe entenderse como parte de una red reguladora amplia, dinámica y altamente interconectada, en la que la señalización mediada por AimP–AimR se integra con otros mecanismos moleculares para permitir un control más fino y contextual de la decisión entre los ciclos lítico y lisogénico, adaptándose de manera eficiente a las condiciones ambientales y fisiológicas del hospedador (Guler et al., 2024; Zamora-Caballero et al., 2024).

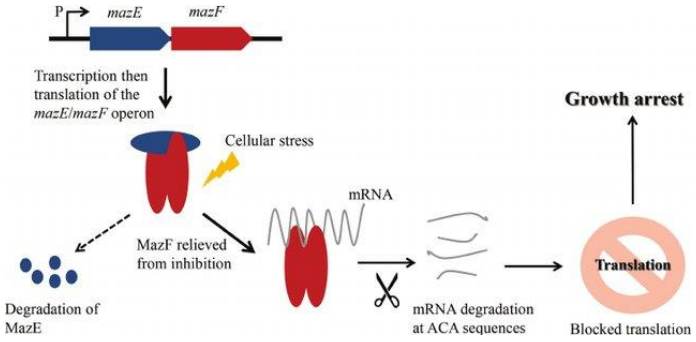


Figura 4. Esquema modelo del sistema toxina-antitoxina MazF/MazE bacteriana (Al-Hinai et al., 2012).

La creciente complejidad atribuida a la regulación de la decisión lisis–lisogenia pone de manifiesto la necesidad de ampliar el foco más allá de los componentes centrales del sistema Arbitrium. La identificación de proteínas adicionales codificadas por el fago, potencialmente implicadas en la modulación de la actividad de AimR o en la organización del ADN viral, sugiere que estos elementos podrían desempeñar funciones clave en la integración de señales y en el ajuste fino de la expresión génica durante la infección.

Comprender el papel de estas proteínas asociadas no solo resulta esencial para descifrar los mecanismos moleculares que gobiernan el ciclo de vida del fago, sino que también es un paso necesario para poder explotar de forma racional el potencial biotecnológico y terapéutico de los bacteriófagos. En este contexto, la caracterización funcional de estos componentes emergentes adquiere un valor estratégico tanto desde una perspectiva básica como aplicada.

1.4. Potencial de YonN en la regulación de la interacción fago–bacteria y control génico viral

Entre las proteínas codificadas por el bacteriófago SPβ cuya función no ha sido completamente caracterizada, YonN emerge como un candidato especialmente relevante en el contexto de la regulación génica viral. YonN ha sido clasificada como una proteína asociada al nucleoide y pertenece a la familia de proteínas HU-like, un grupo de proteínas altamente conservadas en bacterias que desempeñan un papel central en la organización estructural del genoma (Stojkova et al., 2019). Estas proteínas se caracterizan por su capacidad de unirse al ADN bicatenario de forma mayoritariamente no específica y de modificar su conformación mediante la inducción de curvaturas pronunciadas, compactación local y, en determinados contextos, la formación de bucles de ADN (Stojkova & Spidlova, 2022).

En bacterias, las proteínas HU-like actúan como reguladores arquitectónicos globales, influyendo indirectamente en procesos fundamentales como la transcripción, la replicación y la respuesta al estrés, al modular la accesibilidad del ADN a otros factores proteicos (Vis et al., 1995). En *Bacillus*, la proteína HBsu constituye el principal representante de esta familia y es esencial para la viabilidad celular, dado su papel clave en el mantenimiento de la estructura del nucleoide y en la regulación global de la expresión génica (Karaboja & Wang, 2022). Desde un punto de vista estructural y bioquímico, YonN presenta similitudes significativas con HBsu, lo que sugiere una posible conservación de funciones arquitectónicas básicas (Figura 5). Sin embargo, estudios funcionales han demostrado que YonN no puede sustituir a HBsu en la bacteria hospedadora, indicando que ambas proteínas no son funcionalmente equivalentes. Esta evidencia sugiere que YonN podría haber evolucionado para cumplir funciones específicas en el genoma del fago, adaptadas a las necesidades regulatorias virales durante la infección (Ross & Setlow, 2000).



Figura 5. Modelo de la proteína YonN unida a una doble cadena de DNA obtenido mediante AlphaFold.

Las proteínas HU-like suelen presentar una unión al ADN dominada por interacciones electrostáticas, con una afinidad modulable en función de la conformación del ADN y del contexto celular (Schwab & Dame, 2025). Esta característica permite que actúen como moduladores dinámicos de la arquitectura genómica, facilitando o restringiendo el acceso de factores de transcripción a regiones diana (Dame, 2005). En el caso de YonN, esta capacidad sugiere que podría desempeñar un papel como modulador arquitectónico del ADN viral, contribuyendo a la organización estructural del genoma y, de forma indirecta, a la regulación de la expresión génica del fago. Aunque estos mecanismos han sido ampliamente caracterizados en bacterias, su estudio en fagos sigue siendo limitado, lo que plantea interrogantes relevantes sobre su función durante la infección (Collier et al., 2011; Dame, 2005; Ge et al., 2025).

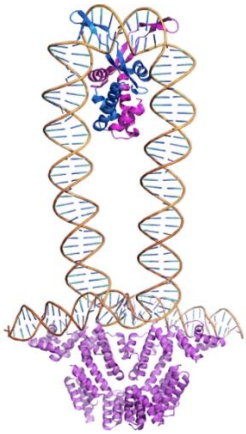


Figura 6. Modelo teórico de la intervención de YonN en el complejo AimR-ADN.

Asimismo, YonN podría interactuar funcionalmente con otras proteínas codificadas por el fago (Figura 6), como AimR, un regulador transcripcional perteneciente al sistema Arbitrium implicado en la decisión entre los ciclos lítico y lisogénico. AimR reconoce secuencias específicas localizadas en regiones promotoras del genoma fágico, formadas por dos repeticiones invertidas conservadas de 6 pb (ATCACT en SPβ y variantes relacionadas como ATGTTC en otros fagos de la familia) separadas por un espaciador de aproximadamente 25 pb. Esta arquitectura resulta especialmente llamativa, ya que se desvía de la separación más habitual observada en numerosos sistemas reguladores bacterianos, donde los sitios de unión suelen encontrarse separados por alrededor de una vuelta completa de la hélice de ADN (~10 pb). La gran distancia entre ambas secuencias reconocidas por AimR se relaciona con la organización estructural del dímero y con la necesidad de mantener una conformación extendida del ADN para permitir la unión simultánea de ambos dominios de reconocimiento (Gallego Del Sol et al., 2019).

La posible interacción de YonN con AimR sugiere su participación en redes regulatorias más amplias, donde su actividad no solo dependería de la unión al ADN, sino también de interacciones proteína–proteína y de la influencia del entorno intracelular, incluyendo potencialmente modificaciones post-traduccionales. En conjunto, estas características sitúan a YonN como un posible elemento estratégico para el control fino de la expresión génica y de la organización del genoma durante el ciclo de vida del fago.

En conjunto, la caracterización de YonN resulta esencial para avanzar en la comprensión de los mecanismos moleculares que gobiernan la interacción fago–bacteria y la regulación de la expresión génica viral. El estudio de sus propiedades bioquímicas y funcionales permitirá dilucidar su papel como modulador arquitectónico y regulador indirecto, aportando información clave para la comprensión integral de la biología reguladora de los bacteriófagos y abriendo posibles vías para su aplicación biotecnológica y terapéutica.

Además, este trabajo se alinea de manera directa con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), concretamente con el ODS 3 (3.1, 3.2) – Salud y bienestar, al perseguir como meta la generación de conocimiento fundamental que contribuya al desarrollo de estrategias innovadoras frente a las infecciones bacterianas multirresistentes. La caracterización bioquímica y funcional de proteínas virales como YonN, así como la comprensión de su papel en la regulación génica de bacteriófagos con potencial terapéutico, sienta las bases para la futura aplicación de estos sistemas como alternativas antibacterianas más eficaces, específicas y sostenibles, contribuyendo a la prevención de enfermedades infecciosas y a la mejora de la salud global.

1.5. Justificación del trabajo

El creciente interés en los bacteriófagos como alternativas terapéuticas frente a la resistencia antimicrobiana ha puesto de manifiesto la necesidad de comprender en profundidad los mecanismos moleculares que regulan su ciclo de vida y su interacción con la bacteria hospedadora. Aunque sistemas como Arbitrium han aportado una nueva perspectiva sobre la capacidad de los fagos para tomar decisiones colectivas e integrar señales ambientales, la comprensión actual del mecanismo molecular completo de todo el proceso sigue siendo incompleta. En particular, la mayoría de los estudios se han centrado en los componentes principales del sistema, dejando en un segundo plano a proteínas accesorias cuya contribución podría resultar determinante para la regulación de la expresión génica viral.

En este contexto, la proteína YonN se presenta como un elemento de especial interés. Su clasificación como proteína HU-like sugiere un papel potencial como modulador arquitectónico del ADN, una función documentada en sistemas bacterianos, pero aun escasamente explorada en bacteriófagos. La ausencia de estudios detallados sobre las propiedades bioquímicas de YonN, su capacidad de unión al ADN, su posible regulación mediante modificaciones postraduccionales y su interacción con otras proteínas virales representa una laguna significativa en el conocimiento actual. Abordar estas cuestiones resulta fundamental no solo para comprender la biología básica del fago SPβ, sino también para sentar las bases de futuras aplicaciones biotecnológicas o terapéuticas basadas en la manipulación racional de sistemas reguladores fágicos.

Por tanto, la caracterización estructural y funcional de YonN se justifica como un paso necesario para avanzar en la comprensión integral de la regulación génica en bacteriófagos y de los mecanismos que gobiernan la interacción fago–bacteria, contribuyendo al desarrollo de enfoques innovadores frente a la crisis global de la resistencia a los antibióticos.

1.6. Hipótesis

La hipótesis principal del trabajo es que YonN actúa como un modulador de la expresión génica del fago mediante su capacidad de unión al ADN y de remodelación de su estructura, desempeñando un papel relevante en la organización del genoma fágico durante la infección. Se plantea que esta función arquitectónica podría influir indirectamente en la accesibilidad del ADN a otros reguladores transcripcionales, contribuyendo a un control más fino y contextual de la expresión génica viral.

Adicionalmente, se plantea la hipótesis de que la actividad de YonN puede estar regulada por modificaciones postraduccionales, como la acetilación de residuos de lisina, lo que permitiría modular dinámicamente su afinidad por el ADN en respuesta a señales intracelulares. Asimismo, YonN podría desempeñar un papel central en la regulación del ciclo de vida del fago, interactuando con otras proteínas codificadas por el fago. En estudios previos, YosL fue identificada como una posible diana, y la actividad de AimR, dada su peculiar forma de reconocimiento del ADN, podría verse modulada por YonN, lo que sugiere que esta proteína participa en redes regulatorias más amplias y complejas.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Grado es llevar a cabo la caracterización estructural, bioquímica y funcional de la proteína YonN del bacteriófago SPβ, con el fin de evaluar su papel como posible modulador de la organización del ADN viral y de la arquitectura genómica durante el ciclo de vida del fago.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Determinar la capacidad de unión de YonN al ADN, así como su comportamiento frente a diferentes conformaciones y condiciones de interacción, mediante la producción heteróloga, optimización y purificación de la proteína en su estado funcional, evaluando su afinidad, especificidad y estabilidad de los complejos proteína–ADN formados.
- Evaluar el efecto de posibles modificaciones postraduccionales sobre la capacidad de unión al ADN de YonN, analizando su impacto en la estabilidad y modulación de los complejos proteína–ADN.
- Analizar la implicación de YonN en redes de interacción funcional con otras proteínas reguladoras del fago, con el objetivo de comprender su papel dentro de los mecanismos de regulación del ciclo viral.

3. METODOLOGÍA

3.1. Análisis bioinformático y predicción estructural

Previo a la fase experimental, y con el objetivo de obtener información estructural y funcional sobre las proteínas estudiadas, se realizaron distintos análisis *in silico* utilizando herramientas bioinformáticas y simulaciones computacionales (descritas en detalle a continuación) a partir de sus secuencias aminoacídicas. Estos incluyeron la recopilación de secuencias a partir de bases de datos públicas, el análisis comparativo mediante herramientas de alineamiento y la generación de modelos estructurales tridimensionales mediante predicción computacional.

Las secuencias se obtuvieron de SubtiWiki y UniProt utilizando los identificadores correspondientes, y se verificaron mediante NCBI Protein. En UniProt se emplearon los registros de YonN (P68573), la acetiltransferasa YfmK (O34536), el regulador AimR (O31927) y la proteína asociada al ADN HBsu (P08821). Una vez obtenidas las secuencias, se realizaron análisis comparativos mediante SIM-Alignment Tool for Protein Sequences, centrados principalmente en YonN y HBsu, dos proteínas relacionadas con la interacción con ADN (Michna et al., 2016; UniProt Consortium, 2023). Este análisis permitió evaluar su grado de similitud y la conservación de regiones específicas, considerando además que HBsu puede ser acetilada por YfmK, por lo que esta comparación sirvió como aproximación inicial para identificar posibles regiones funcionalmente relevantes conservadas.

Las secuencias proteicas se emplearon para la predicción de estructuras tridimensionales mediante AlphaFold (https://alphafoldserver.com/) (Jumper et al., 2021), obteniendo modelos tanto de proteínas individuales como de posibles complejos proteína–ADN. Estos modelos proporcionaron una base estructural homogénea para analizar la organización de dominios, superficies de interacción y regiones implicadas en el reconocimiento del ADN. La calidad de las predicciones se evaluó mediante las puntuaciones de confianza pLDDT (predicted Local Distance Difference Test), un parámetro que estima la fiabilidad local de la estructura predicha para cada residuo de la proteína en una escala de 0 a 100. Valores superiores a 90 indican predicciones muy fiables, entre 70–90 buena confianza, 50–70 menor precisión estructural y por debajo de 50 regiones potencialmente desordenadas o flexibles. Se prestó especial atención a las proteínas YonN, YfmK, AimR y HBsu, cuyos modelos se utilizaron como referencia estructural para interpretar los resultados experimentales (Jumper et al., 2021; Tunyasuvunakool et al., 2021). Adicionalmente, los modelos estructurales obtenidos fueron analizados y visualizados mediante PyMOL (https://www.pymol.org/), lo que permitió examinar en detalle la organización tridimensional y las superficies de interacción.

