



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

INSTITUTO DE MICROBIOLOGÍA BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA
C.S.I.C. / UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

TESIS DOCTORAL

Sistemas de dos componentes y regulación de la
producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor*

Ana Yepes García
Salamanca, 2010

Memoria presentada por Ana Yepes García para optar al grado de
Doctora en Bioquímica.

Ana Yepes García, licenciada en Bioquímica, ha disfrutado de una beca de formación de personal investigador de la Junta de Castilla y León. Durante el desarrollo del trabajo de tesis doctoral también obtuvo una beca de estancia corta Marie Curie del programa AGAPE de la Universidad de Leeds (Reino Unido).

Dra. Margarita Díaz Martínez, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca y **Dr. Ramón Santamaría Sánchez**, Científico Titular del C.S.I.C.

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada “**Sistemas de dos componentes y regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor***”, presentada por Dña. Ana Yepes García para optar al grado de Doctora en Bioquímica, ha sido realizada bajo su dirección en el centro mixto Instituto de Microbiología Bioquímica, C.S.I.C./Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, extienden el presente certificado en Salamanca, a de abril de 2010.

Fdo: Dra. Margarita Díaz Martínez

Dr. Ramón Santamaría Sánchez

Dr. Ángel Domínguez Olavarri, Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la tesis titulada “**Sistemas de dos componentes y regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor***”, presentada por Dña. Ana Yepes García para optar al grado de Doctora en Biología, ha sido realizada bajo la dirección de los Drs. Margarita Díaz Martínez y Ramón Santamaría Sánchez en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido este certificado en Salamanca, a de abril de 2010.

Fdo: Ángel Domínguez Olavarri

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de Tesis, Dra. Margarita Díaz y Dr. Ramón Santamaría, su confianza y su continuo apoyo a lo largo de estos años. He aprendido mucho, he crecido personal y profesionalmente. Sin ninguna duda me habéis educado en Ciencia.

Gracias también al Dr. José Manuel Fernández Ábalos por su gran apoyo sin el cual no habría conseguido la beca predoctoral y por su cercanía y disponibilidad cuando le he necesitado.

También me gustaría mostrar mi agradecimiento al Dr. Kenneth McDowall de la Universidad de Leeds por el acogimiento en su laboratorio y por la formación que me aportó durante los tres meses de estancia.

Gracias a todos mis compañeros del grupo *Streptomyces* y compañeros del laboratorio a lo largo de estos años. Ha sido un placer compartir tantas cosas con todos vosotros, los que estáis y los que ya os habéis marchado. Quiero hacer especial mención de dos personas que me han ayudado enormemente durante la tesis: María Jesús, muchas gracias por tu disponibilidad y tu ayuda desde el primer hasta el último día, y Sergio, gracias por tu infinito apoyo en esta última etapa. Gracias también a Laura, a Belí, a Ana Esteban y a Javi, por todos los ánimos diarios y por todo lo compartido con ell@s.

Todo este trabajo se ha llevado a cabo en el IMB y me siento privilegiada por ello. Me gustaría dirigir mis agradecimientos a toda la gente que hace que este centro funcione con la calidad excepcional que lo hace. Por la competencia de mucha gente y las sonrisas de otra mucha. Gracias especialmente a todos los “becarios” por ser como una gran familia.

Hay muchas personas que quizás no tan directamente me han ayudado en este periodo de mi vida. Lo bueno es que estaban antes, han estado estos años y espero estén siempre. Muchas gracias a mis chicas “salmantinas” María, Lorena y Laura. A las exsalmantinas por los magníficos años en la carrera y por entendernos siempre tan bien. Y a las abulenses, gracias por vuestro interés en mi trabajo, aunque siempre suene a chino...

Jorge: gracias, gracias y mil gracias...por todos los consejos, por toda tu dedicación, por animarme siempre. Ha sido genial compartir esta experiencia juntos y espero muchas más!!

Por último, me gustaría agradecer y dedicar esta tesis a toda mi familia. En especial a mis abuelos, porque es mi forma de hacer una mención especial de estas grandísimas personas. Gracias de corazón a mis padres y a mi hermana, por vuestro interés y por animarme siempre. Sois tres pilares indispensables en mi vida.

INTRODUCCIÓN **1**

| | |
|---|----|
| 1. EL GÉNERO <i>Streptomyces</i> | 3 |
| 1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES | 3 |
| 1.2. ORGANIZACIÓN GENÓMICA | 3 |
| 1.3. CICLO DE VIDA | 5 |
| 2. METABOLISMO SECUNDARIO EN <i>Streptomyces</i> | 9 |
| 2.1. ASPECTOS GENERALES | 9 |
| 2.2. PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN <i>Streptomyces</i> | 10 |
| 3. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN <i>S. coelicolor</i> | 12 |
| 3.1. GENES DE REGULACIÓN ESPECÍFICA | 13 |
| 3.2. GENES DE REGULACIÓN GLOBAL | 13 |
| 4. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES | 15 |
| 4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES | 15 |
| 4.2. ARQUITECTURA DE LAS HKs Y LOS RRs | 17 |
| 4.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS SISTEMAS DE DOS COMPONENTES | 19 |
| 4.4. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES EN <i>S. coelicolor</i> | 22 |
| 5. ANTECEDENTES | 25 |
| 5.1. ENTORNO GENÓMICO Y CONSERVACIÓN DE LOS TCSs AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3 | 28 |

OBJETIVOS **31**

RESULTADOS **35**

CAPITULO I: ESTUDIO IN VIVO DE LOS TCSs AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3 EN *Streptomyces coelicolor* M145: RELEVANCIA BIOLÓGICA DE LOS SISTEMAS Y EXPRESIÓN

DIFERENCIAL DE GENES **37**

I.1. RELEVANCIA BIOLÓGICA DE LOS TCSs AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3 EN LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS Y DIFERENCIACIÓN EN *S. coelicolor* M145 **39**

| | |
|---|----|
| 1. FENOTIPO DE LOS MUTANTES NULOS $\Delta abrA1/A2::accIV$ y $\Delta abrC1/C2/C3::accIV$ | 39 |
| 1.1. PRODUCCIÓN DE ACTINORRODINA EN EL MUTANTE $\Delta abrA1/A2::accIV$ EN MEDIO NMMP | 39 |
| 1.2. PRODUCCIÓN DE ACTINORRODINA EN EL MUTANTE $\Delta abrC1/C2/C3::accIV$ EN MEDIO AN | 43 |
| 1.3. CUANTIFICACIÓN DE CDA Y UNDECILPRODIGIOSINA EN LAS CEPAS MUTANTES $\Delta abrA1/A2::accIV$ y $\Delta abrC1/C2/C3::accIV$ | 44 |
| 2. COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES NULOS $\Delta abrA1/A2$ y $\Delta abrC1/C2/C3$ | 46 |
| 2.1. FENOTIPO DE LAS CEPAS REVERTIENTES $\Delta abrA1/A2.pHabrA1A2$ Y $\Delta abrC1/C2/C3.pHabrC1C2C3$ | 47 |
| 3. EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE LOS GENES DE LOS SISTEMAS <i>abrA1/A2</i> Y <i>abrC1/C2/C3</i> | 50 |
| 3.1. SOBREENPRESIÓN CONJUNTA DE LOS GENES DE CADA SISTEMA | 50 |
| 3.2. SOBREENPRESIÓN DE LOS RRs <i>abrA2</i> y <i>abrC3</i> | 54 |

I.2. DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE LAS CEPAS MUTANTES $\Delta abrC1/C2/C3$ y $\Delta abrA1/A2$ Y LA CEPA SILVESTRE *S. coelicolor* M145 **63**

| | |
|--|----|
| 1. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE $\Delta abrC1/C2/C3$ vs. wt: MICROARRAYS cDNA-gDNA | 63 |
| 1.1. CONDICIONES Y ELABORACIÓN DE LOS MICROARRAYS | 63 |
| 1.2. RESULTADOS DE LOS MICROARRAYS | 65 |
| 1.3. COMPROBACIÓN DE RESULTADOS MEDIANTE RT-PCR SEMICUANTITATIVA | 73 |
| 2. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE $\Delta abrA1/A2$ vs wt: MICROARRAYS cDNA-cDNA | 74 |
| 2.1. CONDICIONES Y ELABORACIÓN DE LOS MICROARRAYS | 74 |
| 2.1. RESULTADOS DE LOS MICROARRAYS | 75 |
| 2.4. VALIDACIÓN DE RESULTADOS MEDIANTE RT-PCR SEMICUANTITATIVA | 79 |

| | |
|--|------------|
| CAPITULO II. CARACTERIZACIÓN IN VITRO DE LOS SISTEMAS AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3 Y BÚSQUEDA DE SUS DIANAS MOLECULARES | 81 |
| II.1. CARACTERIZACIÓN IN VITRO DE LOS SISTEMAS AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3 | 83 |
| 1. PURIFICACIÓN DE LOS REGULADORES DE RESPUESTA AbrA2 y AbrC3 | 83 |
| 2. FOSFORILACIÓN DE LOS RR _s CON FOSFODONADORES DE BAJO PESO MOLECULAR | 85 |
| 3. FOSFORILACIÓN DE LOS RR _s POR TRANSFERENCIA DEL FOSFATO DESDE SUS HK _s ASOCIADAS | 89 |
| 3.1. PURIFICACIÓN DE LAS HK _s AbrA1, AbrC1 y AbrC2 | 89 |
| 3.2. AUTOFOSFORILACIÓN DE LAS HK _s CON (γ - ³² P) ATP | 91 |
| 3.3. MUTACIÓN PUNTUAL DE LOS RESIDUOS HISTIDINA FOSFORILABLES DE LAS HK _s | 92 |
| 3.4. REACCIÓN DE FOSFOTRANSFERENCIA HK (AbrC1 o AbrC2)-RR (AbrC3) | 93 |
| 3.5. REACCIÓN DE FOSFOTRANSFERENCIA DE LA HK AbrC2 AL REGULADOR HUÉRFANO SCO2281 | 95 |
| 4. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS FORMAS TRUNCADAS C-t DE LOS RR _s AbrA2 y AbrC3 (RR _s -DBD) | 96 |
| II.2. BÚSQUEDA DE LAS DIANAS MOLECULARES DE LOS RR_s AbrA2 y AbrC3 | 98 |
| 1. SELEX | 98 |
| 1.1. INMOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AbrA2, AbrA2 ^{DBD} y AtrA | 99 |
| 1.2. SELEX: CICLOS DE SELECCIÓN-AMPLIFICACIÓN | 100 |
| 1.3. SECUENCIACIÓN DE LOS APTÁMEROS | 101 |
| 2. CAPTURA DE PROMOTORES POR INTERACCIÓN DNA-PROTEÍNA | 105 |
| 2.1. INMOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AbrA2 ^{DBD} , AbrC3 ^{DBD} y AtrA | 105 |
| 2.2. CAPTURA DE LAS DIANAS DE LOS RR _s Y CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE DNA EN pSK ⁺ | 105 |
| 2.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS RESULTANTES DE LAS CAPTURAS | 106 |
| 3. COMPROBACIÓN DE LAS POSIBLES DIANAS MOLECULARES MEDIANTE ENSAYOS DE RETARDO EN GEL (EMSAs) | 109 |
| | |
| DISCUSIÓN | 117 |
| 1. SISTEMAS AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3: PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS Y DIFERENCIACIÓN EN <i>S. coelicolor</i> | 119 |
| 1.1. SISTEMA AbrA1/A2 | 119 |
| 1.2. SISTEMA AbrC1/C2/C3 | 124 |
| 2. FOSFORILACIÓN Y ACTIVACIÓN DE AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3 IN VITRO | 126 |
| 2.1. FOSFORILACIÓN DE LOS RR _s AbrA2 Y AbrC3 | 126 |
| 2.2. CARACTERIZACIÓN DE LA TRANSFERENCIA DEL FOSFATO EN EL SISTEMA AbrC1/C2/C3 | 127 |
| 3. REGULADOR AtrA | 129 |
| | |
| CONCLUSIONES | 131 |
| | |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 135 |
| 1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS | 137 |
| 2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS | 139 |
| 2.1. MEDIOS DE CULTIVO | 139 |
| 2.2. CONDICIONES DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS | 141 |
| 3. VECTORES UTILIZADOS | 141 |
| 4. MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 147 |
| 4.1. AISLAMIENTO DE DNA | 147 |
| 4.2. AISLAMIENTO DE RNA | 148 |
| 4.3. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS | 149 |
| 4.4. MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DEL DNA | 149 |

| | |
|---|-----|
| 4.5. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA | 150 |
| 4.6. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA | 151 |
| 4.7. CONSTRUCCIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES SIN MARCADOR DE RESISTENCIA (Scar) EN <i>S. coelicolor</i> | 152 |
| 5. INTRODUCCIÓN DE DNA EN MICROORGANISMOS | 153 |
| 5.1. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i> | 153 |
| 5.2. TRANSFORMACIÓN DE <i>Streptomyces</i> | 153 |
| 6. HIBRIDACIÓN Y PROCESAMIENTO DE MICROARRAYS (cDNA vs gDNA) | 153 |
| 6.1. MARCAJE DE cDNA Y gDNA | 153 |
| 6.2. PREHIBRIDACIÓN E HIBRIDACIÓN DE LOS MICROARRAYS | 154 |
| 6.3. DETECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE DATOS | 155 |
| 6.4. MICROARRAYS cDNA vs. cDNA | 155 |
| 7. MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS | 155 |
| 7.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE) | 155 |
| 7.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS | 156 |
| 7.3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOT | 157 |
| 7.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS | 158 |
| 7.5. ENSAYOS Y DETECCIÓN DE FOSFORILACIÓN Y FOSFOTRANSFERENCIA | 158 |
| 8. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL (EMSA) | 159 |
| 9. SELEX (“Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment”) | 160 |
| 9.1. INMOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PURAS EN BOLAS MAGNÉTICAS | 160 |
| 9.2. SELEX: CICLOS DE SELECCIÓN-AMPLIFICACIÓN | 160 |
| 9.3. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL DNA OBTENIDO | 160 |
| 10. INCUBACIÓN RR- gDNA DE <i>Streptomyces coelicolor</i> | 161 |
| 10.1. INMOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PURAS EN BOLAS MAGNÉTICAS | 161 |
| 10.2. DIGESTIÓN PARCIAL DE gDNA DE <i>S. coelicolor</i> CON <i>Sau3A</i> | 161 |
| 10.3. UNIÓN RR-gDNA, RECUPERACIÓN DEL DNA UNIDO, CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN | 161 |
| 11. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS | 161 |
| 11.1. BIOENSAYO EN MEDIO SÓLIDO: PRODUCCIÓN DE CDA | 161 |
| 11.2. ENSAYO EN MEDIO SÓLIDO: PRODUCCIÓN DE ACTINORRODINA Y UNDECILPRODIGIOSINA | 162 |
| 11.3. ENSAYO EN MEDIO LÍQUIDO: CUANTIFICACIÓN DE ACTINORRODINA Y UNDECILPRODIGIOSINA | 162 |
| 12. CURVAS DE CRECIMIENTO | 162 |
| 13. ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE DATOS | 163 |
| 13.1. SOPORTES INFORMÁTICOS DE ANÁLISIS DE DNA Y PROTEÍNAS | 163 |
| 13.2. BASES DE DATOS ONLINE | 163 |
| 13.3. PRESENTACIÓN DE DATOS | 163 |

APÉNDICES **165**

BIBLIOGRAFÍA **175**

INTRODUCCIÓN



1. EL GÉNERO *Streptomyces*

1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los estreptomicetos son los microorganismos más estudiados dentro del orden de los *Actinomycetales*, siendo el género *Streptomyces* el mejor conocido (Locci, 1989). Este género agrupa bacterias miceliales Gram positivas y fundamentalmente aerobias, aunque en determinadas condiciones se ha descrito que pueden crecer en anaerobiosis (van Keulen *et al.*, 2003). Son microorganismos que poseen un cromosoma lineal de gran tamaño, superando en todos los casos las 8 Mb. Otra característica destacable del género es su complejo ciclo de vida, el cual conlleva diferenciación morfológica.

El género *Streptomyces*, con más de 500 especies descritas, constituye uno de los grupos de bacterias más numerosas y presenta una gran diversidad (<http://www.bergeys.org/outlines.html>). Su hábitat natural más común es el suelo, aunque también se han hallado en medios acuáticos (Moran *et al.*, 1995). Estos microorganismos viven de forma saprofítica degradando restos orgánicos, principalmente vegetales (Hodgson, 2000). Esta capacidad descomponedora es posible gracias a la producción de una amplia gama de enzimas extracelulares hidrolíticas, algunas de ellas con aplicaciones en industria. La liberación de nutrientes al medio a partir de biopolímeros insolubles como la lignina, pectina, quitina, celulosa, etc, convierte a las distintas especies de *Streptomyces* en microorganismos centrales en el reciclaje de carbono. Además de su versatilidad metabólica, este género posee una atractiva y variada capacidad biosintética. Son microorganismos capaces de sintetizar una gran colección de metabolitos secundarios con actividades biológicas variadas tales como: antitumorales, inmunosupresoras, antibióticas, herbicidas, inhibidores enzimáticos, pigmentos, aromas etc. (Thompson *et al.*, 2002; Challis y Hopwood, 2003). Muchos resultan tener aplicaciones realmente valiosas en medicina, veterinaria y agricultura.