Por otra parte, los geles obtenidos en los ensayos de interacción proteína–ADN se analizaron mediante el software Gel Analyzer (versión 26.1) (https://www.gelanalyzer.com/), evaluando el desplazamiento de las bandas, y mediante ImageJ (https://imagej.net/ij/), empleado para la cuantificación y análisis densitométrico de las señales observadas en los geles.

3.2. Cepas bacterianas, medios y reactivos utilizados

Las cepas bacterianas utilizadas correspondieron a cepas comerciales disponibles en el laboratorio del Dr. Alberto Marina Moreno situado en el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV). En concreto se emplearon diferentes cepas de *Escherichia coli* para distintos fines: *DH5*α para clonación y mantenimiento de plásmidos por su alta eficiencia y estabilidad genética, y *BL21-CodonPlus (DE3)-RIL* para la expresión de proteínas recombinantes, optimizando la traducción de codones raros gracias a ARNt adicionales. Ambas se conservaron en alícuotas con glicerol a −80 °C para asegurar su viabilidad y estabilidad genética.

Para el crecimiento bacteriano, propagación de plásmidos y expresión de proteínas recombinantes se emplearon distintos medios de cultivo según el objetivo experimental. El medio Luria–Bertani (LB) se utilizó para el crecimiento rutinario de *E. coli* y la selección de transformantes, tanto en medio líquido como sólido (suplementado con agar). Para mantener la presión de selección se añadieron antibióticos tras el enfriamiento del medio: ampicilina (100 µg/mL) en *E. coli DH5a* y ampicilina (100 µg/mL) junto con cloranfenicol (33 µg/mL) en *E. coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIL* (Tabla 1).

Para los experimentos de expresión proteica se utilizó el medio de autoinducción AIZY, preparado a partir del medio base ZY y suplementado con fuentes de carbono y sales que permiten la inducción progresiva de la expresión sin necesidad de inductores químicos, además de los antibióticos necesarios para mantener la presión selectiva (Studier, 2005).

Por otra parte, los tampones empleados en la purificación y manipulación de proteínas recombinantes se diseñaron para garantizar su estabilidad, correcta unión a la resina IMAC y su posterior elución. El Buffer A se utilizó como tampón de unión y el Buffer B como tampón de elución mediante altas concentraciones de imidazol. En ambos casos se prepararon variantes suplementadas con glicerol (10%) y TCEP (1 mM) para mejorar la estabilidad estructural y mantener condiciones redox adecuadas. Finalmente, se utilizó un tampón de diálisis para eliminar imidazol y sales tras la purificación y equilibrar las proteínas en condiciones adecuadas para su almacenamiento o uso experimental (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo y buffers empleados en los experimentos de crecimiento bacteriano, expresión y purificación de proteínas recombinantes.

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
Luria–Bertani (LB)	Triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), NaCl (10 g/L)
LB-agar	LB + agar 3%
ZY	Triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L)
AIZY	Medio ZY + NPS 20X (sulfato amónico 66 g/L, KH_2PO_4 136 g/L, Na_2HPO_4 142 g/L), 5052 50X (glicerol 250 g/L, glucosa 25 g/L, lactosa 100 g/L), $MgSO_4$ 1 M (1 mL/L), antibióticos específicos
Buffer A	NaCl (500 mM), Tris-HCl pH 8 (50 mM), imidazol (1 mM) ± glicerol 10% ± TCEP 1 mM
Buffer B	NaCl (500 mM), Tris-HCl pH 8 (50 mM), imidazol (500 mM) ± glicerol 10% ± TCEP 1 mM
Buffer de diálisis	NaCl (250 mM), Tris-HCl pH 8 (20 mM), EDTA (0,5 mM), β-mercaptoetanol (1 mM)

3.3. Amplificación de ADN, clonación y construcción de plásmidos

3.3.1. Diseño y obtención de fragmentos de ADN para los ensayos experimentales

Con el objetivo de estudiar la interacción de las proteínas estudiadas con el ADN, se diseñó un conjunto de fragmentos de ADN con diferentes características de longitud, composición y organización de secuencias reguladoras. Estos fragmentos fueron pensados para permitir el análisis comparativo de la unión proteína–ADN en función de parámetros estructurales como la distancia entre motivos de reconocimiento, la curvatura intrínseca del ADN o el contenido en GC (Crothers et al., 1992).

Se empleó como fragmento de referencia un ADN nombrado “Zenit” (700 pb) sin función codificante conocida, utilizado como sustrato basal para las comparaciones experimentales. Además, se diseñaron dos fragmentos adicionales con modificaciones en la distancia entre las secuencias de reconocimiento de AimR: ADN Plus, en el que la separación entre las cajas de reconocimiento se situó a 35 pb, y ADN Minus, en el que dicha distancia se redujo hasta las 12 pb. Estos fragmentos se diseñaron y utilizaron para evaluar la longitud mínima de ADN necesaria para la unión de YonN y determinar cómo el tamaño del fragmento influye en la formación de complejos proteína–ADN.

Adicionalmente, se incluyeron fragmentos diseñados para estudiar el efecto de las propiedades estructurales intrínsecas del ADN sobre la interacción proteína–ADN. Para ello, se diseñó un fragmento denominado ADN no curvado (ADNNC), caracterizado por un elevado contenido en GC, y un fragmento ADN curvado (ADNCu), con menor contenido en GC y mayor propensión a adoptar conformaciones estructuralmente curvadas (Parks et al., 2025). Ambos fragmentos fueron sintetizados comercialmente como gBlocks Gene Fragments (https://www.idtdna.com/site/order/gblockentry) y se diseñaron incorporando secuencias objetivo para T7 en sus extremos, lo que permitió su posterior amplificación mediante PCR para la obtención de cantidades suficientes de ADN para los ensayos experimentales (Tabla 2). Estas secuencias fueron seleccionadas a partir de literatura científica previa en la que se describen fragmentos de ADN con propiedades estructurales bien caracterizadas.

Tabla 2. Secuencias de los fragmentos sintéticos de ADN (gBlocks Gene Fragments) diseñados para los ensayos de interacción proteína–ADN.

GBLOCKS GENE FRAGMENTS	SECUENCIA
ADN CURVADO	5´TAATACGACTCACTATAGGGGGGCAATTACGGCCTTTTACGCGCATATTCGCGCAATATCGGGCATCACTGCG CAATAACGCGCAATAACGCGCAAATACGGGCAAATTCGGGCATTTACGGAGTGATACGGGCAAAAACGCCCT TAAACGGGCAAATTCGCCCAATTACGGCCCGCTGAGCAATAACTAGC 3´
ADN NO CURVADO	5´TAATACGACTCACTATAGGGGCGGGCAATATCGCGCCCGCCATAATCGCGCGCGGCAATTACGGGCCCG GCTAAATATCACTCGGCAAAAACGGGCCCGGCATAAACGGGGCCGGCAAATTCGCGCCCGGCTATAACGG GAGTGATAATTACGCGCCCGGCTAATACGGGCGCGCCATATTCGGGCCCGGCTTATTCGCGGCCCCGCTGA GCAATAACTAGC 3´

Como control de interacción con ADN natural, se amplificó un fragmento del gen ricA a partir de ADN genómico de *Bacillus subtilis* 168 mediante primers específicos, permitiendo comparar la unión de las proteínas a secuencias naturales frente a fragmentos diseñados experimentalmente.

Para ampliar el conjunto de secuencias disponibles en los ensayos de interacción proteína–ADN, se seleccionaron y amplificaron fragmentos de distintas regiones génicas del genoma de *Bacillus subtilis* 168 que contenían secuencias de reconocimiento de AimR, priorizando aquellas con cajas de unión separadas por más de 265 pb. Los fragmentos obtenidos, con tamaños entre 180 y 500 pb, incluyeron las regiones YopRS (300 pb), YONX–YOPA (500 pb), YOPD–YOPE (400 pb), YozV–YobD (180 pb) y NasF–NasE (300 pb), asegurando en todos los casos la presencia de al menos un motivo de unión para permitir comparaciones en los ensayos de interacción.

Los primers empleados fueron diseñados específicamente para cada región génica, garantizando la especificidad de amplificación y la obtención de productos del tamaño esperado (Anexo 1. Tabla 1).

La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó utilizando la polimerasa Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific), debido a su elevada fidelidad y eficiencia de amplificación. No obstante, en determinados experimentos específicos se empleó la polimerasa DreamTaq (Thermo Scientific), principalmente en amplificaciones rutinarias donde no era necesaria una alta fidelidad.

Las reacciones de PCR con Phusion Flash se prepararon en un volumen final de 50 µL utilizando Master Mix 2X, primers forward y reverse a 0,5 µM y ADN molde, aplicando un programa rápido con desnaturalización inicial a 98 °C, seguida de 30 ciclos con tiempos cortos de desnaturalización, hibridación a la temperatura específica de los primers y extensión a 72 °C (15–30 s/kb), finalizando con una extensión terminal de 1 min. Por su parte, las amplificaciones con DreamTaq se realizaron en 20 µL con tampón 1X con $MgCl_2$, dNTPs 200 µM, primers 0,5 µM, 1,25 U de polimerasa y 1–10 ng de ADN, utilizando un perfil térmico de 35–40 ciclos con desnaturalización a 95 °C, hibridación a la temperatura de los primers y extensión a 72 °C (1 min/kb), seguida de una extensión final de 10 min (Cho et al., 2014).

En todos los casos, los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X para verificar el tamaño esperado y la especificidad de la amplificación antes de su purificación.

3.3.2. Purificación de productos de PCR

Tras verificar que se ha amplificado un único fragmento del tamaño adecuado, los productos de PCR se purificaron para eliminar primers, nucleótidos libres, enzimas y componentes del tampón que pudieran interferir en pasos posteriores. La purificación se realizó con el GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, uniendo el ADN a columnas de sílice, realizando lavados para eliminar impurezas y eluyendo finalmente el ADN limpio en el tampón de elución del kit.

La concentración y pureza de los fragmentos purificados se determinaron mediante espectrofotometría con un equipo NanoDrop (Thermo Scientific), registrando la concentración en ng/µL y la relación A260/A280 como indicador de pureza. Este análisis permitió asegurar la calidad de los fragmentos antes de su uso en experimentos posteriores.

3.3.3. Clonación de los genes de interés en el vector de expresión

El protocolo de clonación seguido para los genes correspondientes a YonN, YfmK y HBsu aplicó una estrategia común de amplificación, ensamblaje y construcción de plásmidos recombinantes, lo que permitió estandarizar las condiciones experimentales y asegurar el correcto funcionamiento de los distintos constructos (Savitsky et al., 2010).

Los genes de interés se amplificaron mediante PCR de alta fidelidad a partir de ADN genómico de *B. subtilis* 168 utilizando Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific), minimizando la introducción de mutaciones durante la amplificación. Los primers fueron diseñados para permitir la inserción posterior en el vector de expresión pLICSGC1 mediante regiones de solapamiento compatibles con el sistema NEBuilder HiFi DNA Assembly (New England Biolabs) (Gibson et al., 2009).

El vector pLICSGC1 se empleó para la expresión de proteínas recombinantes bajo el promotor T7, incorporando una etiqueta His-tag para su purificación por cromatografía IMAC y un sitio de corte para la proteasa TEV (Kapust et al., 2001). Los fragmentos amplificados y el vector se ensamblaron mediante NEBuilder HiFi DNA Assembly, técnica que permite la unión precisa mediante regiones solapantes sin necesidad de enzimas de restricción, ajustando las proporciones molares según las recomendaciones del fabricante. Los productos obtenidos se utilizaron para su transformación en células competentes para su propagación y selección.

3.3.4. Transformación bacteriana, selección de clones y aislamiento de plásmidos

Los plásmidos recombinantes obtenidos se introdujeron en *E. coli DH5a* competentes mediante choque térmico para su propagación y selección. Tras la recuperación en medio LB, las células se sembraron en placas suplementadas con ampicilina (100 µg/mL) para seleccionar las colonias transformantes portadoras del vector pLICSGC1.

Para identificar las colonias que habían incorporado correctamente el plásmido recombinante, se realizó PCR de colonias utilizando DreamTaq (Thermo Scientific) y pequeñas cantidades de material celular como molde. Los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para confirmar la presencia de insertos del tamaño esperado y seleccionar los clones positivos. Estos fragmentos se purificaron posteriormente mediante tratamiento con ExoProStar para eliminar primers y dNTPs residuales, y se enviaron a secuenciación Sanger (STABVIDA) con el fin de confirmar la correcta inserción del gen y la ausencia de mutaciones derivadas de la amplificación o el proceso de clonación.

Una vez confirmada la secuencia correcta, las colonias positivas se expandieron en cultivos líquidos de LB con ampicilina a 37 °C bajo agitación durante al menos 12 horas, y el ADN plasmídico se purificó mediante el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific), obteniendo muestras de alta pureza adecuadas para experimentos posteriores. Los plásmidos verificados se introdujeron posteriormente en *E. coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIL* electrocompetentes mediante electroporación y, tras su recuperación, las células se sembraron en placas de LB con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (33 µg/mL), obteniendo así los constructos listos para la expresión heteróloga de las proteínas recombinantes.

3.4. Expresión heteróloga de proteínas recombinantes.

La expresión heteróloga de las proteínas recombinantes YonN, YfmK y HBsu se llevó a cabo en *Escherichia coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIL* transformadas con los constructos derivados del vector pLICSGC1. Esta cepa se seleccionó por su compatibilidad con sistemas de promotor T7 y por su capacidad de mejorar la traducción de genes heterólogos mediante el aporte de tRNAs específicos frente a codones poco frecuentes.

Para la expresión proteica, colonias transformadas se utilizaron para inocular precultivos en medio selectivo, que posteriormente sirvieron para iniciar cultivos de mayor volumen en medio de autoinducción AIZY. Estos se incubaron a 37 °C bajo agitación hasta alcanzar una OD_{600} ≈ 0,6, momento en el que la temperatura se redujo a 20 °C durante al menos 12 h para favorecer una expresión más lenta y mejorar la solubilidad de las proteínas recombinantes. Finalmente, las células se recolectaron por centrifugación a 5.000 G, se eliminó el sobrenadante y los pellets se almacenaron a −20 °C hasta su uso en los procesos de lisis y purificación (Studier, 2005).

3.5. Purificación de proteínas recombinantes

Con el objetivo de determinar las condiciones de tampón óptimas para la manipulación y purificación de las proteínas recombinantes YonN, HBsu y YfmK, se realizaron ensayos de estabilidad térmica mediante Differential Scanning Fluorimetry (DSF), también conocido como ensayo ThermoFluor (Becerra et al., 2025). Para estos experimentos se emplearon alícuotas de proteínas previamente purificadas y conservadas en la colección del laboratorio del Dr. Alberto Marina Moreno situado en el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV), permitiendo evaluar su comportamiento bajo distintas condiciones fisicoquímicas antes de nuevas purificaciones.