1.2. ORGANIZACIÓN GENÓMICA

Como se apuntó anteriormente, los cromosomas de estas bacterias son anormalmente grandes. El tamaño varía entre 8 y 9 Mb en función de la especie, lo que llega a duplicar a otros cromosomas bacterianos como el de *Escherichia coli* (Smith *et al.*, 1987) o el de *Bacillus subtilis* (Young, 1974), que apenas sobrepasan las 4 Mb. Además, otra característica relevante de su composición genómica es el elevado contenido en guaninas y citosinas (G+C), presentando un porcentaje entre el 70 y el 74 %.

El cromosoma lineal de las distintas especies de *Streptomyces* contiene en sus extremos secuencias cortas repetidas e invertidas que se consideran los telómeros del mismo y cuyo tamaño varía según la especie, desde las 24 kb en *S. griseus* a las 210 kb de *S. ambofaciens*

(Goshi *et al.*, 2002). A estas secuencias se unen proteínas mediante enlaces covalentes en los extremos 5' y su papel es esencial en la replicación del DNA (Bao y Cohen, 2001).

Dentro de este género, se considera a *S. coelicolor* la especie más representativa. A lo largo de los años se han desarrollado gran cantidad de herramientas genéticas para su manipulación, por lo que es la especie mejor conocida genéticamente. Su genoma fue el primero del género que se secuenció (www.sanger.ac.uk) (Bentley *et al.*, 2002). Posee un cromosoma de 8,7 Mb con un elevado potencial codificante extendido de forma uniforme. Se han identificado 7.825 genes hipotéticos y tiene un único origen de replicación (OriC) localizado en la región central. El cromosoma se ha estructurado en regiones diferenciadas como se muestra en la figura I.1. Se puede distinguir una región central de 4,9 Mb en la que se encuentran mayoritariamente genes esenciales para el crecimiento. Entre estos genes destacan: genes implicados en división celular, en replicación del DNA, en transcripción, traducción y en la biosíntesis de aminoácidos (aas). La región central o *core* está flanqueada por dos brazos, el izquierdo de 1,5 Mb y el derecho de 2,3 Mb. Estas regiones laterales del cromosoma contienen muchos genes que codifican proteínas no esenciales como enzimas del metabolismo secundario y enzimas hidrolíticas (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003). La cepa secuenciada, *S. coelicolor* A3(2), tiene además tres plásmidos: SCP1 (lineal de 350 Kb), SCP2 (30 Kb) y SLP1 integrado en el cromosoma (Kieser, 2000).

Actualmente existen otras especies de interés completamente secuenciadas como son *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003), *S. griseus* (Ohnishi *et al.*, 2008), *S. scabies*, (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scabies/) y *S. peucetius* (Parajuli *et al.*, 2004) y otras 17 en progreso entre las que destacan *S. clavurigerus*, *S. pristinaespiralis*, *S. roseosporus* y *S. albus* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/streptomyces_group/GenomeDescriptions.html). La secuenciación de todas ellas ha contribuido, entre otras cosas, a confirmar una clara conservación en la distribución de los genes en la región central del cromosoma y una escasa similitud de las regiones laterales. Estos fenómenos se deben en gran parte a la enorme inestabilidad del cromosoma lineal de estas bacterias. Así, en ausencia de presión selectiva, éste sufre con frecuencia pérdidas de cientos de kilobases en las regiones laterales y extensas amplificaciones en torno a las secuencias desaparecidas. Los reordenamientos del genoma conducen a la diversidad metabólica existente entre las distintas especies de *Streptomyces*. Por tanto, disponer de las secuencias de genomas de distintas especies constituye una buena herramienta para profundizar en los procesos de diversificación.

El alto grado de sintenia en la región central del cromosoma de los distintos *Streptomyces* (unos 3000 genes) es extensible a muchos actinomicetos. La comparación genómica entre distintos actinomicetos también pone de manifiesto la expansión cromosómica de *Streptomyces* y su riqueza en genes, destacando entre otros, los sistemas reguladores. Queda por tanto

reflejado en el genoma de estas bacterias la capacidad de detectar y responder a gran variedad de estímulos extracelulares (Hsiao y Kirby, 2008).

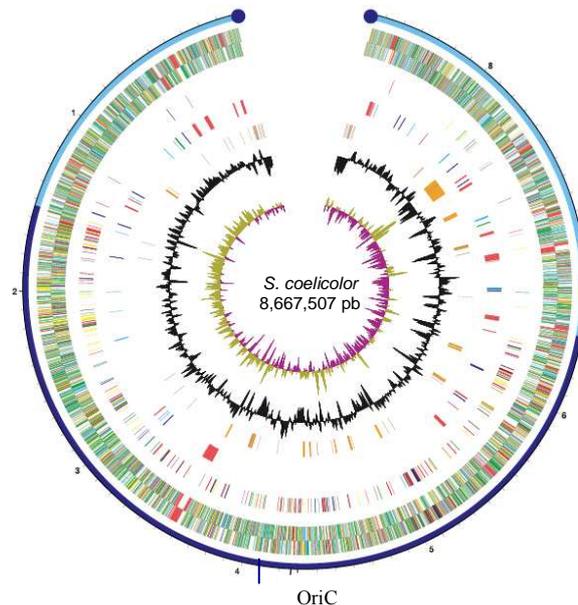


Figura I.1. Representación circular del cromosoma de *S. coelicolor* tomado de (Bentley *et al.*, 2002). La escala exterior sigue el orden contrario a las agujas del reloj en Mb. Las proteínas terminales se representan mediante los dos círculos azules. Queda señalada también la región central (azul oscuro), los brazos del cromosoma (azul claro) y el origen de replicación (OriC).

1.3. CICLO DE VIDA

El ciclo de desarrollo de los microorganismos del género *Streptomyces* es un proceso complejo a lo largo del cual se han descrito estructuras diferenciadas. Este proceso de diferenciación ha sido ampliamente estudiado en medio sólido, debido principalmente a que en cultivos líquidos la mayoría de las cepas no son capaces de esporular. Las estructuras diferenciadas en cultivos de superficie son: un **micelio sustrato**, producto de la fase vegetativa del ciclo y un **micelio aéreo** o reproductivo, que culminará su desarrollo con la formación de **esporas** (Figura I.2).

Una de las peculiaridades de este género es que sólo se encuentran como microorganismos unicelulares en una de las fases del desarrollo, la fase de espora (Chater y Losick, 1997).

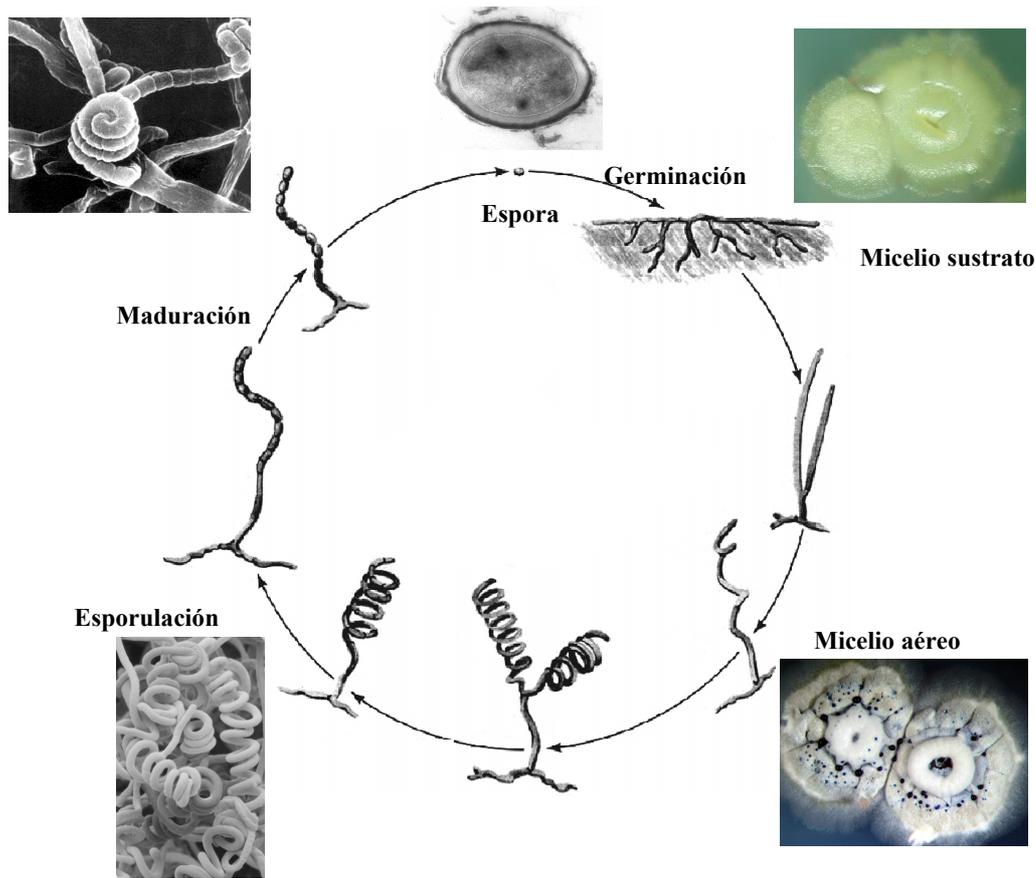


Figura I.2. Ciclo de vida de *Streptomyces*. (Modificado de Chater, 1979).

Cuando las condiciones del medio son favorables se produce la germinación de la espora y se origina el micelio sustrato. Esta estructura está formada por un entramado de hifas ramificadas donde los septos son escasos y delimitan compartimentos que contienen varias copias del genoma (Waksman, 1967; Chater y Losick, 1997). Tras este crecimiento vegetativo, en el cual los nutrientes disponibles del medio se han transformado eficientemente en biomasa micelial, comienzan a originarse hifas menos ramificadas que crecen elevándose sobre la colonia formando el micelio aéreo. El desarrollo de este micelio se lleva a cabo, al menos en parte, a expensas de los nutrientes provenientes de la lisis del micelio sustrato (Mendez *et al.*, 1985). En los últimos años se ha descrito que el desarrollo del micelio es un proceso más complejo y heterogéneo de lo que se creía en un principio. Cuando germina la espora se forma un micelio joven compartimentalizado, denominado micelio primero, en el cual, tras una temprana ronda de muerte celular alternan segmentos vivos y muertos en la misma hifa (Manteca *et al.*, 2005a; Manteca *et al.*, 2005b). Posteriormente, a partir de los segmentos vivos anteriores se generan islas de micelio no compartimentalizado (sincitio), denominado micelio segundo, que es el precursor del micelio aéreo (Manteca *et al.*, 2007). Estos autores proponen como fase vegetativa de crecimiento la que implica el desarrollo del micelio primero compartimentalizado, considerando la fase reproductiva, el resto de eventos del desarrollo. La

fase reproductiva del ciclo culmina cuando las hifas aéreas detienen su crecimiento y comienzan a fragmentarse transversalmente, transformándose en largas hileras de esporas unigenómicas e hidrofóbicas (Chater y Losick, 1997). En el caso del desarrollo de colonias aisladas así como del desarrollo de *Streptomyces* en suelos y en cultivos sumergidos, la fase vegetativa del ciclo se alarga en el tiempo siendo la predominante (figura I.3.) oponiéndose a lo que ocurre en medios de cultivo complejos y condiciones estándar de laboratorio (ej. densos inóculos de esporas y temperatura de crecimiento de 28-30° C) (Manteca y Sánchez, 2009). Tanto la formación como la metamorfosis de las hifas aéreas reproductivas, que recuerda al comportamiento de los hongos filamentosos, permite la dispersión y colonización de nuevos nichos.

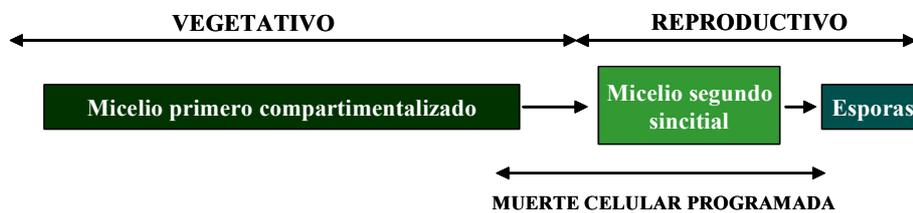


Figura I.3. Fases características del ciclo celular de *Streptomyces* crecido en condiciones naturales según se propone en (Manteca y Sánchez, 2009).

La síntesis de metabolitos secundarios coincide generalmente con el comienzo de la diferenciación morfológica y la formación del micelio aéreo. Estos dos procesos muestran elementos comunes de regulación génica (Hopwood, 1988), pero, en general, hay poca información acerca de las señales que activan los mecanismos reguladores pleiotrópicos y de la red reguladora común a ambos procesos.

1.3.1. Genes implicados en el desarrollo morfológico

A medida que crece el micelio sustrato comienza a haber limitación de nutrientes y otros tipos de estrés fisiológico. La adaptación a estos cambios es mediada en parte vía nucleótidos polifosforilados como es el ppGpp, sintetizado por el gen *relA* (Chakraborty *et al.*, 1996). Se ha comprobado que la síntesis de ppGpp produce variaciones importantes en la fisiología de las células provocando un cambio en el perfil transcripcional: baja la expresión de genes de desarrollo vegetativo y aumenta la de los responsables de diferenciación y metabolismo secundario (Hesketh *et al.*, 2007). Otras moléculas de señalización química que intervienen en el proceso de diferenciación son las γ -butirolactonas. Estas moléculas, junto con sus receptores específicos, pueden ser consideradas como hormonas bacterianas. Sus genes biosintéticos, así como sus receptores, son importantes en los procesos de diferenciación morfológica y bioquímica. El factor A producido por *S. griseus* es la γ -butirolactona mejor conocida hasta la

fecha. Su efecto pleiotrópico sobre diferenciación y producción de antibióticos ha sido ampliamente caracterizado por varios autores (Chater y Horinouchi, 2003; Ohnishi *et al.*, 2005). En *S. coelicolor* se han encontrado γ -butirolactonas denominadas SCB que presentan diferencias estructurales significativas con el factor A de *S. griseus*, pero no se han hallado evidencias de que actúen sobre la diferenciación morfológica. Parece ser que estas butirolactonas sólo afectan al metabolismo secundario (Chater y Horinouchi, 2003; Mehra *et al.*, 2008). En muchos otros estreptomicetos se han encontrado múltiples homólogos a los receptores de γ -butirolactonas y la mayoría están localizados próximos a *clusters* biosintéticos de antibióticos (Takano, 2006).

A parte de las moléculas de señalización citadas (ppGpp y butirolactonas) hay dos grupos de genes cuyos productos están implicados en los procesos de desarrollo morfológico (Chater y Horinouchi, 2003). Ambos grupos codifican en su mayoría proteínas reguladoras. A continuación se destaca brevemente su papel en diferenciación:

- **Genes *bld***

Los mutantes nulos *bld* (del inglés “bald”, calvo) presentan un fenotipo deficiente en la formación de micelio aéreo. Los productos de estos genes desencadenan una cascada de señales extracelulares que culmina con la síntesis de una pequeña proteína hidrofóbica, SapB. Esta proteína tiene actividad surfactante (rompe la tensión superficial entre el agua y el aire) permitiendo la elevación de las hifas en el aire y la consecuente formación de micelio aéreo (Willey *et al.*, 1991; Willey *et al.*, 2006; Capstick *et al.*, 2007).

- **Genes *whi***

El conjunto de eventos que finaliza con la formación de las esporas a partir de las hifas aéreas está controlado por los genes *whi*. Se denominan así porque se descubrieron analizando mutantes blancos “*white*”, color característico de colonias no esporuladas. Son genes reguladores de distintas clases con dominios de unión a DNA. Se han identificado al menos 8 genes *whi* y se dividen en tempranos y tardíos. Actúan conjuntamente con otras proteínas (ej. SigF, FtsZ) que intervienen en la septación y maduración de las esporas (Chater, 2001; Flardh y Buttner, 2009).