La estabilidad térmica se analizó usando el colorante fluorescente SYPRO Orange, que incrementa su señal al unirse a regiones hidrofóbicas expuestas durante la desnaturalización. Las reacciones se prepararon en un volumen final de 22 µL en placas de PCR de 96 pocillos, conteniendo la proteína a concentración constante, el colorante y las distintas condiciones de tampón a evaluar (Becerra et al., 2025; Niesen et al., 2007).

Para identificar las condiciones más favorables de estabilidad proteica, se realizó un cribado de 48 condiciones (Anexo 1. Tabla 2) evaluando el efecto del pH, la fuerza iónica y diversos aditivos, analizando tampones en un rango de pH 4.5–9.5 (100 mM, 150 mM NaCl), incluyendo acetato de sodio, Bis-Tris, citrato, cacodilato, MES, HEPES, fosfato, Tris, Bicina y CHES, así como sistemas de amplio rango como SPG y MMT. También se estudió el efecto de NaCl (0–500 mM) y de compuestos estabilizantes como glicerol, cationes divalentes, agentes reductores, osmólitos, sales, agentes quelantes, detergentes suaves y desnaturalizantes. Los ensayos de estabilidad térmica se realizaron en un termociclador de PCR en tiempo real con un gradiente de 20–95 °C (1 °C/min), determinándose la Tm a partir del análisis de fluorescencia, lo que permitió seleccionar las condiciones de tampón óptimas para mejorar la estabilidad proteica y la reproducibilidad experimental (Niesen et al., 2007).

Para la purificación de HBsu se emplearon los buffers A y B estándar, mientras que YonN requirió tampones suplementados con glicerol al 10% para mejorar su estabilidad. En el caso de YfmK, los buffers se suplementaron con glicerol (10%) y TCEP (1 mM) para mantener condiciones redox adecuadas y prevenir la oxidación proteica.

Los pellets celulares se resuspendieron en el tampón correspondiente y se lisaron por sonicación (7 min, pulso 1:1, 40% amplitud). Tras la lisis, los extractos celulares se centrifugaron a 15.000 G, obteniéndose una fracción soluble que se separó del material insoluble y se cargó sobre columnas HisTrap™ FF Crude (Cytiva) pre-equilibradas con Buffer A. Las proteínas recombinantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad IMAC, eluyéndose con un gradiente de imidazol en Buffer B utilizando un sistema FPLC permitiendo separar las proteínas según su afinidad por la resina de níquel, colectando fracciones diferenciadas según la fuerza de interacción con la columna.

La elución de las proteínas se monitorizó mediante absorbancia UV/Vis (280 nm) para identificar las fracciones de interés y optimizar su recuperación. Estas fracciones se analizaron posteriormente mediante SDS-PAGE, cargando 20 µL de muestra con Protein Loading Buffer 6X tras desnaturalización térmica, lo que permitió identificar aquellas que contenían la proteína diana con mayor pureza relativa.

Las fracciones que mostraron presencia de la proteína de interés según el análisis por SDS-PAGE se combinaron en un único lote para maximizar el rendimiento final. Estas muestras se introdujeron en una membrana de diálisis adaptada al peso molecular de cada proteína. Posteriormente, se añadió proteasa TEV (1 mg/mL) en una proporción aproximada 1:25, con el objetivo de escindir la etiqueta His-tag en el sitio de reconocimiento específico. La diálisis se realizó en 2 L de tampón de diálisis durante aproximadamente 12 horas a 4 °C con agitación suave.

Tras la diálisis y la digestión con proteasa TEV, la muestra se cargó nuevamente en una columna de afinidad IMAC para separar la proteína de interés, ya digerida, de aquellos componentes que conservaban la etiqueta de histidinas. Bajo estas condiciones, la proteína objetivo que ha sido digerida, al carecer de la etiqueta, no se une a la resina de la columna y se recupera en la fracción de flujo no retenido, mientras que las proteínas no digeridas, la cola His liberada y la propia TEV (que también contiene una cola de histidinas) permanecen unidas a la columna.

Para evaluar la eficiencia de digestión y la pureza final, se analizaron mediante SDS-PAGE las fracciones correspondientes al material pre-dializado, la fracción retenida en la columna y el flujo no retenido. Este análisis confirmó que la proteína de interés se encontraba mayoritariamente en la fracción de flujo no retenido. La cuantificación proteica se realizó, cuando fue posible, mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Este método se basa en el cambio de absorbancia del colorante Coomassie Brilliant Blue al unirse a proteínas, permitiendo estimar su concentración mediante la comparación con una recta patrón generada a partir de concentraciones conocidas de BSA. Finalmente, las muestras se concentraron mediante centrifugación utilizando filtros centrífugos a 5.000 G y se almacenaron a −80 ºC hasta su uso en experimentos posteriores.

3.6. Ensayos de interacción proteína–proteína y proteína–ADN

Para caracterizar la capacidad de unión al ADN y la posible formación de complejos regulatorios, se realizaron ensayos de interacción proteína–ADN en condiciones nativas utilizando proteínas recombinantes purificadas y fragmentos de ADN específicos, evaluando la formación de complejos mediante cambios en la movilidad electroforética (Goshima et al., 1990).

Los complejos proteína–ADN se detectaron mediante ensayos de retardo de movilidad en geles de agarosa al 1 % (10 g/L de agarosa) en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA), incorporando colorante SYBR RED para visualizar el ADN y Ladder VII como referencia de tamaño. Las muestras de 20 µL se incubaron brevemente a temperatura ambiente, se cargaron con Tritrack DNA loading dye y se realizó la electroforesis a 100 V hasta lograr una separación adecuada de las bandas, permitiendo identificar el ADN libre y los complejos por cambios en la migración.

Se evaluó la dependencia de la interacción proteína–ADN respecto a la concentración mediante ensayos de desplazamiento electroforético (EMSA) (Hellman & Fried, 2007) en geles de poliacrilamida nativos al 8–9 %, que permiten separar complejos sin desnaturalizar proteínas ni ADN. Se cargaron 12 µL por pocillo mezclando ADN con distintas concentraciones de proteína en tampón PBS, incluyendo controles de ADN solo. La electroforesis se realizó a 80 V a temperatura ambiente y los geles se tiñeron con SYBR RED, permitiendo identificar ADN libre y complejos proteína–ADN y analizar la formación de complejos según la concentración proteica.

Los geles de agarosa y poliacrilamida se visualizaron mediante exposición a fluorescencia utilizando un equipo equivalente al Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad). En el caso de los geles de poliacrilamida, la tinción con SYBR RED se realizó tras la electroforesis, mientras que en los geles de agarosa el colorante se añadió durante la preparación del gel. Finalmente, las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante software ImageJ y Gel Analyzer para evaluar la migración del ADN y la formación de complejos proteína–ADN en función de las condiciones de ensayo.

3.7. Ensayo de acetilación in vitro

El ensayo de acetilación se llevó a cabo siguiendo un protocolo previamente descrito (Carabetta et al., 2019). Brevemente, se incubaron 3 µg de la enzima acetiltransferasa (YfmK) con 5 µg de la proteína sustrato en presencia de 25 µM de acetil-CoA durante 2 h a 37 °C.

3.8. Cristalografía de proteínas

La cristalización se realizó a partir de las proteínas recombinantes previamente purificadas, mezclándolas con distintas soluciones precipitantes y tampones de kits comerciales que proporcionan gradientes de sal, pH y componentes orgánicos para favorecer la nucleación y el crecimiento cristalino. Las gotas se prepararon en placas mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada y se incubaron en condiciones controladas hasta la aparición de cristales, que posteriormente se seleccionaron y enviaron al Sincrotrón ALBA (Barcelona) para su análisis estructural (Becerra et al., 2025; McPherson & Gavira, 2014).

4. RESULTADOS

4.1. Modelado estructural y análisis de similitud proteica

Se generaron modelos estructurales tridimensionales de YonN y HBsu mediante predicción computacional utilizando AlphaFold, así como modelos de los complejos YonN–ADN, YonN–ADN–AimR y AimR–ADN. Los modelos correspondientes a proteínas individuales presentaron valores elevados de confianza estructural (pLDDT > 90) en sus secuencias, mientras que los complejos con ADN mostraron valores inferiores en las regiones implicadas en la interacción, especialmente en las zonas de contacto directo con el ADN (90 > pLDDT > 70), debido a las limitaciones en el tamaño de la muestra se prescindió de la realización de análisis estadísticos.

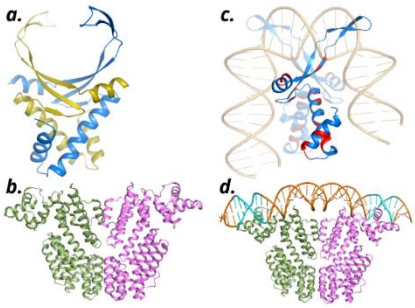


Figura 7. Representación estructural de YonN y AimR: (a) dímero de YonN (cadena A azul/cadena B amarillo); (b) dímero de AimR (cadena A verde/cadena B rosa); (c) YonN unido a ADN con lisinas conservadas resaltadas en rojo; (d) AimR unido a ADN con sitios de unión específicos resaltados en cian.

El modelo de YonN mostró una organización dimérica compacta en la que ambas cadenas polipeptídicas pudieron diferenciarse claramente (Figura 7a). La disposición general de la estructura presentó una arquitectura compatible con proteínas de unión al ADN. Por su parte, el modelo estructural de AimR mostró igualmente una conformación dimérica bien definida, consistente con la estructura previamente descrita para esta proteína (Figura 7b).

En el complejo YonN–ADN, la proteína se dispuso rodeando parcialmente la doble hélice, observándose varios residuos de lisina expuestos hacia la superficie de interacción (Figura 7c). Estas lisinas se localizaron en posiciones conservadas respecto a HBsu. En contraste, el complejo AimR–ADN presentó regiones de interacción más localizadas y definidas sobre la doble hélice, observándose zonas concretas de contacto entre la proteína y el ADN (Figura 7d).

Finalmente, el alineamiento de secuencia entre YonN y HBsu mostró un 68,5 % de identidad, indicando un elevado grado de similitud entre ambas proteínas a nivel primario (Figura 8).

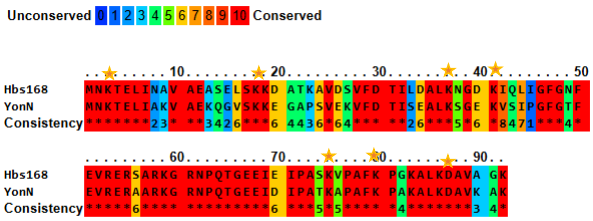


Figura 8. Alineamiento de las secuencias de las proteínas HBsu y YonN. Los residuos en color rojo representan las regiones de mayor conservación y en azul las de menor, marcándose con estrellas las lisinas descritas que se acetilan en HBsu.

4.2. Clonación, selección de clones y obtención de cepas de expresión

Los genes de interés correspondientes a YonN, YfmK y HBsu fueron amplificados de forma exitosa mediante PCR a partir de ADN genómico de *B. subtilis* 168 utilizando primers específicos diseñados para su clonación en el vector de expresión pLICSGC1. Tras la obtención de los fragmentos amplificados, estos fueron insertados en el vector y posteriormente transformados en células competentes de *E. coli DH5α*.

Las transformaciones produjeron colonias viables en placas selectivas suplementadas con el antibiótico correspondiente, observándose un crecimiento bacteriano homogéneo y sin evidencias visibles de contaminación entre las distintas construcciones. La presencia de colonias aisladas permitió seleccionar múltiples candidatos independientes para cada clonación (Figura 9).

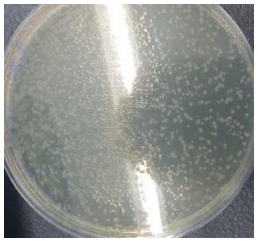


Figura 9. Placa de cultivo con colonias de *E. coli DH5α* obtenidas tras la transformación con el vector de expresión de la proteína YfmK. Se observa el crecimiento de colonias aisladas sobre medio sólido selectivo, indicando la correcta incorporación del plásmido tras el choque térmico.

Posteriormente, se realizó un análisis mediante PCR de colonias sobre diferentes transformantes seleccionados. En todos los casos se obtuvieron amplificaciones compatibles con el tamaño esperado de los insertos, identificándose al menos dos clones positivos independientes por cada construcción generada (Figura 10). Estos resultados confirmaron preliminarmente la correcta incorporación de los genes de interés en el vector de expresión.

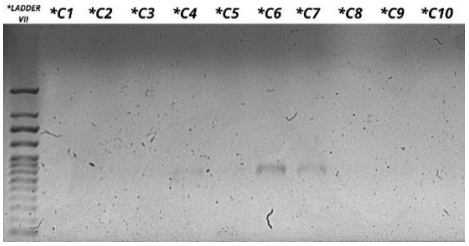


Figura 10. Análisis por PCR de colonias de los transformantes de *E. coli DH5a* para la construcción del vector de expresión de la proteína YfmK. Se muestran los productos de amplificación de diez colonias seleccionadas (C1-C10), junto al patrón de migración Ladder VII. La presencia de bandas en los carriles C4, C6 y C7 confirma la correcta incorporación del inserto en dichas colonias.

La identidad de los constructos positivos fue posteriormente verificada mediante secuenciación Sanger. El análisis de las secuencias obtenidas confirmó la correcta inserción de los genes clonados y la ausencia de mutaciones, deleciones o alteraciones detectables en las regiones analizadas.

Finalmente, los plásmidos verificados se transformaron en la cepa de expresión *E. coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIL*. Las transformaciones dieron lugar nuevamente a colonias viables bajo condiciones selectivas, y las pruebas posteriores de expresión confirmaron que los constructos obtenidos eran funcionales para la producción de las proteínas recombinantes YonN, HBsu e YfmK.

4.3. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

La expresión heteróloga de YonN, YfmK y HBsu en *Escherichia coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIL* bajo condiciones de autoinducción permitió obtener un crecimiento celular reproducible, con un rendimiento medio de biomasa de aproximadamente 10 g/L de cultivo (Figura 11). Este rendimiento fue consistente entre constructos, sin observarse diferencias relevantes en la acumulación global de biomasa entre las distintas proteínas expresadas, sin embargo, se omitieron los análisis estadísticos por insuficiencia del tamaño muestral.