Además de estas proteínas reguladoras, existen otras de tipo estructural tales como SapB, las chaplinas (Chp) y las rodlinas (Rdl). Los tres tipos cubren la superficie celular y permiten la formación del micelio aéreo (SapB) y el mantenimiento de una capa fibrosa hidrofóbica que aísla a las hifas y esporas del ambiente acuoso (Chp y Rdl). Esta cubierta es muy similar a la de las superficies aéreas de los hongos filamentosos (Claessen *et al.*, 2006). En los últimos años se han hecho grandes avances en la biología celular y en la genética del crecimiento y desarrollo morfo-genético de *Streptomyces*, principalmente de *S. coelicolor*. Se está empezando a dilucidar

la base molecular del crecimiento apical y de las ramificaciones de las hifas, demostrándose que, a diferencia de otros organismos, DivIVA es la proteína más importante en este proceso en vez de MreB (que tiene esta función en *E. coli* y *B. subtilis*) (Hempel *et al.*, 2008). La función de MreB en *S. coelicolor* es el correcto ensamblaje de la pared celular de la espora (Flardh y Buttner, 2009). El crecimiento polar, independiente de MreB, también es independiente de FtsZ y de la división celular. Otras proteínas muy importantes que intervienen en el control de la esporulación son las proteínas SsgA-like (SALPs), recientemente implicadas en la localización del septo, en la síntesis y el engrosamiento de la pared de la espora y en su separación autolítica. La propia proteína SsgA activa la división celular específica de esporulación (Traag y van Wezel, 2008; Xu *et al.*, 2009). La correcta segregación de los genomas en las esporas unigenómicas, producida al final de la septación es dependiente, al menos, de las proteínas ParAB y FtsZ (Flardh y Buttner, 2009).

2. METABOLISMO SECUNDARIO EN *Streptomyces*

2.1. ASPECTOS GENERALES

Durante el ciclo biológico de *Streptomyces* se pueden diferenciar dos tipos de metabolismo, primario y secundario. El **metabolismo primario** se define como el conjunto de reacciones anabólicas y catabólicas cuyo resultado es el mantenimiento de los procesos vitales de la célula (síntesis de ácidos grasos, proteínas, lípidos, polisacáridos, coenzimas etc...) y el incremento de la biomasa total. Estos procesos son esencialmente idénticos en todas las células vivas. Por el contrario, en el **metabolismo secundario** se forman productos que no son esenciales para el crecimiento del organismo productor, al menos en las condiciones estudiadas. No obstante, los productos originados suelen conferir ventajas ecológicas y consecuentemente una mayor competitividad biológica.

Los metabolitos secundarios poseen algunas características comunes entre las que se pueden resaltar las siguientes:

- La mayoría de los compuestos son específicos de la cepa productora.
- Presentan estructuras químicas y actividades biológicas muy variadas.
- En general son productos de complejas rutas biosintéticas.

La síntesis de los metabolitos secundarios se produce al final de la fase de crecimiento exponencial o en la fase estacionaria, y se encuentra estrechamente relacionada con la diferenciación morfológica en *Streptomyces* tal como se ha comentado previamente.

2.2. PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN *Streptomyces*

Dentro del amplio y heterogéneo abanico de metabolitos secundarios producidos por el género *Streptomyces* son muchos los que tienen aplicaciones industriales (tabla I. 1.). Dentro de este grupo destacan los antibióticos por sus extensas aplicaciones clínicas. Las bacterias de este género producen más del 50 % de los antibióticos naturales disponibles actualmente.

Los antibióticos se definen como metabolitos de bajo peso molecular producidos principalmente por microorganismos, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento o causar la muerte de otros microorganismos a bajas concentraciones. Los genes cuyos productos intervienen en su biosíntesis están físicamente agrupados en *clusters*. El tamaño de éstos suele ser variable, extendiéndose desde 15 Kb hasta 100 Kb, y los genes implicados en resistencia, transporte y regulación también suelen incluirse en dichas agrupaciones génicas (Bibb y Hesketh, 2009).

Tabla I.1. Ejemplos de especies productoras y metabolitos secundarios con distintas aplicaciones industriales. (Ejemplos tomados de Kieser *et al*, 2000).

| Especie productora | Metabolito secundario | Aplicación |
|-------------------------|-----------------------|--------------------------|
| <i>S. cacaoi</i> | Polioxina | pesticida |
| <i>S. hygroscopicus</i> | Rapamicina | inmunosupresor |
| <i>S. aureofaciens</i> | Tetraciclina | antibacteriano |
| <i>S. hygroscopicus</i> | Bialafos | herbicida |
| <i>S. griseus</i> | Estreptomycin | antibacteriano |
| <i>S. avermitilis</i> | Avermectina | antiparasítico |
| <i>S. griseus</i> | Candidina | antifúngico |
| <i>S. noursei</i> | Nistatina | antifúngico |
| <i>S. peucetius</i> | Doxorubicina | antitumoral |
| <i>S. lavandulae</i> | Estreptotricina | promotor del crecimiento |

2.2.1. Metabolitos secundarios con actividad antibiótica en *S. coelicolor*

El análisis de la secuencia del cromosoma de *S. coelicolor* ha permitido la identificación de al menos 23 *clusters* de genes (aproximadamente el 4,5 % del genoma) relacionados con la biosíntesis de enzimas del metabolismo secundario. Tres de los *clusters* citados se conocían antes de la secuenciación del genoma y corresponden a las rutas biosintéticas de los antibióticos **actinorrodina (ACT)**, **undecilprodigiosina (RED)** y **antibiótico dependiente de calcio (CDA, del inglés: *Calcium Dependent Antibiotic*)**. *S. coelicolor* A3(2) produce además un cuarto antibiótico denominado metilenomicina cuyos genes biosintéticos están localizados en el plásmido SCP1. Otro *cluster* descrito es el del poliquétido críptico o *cpk*, que agrupa entre otros,

genes que codifican subunidades de una poliquétido sintasa de tipo I, aunque actualmente no se ha determinado el producto (Pawlik *et al.*, 2007). Entre el resto de los *cluster* del metabolismo secundario se han identificado por homología otras poliquétido sintetasas de tipo I y II, chalcona sintetasas, péptido sintetasas no-ribosomales (NRPSs) y terpeno ciclasas (Bentley *et al.*, 2002).

Los cuatro antibióticos producidos por *S. coelicolor* tienen distinta naturaleza química (Figura I.4.). La actinorrodina es un poliquétido aromático pigmentado que sirve como indicador de pH. Es de color azul y soluble en agua en medio básico (pH>7) y rojo e insoluble en agua en medio ácido. La undecilprodigiosina es un pigmento rojo con una estructura de tripirrol altamente hidrofóbica. El CDA es un lipopéptido cíclico y la metilenomicina es una ciclopentanona. El papel principal de estos antibióticos es defender la colonia de competidores al tiempo que se desarrolla el micelio aéreo y se lisa el micelio sustrato (Kieser *et al.*, 2000). Todos ellos son activos frente a Gram positivas, aunque su actividad biológica permanece bastante inexplorada. La actinorrodina por su relación estructural con otros antibióticos como la kalafungina y nanomicina podría actuar como un agente alquilante biorreductor. La undecilprodigiosina pertenece al grupo de las prodigiosinas, las que actualmente tienen gran atractivo por su efecto inmunosupresor y anticancerígeno (Williamson *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2007). El CDA forma un ionóforo dependiente de calcio y actúa alterando la permeabilidad de la membrana plasmática de otros microorganismos (Lakey *et al.*, 1983).

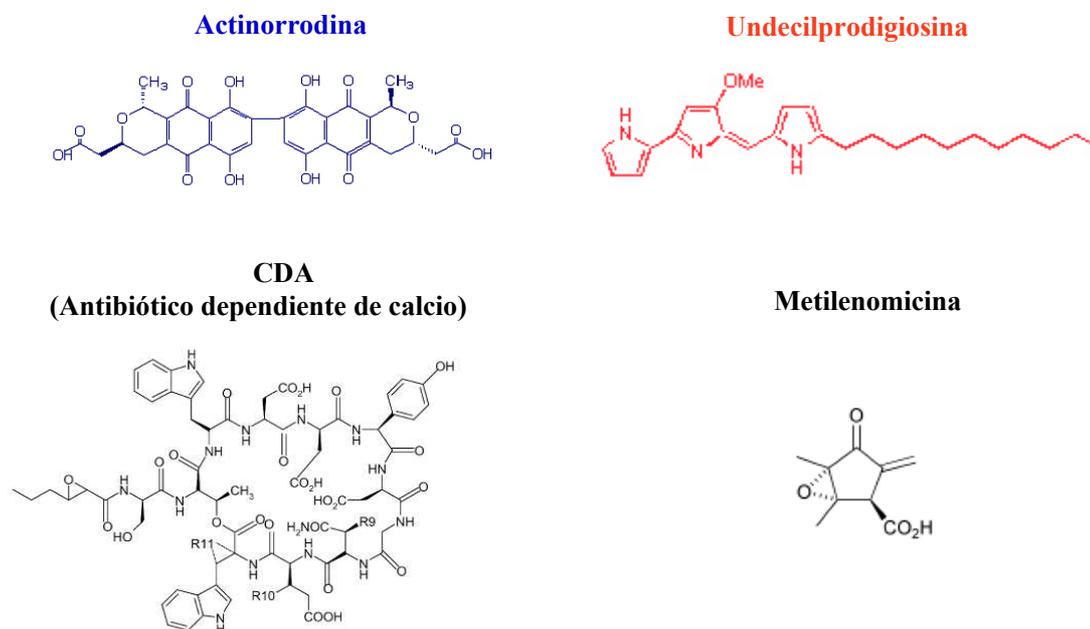


Figura I.4. Estructura química de los antibióticos producidos por *S. coelicolor* A3 (2).

Pese a su actividad antibacteriana estos antibióticos no tienen interés en clínica, sin embargo, poseen otras características que resultan valiosas en investigación. La actinorrodina y la undecilprodigiosina gracias a su pigmentación, confieren colores característicos a los cultivos de las cepas productoras. El hecho de que aporten una característica fenotípica fácilmente identificable, ha resultado muy útil en los estudios genéticos sobre biosíntesis de antibióticos en distintas especies de *Streptomyces*. Cabe destacar que el *cluster* de biosíntesis de actinorrodina jugó un papel esencial en la obtención de los primeros antibióticos híbridos, resultantes de la cooperación metabólica entre las enzimas biosintéticas de dos antibióticos distintos: medermicina-actinorrodina en la obtención del antibiótico híbrido mederrodina y granaticina-actinorrodina para obtener los híbridos dihidrogranaticina y dihidrogranatirrodina (Hopwood *et al.*, 1985b).

3. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN *S. coelicolor*

En bacterias, la síntesis de metabolitos secundarios está sometida principalmente a una regulación transcripcional, aunque también existen mecanismos de regulación traduccional y postraduccional. La producción de antibióticos en *S. coelicolor* comienza cuando el cultivo entra en fase estacionaria y coincide temporalmente con los procesos de diferenciación morfológica. Cada *cluster* biosintético está sometido a **una regulación específica** que hace que un determinado antibiótico se sintetice en un momento concreto y bajo una serie de circunstancias. A su vez, la biosíntesis de varios o de todos los antibióticos está controlada coordinadamente por **reguladores globales o pleiotrópicos**. Hay reguladores que incluso afectan a procesos completamente diferentes como son la producción de antibióticos y la diferenciación morfológica (Huang *et al.*, 2005). La expresión de ambos grupos de genes reguladores (específicos y globales) y consecuentemente el comienzo de la biosíntesis de antibióticos, está determinado e influenciado por gran variedad de factores fisiológicos y medioambientales entre los que destacan: la tasa de crecimiento del microorganismo, moléculas de señalización, desequilibrio del metabolismo y varios tipos de estrés fisiológico (Bibb, 1996).

La clasificación de los reguladores de la producción de antibióticos debe tratarse con cautela. Por un lado se puede hablar de una regulación jerárquica, en la que hay reguladores que actúan a niveles inferiores (específicos) y otros que actúan a un nivel superior (globales). En principio, la actuación de los reguladores específicos es controlada por los reguladores globales. Sin embargo, tanto la “especificidad” como la “globalidad” son relativas, ya que en determinadas ocasiones reguladores más bajos en esa jerarquía pueden actuar por encima de aquellos más “globales” (Huang *et al.*, 2005). Por tanto, la regulación de la biosíntesis de

antibióticos se trata de una complejísima red interconectada a varios niveles muy difícil de desentramar (Martínez-Antonio y Collado-Vides, 2003).

3.1. GENES DE REGULACIÓN ESPECÍFICA

Este grupo incluye genes que codifican factores de transcripción localizados en un determinado *cluster* biosintético. Son los denominados **reguladores específicos de ruta** (*pathway specific regulators*) (Bibb, 1996). Dichos reguladores actúan en la mayoría de los casos como activadores de la transcripción, regulando la expresión de numerosos transcritos mono- o policistrónicos en una agrupación génica para antibióticos. Algunos de estos genes identificados en *S. coelicolor* son el *actII-ORF4* del *cluster* biosintético de la actinorrodina (Fernández-Moreno *et al.*, 1991), los genes *redD* y *redZ* del *cluster* de la undecilprodigiosina (Takano *et al.*, 1992; White y Bibb, 1997), y el *cdaR* del *cluster* del CDA (Chouayekh y Virolle, 2002; Ryding *et al.*, 2002). Muchos de estos reguladores específicos de ruta codifican proteínas reguladoras que pertenecen a la **familia SARP** (***Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins***). Esta familia agrupa a proteínas que contienen en el extremo amino terminal (N-t) un motivo de unión a DNA tipo hélice-giro-hélice (H-T-H) y comparten similitud en secuencia con proteínas pertenecientes a la familia OmpR (Wietzorrek y Bibb, 1997). Varias proteínas de la familia SARP parecen reconocer repeticiones heptaméricas en las regiones promotoras de sus genes diana (Bibb, 2005).

Otros reguladores transcripcionales específicos de ruta pertenecen a la **familia LAL** (***Large ATP-binding regulators of the LuxR class***). Estas proteínas contienen un motivo de unión a nucleótidos trifosfato en el extremo amino terminal y un motivo de unión a DNA (H-T-H) en la región carboxilo terminal (C-t) característico de la familia de proteínas reguladoras bacterianas LuxR. Este grupo de reguladores está poco caracterizado. En *S. coelicolor* no se ha descrito ningún regulador específico de ruta que pertenezca a esta familia pero sí se han identificado en otras especies del género *Streptomyces*: PikD de la ruta de la picromicina en *S. venezuelae* (Wilson *et al.*, 2001), TmcN de la ruta de tautomycetina en *Streptomyces sp. CK4412* (Hur *et al.*, 2008) y AveR de la ruta de avermectina en *S. avermilitis* (Kitani *et al.*, 2009), entre otros.

Ambas familias, SARP y LAL, parecen ser exclusivas de actinomicetos (Bibb, 2005).

3.2. GENES DE REGULACIÓN GLOBAL

Los genes que codifican reguladores globales suelen localizarse fuera de los *cluster* biosintéticos. Dentro de este grupo se pueden diferenciar a su vez varios tipos de reguladores:

1.- Genes reguladores con efectos globales o pleiotrópicos sobre la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario. Un ejemplo de este tipo de genes reguladores lo

constituyen los genes *bld*, los cuales dirigen el desarrollo del micelio aéreo y regulan también la producción de antibióticos. Se ha comprobado que los mutantes *bldA* muestran defectos morfológicos y menor producción de los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina (Fernández-Moreno *et al.*, 1991; White y Bibb, 1997; Takano *et al.*, 2003; Hesketh *et al.*, 2007). Este es a su vez un ejemplo de regulación a nivel traduccional, puesto que *bldA* codifica el único tRNA que reconoce específicamente un codón de leucina (UUA) de uso muy poco frecuente. En su ausencia, la traducción de aquellas proteínas que lleven el codón UUA en su secuencia quedará bloqueada. Otro ejemplo de regulador pleiotrópico es el gen *relA* responsable de la síntesis de ppGpp en *Streptomyces*. Esta molécula afecta entre otros procesos a la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina, así como a la diferenciación morfológica (Hesketh *et al.*, 2007).

Otro regulador pleiotrópico es el gen *absB*. El producto de este gen es una ribonucleasa III y es el primer ejemplo de un posible control de la síntesis global de antibióticos a nivel de degradación de RNA en *S. coelicolor* (Adamidis y Champness, 1992; Sello y Buttner, 2008). Se ha demostrado que la actividad endoribonucleasa de esta enzima es esencial para la regulación de la producción de antibióticos (Gravenbeek y Jones, 2008), por lo que se cree que podría unirse y degradar determinados RNAs diana que actúan como represores o bien podría activar directamente genes necesarios para la síntesis de antibióticos (Jones, 2010). Además muy recientemente se le ha relacionado con la regulación del desarrollo morfológico (Xu *et al.*, 2010).

2.- Reguladores globales de la producción de antibióticos. Este grupo engloba a los genes que ejercen su regulación sobre la producción de dos o más antibióticos, pero no tienen efecto sobre el desarrollo morfológico. A continuación se citan varios ejemplos:

- **AfsR y AfsS**

Son reguladores que forman parte de una cascada de señalización que se activa vía Ser/Thr quinasas como AfsK, PkaG y AfsL. Cada una de estas quinasas actúa respondiendo a una señal específica y fosforilan a AfsR activándolo. AfsR es un regulador tipo SARP que se une al promotor de *afsS* (regulador similar a los factores sigma) y activa su transcripción (Tanaka *et al.*, 2007). Ambas proteínas, aunque se desconoce de que manera, regulan la producción de undecilprodigiosina y actinorrodina, y modulan respuestas frente a estrés nutricional. Además recientemente se ha descubierto una regulación cruzada entre AfsR y PhoP, un regulador de respuesta del que se hablará en el siguiente apartado, que controla la transcripción de genes regulados por fosfato y que afecta positivamente a la biosíntesis de metabolitos secundarios en *S. coelicolor* (Santos-Beneit *et al.*, 2009).

- **AtrA**

Es una proteína reguladora de la familia de reguladores TetR que se identificó por unirse al promotor del gen *actII-ORF4* y activar su transcripción (Uguru *et al.*, 2005). Es un regulador conservado en otros *Streptomyces* y tanto él como su ortólogo en *S. griseus* (AtrA-g), son capaces de activar directamente la expresión de *strR* (SARP del *cluster* de estreptomicina) incrementando la producción de estreptomicina en determinados medios de cultivo (Uguru *et al.*, 2005; Hirano *et al.*, 2008). Recientemente, se ha comprobado que este regulador tiene efecto sobre varios procesos celulares distintos a la producción de antibióticos, tales como biosíntesis de la pared celular y metabolismo del glicerol (comunicación oral K.McDowall, ISBA 2009). Además se le ha asociado con el transporte de N-acetilglucosamina, ya que se ha comprobado que activa directamente la expresión del gen que codifica la permeasa NagE2 (Nothhaft *et al.* 2010). A lo largo de este trabajo se ha utilizado esta proteína como control de varios experimentos, por lo que su implicación en los distintos procesos se detallará a lo largo de la memoria.

- **Sistemas de dos componentes**

Se han descrito varios sistemas de dos componentes que afectan de forma global a la regulación de la biosíntesis de antibióticos. Uno de los ejemplos mejor conocidos es el sistema AbsA1/A2 de *S. coelicolor*, que regula coordinadamente la biosíntesis de los cuatro antibióticos conocidos sin afectar a los procesos de diferenciación (Adamidis *et al.*, 1990; McKenzie y Nodwell, 2007; McKenzie y Nodwell, 2009).

En el presente trabajo nos hemos centrado en el estudio de varios **sistemas de dos componentes** de *S. coelicolor*, por lo que en el siguiente apartado se detallan sus características.

4. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES

4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las células, eucariotas y procariotas, tienen una gran capacidad para reconocer, integrar y responder a una amplia variedad de señales ambientales y fisiológicas. En este proceso de elaboración de una respuesta adaptativa frente a los distintos estímulos del medio, las rutas de transducción de señales juegan el papel principal.

La **vía primordial de señalización** para las bacterias son **los sistemas de dos componentes (TCSs, del inglés *Two Component Systems*)**. Estos sistemas también se han identificado en archaeas (Kim y Forst, 2001) aunque constituyen un número reducido de sistemas de señalización. En eucariotas las cascadas de señales dirigidas por Ser/Thr/Tyr quinasas son las más abundantes, no obstante, también se han identificado TCSs en levaduras, hongos, protozoos y plantas (Thomason y Kay, 2000; Urao *et al.*, 2000). No se han hallado en

genomas animales ya secuenciados, incluido el humano, por lo que se considera que estas proteínas no están presentes en el reino animal (Wolanin *et al.*, 2002).

Los sistemas de dos componentes constan de una proteína sensora denominada **histidín quinasa (HK, del inglés *histidine kinase*)**, y un **regulador de respuesta (RR)** que actúan en conjunto. La localización de los genes que codifican estas proteínas es variable, encontrándose repartidos por todo el cromosoma. Cuando se habla de sistemas de dos componentes como tal, se hace referencia a HKs que tienen su correspondiente pareja RR adyacente en el genoma (o viceversa). En determinados casos estos genes se encuentran sin pareja contigua en el genoma y se los denomina huérfanos. En los genomas bacterianos, en los que hay una media de 10 a 50 sistemas de dos componentes (Szurmant *et al.*, 2007), la incidencia de HKs y RRs huérfanos es variable. Cabe destacar el gran número de TCSs descrito en el genoma de *Myxococcus xanthus*, en el que se han identificado 146 HKs y 130 RRs, de los que el 50 % de los genes que codifican HKs y el 40 % que codifican RRs se encuentran sin su correspondiente pareja (Overgaard *et al.*, 2006). Aunque se sabe poco acerca de los HK-RR huérfanos se ha comprobado que puede haber regulación cruzada entre los RR huérfanos con HKs emparejadas y viceversa. Se cree que las HKs huérfanas pueden constituir una manera de ampliar el rango de señales ambientales a las que puede responder un determinado RR (Wang *et al.*, 2009b). En muchos sistemas de dos componentes la función de las HKs está regulada por proteínas auxiliares. Algunas de ellas actúan influyendo en la estabilidad de los RRs, ampliando de este modo la diversidad de respuesta a múltiples señales. En algunos casos estas proteínas auxiliares son responsables de la coordinación entre diferentes sistemas (Buelow y Raivio, 2009).

En los últimos años, ha aumentado el interés por el estudio de los sistemas de dos componentes. Este hecho probablemente se debe a que la disponibilidad del elevado número de genomas bacterianos secuenciados, ha revelado la gran importancia que estos parecen tener, tanto por su ubicuidad (distribuidos en Gram positivas y negativas) como por su abundancia en determinadas bacterias (ej. mixobacterias y estreptomicetos). El volumen de las secuencias de genomas públicas disponibles es tan amplio que se han desarrollado varias bases de datos disponibles en la red, como P2CS y MIST2 (<http://www.p2cs.org/>, <http://mistdb.com/>) (Barakat *et al.*, 2009; Ulrich y Zhulin, 2010). En la versión actual de la base de datos P2CS (*Prokariotic 2-Component Systems*) se describen más de 50000 proteínas TCSs codificadas por 755 genomas y 39 metagenomas. Además, los sistemas de dos componentes se han relacionado con múltiples procesos celulares incluyendo división celular, motilidad, formación de biofilm, comunicación intercelular etc (Groban *et al.*, 2009), entre los cuales cabe destacar aquellos relacionados con la virulencia de algunos microorganismos patógenos y con la resistencia a antibióticos. Esta característica, junto con su ausencia en el reino animal, los convierte en atractivas dianas antimicrobianas (Watanabe *et al.*, 2008; Gotoh *et al.*, 2010).

4.2. ARQUITECTURA DE LAS HKs Y LOS RRs

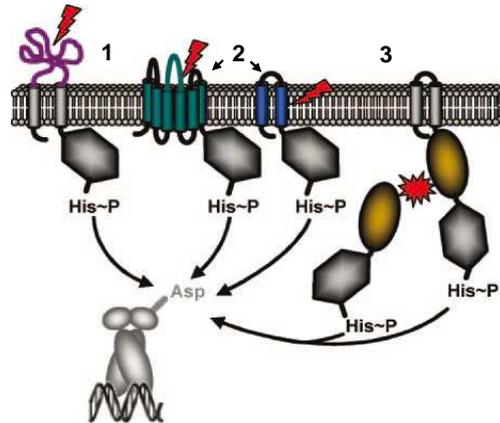
Generalmente las **HKs** son proteínas de membrana cuyo tamaño oscila entre los 40 y 110 kDa. Suelen actuar como proteínas homodiméricas. Cada monómero está formado por dos regiones: la región amino terminal, donde se localiza el dominio sensor y la región carboxilo terminal, que es donde reside la actividad quinasa de la proteína.

La región amino terminal es variable en secuencia, lo cual refleja la gran diversidad de señales ambientales a las que pueden responder las distintas quinasas sensoras. El **dominio sensor**, localizado en esta región, suele ser extracelular y su función es el reconocimiento de la señal. Las HKs pueden clasificarse en tres grandes grupos en base a la topología de sus dominios sensores. El grupo mayoritario lo constituyen aquellas en las que el dominio sensor se localiza en el periplasma o en la superficie extracelular mediante, al menos, dos dominios transmembranales. Este grupo de HKs responde a estímulos extracelulares, comúnmente solutos y nutrientes. En el segundo grupo se clasifican las HKs que no tienen un dominio sensor extracelular aparente y se cree que responden a estímulos asociados a membrana ya que se localizan en la misma mediante múltiples dominios transmembrana (de 2 a 20). Por último, el tercer grupo presenta un dominio sensor intracelular que puede estar o no asociado a membrana y parece responder a estímulos internos. Algunas HKs combinan varias de las topologías (Mascher *et al.*, 2006). Existen una serie de dominios múltiples alternativos que pueden estar localizados en el dominio sensor y que permiten a estas proteínas responder a muy diversos estímulos bien directamente o gracias a la interacción con proteínas auxiliares. En los dominios extracitoplasmáticos de un limitado número de HKs se han encontrado dominios de las familias CACHE, CHASE y PBP entre otros. En cuanto a los sensores citoplasmáticos, el 33 % de las HKs tienen un dominio PAS (unos pequeños ligandos) y el 9 % un dominio GAF. El otro dominio citoplásmico importante encontrado, presente en el 31 % de las HKs, es el HAMP (Gao y Stock, 2009).

La región carboxilo terminal de la proteína, consta a su vez de dos dominios: un **dominio catalítico (CA ó HATPase_c)**, responsable de la unión a ATP, y un **dominio de dimerización, y fosfotransferencia (DHp)** donde se localiza el motivo “H Box” que incluye el residuo conservado de histidina necesario para su activación (Robinson *et al.*, 2000).

En la figura I.5.(A) se representa los diferentes grupos de HKs y en I.5.(B) la estructura conservada de las HKs mayoritarias. En la inmensa mayoría de los sistemas de dos componentes se desconocen los estímulos que detectan los dominios sensores de las HKs.

A.



B.

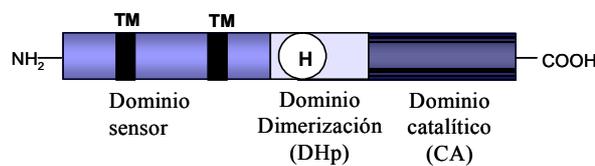


Figura I.5. A. Representación de los tres grupos de HKs (tomada de (Mascher *et al*, 2006): (1) sensoras de estímulos extracitoplásmicos, (2) sensoras de estímulos ligados a la membrana y (3) sensoras citoplásmicas. B. Representación esquemática de un monómero de una HK prototipo (grupo 1). Los segmentos transmembrana son las regiones marcadas como TM. El aminoácido histidina se representa con la letra H.

Existe otra clasificación de HKs en base a la presencia de aminoácidos conservados alrededor de la histidina fosforilable (característica distintiva de este grupo de proteínas). De esta forma se han descrito 5 grupos de HKs: I, II, IV, IIIA y IIIB. Los dos últimos están estrechamente relacionados. (Fabret *et al.*, 1999)

Los **RRs** son proteínas de 25 kDa de tamaño medio que constan generalmente de dos dominios, un **dominio regulador** en la región amino terminal (también llamado dominio receptor o REC) y un **dominio efector** en la zona carboxilo terminal. En el dominio regulador se localizan una serie de residuos aminoácidos conservados imprescindibles para la fosforilación del RR. Este conjunto de aminoácidos está constituido por 3 residuos Asp(D)/Glu(E) que forman el denominado bolsillo ácido, entre los cuales se encuentra el receptor del fosfato. Otro aminoácido relevante en la función catalítica es una Lys (K) y otros implicados en el cambio conformacional son una Thr(T)/Ser(S) y una Tyr(Y) (Gao y Stock, 2009). La región más variable de la proteína la constituye el dominio efector, el cual media la respuesta apropiada frente al estímulo específico de ese sistema (Figura I.6.). La mayoría de los dominios efectores tienen capacidad de unión a DNA (63 %) y actúan como reguladores transcripcionales, no obstante, una pequeña parte de los RRs tienen dominios efectores enzimáticos (13 %), de unión a RNA (1 %) o de unión a proteínas (3 %) (Galperin y Nikolskaya, 2007; Gao y Stock, 2009). Existen a su vez RRs que constan sólo de dominio

receptor REC (un 17 %), como es el caso de CheY (RR de quimiotaxis de *E. coli*) y Spo0F (RR de esporulación de *B. subtilis*) (Jenal y Galperin, 2009).

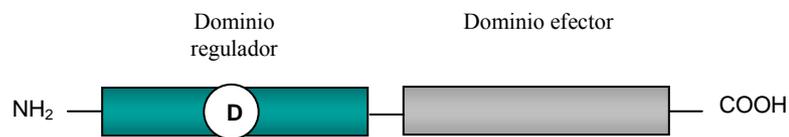


Figura I.6. Representación esquemática de un RR. El aminoácido aspártico se representa mediante la letra D.

Los RRs que actúan como reguladores transcripcionales se clasifican por la relación estructural de sus dominios efectores, debido a que el dominio receptor, donde se localiza el aspártico fosforilable, está muy conservado en todos ellos y es imposible establecer una clasificación en base a éste. Se clasifican según sus dominios C-t en tres subfamilias mayoritarias: OmpR (30 %), NarL (17 %) y NtrC (10 %). El resto de subfamilias son poco comunes siendo la más representada la familia LytTR (3 %) (Galperin, 2006; Gao y Stock, 2009). En la siguiente dirección de Internet se recoge toda la información relativa a una lista completa de los reguladores codificados por 200 genomas analizados: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/RRcensus.html (Galperin y Nikolskaya, 2007; Jenal y Galperin, 2009). En general, la función de los RRs puede ser, bien la de actuar como activadores, bien como represores o como ambas cosas dependiendo de la diana. La descripción estructural de los mismos no ayuda a definir que genes son regulados por un determinado RR y puede tratarse desde un simple operón hasta cientos de genes.

4.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS SISTEMAS DE DOS COMPONENTES

El mecanismo de actuación fundamental en una ruta de señalización de dos componentes prototipo es el siguiente:

El estímulo es detectado por el dominio sensor de una determinada HK; como consecuencia de ese reconocimiento la HK cataliza la autofosforilación de un residuo específico de histidina a partir de una molécula de ATP. Esta autofosforilación se da frecuentemente en trans, es decir, un monómero HK fosforila al otro monómero y viceversa, no obstante también puede ocurrir en cis, donde cada monómero se autofosforila independientemente del otro (Casino *et al.*, 2009). Posteriormente el RR cataliza la transferencia del grupo fosforil desde el residuo histidina de la HK hasta el residuo aspártico localizado en su dominio regulador. La fosforilación del dominio regulador da lugar a un cambio conformacional en el mismo, y consecuentemente a la forma activa del dominio efector, el cual podrá llevar a cabo su función

generalmente uniéndose a secuencias específicas de DNA y regulando la expresión génica. **(Figura I.7).**

En la célula, los reguladores de respuesta se encuentran en equilibrio entre los dos estados conformacionales, activo e inactivo. La fosforilación del dominio regulador por parte de la histidín quinasa desplaza el equilibrio hacia la conformación activa.

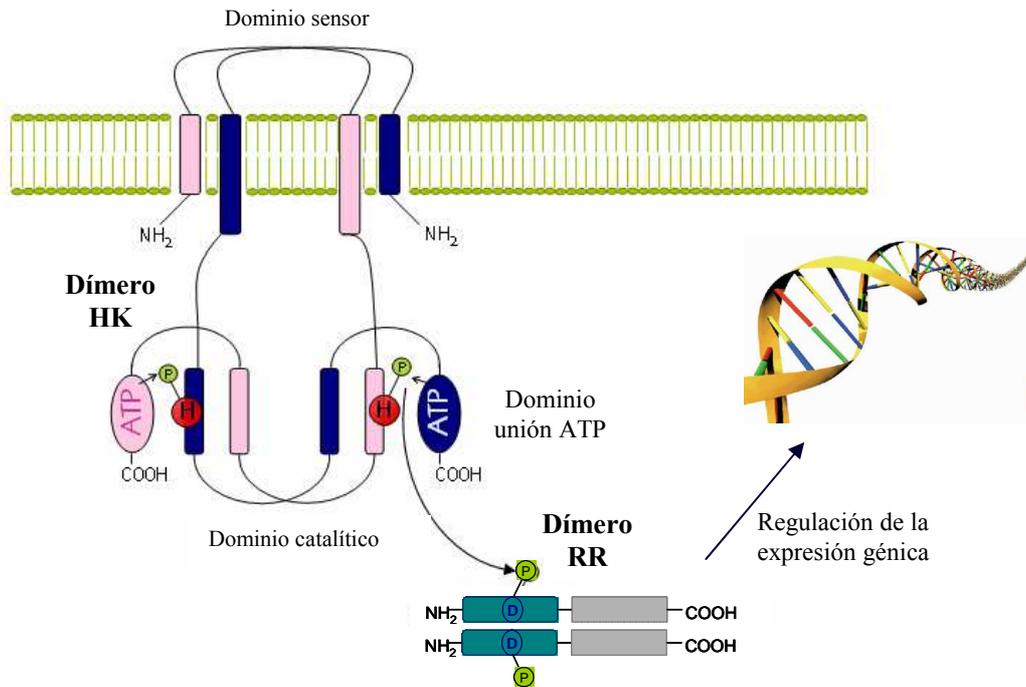


Figura I.7. Mecanismo de acción de un sistema de dos componentes típico de organismos procariontes.