Figura 11. Biomasa celular recogida compactada tras la centrifugación de los cultivos de expresión proteica.

La purificación de las proteínas recombinantes YonN, YfmK y HBsu mediante cromatografía de afinidad IMAC fue monitorizada combinando el análisis cromatográfico por FPLC con la evaluación de las fracciones obtenidas mediante SDS-PAGE (Figura 13). Las condiciones de purificación empleadas fueron seleccionadas teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente en los ensayos de estabilidad térmica (Thermofluor), realizados con las tres proteínas recombinantes, con el objetivo de identificar condiciones que favorecieran una mayor estabilidad estructural durante la purificación y los ensayos posteriores.

Como ejemplo representativo en el caso de YonN, se observaron diferencias claras entre las condiciones analizadas, detectándose un aumento de la estabilidad térmica en determinadas condiciones tampón. La condición C04 (500mM NaCl, Hepes pH 7.5) (Anexo 1. Tabla 2) mostró un desplazamiento positivo de la temperatura de fusión respecto a la condición A01 (150mM NaCl, 100mM AcNa pH 4.5), pasando de aproximadamente 42 °C a 54 °C, correspondiente a un incremento cercano a 12 °C en la estabilidad térmica de la proteína (Figura 12). Esta condición fue utilizada posteriormente en los ensayos de purificación y caracterización de YonN.

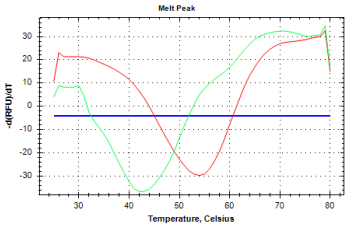


Figura 12. Ensayo de estabilidad térmica (Thermofluor) de la proteína YonN. Se representan los picos de fusión (Melt Peak) respecto a la temperatura. La recta verde corresponde a la condición A01 (Tm=42ºC) y la recta roja a la condición C04 (Tm=54ºC).

En el caso de YonN, el cromatograma mostró un pico de elución localizado en la fase final del gradiente (Figura 13 a). El análisis por SDS-PAGE reveló la aparición de una banda definida en las fracciones A7–A9, localizada en la región inferior del gel y compatible con el bajo peso molecular esperado para la proteína. La intensidad de la banda aumentó progresivamente entre las fracciones centrales del pico, indicando un enriquecimiento gradual de la proteína recombinante.

Para YfmK, el cromatograma presentó varios eventos de elución diferenciados (Figura 13 b). Las primeras fracciones recogidas (A11–A15) mostraron escasa presencia de la proteína diana, mientras que a partir de las fracciones A16–A22 apareció una banda intensa y bien definida compatible con YfmK. Estas bandas coincidieron con el incremento de la señal cromatográfica asociado al gradiente de elución, observándose además una reducción notable de bandas secundarias en las fracciones más enriquecidas, lo que indica una elevada pureza relativa de la proteína obtenida.

La proteína HBsu presentó el mayor rendimiento de purificación de las tres proteínas analizadas (Figura 13 c). El cromatograma mostró un pico de elución amplio y claramente definido, mientras que el SDS-PAGE reveló bandas extremadamente intensas en las fracciones A3–A7 situadas en la región inferior del gel, coherentes con el pequeño tamaño molecular característico de las proteínas tipo HU de *B. subtilis*, usualmente de 9 a 15 kDa. En las fracciones centrales del pico cromatográfico se observó la mayor concentración de proteína, mientras que en las fracciones más tardías disminuyó progresivamente la intensidad de la banda principal junto con la presencia de contaminantes.

En conjunto, la correspondencia entre los picos cromatográficos y las bandas observadas en SDS-PAGE confirmó el éxito del proceso de purificación para las tres proteínas recombinantes, obteniéndose fracciones enriquecidas y con un elevado grado de pureza relativa adecuadas para los ensayos posteriores (Figura 13).

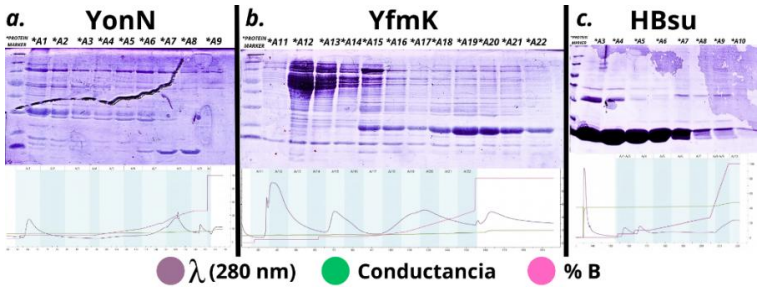


Figura 13. Perfiles de elución y análisis electroforético de la purificación de las proteínas YonN (a.), YfmK (b.) y HBsu (c.). Se muestran los cromatogramas obtenidos mediante cromatografía de afinidad (FPLC) detallando la absorbancia a 280 nm (línea púrpura), la conductancia (línea verde) y el gradiente de eluyente (% B, línea rosa). En la parte superior de cada panel, se presenta el análisis por SDS-PAGE de las fracciones recolectadas durante los picos de elución, indicando el patrón de peso molecular y la numeración de las fracciones correspondientes.

Tras el tratamiento con proteasa TEV y el posterior proceso de diálisis, el análisis mediante SDS-PAGE mostró un cambio evidente en el patrón de migración de HBsu, compatible con la eliminación de la etiqueta His-tag (Figura 14). La comparación entre la proteína no digerida y las muestras sometidas a digestión reveló un desplazamiento de la banda principal hacia una posición de mayor movilidad electroforética, indicando una disminución del peso molecular aparente tras la escisión de la etiqueta de afinidad.

Las muestras digeridas presentaron además un perfil más definido y limpio respecto a la proteína inicial, observándose una reducción de bandas inespecíficas y contaminantes asociados al proceso de purificación previo. Este cambio en el patrón electroforético confirma que la digestión con TEV se produjo de manera eficiente y permitió obtener una forma procesada de HBsu más homogénea. Por otra parte, en la fracción correspondiente a los restos de digestión se detectaron bandas adicionales atribuibles a la propia proteasa TEV y a fracciones de HBsu no digerida que permanecieron retenidas durante el proceso de separación. La acumulación de estas especies en la fracción residual indica que parte del material asociado a proteínas no procesadas o contaminantes quedó efectivamente separado de la proteína diana (Figura 14).

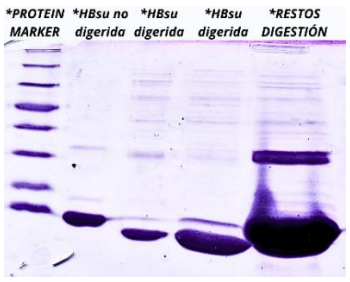


Figura 14. Gel de poliacrilamida mostrando el proceso de digestión de la proteína HBsu. Se comparan muestras no digeridas, digeridas y restos de la reacción.

El procesamiento posterior mediante cromatografía de exclusión molecular permitió un refinamiento adicional del perfil proteico. Las fracciones obtenidas tras este paso mostraron una reducción notable de bandas accesorias contaminantes, quedando principalmente una señal dominante en las fracciones intermedias (A3), mientras que las fracciones finales carecieron de señal detectable. Este comportamiento fue consistente con la eliminación de agregados y contaminantes de mayor tamaño, obteniéndose muestras más homogéneas adecuadas para análisis posteriores (Figura 15).

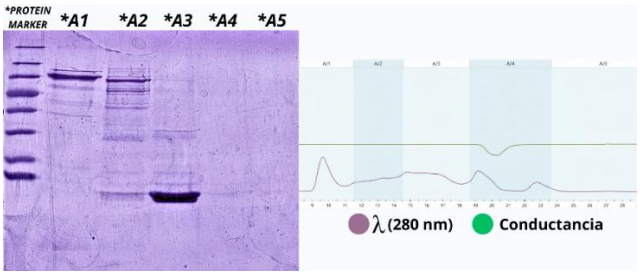


Figura 15. Seguimiento de la purificación de la proteína HBsu mediante cromatografía de exclusión molecular (FPLC). Se muestran las fracciones eluidas de A1 a A5 analizadas por SDS-PAGE junto a su respectivo cromatograma, donde se registra la absorbancia (280 nm) y la conductancia.

En términos de detección espectrofotométrica, YonN y HBsu no mostraron absorbancia apreciable a 280 nm una vez eliminada la etiqueta His-tag, siendo la señal observada en etapas iniciales atribuible exclusivamente a dicha etiqueta debido a la composición de estas proteínas. En ausencia de ésta, la monitorización por FPLC a 280 nm no resultó informativa para estas proteínas, aunque su presencia y comportamiento en las distintas etapas de purificación fue confirmada mediante SDS-PAGE (Figura 15).

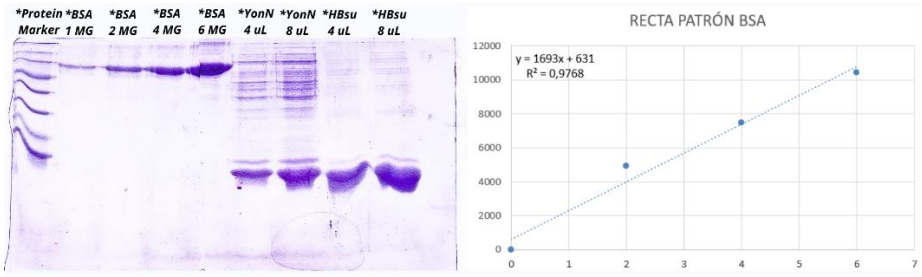


Figura 16. Cuantificación de las proteínas YonN y HBsu mediante SDS-PAGE. Se emplea una curva de calibración con diferentes cantidades de BSA (1 a 6 mg).

De forma consistente, la cuantificación proteica no pudo resolverse de manera fiable mediante absorbancia ni mediante el método Bradford utilizando BSA como estándar para todas las proteínas. En el caso de YonN y HBsu, el método Bradford no proporcionó resultados reproducibles, por lo que su concentración se determinó mediante un enfoque alternativo basado en SDS-PAGE, empleando cantidades conocidas de BSA como referencia e integrando el área de las bandas mediante análisis densitométrico con ImageJ (Figura 16). A partir de este procedimiento se estimaron concentraciones de 8,77 mg/mL para YonN y 15,37 mg/mL para HBsu.

En contraste, las proteínas YfmK y AimR sí pudieron cuantificarse de forma fiable mediante el método Bradford con BSA como patrón, obteniéndose concentraciones de 26,21 mg/mL para YfmK y 25 mg/mL para AimR.

4.4. Resultados de cristalización de proteínas recombinantes

Los ensayos de cristalización realizados con las proteínas recombinantes YonN, HBsu y YfmK mostraron comportamientos claramente diferenciados en función de la proteína analizada, con dos estados principales observados de forma recurrente: agregación proteica y formación de cristales con morfologías definidas (Figura 17).

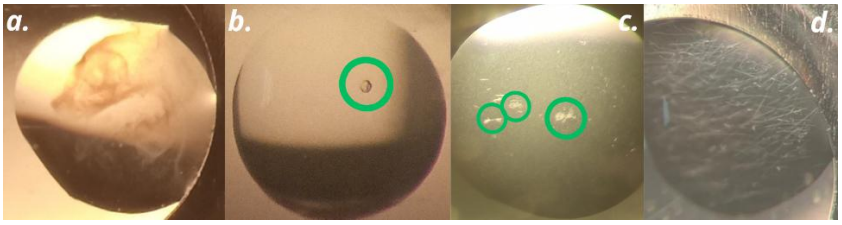


Figura 17. Micrografías de ensayos de cristalización: (a) proteína en estado de agregación; (b) cristal poliédrico; (c) cristales en forma agujas unidas; (d) cristales en forma agujas.

YonN no mostró formación de cristales en ninguna de las condiciones ensayadas, observándose únicamente agregados proteicos amorfos sin evidencias de nucleación o crecimiento cristalino organizado (Figura 17 a).

Por su parte, YfmK formó cristales con morfología poligonal, más compactos y geométricamente definidos, con caras planas y contornos regulares característicos de un crecimiento cristalino estable (Figura 17 b).

En contraste, HBsu presentó cristales bien definidos con morfología alargada tipo aguja, tanto como estructuras individuales finas como agrupaciones con aspecto de ramillete (Figura 17 c y d).

Con el objetivo de evaluar la naturaleza y calidad de los cristales obtenidos, muestras de HBsu y YfmK fueron analizadas posteriormente en el sincrotrón ALBA, concretamente en la beamline XAIRA. Los cristales obtenidos para HBsu correspondieron efectivamente a cristales proteicos, aunque presentaron una capacidad de difracción limitada, alcanzando únicamente una resolución aproximada de 20 Å, insuficiente para un análisis estructural detallado. Por el contrario, los cristales obtenidos para YfmK no correspondieron a proteína, sino a cristales de sal generados bajo las condiciones de cristalización ensayadas.

En conjunto, los resultados evidencian un comportamiento diferencial entre las proteínas estudiadas, con ausencia total de cristalización ordenada en YonN, frente a la formación de cristales bien definidos en HBsu y YfmK. Además, se observa una clara distinción morfológica entre ambas proteínas cristalizables, con estructuras tipo aguja en HBsu y cristales poligonales en YfmK, lo que refleja diferencias intrínsecas en su capacidad de empaquetamiento cristalino.

4.5. Análisis de la interacción proteína–ADN mediante ensayos EMSA

4.5.1. Influencia del tipo de ADN en la interacción con YonN

Con el objetivo de evaluar la capacidad de unión de YonN a diferentes sustratos de ADN y determinar si existía preferencia por determinadas conformaciones estructurales, se realizaron ensayos EMSA empleando ADN no curvado (NC), ADN curvado (Cu) y el fragmento RicA (Figura 18).

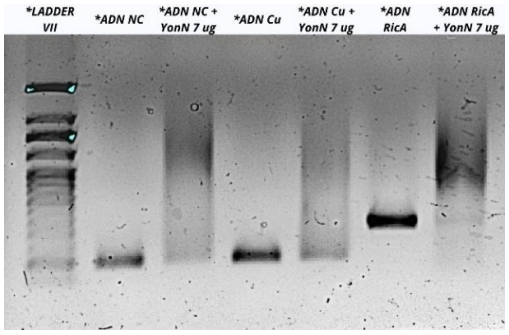


Figura 18. Estudio de especificidad de YonN (7 µg) frente a diferentes conformaciones de ADN: No Curvado (NC), Curvado (Cu) y RicA. Los carriles pares muestran el desplazamiento del ADN tras la adición de la proteína. *(Versión extendida en el anexo)*

En ausencia de proteína, cada fragmento presentó una movilidad electroforética característica y bandas bien definidas. Tras la adición de 7 µg de YonN, todos los fragmentos mostraron alteraciones en su migración compatibles con la formación de complejos proteína–ADN. El ADN no curvado presentó el desplazamiento visible pasando de 543.9 px a 370.3 px, lo que corresponde a una diferencia aproximada de 173.6 px respecto al control.

En el caso del ADN curvado, el ADN libre se localizó en 535.5 px y, tras añadir YonN, se observaron dos bandas. Una de ellas permaneció próxima a la posición original en 531.3 px, correspondiente al ADN libre, mientras que la segunda banda se detectó en 305.9 px, mostrando un desplazamiento de aproximadamente 229.6 px.

Por su parte, el fragmento RicA presentó una banda de ADN libre en 490.7 px y una banda desplazada en 412.3 px en presencia de YonN, correspondiente a una diferencia de aproximadamente 78.4 px.

En conjunto, todos los sustratos analizados mostraron desplazamientos superiores a 50 px en al menos una de las poblaciones detectadas, indicando que YonN es capaz de alterar significativamente la movilidad electroforética de diferentes tipos de ADN. Además, en todos los carriles que contenían YonN se observó un patrón de fluorescencia difusa distribuido a lo largo del gel, acompañado de acumulación de señal en los pocillos de carga, dificultando la visualización de complejos discretos y homogéneos (Figura 18).

Estos resultados confirmaron la capacidad de YonN para interaccionar con distintos fragmentos de ADN, por lo que posteriormente se comparó su comportamiento con el de HBsu, proteína HU-like de *B. subtilis* estructuralmente relacionada.

4.5.2. Comparación de la unión al ADN entre YonN y HBsu

Con el fin de comparar el comportamiento de YonN con una proteína HU-like caracterizada, se analizaron los patrones de unión al fragmento RicA utilizando distintas concentraciones de YonN y HBsu (Figura 19).

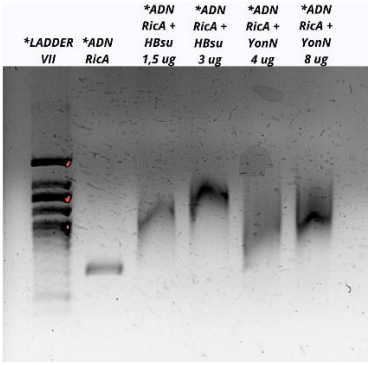


Figura 19. Ensayo EMSA en gel de agarosa comparando la afinidad del fragmento RicA por las proteínas HBsu (1.5 y 3 µg) y YonN (4 y 8 µg), incluyendo el patrón de migración Ladder VII. *(Versión extendida en el anexo)*

El ADN libre presentó una banda definida en 441.6 px. En presencia de HBsu, se observó un desplazamiento claro y dependiente de la concentración. Con 1.5 µg de proteína, la banda se localizó en 336 px, correspondiente a una diferencia de aproximadamente 105.6 px respecto al control. Al incrementar la concentración hasta 3 µg, la banda se desplazó hasta 304.2 px, aumentando la diferencia hasta 137.4 px.

YonN también produjo un desplazamiento de la movilidad del fragmento RicA respecto al ADN libre. A 4 µg, la banda se situó en 358.2 px, mostrando un desplazamiento de 83.4 px, mientras que a 8 µg se registró en 344.4 px, incrementando la diferencia hasta 97.2 px respecto al control.

Aunque ambas proteínas alteraron la movilidad del ADN, el incremento del retardo fue más progresivo en HBsu. Además, las bandas correspondientes a HBsu aparecieron más definidas y homogéneas, mientras que los carriles de YonN presentaron nuevamente un patrón de fluorescencia difusa distribuido por encima de las bandas y acumulación de señal en los pocillos de carga (Figura 19).

Las diferencias observadas entre ambas proteínas motivaron la realización de ensayos de competencia utilizando múltiples fragmentos de ADN, con el objetivo de evaluar posibles preferencias de unión y comparar el comportamiento de YonN y HBsu en condiciones competitivas.

4.5.3. Ensayos de competencia y especificidad de unión

La especificidad de unión de YonN y HBsu se evaluó mediante ensayos EMSA utilizando simultáneamente los fragmentos ADN Zenit y ADN RicA (Figura 20).

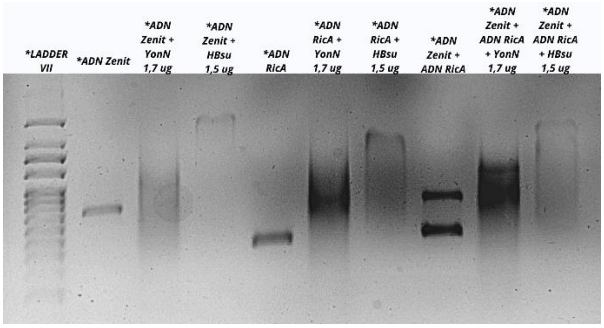


Figura 20. Comparativa de unión individual y competitiva de YonN (1.7 µg) y HBsu (1.5 µg) con los sustratos ADN Zenit y ADN RicA. Se detallan los desplazamientos de banda y la formación de complejos nucleoproteicos. Se incluye el patrón de migración Ladder VII. *(Versión extendida en el anexo)*

En ausencia de proteína, ambos fragmentos migraron como bandas claramente diferenciadas, localizándose Zenit en 286 px y RicA en 326.7 px, con una separación aproximada de 40.7 px entre ambas bandas.

Cuando los fragmentos fueron incubados individualmente con YonN, ambos mostraron desplazamientos respecto a sus posiciones libres. Zenit pasó de 286 px a 255.2 px, mostrando una diferencia de aproximadamente 30.8 px, mientras que RicA se desplazó desde 326.7 px hasta 272.25 px, correspondiente a una diferencia aproximada de 54.45 px.

En condiciones de competencia, donde ambos fragmentos se encontraban en la misma muestra, se observó una única banda en 261.25 px, localizada entre las posiciones correspondientes a los ADN libres y sin resolución diferenciada entre ambos sustratos.

HBsu produjo desplazamientos más marcados en los ensayos individuales. Zenit pasó de 286 px a 150.15 px, mostrando una diferencia de aproximadamente 135.85 px, mientras que RicA se desplazó desde 326.7 px hasta 251.9 px presentando un patrón difuso de fluorescencia, correspondiente a un cambio de aproximadamente 74.8 px respecto al control.

En el ensayo de competencia con HBsu, la mezcla de ambos ADNs generó una banda difusa, sin resolución independiente de ambos fragmentos (Figura 20).

En todos los carriles que contenían YonN se observó fluorescencia retenida en los pocillos de carga y un patrón difuso a lo largo del gel. Aunque este comportamiento también se detectó parcialmente en HBsu, las bandas obtenidas con esta proteína fueron más definidas y homogéneas.

Dado que YonN podría participar en procesos regulatorios más complejos dentro de la regulación fágica, se evaluó posteriormente su posible relación funcional con AimR mediante ensayos de interacción proteína–ADN en presencia de ambas proteínas.

4.5.4. Análisis de la interacción de YonN con AimR

Se analizó la interacción de YonN y AimR con el fragmento ADN Plus, tanto de forma individual como en combinación, con el objetivo de determinar posibles efectos sobre la formación de complejos proteína–ADN (Figura 21).

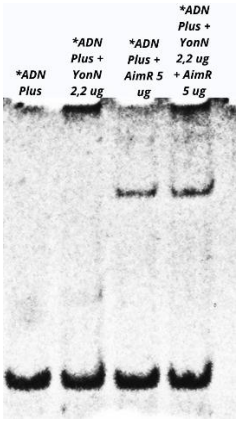


Figura 21. Análisis EMSA de la interacción de YonN (2.2 µg) y AimR (5 µg) con el fragmento de ADN Plus. Se muestran carriles con proteínas individuales y en combinación para observar el desplazamiento de las bandas de ADN libre. *(Versión extendida en el anexo)*

El ADN libre presentó una banda definida localizada en 754.8 px. En presencia de YonN (2.2 µg), la banda se detectó en 756.5 px, con una diferencia de aproximadamente 1.7 px en sentido opuesto respecto al control, indicando ausencia de un desplazamiento.

AimR produjo la aparición de una segunda banda retardada. Además de la banda correspondiente a ADN libre situada en torno a 753 px, se observó una banda retardada en 256.7 px, lo que supone una diferencia aproximada de 502 px respecto al ADN libre y evidencia la formación de complejos proteína–ADN estables.

Cuando YonN y AimR se incubaron junto con el ADN, el patrón observado fue prácticamente equivalente al obtenido con AimR en solitario. La banda retardada apareció en 254.15 px, obteniéndose una diferencia superior a 500 px respecto al ADN libre y sin detectarse nuevas bandas o desplazamientos adicionales (Figura 21).

En todos los carriles que contenían proteínas se observó retención de fluorescencia en los pocillos y una ligera señal difusa distribuida a lo largo del gel. La persistencia de este patrón en múltiples ensayos llevó a analizar de forma más detallada el efecto de la concentración de YonN sobre la movilidad electroforética y la naturaleza de la fluorescencia observada.

4.5.5. Análisis de la dependencia de la concentración de YonN

Con el objetivo de determinar la concentración óptima de YonN para los ensayos EMSA y analizar el origen del patrón de fluorescencia difusa observado en experimentos previos, se realizaron ensayos de titración utilizando el fragmento RicA y concentraciones crecientes de proteína (Figura 22).

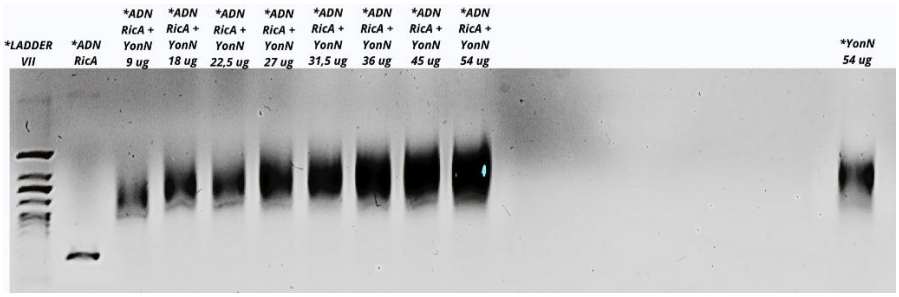


Figura 22. Titración de la proteína YonN (9 a 54 µg) con el fragmento de ADN RicA. El último carril muestra el control de la proteína YonN (54 µg) en ausencia de ADN exógeno. Se incluye el patrón de migración Ladder VII. *(Versión extendida en el anexo)*

El ADN libre presentó una banda única localizada en 407.4 px. A bajas concentraciones de YonN se observó un desplazamiento progresivo compatible con la formación de complejos proteína–ADN. Con 9 µg de proteína, la banda se localizó en 304.5 px, mostrando una diferencia aproximada de 102.9 px respecto al ADN libre. Al aumentar la concentración hasta 18 µg, la banda pasó a 281.4 px, incrementando el desplazamiento hasta aproximadamente 126 px.

En concentraciones intermedias, como 22.5 µg y 27 µg, las bandas se localizaron en 277.2 px y 270.9 px respectivamente, manteniéndose diferencias superiores a 130 px respecto al control. Sin embargo, a partir de este punto la movilidad dejó de mostrar una progresión claramente dependiente de la concentración. Las posiciones registradas en 31.5, 36, 45 y 54 µg variaron entre 257 y 269 px, con diferencias reducidas entre condiciones consecutivas.

Paralelamente, se observó un incremento progresivo de la intensidad de la fluorescencia difusa a medida que aumentaba la concentración de YonN. Este patrón se hizo especialmente evidente en las concentraciones más elevadas, donde la señal fluorescente predominó sobre la definición de bandas discretas y se extendió desde los pocillos de carga hacia el interior del gel.

De manera destacada, el carril correspondiente a YonN en ausencia de ADN exógeno presentó una banda fluorescente localizada en 261.97 px, una posición muy similar a la observada en presencia de ADN a altas concentraciones de proteína, como 257.77 px para 45 µg y 266.17 px para 54 µg. Además, la intensidad y distribución de la fluorescencia en el carril de YonN sola fueron comparables a las observadas en las concentraciones más elevadas incubadas con ADN (Figura 22).

La detección de una señal fluorescente prácticamente equivalente entre YonN sola y YonN incubada con ADN sugirió la posible presencia de material fluorescente asociado a la proteína purificada, por lo que se diseñaron experimentos adicionales para evaluar si YonN presentaba ADN endógeno retenido proveniente de la purificación de la proteína.

4.5.6. Evaluación de la presencia de ADN co-purificado con YonN

Con el fin de analizar la naturaleza de la señal fluorescente asociada a YonN, se evaluó el efecto de distintas condiciones desnaturalizantes sobre la movilidad electroforética de la proteína (Figura 23).

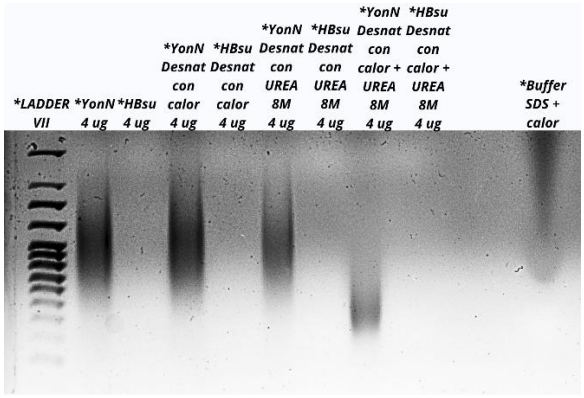


Figura 23. Análisis del efecto de agentes desnaturalizantes (calor y urea 8M) sobre la movilidad de las proteínas YonN y HBsu (4 µg). Se incluye el patrón de migración Ladder VII y el buffer SDS de forma independiente. *(Versión extendida en el anexo)*

En condiciones nativas, en YonN se detectó una banda en 302.32 px acompañada de un patrón de fluorescencia difusa distribuido a lo largo del gel. La aplicación individual de calor no produjo un cambio relevante en la movilidad, registrándose la banda en 296.52 px. De forma similar, la incubación con urea 8 M desplazó la banda hasta 310.3 px.