Recientemente se ha identificado en procariontes un grupo de RRs que, aunque conservan las características estructurales de los RRs convencionales, carecen de los residuos clave para su fosforilación. Estos RRs se activan independientemente de su fosforilación y se han denominado PIARR (*Phosphorilation-Independent Activation of Response Regulator* (Ruiz, 2008).

Además de estas rutas de fosfotransferencia, que son las más abundantes en procariontes, existen otras más complejas donde frecuentemente actúan más de dos proteínas y se dan múltiples pasos de fosfotransferencia (*phosphorelay system*) (Zhang y Shi, 2005). En este tipo de rutas el grupo fosforil se transfiere desde la quinasa sensora a proteínas citoplasmáticas intermediarias que finalmente se encargan de fosforilar el aspártico del dominio receptor del RR. En la mayoría de estas rutas complejas, las HKs se conocen como quinasas híbridas por poseer los dominios que contienen los aminoácidos fosforilables histidina y aspártico en la misma proteína. En este caso se transfiere el grupo fosforil desde el aspártico de la HK híbrida a

proteínas intermediarias denominadas histidin fosfotransferasas (HPT), las cuales contienen una histidina fosforilable. Estas proteínas van a jugar un papel esencial en la transferencia del fosfato hasta los RRs citoplasmáticos (Figura I.8.). Estas cascadas de fosforilación complejas son más características de eucariotas (West y Stock, 2001).

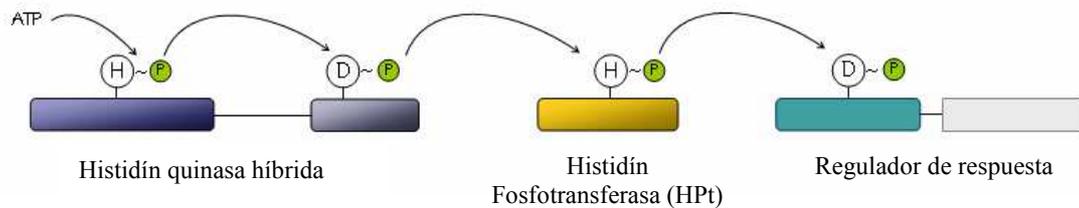


Figura I.8. Mecanismo de acción de una cascada de fosforilación de un sistema de múltiples componentes. (*Multi-component phosphorelay system*).

El tiempo de vida de los distintos RR fosforilados puede variar de segundos a horas. Esta enorme variabilidad está directamente relacionada con el tipo de respuesta que llevan a cabo. Este proceso puede deberse, bien a la autodefósforilación propia del RR, o bien a la actividad fosfatasa de otras proteínas (Silversmith, 2010). Frecuentemente es la propia HK la que presenta esta actividad hacia su respectivo RR, constituyendo así una forma adicional de regular el nivel de RR fosforilado presente en la célula. (West y Stock, 2001; Kenney, 2010). Un ejemplo de actividad quinasa y fosfatasa en la misma HK es el de AbsA1 frente a su RR AbsA2 (Sheeler *et al.*, 2005).

El grado de especificidad entre la HK y el RR de una determinada pareja es muy elevado. Se han hecho estudios de regulación cruzada entre diferentes parejas de HKs y RRs *in vitro*. Se ha comprobado que la regulación cruzada es posible, pero se da con muy baja frecuencia y sólo un número muy reducido de HKs son las que presentan esa “promiscuidad”. Además, en la mayoría de las ocasiones las cinéticas son tan lentas que resultan irrelevantes desde el punto de vista biológico (Groban *et al.*, 2009). La especificidad HK-RR viene determinada por la secuencia primaria de ambas proteínas y reside en unos pocos aminoácidos localizados en el dominio de fosforilación de la quinasa. De hecho, en el trabajo de Skerker y colaboradores, demuestran cómo cambiando tan sólo 4 aminoácidos clave en el reconocimiento HK-RR se puede reconducir la especificidad (Skerker *et al.*, 2008). Además de las preferencias cinéticas de cada quinasa por su regulador, hay acciones adicionales que preservan la fidelidad *in vivo*. Uno de estos ejemplos lo constituye la actividad fosfatasa exhibida por muchas quinasas sobre sus RRs. Se cree que así se elimina un posible *background* de regulador fosforilado inespecíficamente. Otro factor a tener en cuenta es la competición por el sustrato. Se ha demostrado que puede darse regulación cruzada entre dos sistemas muy similares, *in vivo*,

cuando se eliminan las parejas correspondientes de una HK y un RR (Skerker *et al.*, 2008; Groban *et al.*, 2009).

Por otra parte, se ha demostrado experimentalmente que es posible fosforilar *in vitro* algunos RRs, en ausencia de sus HKs, mediante el uso de diferentes fosfodonadores de bajo peso molecular (acetilfosfato, carbamoilfosfato o fosforamidatos), aunque en este caso, las tasas de fosforilación son mucho menores (Lukat *et al.*, 1992; Hoskisson y Hutchings, 2006; Barbieri y Stock, 2008). Esta evidencia *in vitro* de fosfotransferencia con fosfodonadores como el acetilfosfato, sugieren la posibilidad de una relación entre los sistemas de dos componentes y el estado metabólico de la célula (Wolfe, 2010).

4.4. SISTEMAS DE DOS COMPONENTES EN *S. coelicolor*

El rango de estímulos medioambientales a los cuales una bacteria puede responder está directamente relacionado con el número de HKs codificadas por su genoma. Analizando los datos de la secuencia del genoma de *S. coelicolor* se han identificado, por similitud en secuencia de dominios conservados, 67 sistemas de dos componentes, 17 HKs y 13 RRs huérfanos (Hutchings *et al.*, 2004). El porcentaje de sistemas de dos componentes en relación al número total de genes es del 0,86 % aproximadamente, la cual supone en general, un 25 % más que en el resto de bacterias no patógenas de vida libre (Kim y Forst, 2001). Esta elevada proporción sugiere que *S. coelicolor* es un microorganismo bien equipado para responder al amplio rango de estímulos a los que se enfrenta debido al hábitat natural en el que se encuentra, el suelo (Bentley *et al.*, 2002). El hecho de que además estén distribuidos por todo el cromosoma (*core* y brazos) pone de manifiesto que estos sistemas participan en muchas respuestas celulares, aunque actualmente no se ha descrito ningún TCS que regule funciones vitales para *Streptomyces*. Por el contrario, sí se han descrito TCSs esenciales en otras bacterias. Un claro ejemplo lo constituye el sistema Yyc(FG), que controla el equilibrio homeostático en varios géneros de bacterias Gram positivas (Winkler y Hoch, 2008).

La gran mayoría de las HKs identificadas en el genoma de *S. coelicolor* pertenecen a los grupos II y IIIA dentro de la clasificación establecida. Además las RRs parejas de HKs del grupo II pertenecen a la familia NarL (53 en total) y los emparejados con las kinasas del grupo IIIA a la familia OmpR (21) (Hutchings *et al.*, 2004). Solo existen 3 RRs que tienen únicamente dominio REC, 1 con dominio de unión LytTR, 1 con dominio de unión a RNA y 2 con un dominio enzimático tipo PP2C ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/ Complete_Genomes/RRcensus.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/RRcensus.html)).

La mayor parte de los sistemas de dos componentes de *S. coelicolor* no están caracterizados. A continuación se muestra una tabla resumen (Tabla I.2) de los sistemas que se han identificado experimentalmente en esta especie y de otros sistemas que han sido descritos mediante homología con sistemas previamente caracterizados en otras bacterias.

Tabla I.2. Sistemas de dos componentes con función identificada de forma directa en *S. coelicolor* o por homología con otros sistemas.

| Sistema regulador | Proceso regulado (Directa o indirectamente) | Referencia |
|-------------------|---|--|
| AbsA1/A2 | Producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i> | (Adamidis <i>et al.</i> , 1990) |
| PhoPR | Transporte de fosfato y producción de antibióticos en <i>S. lividans</i> y <i>S. coelicolor</i> | (Sola-Landa <i>et al.</i> , 2003; Rodríguez-García <i>et al.</i> , 2007) |
| AfsQ1/Q2 | Producción de antibióticos y diferenciación en <i>S. coelicolor</i> | (Ishizuka <i>et al.</i> , 1992) |
| CutRS | Producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i> | (Chang <i>et al.</i> , 1996) |
| EcrA1/A2 | Producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i> | (Li <i>et al.</i> , 2004) |
| RapA1A2 | Producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i> | (Lu <i>et al.</i> , 2007) |
| CseBC | Homeostasis de pared celular en <i>S. coelicolor</i> | (Paget, 1999) |
| VanRS | Resistencia a vancomicina en <i>S. coelicolor</i> | (Hong, 2004) |
| OsaAB | Osmoadaptación y producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i> | (Bishop <i>et al.</i> , 2004) |
| ChiRS | Producción de una quitinasa en <i>S. thermoviolaceus</i> y <i>S. coelicolor</i> | (Tsujiibo <i>et al.</i> , 1999; Homerova <i>et al.</i> , 2002) |
| KdpDE | Presión osmótica en <i>E. coli</i> y <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | (Wood, 1999; Steyn <i>et al.</i> , 2003) |
| RagKR | Esporulación independiente de SapB en <i>S. coelicolor</i> | (San Paolo <i>et al.</i> , 2006) |

Observando la tabla I.2. se puede comprobar que la mayoría de los sistemas identificados hasta la fecha están relacionados con la producción de antibióticos. Esto se debe en parte a la forma de identificación. En muchos casos se hacen *screening* buscando mutantes deficientes en síntesis de antibióticos y es *a posteriori* cuando se identifica el gen que causa esta deficiencia. Independientemente de este motivo, encontrar un número tan elevado de reguladores que alteran la producción de antibióticos no es algo tan sorprendente debido a: (1) la redundancia de éstos en *Streptomyces* y (2) la variedad de condiciones ambientales a las que tiene que responder. Esta redundancia supone a su vez que la actuación de estos sistemas se limite a unas condiciones de crecimiento particulares, y que como consecuencia, un fenotipo pase desapercibido en numerosas ocasiones. A continuación, se resume el papel conocido de los TCSs implicados en la regulación de la producción de antibióticos:

El sistema **AbsA1/A2** se identificó cuando se analizaban mutantes derivados de la cepa A3(2), los cuales tenían bloqueada la producción de los dos antibióticos pigmentados

producidos por *S. coelicolor* (Adamidis *et al.*, 1990). Este sistema constituye una excepción dentro de los sistemas globales en cuanto a localización, puesto que se encuentra formando parte del *cluster* del CDA. Actualmente, junto con el sistema de dos componentes PhoP/R, es uno de los mejor conocidos (Sheeler *et al.*, 2005). Los estudios realizados durante los últimos años han revelado que este sistema ejerce un control negativo sobre la producción de los cuatro antibióticos producidos por esta bacteria, sin afectar por ello a los procesos de diferenciación morfológica. Se ha demostrado mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, del inglés: *Chromatin Immunoprecipitation*) y geles de retardo (EMSA, del inglés: *Electrophoretic Mobility Shift Assay*), que AbsA2 fosforilado se une al promotor de los genes *cdaR*, *redZ* y *actII-ORF4*, controlando de esta forma su transcripción (McKenzie y Nodwell, 2007). Por lo tanto, es un sistema que afecta directamente a la biosíntesis de antibióticos.

PhoP/R es uno de los pocos sistemas de los que se conoce su señal activadora, la deficiencia de fosfato. El mutante nulo en *phoP* (RR) muestra una disminución de la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en *S.coelicolor*. Se sabe que es una regulación indirecta, no se une a los promotores de los genes reguladores específicos de los *clusters* biosintéticos (*actII-ORF4* y *redD*). Recientemente, tal y como se ha mencionado previamente en la introducción, se ha demostrado que PhoP compite con el regulador AfsR por unirse al promotor de *afsS*, al propio promotor *phoPR* y al del operón *pst*. Queda patente, por tanto, la interrelación de dos reguladores globales muy importantes en el desarrollo del metabolismo secundario (Santos-Beneit *et al.*, 2009).

AfsQ1/Q2 se relacionó con la regulación de antibióticos cuando se clonó el gen AfsQ1 (RR) de *S. coelicolor* y se introdujo en un plásmido multicopia en *S. lividans*. De esta manera, se activó la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en esta especie no productora habitual, aunque portadora natural de los *cluster* biosintéticos ACT y RED (Ishizuka *et al.*, 1992). Es importante destacar el elevado parecido entre estas dos especies, sus genomas presentan aproximadamente un 80 % de identidad. Estudios más recientes en *S.coelicolor* han demostrado que el mutante nulo *afsQ* tiene fenotipo completamente dependiente del medio de cultivo. Dicho mutante presenta una reducción de los tres antibióticos (ACT, RED y CDA) y una aceleración en la formación de micelio aéreo (Shu *et al.*, 2009).

El sistema **CutRS** se ha relacionado con la regulación negativa sobre la producción de actinorrodina. La sobreexpresión de este sistema en *S. coelicolor* reprime la producción de actinorrodina de la misma manera que el sistema AbsA1/A2. Así mismo, la delección del regulador CutR resulta en una superproducción de actinorrodina (Brian *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1996).

El sistema **EcrA1/A2** constituye un ejemplo de regulación positiva sobre la producción de undecilprodigiosina, pero no muestra efecto sobre la síntesis de actinorrodina (Li *et al.*, 2004).

Otro ejemplo de regulación positiva es **RapA1/A2**. Se ha demostrado su papel positivo sobre la producción de actinorrodina y sobre el poliquétido tipo I. En el mutante nulo de este sistema se ve disminuida la transcripción de los SARP de estos dos *cluster* (*actII-ORF4* y *kasO*), pero aun se desconoce la manera en que lo hace (Lu *et al.*, 2007).

El resto de sistemas conocidos en *S. coelicolor* se asocian con distintas funciones celulares no relacionadas con el metabolismo secundario. Ninguno de ellos es esencial para la vida del microorganismo, sin embargo, le confieren la capacidad de mantener la integridad celular frente a varios tipos de estrés o daño. Por ejemplo, el sistema CseBC media respuesta frente agentes que dañan la pared celular, VanRS activa un conjunto de genes implicados en la resistencia a vancomicina y tanto OsaAB como KdpDE son dos sistemas relacionados con el mantenimiento de la presión osmótica (el último no está caracterizado experimentalmente en *S. coelicolor*). Destacar también el sistema ChiRS, el cual media la señal cuando hay quitina en el medio para activar la expresión de *chiC*, una quitinasa. Uno de los últimos sistemas descritos es el RagKR y participa en el disparo de la esporulación en ausencia de la proteína SapB (San Paolo *et al.*, 2006).

5. ANTECEDENTES

Uno de los objetivos más perseguidos en *Streptomyces* es conocer las rutas de señalización que desencadenan la producción de antibióticos, con vistas a la explotación industrial de cepas hospedadoras en las que se pueda controlar la biosíntesis de un determinado metabolito secundario. No obstante, es un importante handicap la complejidad de la regulación de las rutas biosintéticas, reflejo a su vez, del amplio rango de estímulos a los que estas bacterias son capaces de responder.

Hay numerosas evidencias experimentales, como se ha descrito previamente, que relacionan los TCSs con el control del metabolismo secundario. Por tanto, con el objetivo de ampliar el conocimiento de los mecanismos de respuesta que regulan la biosíntesis de antibióticos, mediados por los sistemas de dos componentes, se inició esta línea de investigación en el laboratorio. Con este fin, se decidió analizar la funcionalidad de seis sistemas de dos componentes que presentaban similitud de secuencia con el sistema AbsA1/A2, principalmente con el RR AbsA2, descrito como un regulador negativo global de la producción de antibióticos. En la tabla I.3. se ofrece una breve información de los TCSs seleccionados.

Tabla I.3. Tabla resumen de los sistemas de dos componentes escogidos para el estudio.

| Cósmido.ORF | Anotación genómica | Función | Grupo | Tamaño (pb) | % Identidad con AbsA1 ó AbsA2 |
|-------------|--------------------|---------|-------|-------------|-------------------------------|
| SCH11.33 | SCO1744 | HK | II | 1167 | 30,7 |
| SCH11.34 | SCO1745 | RR | NarL | 666 | 43,1 |
| SC5F7.35c | SCO2165 | RR | NarL | 1251 | 44,6 |
| SC5F7.36c | SCO2166 | HK | II | 684 | 20,9 |
| SCH10.16c | SCO3638 | RR | NarL | 666 | 48,1 |
| SCH10.17c | SCO3639 | HK | II | 1419 | 28,9 |
| SCH10.18c | SCO3640 | RR | NarL | 687 | 46,6 |
| SCH10.19c | SCO3641 | HK | II | 1380 | 30,6 |
| SCD20.14c | SCO4596 | RR | NarL | 672 | 33 |
| SCD20.15c | SCO4597 | HK | II | 1368 | 24,8 |
| SCD20.16c | SCO4598 | HK | II | 1224 | 22,8 |
| SCD40A.13 | SCO4667 | HK | II | 1296 | 26,6 |
| SCD40A.14 | SCO4668 | RR | NarL | 633 | 32,3 |

Para comprobar si estos TCSs estaban relacionados con la producción de antibióticos se obtuvieron mutantes de delección de cada uno de los sistemas seleccionados. Los mutantes nulos se consiguieron reemplazando la pareja o trío de genes, dado el caso, por un “cassette” de resistencia a apramicina (técnica REDIRECT (Gust, 2002)). Tras la comprobación de las mutaciones se analizaron las características fenotípicas de dichos mutantes, en cuanto a cambios en la producción de antibióticos y diferenciación morfológica, en diferentes medios de cultivo. La descripción detallada del método de mutación y de los ensayos fenotípicos se describió en el trabajo de grado titulado “Mutación y estudio de sistemas de dos componentes en *Streptomyces coelicolor*: reguladores globales de la producción de antibióticos (Yepes, 2006). A continuación, se resumen los resultados y se presentan las conclusiones alcanzadas.

Tres de los mutantes estudiados ($\Delta 1744/45::accIV$, $\Delta 2165/66::accIV$ y $\Delta 4596/97/98::accIV$) presentaron diferencias fenotípicas significativas con respecto a la especie silvestre en medios de cultivo sólidos. Dos de ellos ($\Delta 2165/66::accIV$ y $\Delta 1744/45::accIV$) presentaron un aumento en la producción de antibióticos. Tal y como muestra la figura I.9., ambos mutantes producen más actinorrodina en los medios R2YE e YEPD (A y B), más undecilprodigiosina en medio PGA (C) y un ligero aumento de CDA (D) (bioensayo frente a *Bacillus subtilis* en AN). El tercer mutante ($\Delta 4596/97/98$) mostró una disminución en la producción de antibióticos en los medios R2YE, AN y PGA por lo que podría actuar como un regulador positivo. Además, tanto el mutante $\Delta 1744/45::accIV$ como el $\Delta 4596/97/98::accIV$ presentaron alteraciones en los procesos de diferenciación morfológica. Como se muestra en la

figura I.9. (E), el mutante $\Delta 1744/45::accIV$ se caracteriza por un desarrollo morfológico precoz y el $\Delta 4596/97/98::accIV$ tiene el fenotipo opuesto, un retraso en la formación del micelio aéreo.

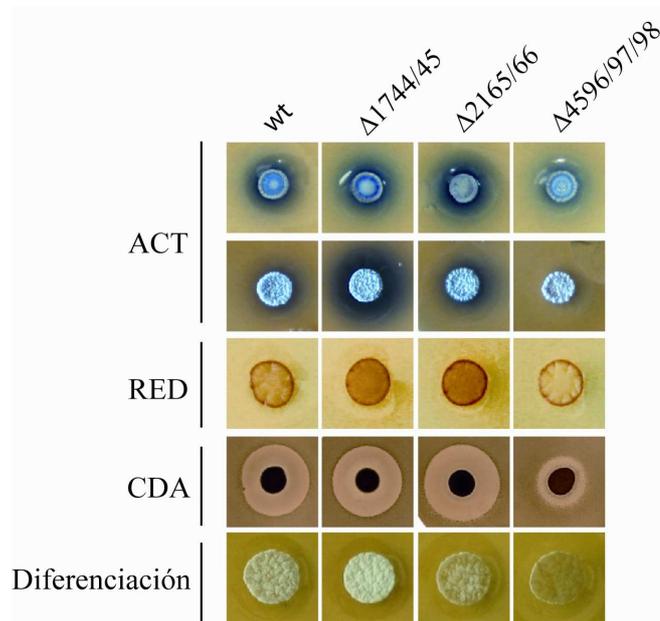


Figura I.9. Producción de antibióticos de las diferentes cepas en distintos medios de cultivo. A: producción de actinorrodina en R2YE; B: producción de actinorrodina en YEPD; C: producción de undecilprodigiosina en PGA; D: producción de CDA (bioensayo contra *B. subtilis*); E: diferenciación morfológica en YEPD (tras dos días de crecimiento).

Con todos estos resultados se “clasificó” a los sistemas compuestos por los *SCOs* 1744/45 y *SCOs* 2165/66, como reguladores negativos, y al sistema triple *SCOs* 4596/97/98 como un regulador positivo de la producción de antibióticos en *S. coelicolor*. De esta manera, se asignó un nombre a cada sistema basado en la nomenclatura comúnmente utilizada en *Streptomyces*. Los tres se identificaron como Abr (del inglés, **A**ntibiotic **r**egulator) denominándose los *SCOs* 1744/45: AbrA1/A2, los *SCOs* 2165/66: AbrB1/B2 y los *SCOs* 4598/97/96: AbrC1/C2/C3.

En los medios de cultivo ensayados, el resto de mutantes ($\Delta SCO4667/68::accIV$, $\Delta SCO3638/39::accIV$ y $\Delta SCO3640/41::accIV$) no presentaron alteraciones fenotípicas significativas. Estos resultados no los excluyen como sistemas de control de la producción de antibióticos ya que al no tratarse de reguladores específicos de ruta es muy frecuente que el fenotipo sea altamente dependiente de medio y las condiciones de cultivo como ocurre con otros reguladores (Shu *et al.*, 2009).

Debido a que esta tesis se centrará en el estudio de dos de los sistemas mencionados, AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3, se considera importante presentar el entorno genómico en el que se encuentran estos dos sistemas, así como la conservación en otras especies de *Streptomyces*.

5.1. ENTORNO GENÓMICO Y CONSERVACIÓN DE LOS TCSs *AbrA1/A2* y *AbrC1/C2/C3*

Debido a las asociaciones funcionales entre genes co-regulados (que forman parte de un mismo operón o genes divergentes que comparten promotor) y debido también a que en numerosas ocasiones se puede deducir el significado biológico de un gen por su evolución, reflejado a su vez en la conservación entre especies, es importante conocer el entorno genómico y la conservación de los genes que constituyen los TCSs de interés.

5.1.1. Sistema *AbrA1/A2*

El sistema *AbrA1/A2* está codificado por dos genes que posiblemente formen parte de un operón junto a otros dos genes que lo preceden y que codifican un sistema de transporte tipo ABC: una proteína de unión a ATP (SCO1742) y una proteína transportadora (SCO1743). La organización física entre un TCS y un sistema de transporte tipo ABC es común en otras bacterias Gram positivas (Joseph *et al.*, 2002; Meehl *et al.*, 2007), en las que generalmente el TCSs regula la expresión del sistema de transporte y consecuentemente su función. Esta agrupación de genes en concreto, resultó ser similar al operón *bcrA* de *Bacillus licheniformes*, el cual es responsable de la resistencia a bacitracina (antibiótico endógeno de esta especie) (Podlesek *et al.*, 1995; Neumuller *et al.*, 2001). Debido a que por un lado, se había asociado el TCS con la producción de antibióticos y por otro lado, el sistema de transporte ABC podía asociarse (por similitud) a la subfamilia BcrA (proteínas implicadas en resistencia a antibióticos peptídicos) y a CcmA (una ATPasa de un sistema de transporte multidrogas), se decidió llevar a cabo en el laboratorio un mutante nulo en el sistema de transporte ($\Delta I742/43$), así como la delección del operón completo ($\Delta I742/45$) en *S. coelicolor*. El fin era comprobar una posible relación con la síntesis o la resistencia a algún antibiótico endógeno o exógeno (Krause, 2009). Los resultados fenotípicos (figura I.10) demostraron que el sistema de transporte no estaba relacionado directamente con la producción de undecilprodigiosina ni actinorrodina, sin embargo, su delección conjunta con *abrA1/A2* tenía un efecto supresor del fenotipo de la delección individual del TCS (producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en el mutante $\Delta abrA1/A2$). Por otro lado, la producción de CDA en el mutante $\Delta I742/43$ (transportador ABC) era equivalente a la de $\Delta abrA1/A2$, llegando ambas mutaciones a tener un efecto aditivo reflejado en el CDA producido en el cuádruple mutante (figura I.10.B). Respecto a la posible relación con la resistencia a antibióticos, los resultados demostraron que ni la delección, ni la sobreexpresión de este sistema, afectaban a la resistencia a varios tipos de antibióticos ensayados, incluidos la bacitracina y daptomicina, éste último es un antibiótico peptídico muy similar al CDA (resultados no mostrados).

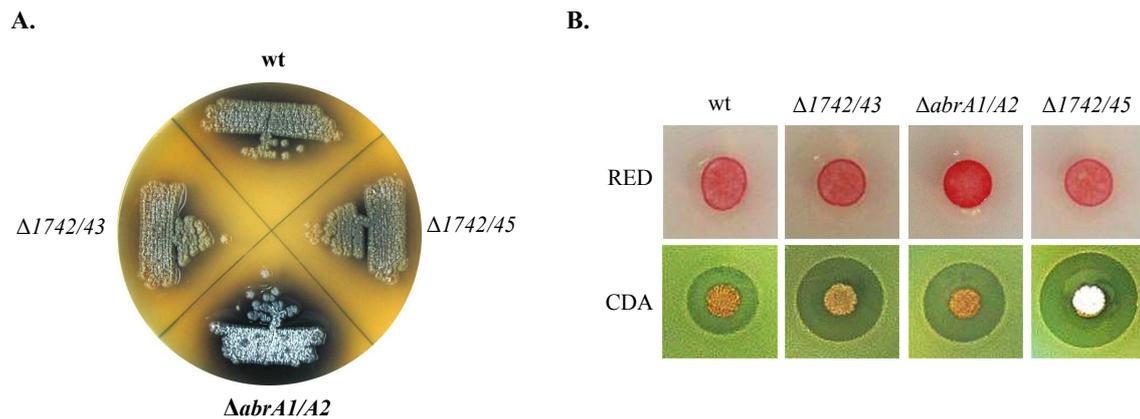


Figura I.10. Producción de antibióticos de las cepas wt, $\Delta 1742/43$, $\Delta abrA1/A2$ y $\Delta 1742/45$. (A). Producción de actinorrodina en YEPD. (B). Producción de undecilprodigiosina (RED) en PGA y producción de CDA en AN.

Respecto a la conservación del sistema *abrA1/A2*, no se encuentran ortólogos en otros *Streptomyces*, sin embargo, los genes que rodean el operón sí están conservados, es más, en *S. avermitilis* se localizan en el mismo orden, salvando el operón, lo cual hace pensar que podría ser consecuencia de una inserción en esta región del genoma (Figura I.11.).

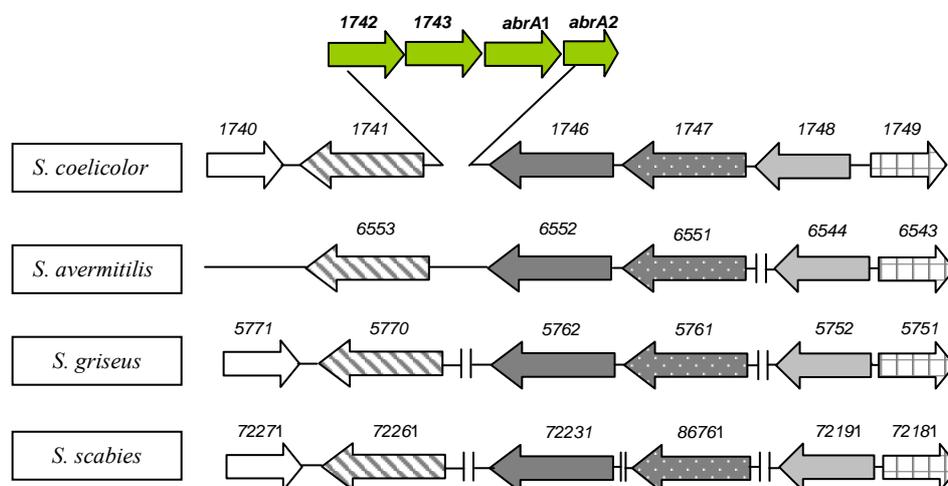


Figura I.11. Representación del entorno génico del operón 1742-45 en *S. coelicolor* y comparación con *S. avermitilis*, *S. griseus* y *S. scabies*. Las flechas con el mismo patrón significan conservación. (Las funciones de los productos de los SCOs se detallan a continuación: SCO1740: posible proteína de membrana, SCO1741: probable serín proteasa de secreción, SCO1746: serín proteasa de secreción, SCO1747: proteína hipotética, SCO1748: posible regulador de expresión, SCO1749: proteína hipotética).

5.1.2. Sistema *AbrC1/C2/C3*

Los tres genes que constituyen este sistema, dos HKs y un RR, no parecen formar una unidad transcripcional. Se encuentran separados por regiones intergénicas lo suficientemente extensas como para actuar como promotores y dirigir la expresión del gen que preceden,

independientemente de los otros dos. Es un sistema altamente conservado en otros *Streptomyces* (Hsiao y Kirby, 2008) (figura I.12.). Por ejemplo, la proteína AbrC3 (SCO4596) posee ortólogos en más de 20 especies de *Streptomyces* con más de un 90 % de identidad de secuencia.

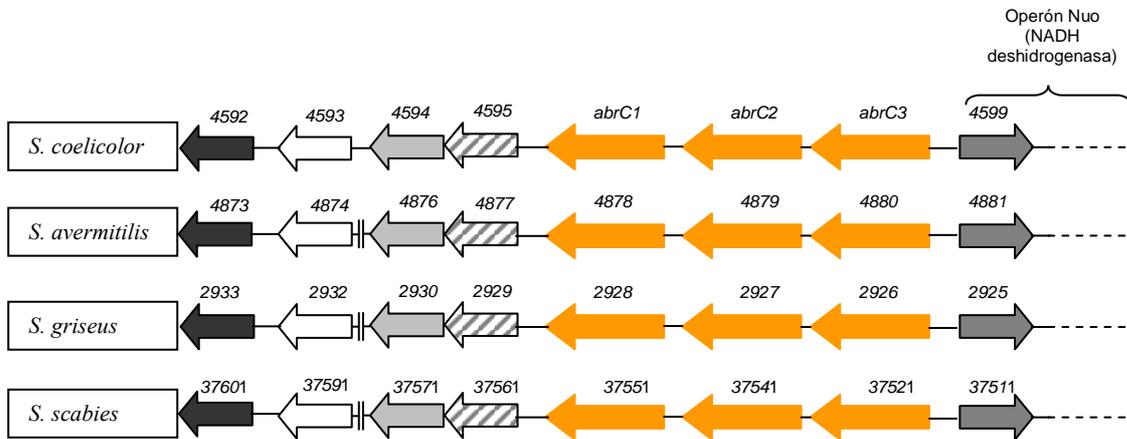


Figura I.12. Representación del entorno génico de los genes *abrC1*, *abrC2* y *abrC3* en *S. coelicolor* y comparación con *S. avermitilis*, *S. griseus* y *S. scabies*. Las flechas con el mismo patrón significan conservación. Las funciones de los productos de los SCOs se detallan a continuación: (SCO4592: proteína de membrana, SCO4593: proteína hipotética, SCOs 4594-95: subunidades β y α (respectivamente) de una oxidorreductasa, SCOs 4599-4611: subunidades de la NADH deshidrogenasa Nuo).

Además este sistema, al menos el regulador y una de las HKs están conservados en otros géneros de actinomicetos destacando, entre otros, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Frankia*.

OBJETIVOS

El presente trabajo pretende estudiar la relación entre los sistemas de dos componentes AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3 y los procesos de producción de antibióticos y diferenciación morfológica. La consecución de este objetivo general se ha abordado en varias etapas:

- 1.- Estudio de la relevancia biológica de los TCSs AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3 en la producción de antibióticos y diferenciación de *S. coelicolor* M145.
- 2.- Análisis de las diferencias de expresión génica entre las cepas mutantes $\Delta abrC1/C2/C3$ y $\Delta abrA1/A2$ y la cepa silvestre *S. coelicolor* M145.
- 3.- Caracterización *in vitro* de los sistemas AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3 y búsqueda de sus dianas moleculares.

RESULTADOS



CAPÍTULO I

**ESTUDIO *IN VIVO* DE LOS TCSs AbrA1/A2 y
AbrC1/C2/C3 EN *Streptomyces coelicolor* M145:
RELEVANCIA BIOLÓGICA DE LOS SISTEMAS Y
EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES**

I.1.

RELEVANCIA BIOLÓGICA DE LOS TCSs *AbrA1/A2* y *AbrC1/C2/C3* EN LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS Y DIFERENCIACIÓN EN *S. coelicolor* M145

1. FENOTIPO DE LOS MUTANTES NULOS $\DeltaabrA1/A2::accIV$ y $\DeltaabrC1/C2/C3::accIV$

Como se ha explicado en los antecedentes, en el inicio de este trabajo se obtuvieron mutantes nulos en seis sistemas de dos componentes en la cepa *S.coelicolor* M145 (wt). Tres de estos mutantes $\DeltaabrA1/A2::accIV$, $\DeltaabrB1/B2::accIV$ y $\DeltaabrC1/C2/C3::accIV$ mostraban una producción de antibióticos alterada y en dos de ellos, $\DeltaabrA1/A2::accIV$ y $\DeltaabrC1/C2/C3::accIV$, también se producía una variación en el desarrollo morfológico (Yepes, 2006). Esta tesis se ha centrado en el estudio de los sistemas *abrA1/A2* y *abrC1/C2/C3*, por ser aquellos que al delecionarlos mostraban diferencias fenotípicas más acusadas y además presentaban fenotipos opuestos, un incremento y un descenso de los productos finales de la biosíntesis de antibióticos y diferenciación, respectivamente. Refiriéndose, por tanto, al efecto final causado, se hablará de ellos como un sistema de regulación negativa (*AbrA1/A2*) y un sistema de regulación positiva (*AbrC1/C2/C3*).