Sin embargo, la combinación de calor y urea 8 M provocó un cambio marcado en el patrón de migración, desplazando la banda hasta 485.75 px, lo que supone una diferencia aproximada de 183.4 px respecto a la condición nativa. Paralelamente, el patrón difuso observado en las condiciones anteriores se redujo notablemente tras el tratamiento combinado (Figura 23).

En contraste, HBsu no presentó señales fluorescentes bajo las mismas condiciones experimentales. Estos resultados indicaron un comportamiento diferencial entre ambas proteínas frente a los tratamientos desnaturalizantes.

Debido a que la eliminación de la señal asociada a YonN únicamente se consiguió bajo condiciones fuertemente desnaturalizantes, los experimentos de modificación postraduccional se realizaron utilizando únicamente HBsu como modelo experimental.

4.5.7. Evaluación de la acetilación y su efecto en la unión al ADN

Se analizó el efecto de la acetilación sobre la capacidad de unión al ADN de HBsu utilizando el fragmento RicA como sustrato (Figura 24).

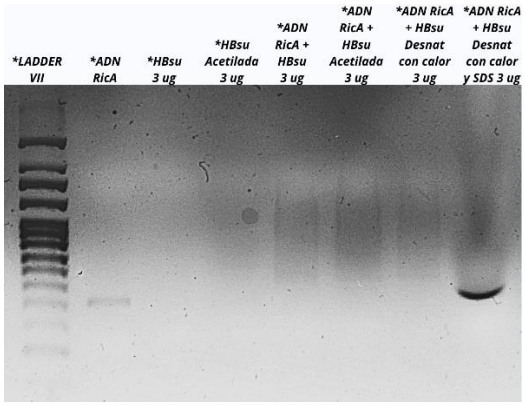


Figura 24. Ensayo EMSA evaluando la unión de HBsu (3 µg) al ADN RicA bajo condiciones de modificación (acetilación) y desnaturalización (calor y SDS), incluyendo además el patrón de migración Ladder VII. *(Versión extendida en el anexo)*

El ADN libre presentó una banda definida en 501.2 px, y en presencia de HBsu nativa (3 µg), la banda se localizó en 380.62 px, correspondiente a una diferencia aproximada de 120.6 px.

La proteína HBsu acetilada mostró un patrón de migración muy similar, detectándose la banda en 377.12 px y manteniendo un desplazamiento de aproximadamente 124.1 px respecto al ADN libre. La diferencia entre HBsu nativa y acetilada fue reducida, cercana a 3.5 px. Por otra parte, el tratamiento térmico de HBsu produjo igualmente una movilidad comparable, situándose la banda en 376.25 px, con una diferencia aproximada de 125 px respecto al ADN libre.

Por el contrario, la condición combinada de calor y SDS dio lugar a la aparición de una banda definida que se localizó en 498.75 px correspondiendo a ADN no unido (Figura 24).

5. DISCUSIÓN

El presente trabajo ha abordado la caracterización estructural, bioquímica y funcional de las proteínas YonN, HBsu, YfmK y AimR, centrado en la interacción proteína–ADN y en la interpretación de los ensayos EMSA. La estrategia experimental permitió comparar YonN con proteínas HU-like como HBsu, una familia de proteínas nucleoidales estructuralmente conservadas, pero funcionalmente diversa, implicada en la compactación del ADN y en la regulación génica en bacterias y fagos (Dame, 2005; Schwab & Dame, 2025; Stojkova et al., 2019), mediante aproximaciones estructurales y bioquímicas complementarias.

El análisis estructural *in silico* (Jumper et al., 2021) mostró una identidad del 68,5 % entre YonN y HBsu, lo que concuerda con lo descrito en la literatura (Collier et al., 2011), sugiriendo conservación del plegamiento típico HU-like (Vis et al., 1995). Sin embargo, en esta familia la conservación estructural no implica equivalencia funcional, ya que variaciones en regiones flexibles pueden afectar significativamente la afinidad por el ADN y la formación de complejos nucleoproteicos (Schwab & Dame, 2025; Stojkova et al., 2019). Además, se identificaron diferencias en la distribución de residuos aromáticos, relevantes para la interpretación de los datos espectroscópicos y de purificación.

En este contexto, la ausencia de triptófano y el bajo contenido en tirosina explican la falta de señal intrínseca a 280 nm tras la eliminación de la His-tag, limitando su detección mediante UV convencional, fenómeno ya descrito en proteínas ricas en interacciones con ácidos nucleicos (Niesen et al., 2007). La señal observada en las etapas iniciales se atribuye a la presencia de un residuo de tirosina (Y) dentro de la secuencia canónica de reconocimiento de la proteasa TEV (ENLYFQG/S) unida a la proteína, lo que explicaría la desaparición de la absorbancia tras la digestión y la eliminación de dicha etiqueta (Kapust et al., 2001). Este comportamiento concuerda con los cromatogramas de FPLC, donde no se detectan picos relevantes a 280 nm tras el procesamiento proteolítico, a pesar de confirmarse la presencia de proteína por SDS-PAGE, evidenciando una limitación intrínseca de la detección UV en proteínas HU-like.

Por otra parte, la expresión heteróloga de YonN, YfmK y HBsu en *E. coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIL* mediante autoinducción utilizando medio AIZY produjo un rendimiento adecuado de biomasa. Estos resultados fueron consistentes con lo descrito por (Studier, 2005), quien estableció que los sistemas de autoinducción permiten alcanzar altas densidades celulares y una expresión proteica eficiente sin necesidad de inducción manual con IPTG. La estabilidad observada durante la expresión y purificación permitió obtener cantidades suficientes de proteína recombinante para realizar de forma reproducible los ensayos bioquímicos y estructurales posteriores, incluyendo los análisis EMSA, cristalización y estudios de estabilidad térmica.

Asimismo, la optimización de las condiciones de trabajo mediante fluorimetría diferencial de barrido (Thermofluor) (Niesen et al., 2007) permitió seleccionar los buffers más adecuados para proteínas con tendencia a la inestabilidad conformacional, especialmente relevantes en la familia HU-like. En el caso de YonN, se observó un incremento aproximado de 12 °C en la temperatura de fusión bajo condiciones específicas, lo que indica una estabilización significativa del estado plegado. Este aumento se tradujo en una mayor reproducibilidad en purificación y en una mejora general de la calidad de los ensayos posteriores, evidenciando que la estabilidad conformacional es un factor determinante en el estudio de proteínas HU-like in vitro.

Una vez establecidas las condiciones experimentales, los ensayos EMSA permitieron evaluar la interacción de YonN con distintos tipos de ADN. YonN mostró unión a ADN no curvado, curvado y al fragmento RicA, confirmando una capacidad de interacción general independiente de la topología. Sin embargo, se observó una señal aparentemente más intensa en ADN no curvado, en contraste con lo descrito para proteínas HU-like canónicas, que suelen mostrar preferencia por ADN curvado o deformado (Parks et al., 2025).

Esta discrepancia podría reflejar particularidades funcionales de proteínas HU-like codificadas por fagos o, alternativamente, estar influida por la presencia de ADN co-purificado asociado a YonN. En consecuencia, aunque los resultados sugieren un comportamiento menos selectivo que el descrito clásicamente, la determinación de su especificidad estructural requiere estudios adicionales bajo condiciones más controladas.

De hecho, uno de los hallazgos más relevantes y consistentes a lo largo del estudio fue la aparición de un patrón de fluorescencia difusa en todos los ensayos en los que participó YonN. Este patrón dificultó la resolución de complejos discretos y se acompañó de retención de señal en los pocillos de carga. En comparación, HBsu mostró bandas más definidas y desplazamientos progresivos dependientes de concentración, lo que sugiere la formación de complejos más homogéneos y controlados.

Este comportamiento se acentuó en los ensayos de titración, donde el desplazamiento del ADN perdió progresividad a altas concentraciones de proteína, dando lugar a una respuesta no lineal dominada por fluorescencia difusa, compatible con sistemas de unión multivalente y múltiples estados de asociación en equilibrio. La similitud de las señales con y sin ADN exógeno, junto con los ensayos de desnaturalización, en los que solo condiciones fuertemente desnaturalizantes alteraron el comportamiento electroforético de YonN, refuerza la hipótesis de ADN co-purificado, ya que la persistencia de la señal bajo condiciones moderadas sugiere complejos estables y su desaparición parcial bajo condiciones extremas indica dependencia de material genético. En conjunto, estos resultados apoyan la presencia de ADN endógeno asociado a YonN y explican la heterogeneidad observada en los EMSA.

En relación con AimR, no se obtuvieron evidencias claras de una interacción funcional directa con YonN sobre el ADN en las condiciones analizadas. Aunque se detectó retención de material en la parte superior del gel en distintas condiciones, la baja resolución de los complejos impidió discriminar entre interacciones específicas, asociaciones inespecíficas o agregados de alto peso molecular. En conjunto, estos resultados no apoyan una participación directa de YonN en el eje regulador clásico del sistema Arbitrium bajo las condiciones experimentales ensayadas, por lo que cualquier relación funcional entre ambas proteínas debe considerarse hipotética.

De forma global, YonN muestra una elevada capacidad de interacción con el ADN y formación de complejos estables, aunque con un comportamiento más heterogéneo y menos definido que el descrito para proteínas HU-like canónicas. La posible co-purificación de ADN constituye un factor limitante clave para la interpretación de su afinidad, especificidad y estequiometría de unión, lo que impide establecer un modelo funcional definitivo.

A futuro, se propone optimizar la eliminación de ADN co-purificado sin comprometer la estabilidad de YonN, lo que permitiría definir con mayor precisión su afinidad real y descartar efectos de arrastre de material genético en los ensayos funcionales. En paralelo, sería conveniente mejorar la resolución de los EMSA mediante la optimización de condiciones electroforéticas y el uso de sustratos de ADN más homogéneos, con el fin de discriminar mejor posibles preferencias de unión.

Asimismo, se plantea complementar el estudio con técnicas biofísicas en solución, como SEC-MALS o anisotropía de fluorescencia, que permitan determinar de forma más fiable el estado oligomérico de YonN y cuantificar su interacción con el ADN. Finalmente, la obtención de estructuras de YonN en estado libre y en complejo con ADN mediante cristalografía constituiría un paso clave para definir con mayor resolución su modo de interacción y compararlo con otras proteínas HU-like.

Aunque el presente trabajo ha permitido establecer una base experimental sólida sobre el comportamiento de YonN, es necesario considerar varias limitaciones que afectan a la interpretación global de los resultados. En particular, la ausencia de medidas cuantitativas de afinidad en solución y de validación funcional in vivo impide definir con precisión parámetros clave como la constante de disociación o el impacto biológico real de su interacción con el ADN. Asimismo, la posible presencia de ADN co-purificado introduce un factor de complejidad adicional que condiciona la interpretación de los ensayos de interacción. En este contexto, los resultados deben entenderse como una caracterización inicial de una proteína fágica previamente poco explorada, que aporta evidencia relevante sobre su comportamiento molecular, pero que no permite aún definir de forma completa su función biológica dentro del bacteriófago SPβ.

Finalmente, este trabajo amplía la comprensión de las interacciones proteína–ADN en sistemas bacterianos y de la relación virus–hospedador, destacando factores que modulan estos procesos como la estabilidad proteica o la presencia de material genético asociado. Los resultados obtenidos pueden ser relevantes en el contexto del control de infecciones bacterianas y la regulación de la virulencia, al aportar conocimiento básico que podría contribuir al desarrollo futuro de nuevas estrategias terapéuticas frente a bacterias patógenas. En este sentido, el estudio se enmarca en el Objetivo de Desarrollo Sostenible 3, especialmente en las metas relacionadas con la mejora de la salud y la reducción de la mortalidad por enfermedades infecciosas.

6. CONCLUSIONES

En consonancia con los objetivos planteados en este trabajo, se han identificado aspectos clave de YonN como proteína implicada en la organización genómica, permitiendo caracterizar patrones de interacción con el ADN que contribuyen a esclarecer su posible papel regulador dentro del ciclo de vida del fago SPβ.

1. Se ha observado que YonN presenta una elevada capacidad de unión con el ADN, reflejada en la retención de material genético durante los procesos de purificación, el cual persiste incluso bajo condiciones experimentales exigentes. Esta robustez en la formación de complejos refleja un papel estratégico en la interacción con el ADN tanto bacteriano como del fago, superando en estabilidad a la proteína homóloga bacteriana HBsu.

2. Se ha explorado la respuesta de la proteína YonN ante diferentes topologías de ADN, revelando que YonN no muestra una preferencia real por ninguna composición específica. Este fenómeno permite concluir que la proteína ejerce una modulación arquitectónica no selectiva, interviniendo en la organización física del genoma mediante un reconocimiento inespecífico que se demarca de los cánones descritos para otras proteínas de la familia HU-like.

3. A partir del estudio de modificaciones postraduccionales se ha obtenido que la acetilación de residuos de lisina conservados podría desempeñar un papel modulador en la interacción proteína–ADN. Sin embargo, los resultados obtenidos con HBsu no muestran una reducción significativa en la capacidad de unión tras el tratamiento con la acetiltransferasa YfmK, lo que sugiere que este tipo de modificación no es suficiente por sí sola para inhibir la unión con el ADN. No obstante, la imposibilidad de reproducir estos ensayos de forma fiable con YonN debido a su estado de co-purificación con ADN limita la comparación directa de estos resultados.

DECLARACIÓN SOBRE EL USO DE IA

Durante la realización de este trabajo se han empleado herramientas de inteligencia artificial como apoyo en tareas de redacción, revisión lingüística y estructuración de la información. No obstante, el contenido final, el análisis crítico y la elaboración íntegra del trabajo son responsabilidad exclusiva del estudiante.