Para profundizar principalmente en las alteraciones de la producción de los antibióticos endógenos (ACT, RED y CDA) que sufrían los dos mutantes seleccionados, se ensayaron una batería de medios de cultivo. De acuerdo con estos resultados (datos no mostrados), se hallaron dos medios en los que las diferencias en producción de actinorrodina entre las cepas wt y cada uno de los mutantes ($\DeltaabrA1/A2::accIV$ ó $\DeltaabrC1/C2/C3::accIV$) se hacían más notables. Estos medios fueron el medio mínimo NMMP en el caso del mutante $\DeltaabrA1/A2::accIV$ y el medio AN para el mutante $\DeltaabrC1/C2/C3::accIV$. Para la cuantificación de RED y CDA se utilizaron los medios PGA y AN puesto que eran los que mejores resultados ofrecían. A continuación se detallan las diferencias entre las cepas en estos medios de cultivo.

1.1. PRODUCCIÓN DE ACTINORRODINA EN EL MUTANTE $\DeltaabrA1/A2::accIV$ EN MEDIO NMMP

Las diferencias de producción de actinorrodina entre la cepa $\DeltaabrA1/A2::accIV$ y la wt en este medio destacaban a simple vista. En la figura R.1. se muestran dos placas de NMMP inoculadas con una población de esporas equivalente de ambas cepas crecidas a 30° C durante 4 días. En ellas se observa la intensa coloración azul del mutante $\DeltaabrA1/A2::accIV$ al compararlo con la cepa wt, indicativo de una mayor producción de actinorrodina.

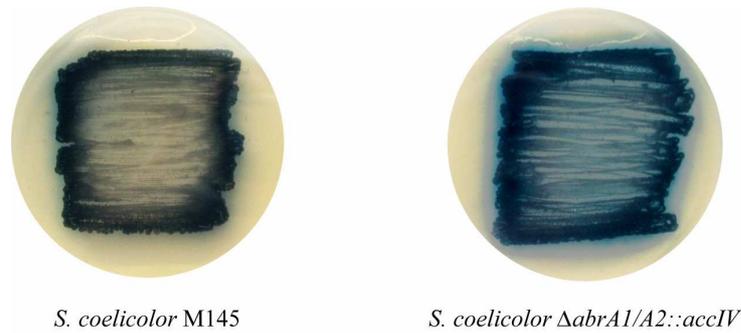


Figura R.1. Producción de actinorrodina de las cepas *S. coelicolor* M145 y $\Delta abrA1/A2::accIV$ en medio NMMP (4 días).

Aun siendo evidentes las diferencias de producción de ACT, se decidió llevar a cabo una cuantificación de este antibiótico con los objetivos de corroborar su producción en medio NMMP líquido y cuantificar las diferencias. Para ello se crecieron las cepas wt y $\Delta abrA1/A2::accIV$ en medio NMMP, inoculando $4 \cdot 10^6$ esporas/ml en 15 ml de cultivo. Para cada cuantificación se utilizaron dos réplicas biológicas, las cuales, a su vez se midieron por duplicado (réplicas técnicas). Tras un seguimiento de la producción a lo largo del tiempo, se destacan en la gráfica los dos tiempos a los que presentaban mayores diferencias, 96 y 108 horas (figura R.2.A.). Para descartar que la diferencia en producción se debiese a una alteración en la tasa de crecimiento de la cepa mutante, se hizo una curva de crecimiento en el medio NNMP líquido (ver materiales y métodos) (figura R.2.B).

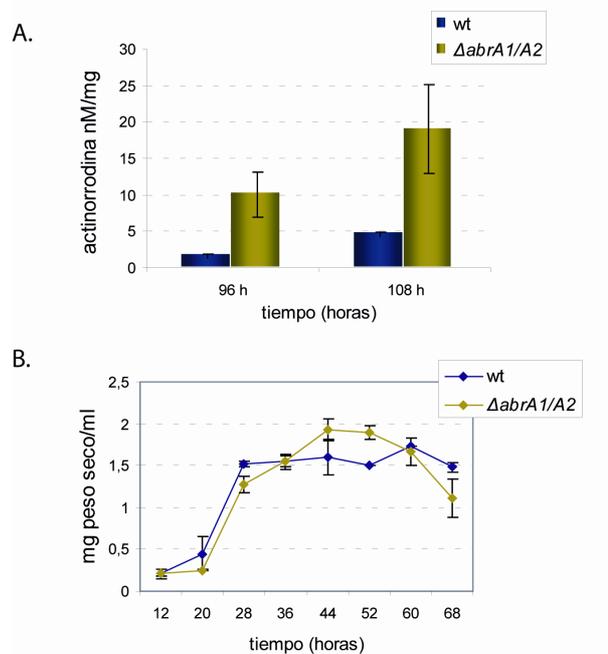


Figura R.2. (A) Cuantificación de actinorrodina (nM/mg de peso seco) producida por las cepas wt y $\Delta abrA1A2::accIV$ en medio NMMP líquido a las 96 y 108 horas de crecimiento. (B) Curva de crecimiento de las cepas wt y $\Delta abrA1A2::accIV$ en NMMP líquido (mg de peso seco/ml). (Las barras de error corresponden al error típico de la media).

Los resultados de la cuantificación demostraron que la producción de actinorrodina en el mutante $\Delta abrA1/A2::accIV$ se incrementaba más de 3 veces en NMMP líquido. Además la curva de crecimiento reveló que las diferencias en producción de ACT no se debían a una alteración de la tasa de crecimiento de la cepa $\Delta abrA1/A2::accIV$ respecto de la cepa wt, ya que ambas cepas crecían a ritmos equivalentes (figura R.2.B).

Debido al fenotipo diferencial tan drástico que presentaban las cepas en el medio NMMP y por ser este un medio mínimo casi definido, se decidió realizar modificaciones en su composición para intentar descubrir si la falta de algún compuesto revelaba la señal frente a la cual respondía este sistema de dos componentes. La composición del medio NMMP es la siguiente:

- *buffer* $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1M, pH 6,8
- Glucosa 0,5 %
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/l
- MgSO_4 0,6 g/l
- casaminoácidos 5 g/l
- Elementos traza (Fe_2SO_4 , ZnSO_4 , MnCl_2 CaCl_2) ($1 \cdot 10^{-5}$ %)
- Agar 2 %

Inicialmente se eliminaron uno a uno los compuestos integrantes del NMMP de forma independiente, con el objetivo de ver si alguno modificaba el fenotipo observado en el medio original, lo que sugeriría una ausencia de señal. Las cepas, *S. coelicolor* M145 y $\Delta abrA1/A2::accIV$ se sembraron en césped ($7,5 \cdot 10^6$ esporas/placa) y se incubaron a 30° C durante 4 días obteniendo en ambas un crecimiento equivalente. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R.3.

| COMPOSICIÓN | FENOTIPO | |
|--|---|---|
| | wt | $\Delta abrA1A2::accIV$ |
| NMMP |  |  |
| - $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer |  |  |
| - glucosa |  |  |
| - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ |  |  |
| - MgSO_4 |  |  |
| - casaminoácidos |  |  |
| - elementos traza |  |  |

Figura R.3. Fenotipos resultantes de la alteración en la composición del NMMP en las cepas wt y $\Delta abrA1/A2::accIV$. La falta de *buffer* $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, glucosa ó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ daba como resultado el mismo fenotipo que el medio NMMP basal, por ello se resumen en la misma fotografía.

En las imágenes se puede apreciar como ni la falta de glucosa, fosfato ni sulfato amónico eliminados de forma independiente, causaba una alteración de los fenotipos con respecto al NMMP original completo. Sin embargo, la ausencia de casaminoácidos, de elementos traza o de $MgSO_4$, sí producían modificación en la producción de antibióticos original. La inhibición de la producción de actinorrodina ante la falta total de casaminoácidos era un fenotipo esperado, debido a que algunos de ellos, bien directamente o bien por sus productos de degradación, son fuente exclusiva de precursores de la producción de antibióticos (por ejemplo, Ile, Val y Leu en el caso de la síntesis de actinorrodina (Sprusansky, 2005)). La producción del antibiótico azul era también imperceptible cuando se eliminaban los elementos traza, no obstante dado que esta mezcla estaba formada por varios elementos y se conocía la composición exacta de los mismos ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $CaCl_2$), se quiso evaluar la influencia de los mismos por separado. Para ello, se fueron eliminando uno a uno del medio original y se observó (figura R.4.) (1) que la falta de $ZnSO_4$ era la causa de la no producción de actinorrodina y (2) que la carencia de $FeSO_4$ igualaba el fenotipo de ambas cepas, desreprimiendo la producción de ACT en la cepa wt.

| COMPOSICIÓN | FENOTIPO | |
|-------------|---|---|
| | wt | $\Delta abrA1A2::accIV$ |
| NMMP |  |  |
| - $MnCl_2$ |  |  |
| - $CaCl_2$ |  |  |
| - $ZnSO_4$ |  |  |
| - $FeSO_4$ |  |  |

Figura R.4. Fenotipos resultantes de la eliminación de cada uno de los elementos traza añadidos al medio NMMP. Las cepas wt y $\Delta abrA1/A2::accIV$ crecidas en ausencia de $MnCl_2$ ó $CaCl_2$ daban como resultado el mismo fenotipo que en el medio basal, por ello se resume con una misma fotografía.

Sintetizando los resultados se disponía de la siguiente información, la ausencia o presencia de los compuestos $MnCl_2$ ó $CaCl_2$ resultaba indiferente en cuanto al fenotipo de ambas cepas por lo que se consideró que no constituían la señal activadora. Sin embargo, se sabía que por un lado, la falta de $MgSO_4$ o la falta de $FeSO_4$ daban lugar a la producción de ACT tanto en la cepa $\Delta abrA1/A2::accIV$ como en la wt, y por otro lado, la falta de $ZnSO_4$ causaba una represión de la síntesis de ACT en ambas cepas. Para ver qué fenotipo predominaba sobre los otros, represión o producción en las dos cepas, se eliminaron conjuntamente $MgSO_4$ - $ZnSO_4$, $FeSO_4$ - $ZnSO_4$, $MgSO_4$ - $FeSO_4$ - $ZnSO_4$ y $MgSO_4$ - $FeSO_4$. Tal como revelaron los resultados (figura R.5.), el fenotipo de no producción en las dos cepas ante la ausencia de $ZnSO_4$ predominaba sobre la carencia de $MgSO_4$, de $FeSO_4$ o de la eliminación conjunta de $MgSO_4$ y $FeSO_4$. Además, la falta de $MgSO_4$ y $FeSO_4$ conjuntamente en presencia

de $ZnSO_4$, producía el mismo fenotipo que su eliminación independiente, causaba una desrepresión de la producción de ACT en la cepa wt. Por tanto, la falta de $ZnSO_4$ impedía la producción de ACT por algún mecanismo independiente del sistema *AbrA1/A2*, de hecho podría ser requerido como cofactor para la actuación de al menos una proteína del *cluster* ACT (Hesketh *et al.*, 2009) y el $MgSO_4$ y $FeSO_4$ podrían ser las señales activadoras del TCS.

| COMPOSICIÓN | FENOTIPO | |
|--------------------------|---|---|
| | wt | $\DeltaabrA1A2::accIV$ |
| NMMP |  |  |
| - $MgSO_4/ZnSO_4$ |  |  |
| - $FeSO_4/ZnSO_4$ |  |  |
| - $MgSO_4/FeSO_4/ZnSO_4$ |  |  |
| - $MgSO_4/FeSO_4$ |  |  |

Figura R.5. Fenotipos resultantes de la ausencia conjunta de los elementos traza: $MgSO_4/ZnSO_4$, $FeSO_4/ZnSO_4$, $MgSO_4/FeSO_4/ZnSO_4$ y $MgSO_4/FeSO_4$.

1.2. PRODUCCIÓN DE ACTINORRODINA EN EL MUTANTE $\DeltaabrC1/C2/C3::accIV$ EN MEDIO AN

Como se ha comentado con anterioridad las mayores diferencias en la producción de actinorrodina entre las cepas wt y $\DeltaabrC1/C2/C3::accIV$ se daban en medio AN. La fotografía de la figura R.6. muestra el resultado de las cepas estriadas y crecidas a 30° C durante 2,5 días, habiendo partido de una concentración de esporas equivalente.



Figura R.6. Producción de actinorrodina de las cepas *S. coelicolor* M145 y $\DeltaabrC1/C2/C3::accIV$ en medio AN (2,5 días).

Vistas estas llamativas diferencias en medio sólido se quiso hacer la cuantificación de actinorrodina en el mismo medio líquido. Para ello se crecieron las cepas wt y

$\Delta abrC1/C2/C3::accIV$ en caldo nutritivo, inoculando 4.10^6 esporas/ml en 15 ml de cultivo (ver materiales y métodos). De forma idéntica a como se hizo con el otro mutante, se utilizaron dos réplicas biológicas y se cuantificó cada muestra por duplicado. Se hizo un seguimiento a lo largo del tiempo y se hallaron las mayores diferencias de producción a las 72 y 96 horas (figura R.7.A.). También se confirmó que ambas cepas tenían tasas de crecimiento equivalentes, al realizar una curva de crecimiento en caldo nutritivo (figura R.7.B.).

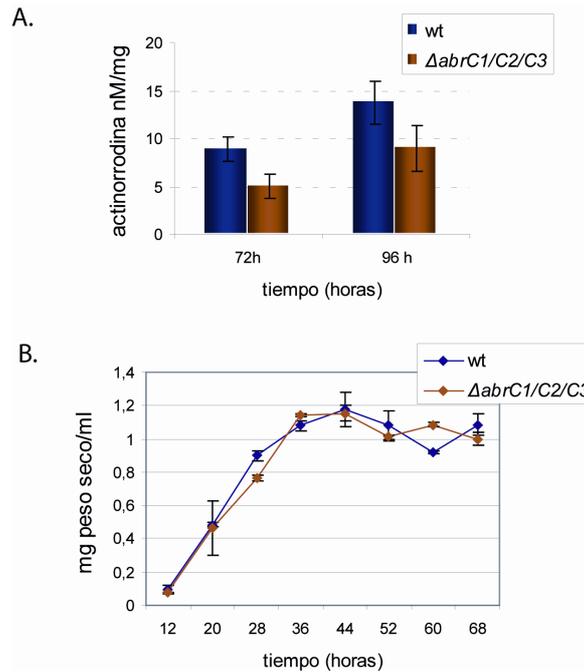


Figura R.7. (A) Cuantificación de actinorrodina (nM/mg de peso seco) en las cepas wt y $\Delta abrC1/C2/C32::accIV$ en medio caldo nutritivo a las 72 y 96 horas de crecimiento. (B) Curva de crecimiento de las cepas wt y $\Delta abrC1/C2/C32::accIV$ en medio caldo nutritivo (mg peso seco/ml). (Las barras de error corresponden al error típico de la media).

Tanto en medio AN sólido como en su equivalente líquido, la cepa mutante $\Delta abrC1/C2/C3::accIV$ presentaba una menor producción de actinorrodina que la cepa wt (20-40 % menos). En este caso dado que se trataba de un medio complejo no se podía alterar su composición de forma precisa para encontrar la señal de activación del sistema.

1.3. CUANTIFICACIÓN DE CDA Y UNDECILPRODIGIOSINA EN LAS CEPAS MUTANTES $\Delta abrA1/A2::accIV$ y $\Delta abrC1/C2/C3::accIV$

Como se comentó en antecedentes, las diferencias en producción de antibióticos entre las cepas wt y los mutantes no se limitaban sólo al antibiótico actinorrodina, sino que también se habían detectado en la producción de CDA y undecilprodigiosina en medio sólido AN y PGA, respectivamente (antecedentes).

Las diferencias de producción de CDA se cuantificaron en un bioensayo, midiendo el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis*, indicativo de la cantidad de CDA producido (materiales y métodos, 11.1). Los resultados mostraron un aumento del 20 % de la cepa $\Delta abrA1/A2::accIV$ y una reducción del 50 % en la cepa $\Delta abrC1/C2/C3::accIV$ respecto a la cepa silvestre (figura R.8).