BIBLIOGRAFÍA

Abedon, S. T., Danis-Wlodarczyk, K. M., & Alves, D. R. (2021). Phage Therapy in the 21st Century: Is There Modern, Clinical Evidence of Phage-Mediated Efficacy? *Pharmaceuticals*, *14*(11), 1157. https://doi.org/10.3390/ph14111157

Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature*, *146*(3713), 837-837. https://doi.org/10.1038/146837a0

Ahmad, M., & Khan, A. U. (2019). Global economic impact of antibiotic resistance: A review. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *19*, 313-316. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.05.024

Al-Hinai, M., Fast, A., & Papoutsakis, E. (2012). Novel System for Efficient Isolation of Clostridium Double-Crossover Allelic Exchange Mutants Enabling Markerless Chromosomal Gene Deletions and DNA Integration. *Applied and environmental microbiology*, *78*, 8112-8121. https://doi.org/10.1128/AEM.02214-12

Becerra, J. E., Gallego Del Sol, F., Rubio-Del-Campo, A., Rodríguez-Díaz, J., Monedero, V., Marina, A., & Yebra, M. J. (2025). Unveiling the structural bases of a-L-fucosidase B activity through mutants boosting transfucosylation efficiency. *International Journal of Biological Macromolecules*, *311*, 143462. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143462

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1), 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Brady, A., Cabello-Yeves, E., Gallego Del Sol, F., Chmielowska, C., Mancheño-Bonillo, J., Zamora-Caballero, S., Omer, S. B., Torres-Puente, M., Eldar, A., Quiles-Puchalt, N., Marina, A., & Penadés, J. R. (2023). Characterization of a unique repression

system present in arbitrium phages of the SPbeta family. *Cell Host & Microbe*, *31*(12), 2023-2037.e8. https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.11.003

Brady, A., Felipe-Ruiz, A., Gallego Del Sol, F., Marina, A., Quiles-Puchalt, N., & Penadés, J. R. (2021). Molecular Basis of Lysis–Lysogeny Decisions in Gram-Positive Phages. *Annual Review of Microbiology*, *75*(1), 563-581. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-033121-020757

Brady, A., Quiles-Puchalt, N., Gallego Del Sol, F., Zamora-Caballero, S., Felipe-Ruíz, A., Val-Calvo, J., Meijer, W. J. J., Marina, A., & Penadés, J. R. (2021). The arbitrium system controls prophage induction. *Current Biology: CB*, *31*(22), 5037-5045.e3. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.08.072

Carabetta, V. J., Greco, T. M., Cristea, I. M., & Dubnau, D. (2019). YfmK is an Nε-lysine acetyltransferase that directly acetylates the histone-like protein HBsu in Bacillus subtilis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(9), 3752-3757. https://doi.org/10.1073/pnas.1815511116

Cho, S. S., Yu, M., Kim, S. H., & Kwon, S.-T. (2014). Enhanced PCR efficiency of high-fidelity DNA polymerase from *Thermococcus waiotapuensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, *63*, 39-45. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.05.005

Collier, C., Machón, C., Briggs, G. S., Smits, W. K., & Soultanas, P. (2011). Untwisting of the DNA helix stimulates the endonuclease activity of Bacillus subtilis Nth at AP sites. *Nucleic Acids Research*, *40*(2), 739. https://doi.org/10.1093/nar/gkr785

Crothers, D. M., Drak, J., Kahn, J. D., & Levene, S. D. (1992). DNA bending, flexibility, and helical repeat by cyclization kinetics. *Methods in Enzymology*, *212*, 3-29. https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)12003-9

Cui, Y., Su, X., Wang, C., Xu, H., Hu, D., Wang, J., Pei, K., Sun, M., & Zou, T. (2022). Bacterial MazF/MazE toxin-antitoxin suppresses lytic propagation of arbitrium-containing phages. *Cell Reports*, *41*(10), 111752. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111752

Dame, R. T. (2005). The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Molecular Microbiology*, *56*(4), 858-870. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04598.x

Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(3), 125-138. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5

Duan, Y., Llorente, C., Lang, S., Brandl, K., Chu, H., Jiang, L., White, R. C., Clarke, T. H., Nguyen, K., Torralba, M., Shao, Y., Liu, J., Hernandez-Morales, A., Lessor, L., Rahman, I. R., Miyamoto, Y., Ly, M., Gao, B., Sun, W., … Schnabl, B. (2019). Bacteriophage targeting of gut bacterium attenuates alcoholic liver disease. *Nature*, *575*(7783), 505-511. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1742-x

Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., Melamed, S., Leavitt, A., Savidor, A., Albeck, S., Amitai, G., & Sorek, R. (2017). Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature*, *541*(7638), 488-493. https://doi.org/10.1038/nature21049

European Centre for Disease Prevention and Control. (2022). *Assessing the health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU/EEA, 2016-2020.* Publications Office. https://doi.org/10.2900/73460

Flynn, C. E., & Guarner, J. (2023). Emerging Antimicrobial Resistance. *Modern Pathology*, *36*(9). https://doi.org/10.1016/j.modpat.2023.100249

Friedman, N. D., Temkin, E., & Carmeli, Y. (2016). The negative impact of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, *22*(5), 416-422. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.002

Furfaro, L. L., Payne, M. S., & Chang, B. J. (2018). Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*, 376. https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00376

Gallego Del Sol, F., Penadés, J. R., & Marina, A. (2019). Deciphering the Molecular Mechanism Underpinning Phage Arbitrium Communication Systems. *Molecular Cell*, *74*(1), 59-72.e3. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.025

Gallego Del Sol, F., Quiles-Puchalt, N., Brady, A., Penadés, J. R., & Marina, A. (2022). Insights into the mechanism of action of the arbitrium communication system in SPbeta phages. *Nature Communications*, *13*(1), 3627. https://doi.org/10.1038/s41467-022-31144-3

Garza Velasco, R., Garza-Manero, S. P., Pastelín-Palacios, R., Moreno-Eutimio, M. A., Garza Velasco, R., Garza-Manero, S. P., Pastelín-Palacios, R., & Moreno-Eutimio, M. A. (2024). Bacteriófagos: Los virus que se emplearán como agentes terapéuticos de las infecciones ocasionadas por bacterias multirresistentes a los antimicrobianos. *Educación química*, *35*(3), 140-149. https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2024.3.86725

GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: A systematic analysis with forecasts to 2050. *Lancet*, *404*(10459), 1199-1226. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1

Ge, P., Rashid, F.-Z. M., & Dame, R. T. (2025). The role of nucleoid-associated proteins in mediating responses to environmental changes. *Current Opinion in Microbiology*, *87*, 102628. https://doi.org/10.1016/j.mib.2025.102628

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, *6*(5), 343-345. https://doi.org/10.1038/nmeth.1318

Goshima, N., Kano, Y., & Imamoto, F. (1990). Characterization of HU-like protein from *Bifidobacterium longum*. *Biochimie*, *72*(4), 207-212. https://doi.org/10.1016/0300-9084(90)90074-Q

Guan, Z., Pei, K., Wang, J., Cui, Y., Zhu, X., Su, X., Zhou, Y., Zhang, D., Tang, C., Yin, P., Liu, Z., & Zou, T. (2019). Structural insights into DNA recognition by AimR of the arbitrium communication system in the SPbeta phage. *Cell Discovery*, *5*, 29. https://doi.org/10.1038/s41421-019-0101-2

Guler, P., Bendori, S. O., Borenstein, T., Aframian, N., Kessel, A., & Eldar, A. (2024). Arbitrium communication controls phage lysogeny through non-lethal

modulation of a host toxin–antitoxin defence system. *Nature Microbiology*, 9(1), 150-160. https://doi.org/10.1038/s41564-023-01551-3

Hellman, L. M., & Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nature Protocols*, *2*(8), 1849-1861. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.249

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, 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., … Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583-589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

Kabwe, M., Dashper, S., & Tucci, J. (2022). The Microbiome in Pancreatic Cancer-Implications for Diagnosis and Precision Bacteriophage Therapy for This Low Survival Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 871293. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.871293

Kapust, R. B., Tözsér, J., Fox, J. D., Anderson, D. E., Cherry, S., Copeland, T. D., & Waugh, D. S. (2001). Tobacco etch virus protease: Mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Engineering*, *14*(12), 993-1000. https://doi.org/10.1093/protein/14.12.993

Karaboja, X., & Wang, X. (2022). HBsu Is Required for the Initiation of DNA Replication in Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, *204*(8), e0011922. https://doi.org/10.1128/jb.00119-22

Kohm, K., Clanner, A. v, Hertel, R., & Commichau, F. M. (2025). Closely related and yet special – how SPβ family phages control lysis–lysogeny decisions. *Trends in Microbiology*, *33*(4), 387-396. https://doi.org/10.1016/j.tim.2024.11.007

Lavelle, K., McDonnell, B., Fitzgerald, G., van Sinderen, D., & Mahony, J. (2023). Bacteriophage-host interactions in Streptococcus thermophilus and their impact on co-evolutionary processes. *FEMS Microbiology Reviews*, *47*(4), fuad032. https://doi.org/10.1093/femsre/fuad032

Liu, K., Wang, C., Zhou, X., Guo, X., Yang, Y., Liu, W., Zhao, R., & Song, H. (2024). Bacteriophage therapy for drug-resistant Staphylococcus aureus infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *14*, 1336821. https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1336821

Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, *1*(2), 111-114. https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590

Matee, M. I. (2026). Genomic insights into antimicrobial resistance in Africa: A one health scoping review (2015–2025). *Bulletin of the National Research Centre*, *50*(1), 48. https://doi.org/10.1186/s42269-026-01421-y

McPherson, A., & Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, *70*(Pt 1), 2-20. https://doi.org/10.1107/S2053230X13033141

Michna, R. H., Zhu, B., Mäder, U., & Stülke, J. (2016). SubtiWiki 2.0—An integrated database for the model organism Bacillus subtilis. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D654-662. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1006

Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Hamadani, B. H. K., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., … Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, *399*(10325), 629-655. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0

Niesen, F. H., Berglund, H., & Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*, *2*(9), 2212-2221. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.321

O'Neill, J. (2016). *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations* (p. 84). Wellcome Trust y HM Government. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf

Parks, A. R., Will, J. L., Mathew, L. G., Massier, S., Hardouin, J., & Escalante-Semerena, J. C. (2025). In Salmonella Typhimurium and Bacillus subtilis, Nucleoid-Associated

HU Proteins Are N-Terminally Acetylated. *Pathogens*, *14*(7), 616. https://doi.org/10.3390/pathogens14070616

Peñalva, G., Cantón, R., Pérez-Rodríguez, M. T., González-López, J. J., Rodríguez-Baño, J., Barrio-Tofiño, E. del, Kirkegaard-Biosca, C., Sánchez-Romero, I., Gutiérrez-Villanueva, A., Marrodán-Ciordia, T., Guerra-Laso, J. M., Rosario-Quintana, C. del, Suárez-Hormiga, L., Cámara, J., Puig-Asensio, M., Heredero, E., Sepúlveda, M. A., Rodríguez-Díaz, J. C., Merino, E., … Paño-Pardo, J. R. (2025). Burden of bacterial antimicrobial resistance among hospitalised patients in Spain: Findings from three nationwide prospective studies. *The Lancet Regional Health – Europe*, *51*. https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2025.101220

Robinson, T. P., Bu, D. P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E. M., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S. I., Jiwakanon, J., Kakkar, M., Kariuki, S., Laxminarayan, R., Lubroth, J., Magnusson, U., Thi Ngoc, P., Van Boeckel, T. P., & Woolhouse, M. E. J. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *110*(7), 377-380. https://doi.org/10.1093/trstmh/trw048

Ross, M. A., & Setlow, P. (2000). The Bacillus subtilis HBsu protein modifies the effects of alpha/beta-type, small acid-soluble spore proteins on DNA. *Journal of Bacteriology*, *182*(7), 1942-1948. https://doi.org/10.1128/JB.182.7.1942-1948.2000

Salam, Md. A., Al-Amin, Md. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. A. (2023). Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare*, *11*(13), 1946. https://doi.org/10.3390/healthcare11131946

Savitsky, P., Bray, J., Cooper, C. D. O., Marsden, B. D., Mahajan, P., Burgess-Brown, N. A., & Gileadi, O. (2010). High-throughput production of human proteins for crystallization: The SGC experience. *Journal of Structural Biology*, *172*(1), 3-13. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.008

Schwab, S., & Dame, R. T. (2025). Identification, characterization and classification of prokaryotic nucleoid-associated proteins. *Molecular Microbiology*, *123*(3), 206-217. https://doi.org/10.1111/mmi.15298

Shang, J., Zhou, Q., & Wei, Y. (2025). Review of the Arbitrium (ARM) System: Molecular Mechanisms, Ecological Impacts, and Applications in Phage–Host Communication. *Microorganisms*, *13*(9), 2058. https://doi.org/10.3390/microorganisms13092058

Sora, V. M., Wallet, C., Meroni, G., Loustau, T., Rohr, O., Zecconi, A., & Schwartz, C. (2026). Antimicrobial Resistance: How Can We Overcome the Problem? *Antibiotics*, *15*(1), 82. https://doi.org/10.3390/antibiotics15010082

Stojkova, P., & Spidlova, P. (2022). Bacterial nucleoid-associated protein HU as an extracellular player in host-pathogen interaction. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 999737. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.999737

Stojkova, P., Spidlova, P., & Stulik, J. (2019). Nucleoid-Associated Protein HU: A Lilliputian in Gene Regulation of Bacterial Virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*, 159. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00159

Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, *41*(1), 207-234. https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G. (2001). Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(3), 649-659. https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001

Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z., Green, T., Zielinski, M., Žídek, A., Bridgland, A., Cowie, A., Meyer, C., Laydon, A., Velankar, S., Kleywegt, G. J., Bateman, A., Evans, R., Pritzel, A., Figurnov, M., Ronneberger, O., Bates, R., Kohl, S. A. A., … Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*, *596*(7873), 590-596. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1

UniProt Consortium. (2023). UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D523-D531. https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052

Venturini, C., Petrovic Fabijan, A., Fajardo Lubian, A., Barbirz, S., & Iredell, J. (2022). Biological foundations of successful bacteriophage therapy. *EMBO Molecular Medicine*, *14*(7), e12435. https://doi.org/10.15252/emmm.202012435

Vis, H., Mariani, M., Vorgias, C. E., Wilson, K. S., Kaptein, R., & Boelens, R. (1995). Solution Structure of the HU Protein fromBacillus stearothermophilus. *Journal of Molecular Biology*, *254*(4), 692-703. https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0648

World Bank. (2017). *Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future*. https://documents1.worldbank.org/curated/en/323311493396993758/pdf/final-report.pdf

World Health Organization. (2025). *Global Antibiotic Resistance Surveillance Report 2025: WHO Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS)* (p. 138). World Health Organization. https://www.who.int/publications/i/item/9789240116337

Zamora-Caballero, S., Chmielowska, C., Quiles-Puchalt, N., Brady, A., Gallego Del Sol, F., Mancheño-Bonillo, J., Felipe-Ruíz, A., Meijer, W. J. J., Penadés, J. R., & Marina, A. (2024). Antagonistic interactions between phage and host factors control arbitrium lysis-lysogeny decision. *Nature Microbiology*, *9*(1), 161-172. https://doi.org/10.1038/s41564-023-01550-4

Zavaleta-Monestel, E., Arguedas-Chacón, S., Rojas-Chinchilla, C., & Díaz-Madriz, J. P. (2025). Antimicrobial Resistance: An Emerging Global Threat to Modern Medicine. *Cureus*, *17*(11), e97668. https://doi.org/10.7759/cureus.97668

ANEXO 1

1. TABLAS

Tabla 1. Primers empleados para la amplificación por PCR de los distintos fragmentos de ADN utilizados en los ensayos de interacción proteína-ADN.

PRIMERS	SECUENCIA
YopRS +	5´GCTGCTGCTTTAGATTGTAATG 3´
YopRS -	5´GGAAGAAGTTAATAAATATTACGC 3´
YONX-YOPA+	5´GAGGGTCAGGGAATTTCGATG 3´
YONX-YOPA-	5´GGAGGATTCAAGAGCTATATTTTCC 3´
YOPD-YOPE+	5´CAGCCTTCTTACTTGTTGTAAACGGTGTG 3´
YOPD-YOPE-	5´GCGTTAAACAGTTATGTTTATACTCTGGCG 3´
YozV-YobD+	5´GTTCTTCTTGCTTACCATGACTTCC 3´
YozV-YobD-	5´GCCTCCCAAAACCATCTAGTTC 3´
NasF-NasE fw	5´CACATCTGCTTCCTTGAGCGC 3´
NasF-NasE rv	5´CAATATGTTTTCTGCCCGATGCACGAC 3´
RicA_Fw	5´CGAGGTGAAATGAGATGACGCTCT 3´
RicA_Rv	5´TTAGAGAGAACAGCTGTTATTTGAATGCTTCA 3´
YfmK Fw	5´ACCTGTACTTCCAATCCATAATGGCTTCAATAGACAGGTTTCAAG 3´
YfmK Rv	5´ACGTCAATGCCAATAGGATATTATCAGTTGCGAAGAATCAGCGTAAGA 3´
rtloop_spbeta Fw	5´GTGAAAAAATTCGCATTTCG 3´
rtloop_spbeta Rv	5´CTCAGGCAATTCTTCTGA 3´
pLIC SGC1 T7 Fw	5´TAATACGACTCACTATAGGGG 3´
pLIC SGC1 T7 Rv	5´GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3´

Tabla 2. Condiciones evaluadas en el cribado de estabilidad térmica mediante Thermofluor.

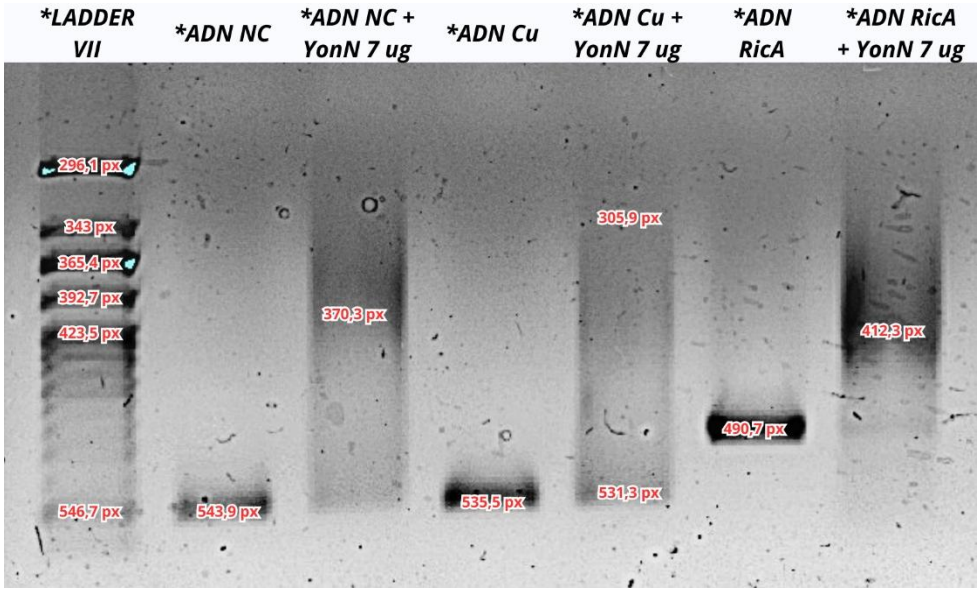
COND.	1	2	3	4	5	6
A	150mM NaCl, 100mM AcNa pH 4.5	150mM NaCl, 100mM Bis Tris pH 5.5	150mM NaCl, 100mM citrate pH 5.6	150mM NaCl, 100mM cacodilato pH 6.5	150mM NaCl, 100mM MES pH 6.5	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7
B	150mM NaCl, 1X SPG 4.5	150mM NaCl, 1X SPG 5.5	150mM NaCl, 1X SPG 6.5	150mM NaCl, 1X SPG 7.5	150mM NaCl, 1X SPG 8	150mM NaCl, 1X SPG 9
C	Hepes pH 7.5	100mM NaCl,	250mM NaCl,	500mM NaCl, Hepes pH 7.5	150mM NaCl, 100mM	150mM NaCl, 100mM

		Hepes pH 7.5	Hepes pH 7.5		Hepes pH 7.5, 5% Glicerol	Hepes pH 7.5, 10% Glicerol
D	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7.5, 1mM EDTA	100mM Hepes pH 7.5, 150mM LiCl2	100mM Hepes pH 7.5, 150mM KCl	100mM Hepes pH 7.5, 150mM NaF	100mM Hepes pH 7.5, 150mM SO4NH4	100mM Hepes pH 7.5, 150mM NO3NH4

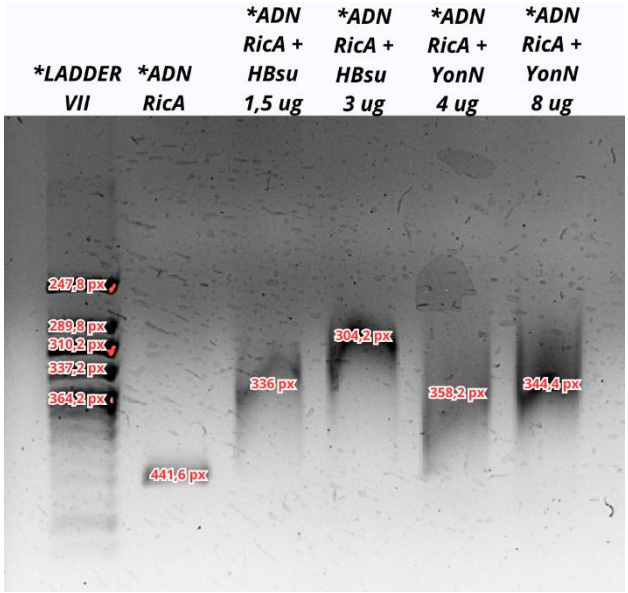
COND.	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7.5	150mM NaCl, 100mM Fosfato pH 7.5	150mM NaCl, 100mM Tris pH 8	150mM NaCl, 100mM Tris pH 8.5	150mM NaCl, 100mM Bicina pH 9	150mM NaCl, 100mM CHES pH 9.5
B	150mM NaCl, 1X MMT 4.5	150mM NaCl, 1X MMT 5.5	150mM NaCl, 1X MMT 6.5	150mM NaCl, 1X MMT 7.5	150mM NaCl, 1X MMT 8	150mM NaCl, 1X MMT 9
C	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7.5, 15% Glicerol	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7.5, 1mM MgCl2	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7.5, 1mM CaCl2	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7.5, 0.1mM ZnCl2, 0.1mM CoCl2	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7.5, 1mM CdCl2, 1mM MnCl2	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7.5, 1mM DTT
D	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7.5, 100mM Sacarosa	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7.5, 300mM Sacarosa	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7.5, Urea 0.5M	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7.5, L-Arg 50mM, L-Glu 50mM	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7.5, Betaina 100mM	150mM NaCl, 100mM Hepes pH 7.5, 0.1% Triton X-100

2. IMÁGENES EXTENDIDAS

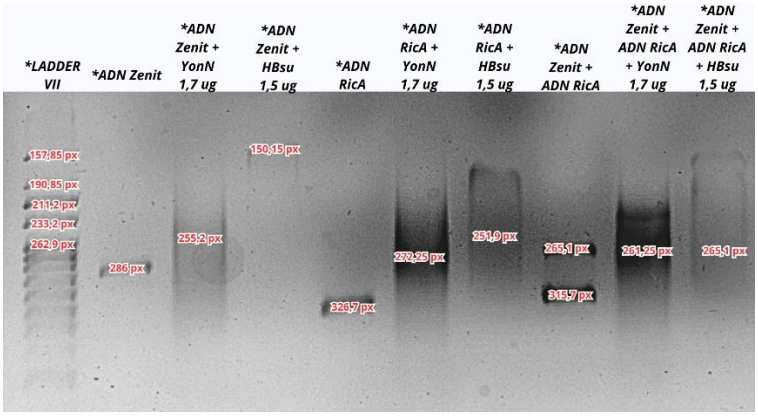
Versión extendida de la figura 18. Estudio de especificidad de YonN (7 µg) frente a diferentes conformaciones de ADN: No Curvado (NC), Curvado (Cu) y RicA. Los carriles pares muestran el desplazamiento del ADN tras la adición de la proteína.



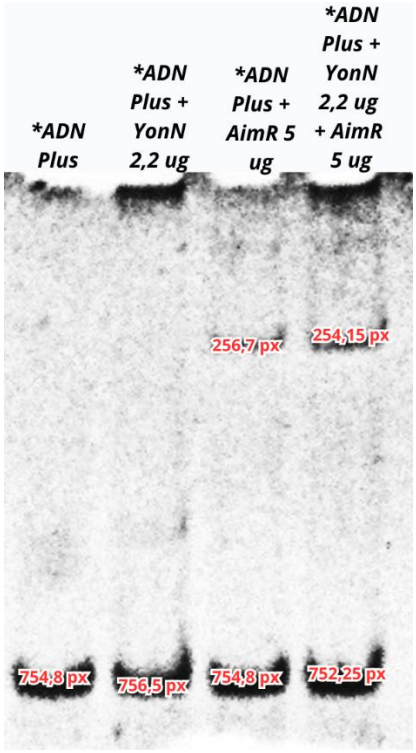
Versión extendida de la figura 19. Ensayo EMSA en gel de agarosa comparando la afinidad del fragmento RicA por las proteínas HBsu (1.5 y 3 µg) y YonN (4 y 8 µg), incluyendo el patrón de migración Ladder VII.



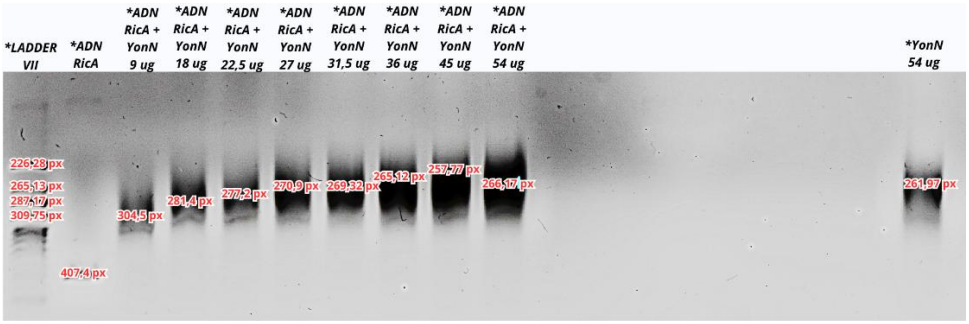
Versión extendida de la figura 20. Comparativa de unión individual y competitiva de YonN (1.7 µg) y HBsu (1.5 µg) con los sustratos Zenit y ADN RicA. Se detallan los desplazamientos de banda y la formación de complejos nucleoproteicos. Se incluye el patrón de migración Ladder VII.



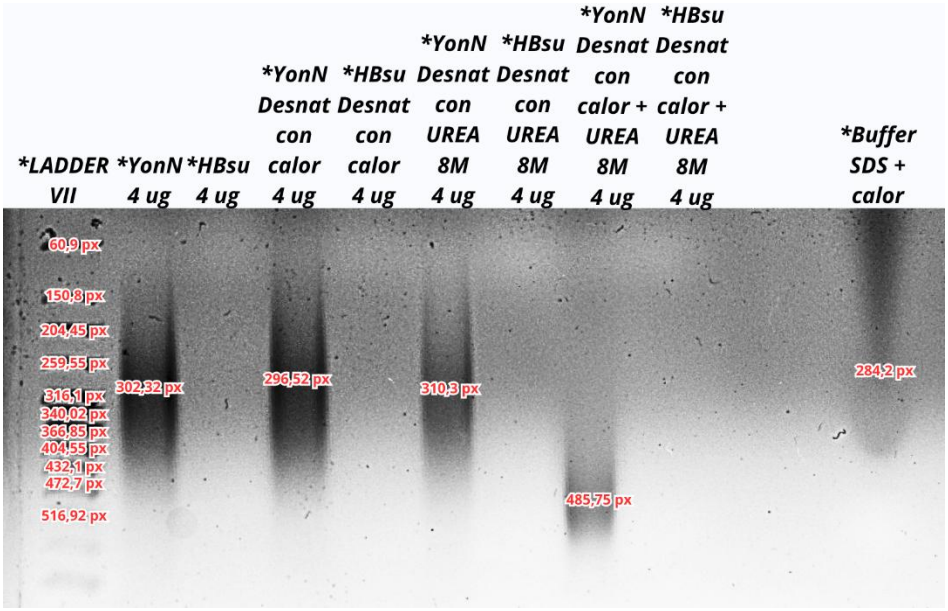
Versión extendida de la figura 21. Análisis EMSA de la interacción de YonN (2.2 µg) y AimR (5 µg) con el fragmento de ADN Plus. Se muestran carriles con proteínas individuales y en combinación para observar el desplazamiento de las bandas de ADN libre.



Versión extendida de la figura 22. Titración de la proteína YonN (9 a 54 µg) con el fragmento de ADN RicA. El último carril muestra el control de la proteína YonN (54 µg) en ausencia de ADN exógeno. Se incluye el patrón de migración Ladder VII.



Versión extendida de la figura 23. Análisis del efecto de agentes desnaturalizantes (calor y urea 8M) sobre la movilidad de las proteínas YonN y HBsu (4 µg). Se incluye el patrón de migración Ladder VII y el buffer SDS de forma independiente.



Versión extendida de la figura 24. Ensayo EMSA evaluando la unión de HBsu (3 µg) al ADN RicA bajo condiciones de modificación (acetilación) y desnaturalización (calor y SDS), incluyendo además el patrón de migración Ladder VII.