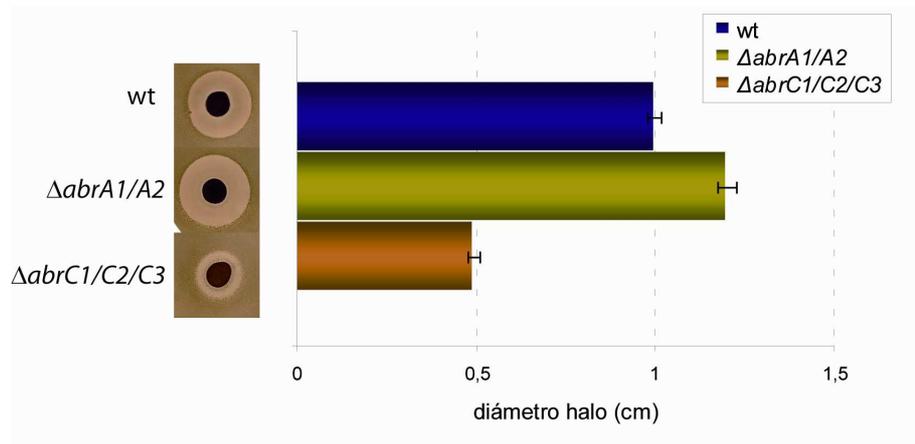


Figura R.8. Cuantificación de la producción de CDA en las cepas wt, $\Delta abrA1/A2::aacIV$ y $\Delta abrC1/C2/C32::aacIV$ en el bioensayo realizado con *B. subtilis* como microorganismo sensible. La barra de error corresponde al error típico de la media tras la medición de 8 muestras independientes (N=8).

Para la cuantificación de las diferencias de undecilprodigiosina se utilizó el medio PGA líquido. Las distintas cepas wt, $\Delta abrA1/A2::accIV$ y $\Delta abrC1/C2/C3::accIV$ se inocularon en los cultivos líquidos de PGA en cantidades idénticas ($4 \cdot 10^6$ esporas/ml) y se llevó a cabo la cuantificación del antibiótico a distintos tiempos, tal y como se detalla en materiales y métodos con las correspondientes réplicas biológicas y técnicas. Los resultados mostraron como la cepa $\Delta abrA1/A2::accIV$ aumentaba significativamente la producción de RED respecto a la wt (en un 40 %) y como, por el contrario, el mutante $\Delta abrC1/C2/C3::accIV$ presentaba una reducción de la producción de undecilprodigiosina de más del 30 %. Tales diferencias no podían ser atribuibles a un crecimiento alterado de las cepas mutantes porque sus respectivas curvas de crecimiento en medio PGA eran equivalentes entre si (figura R.9).

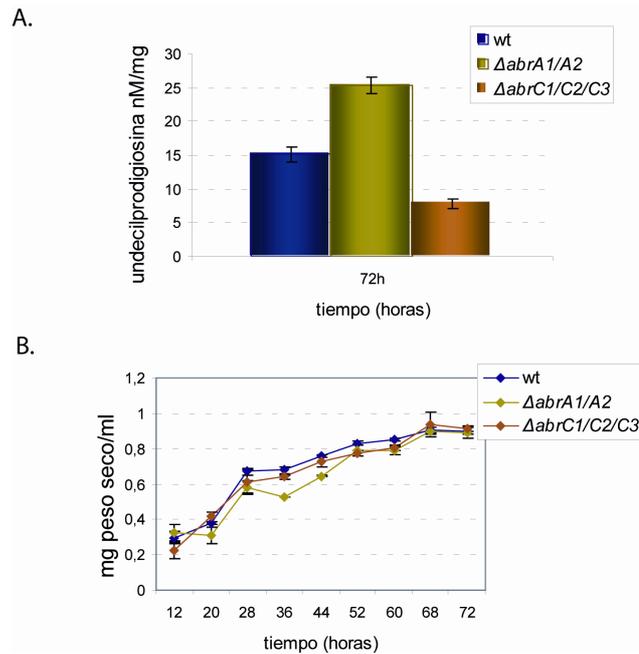


Figura R.9. (A). Cuantificación de undecilprodigiosina (nM/mg peso seco) en medio PGA en las cepas wt, $\Delta abrA1/A2::aacIV$ y $\Delta abrC1/C2/C3::aacIV$ a las 72 horas. (B). Curvas de crecimiento de las cepas wt y $\Delta abrA1/A2::aacIV$ y $\Delta abrC1/C2/C3::aacIV$ en PGA (mg peso seco/ml). (Las barras de error corresponden al error típico de la media).

En resumen en este primer apartado se muestra que los resultados de la cuantificación de los tres antibióticos producidos por las cepas ensayadas (ACT, CDA y RED) corroboraron lo observado previamente en los distintos medios sólidos (anteriores). El sistema *AbrA1/A2*, independientemente de que su función directa se trate de activar o inhibir la expresión de genes, se le puede considerar en último término un regulador negativo de la producción de antibióticos. Lo mismo ocurre con el sistema *AbrC1/C2/C3* considerado, por el contrario, un sistema de regulación positiva de la producción de antibióticos.

2. COMPLEMENTACIÓN DE LOS MUTANTES NULOS $\Delta abrA1/A2$ y $\Delta abrC1/C2/C3$

Dada la implicación de los mutantes nulos de *S.coelicolor* M145 ($\Delta abrA1/A2::accIV$ y $\Delta abrC1/C2/C3::accIV$) en la producción de antibióticos, era importante comprobar que el fenotipo observado se debía realmente a la eliminación del TCS y no a efectos polares debidos a la integración del *cassette* mutagénico. Lo mismo ocurría con el fenotipo observado sobre la diferenciación morfológica, mencionado en los antecedentes, una aceleración de la producción de micelio aéreo en el mutante $\Delta abrA1/A2::aacIV$ y una deceleración en el mutante $\Delta abrC1/C2/C3::aacIV$. Por lo tanto, se decidió llevar a cabo dos estrategias complementarias para descartar posibles efectos polares. En primer lugar y gracias al método de mutación utilizado (REDIRECT, (Gust, 2003)) se eliminó el marcador de resistencia mediante la

generación de las cepas *scar* (ver materiales y métodos. 4.7.) por recombinación de las regiones FRT flanqueantes del *cassette* mutagénico. Las cepas resultantes, $\Delta abrA1/A2$ y $\Delta abrC1/C2/C3$, mostraron los mismos fenotipos que los mutantes originales (datos no mostrados). A continuación y en segundo lugar, se procedió a la construcción de las cepas revertientes de estas mutaciones y al análisis fenotípico de las mismas. Estas cepas se obtuvieron mediante una complementación ectópica de cada mutante con sus correspondientes genes, utilizando vectores derivados del plásmido integrativo de *Streptomyces* pKC796Hyg (Díaz, 2005) como se detalla en el apartado 3 de materiales y métodos.

La integración de genes en el genoma de *Streptomyces* utilizando el plásmido pKC796Hyg no tiene lugar en su locus original sino en el sitio de integración del fago $\phi C31$. De modo que para obtener las cepas revertientes hay que integrar los genes de interés junto con su zona promotora original. Por ello, en primer lugar, se procedió a la identificación de los promotores naturales de cada uno de los sistemas. Como se comentó en la introducción y se recuerda en la figura R.10, el sistema *abrA1/A2* parece formar parte de un operón junto con otros dos genes situados delante en el genoma, que codifican un sistema de transporte de tipo ABC. Por este motivo se consideró que su región promotora era la situada aguas arriba del gen *SCO1742* y se clonó dicha región delante de los genes del TCS en el plásmido denominado pHabrA1A2. En el caso de *abrC1/C2/C3*, aparentemente sus genes no forman una unidad transcripcional puesto que precediendo a cada uno de los genes existe una región intergénica lo suficientemente amplia para poder actuar como promotora (figura R.10). Por ello se clonó todo el fragmento de DNA que contenía los tres genes con sus regiones intergénicas generando el plásmido pHabrC1C2C3.

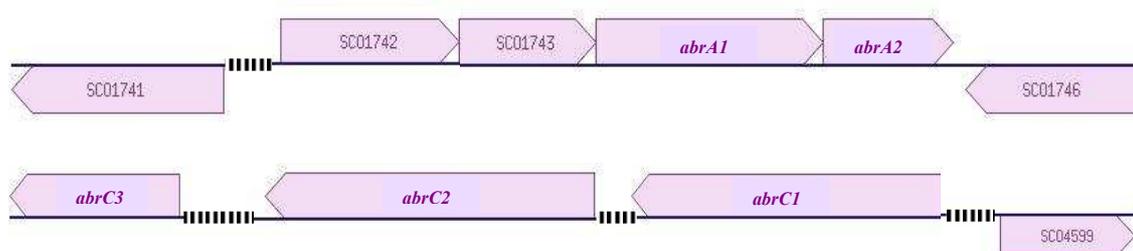


Figura R.10. Esquema del contexto genómico de los TCSs *abrA1/A2* y *abrC1/C2/C3*. La zona rayada representa las regiones utilizadas como promotoras en la complementación.

2.1. FENOTIPO DE LAS CEPAS REVERTIENTES $\Delta abrA1/A2$.pHabrA1A2 y $\Delta abrC1/C2/C3$.pHabrC1C2C3

Una vez construidos los vectores integrativos pHabrA1A2 y pHabrC1C2C3 se transformaron las cepas mutantes de *S. coelicolor* con el plásmido correspondiente en cada caso y se seleccionaron aquellos clones que hubieran adquirido la resistencia a higromicina conferida

por el plásmido. De forma paralela tanto en la cepa silvestre, *S. coelicolor* M145, como en las cepas mutantes se integró el plásmido pKC796Hyg vacío y las cepas resultantes se utilizaron como controles. Se realizaron sucesivos pases de esporulación para asegurar que todos los genomas contenían la integración del plásmido y finalmente se recogieron y cuantificaron las esporas de cada una de las cepas generadas. A continuación se realizaron los ensayos fenotípicos en los medios sólidos donde se habían observado previamente las mayores diferencias en la producción de actinorrodina: NMMP en el caso de la $\Delta abrA1/A2$ y AN para la cepa $\Delta abrC1/C2/C3$.

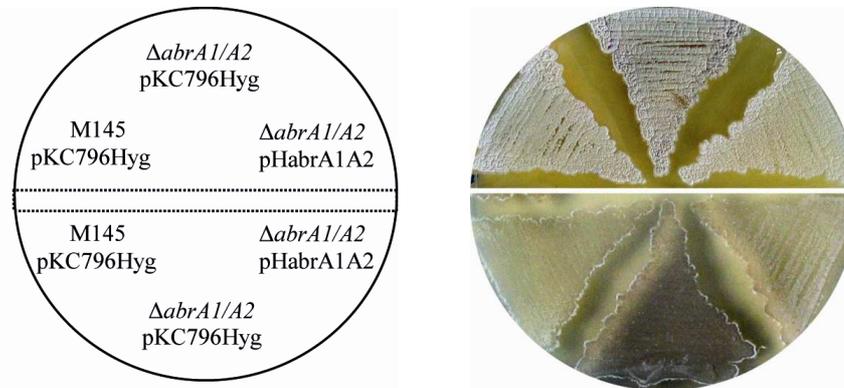
Por un lado, se inocularon placas de medio NMMP suplementado con higromicina (50 $\mu\text{g/ml}$) con una cantidad equivalente de esporas de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145.pKC796Hyg, la cepa mutante $\Delta abrA1/A2$.pKC796Hyg y la cepa revertiente $\Delta abrA1/A2$.pHabrA1A2. Por otro lado, se inocularon placas de medio AN + higromicina 50 $\mu\text{g/ml}$ con la cepa silvestre *S. coelicolor* M145.pKC796Hyg, la cepa mutante $\Delta abrC1/C2/C3$.pKC796Hyg y la cepa revertiente $\Delta abrC1/C2/C3$.pHabrC1/C2/C3 con la misma cantidad de esporas. Las placas se incubaron a 30° C entre 48 y 72 horas para apreciar las diferencias.

En la figura R.11. se presentan los resultados obtenidos, mostrándose en la parte superior de las placas, los efectos observados en la diferenciación de las distintas cepas y en la parte inferior, la producción de actinorrodina que se detecta por su coloración azulada. Cabe destacar que la producción de antibióticos se reduce considerablemente tras la integración de plásmidos que emplean el sitio de integración del fago ϕC31 , como es el caso del pKC796Hyg y derivados de éste. Esta observación ya se había descrito con anterioridad para vectores similares (Baltz, 1998; Vicente *et al.*, 2009). Esta reducción general de la producción de antibióticos resultó ser más pronunciada en determinados medios de cultivo como el NMMP (figura R.11.A). Pese a ello, se pudo comprobar que ambas cepas revertientes recuperaban el fenotipo silvestre, perceptible tanto en diferenciación como en producción de actinorrodina. En la cepa $\Delta abrA1/A2$.pHabrA1A2 la producción de actinorrodina disminuía en medio NMMP igualándose a la producción de la cepa silvestre con el plásmido vacío. En ambas cepas la producción de ACT era prácticamente nula estando muy por debajo de la obtenida en la cepa mutante $\Delta abrA1/A2$.pKC796Hyg. También se pudo observar la ralentización del ciclo de desarrollo de la cepa revertiente igualando de nuevo el fenotipo silvestre. En ambas cepas sólo se visualizaba el micelio aéreo, mientras que la cepa mutante ya había comenzado a esporular (color grisáceo) (figura R.11.A).

De forma similar, la cepa complementada $\Delta abrC1/C2/C3$.pHabrC1C2C3 recuperaba la producción de actinorrodina que había sido eliminada por completo en estas condiciones de cultivo en medio AN en la cepa mutante $\Delta abrC1/C2/C3$.pKC796Hyg. Los niveles de producción, sin embargo, no llegaban a los observados en la cepa silvestre, probablemente

debido a su integración ectópica en el genoma. Los defectos de diferenciación de la cepa mutante también se corregían al reintegrar los genes *abrC1/C2/C3* como se aprecia claramente en la figura R.11.B.

A.



B.

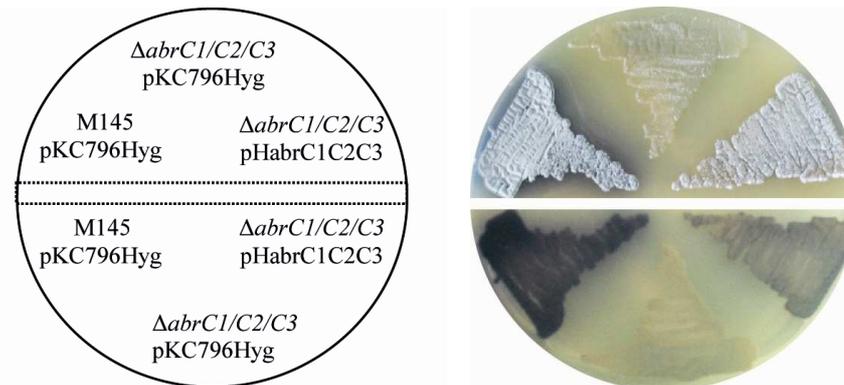


Figura R.11. Ensayo de complementación de los mutantes $\DeltaabrA1/A2$ en medio NMMP+hyg 50 $\mu\text{g/ml}$ (A) y $\DeltaabrC1/C2/C3$ en AN+hyg 50 $\mu\text{g/ml}$ (B). En el semicírculo superior de las placas se muestra la diferenciación de las cepas (parte superior de la placa) y en el inferior la producción de actinorrodina (parte inferior de la placa).

Los resultados demostraban por tanto, que el fenotipo observado en el mutante $\DeltaabrA1/A2$ de incremento en la producción de actinorrodina así como de aceleración en la diferenciación se debían realmente a la ausencia de los genes histidín quinasa y regulador de respuesta del sistema de dos componentes en estudio y no a efectos polares, por lo que se corroboraba su implicación negativa sobre estos procesos. De igual modo, el mutante $\DeltaabrC1/C2/C3$, debía su fenotipo de bajada en la producción de actinorrodina y deceleración de la diferenciación a la falta de los tres genes del sistema siendo, por tanto, un regulador positivo de ambos procesos.

Respecto a la undecilprodigiosina la complementación no resultaba muy clara ya que apenas había diferencias de producción entre las cepas con los plásmidos integrados (resultados

no mostrados). Tampoco pudo comprobarse la complementación sobre la producción de CDA debido a que la integración ectópica del plásmido utilizado en los ensayos, eliminaba completamente la producción de dicho antibiótico.

3. EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE LOS GENES DE LOS SISTEMAS *abrA1/A2* Y *abrC1/C2/C3*

3.1. SOBREEXPRESIÓN CONJUNTA DE LOS GENES DE CADA SISTEMA

Una vez corroborado que, por un lado, la delección de los genes *abrA1/A2* causaba un efecto positivo global sobre producción de antibióticos y diferenciación y que por otro lado la delección de los genes *abrC1/C2/C3* repercutía negativamente en ambos procesos, se propuso estudiar el efecto de la sobreexpresión de los genes integrantes de cada TCS en conjunto (HK(s)+RR).

Con esta finalidad, se construyeron plásmidos de sobreexpresión con los genes de interés derivados del pN702GEM3 (Díaz *et al.*, 2005), un vector de alto número de copias bifuncional *E. coli-Streptomyces*. En el caso del sistema *abrA1/A2*, la pareja de genes se clonaron bajo el control del promotor de la xilanasa *xysA*, un promotor fuerte e inducible por xilosa y xilano (Rodríguez *et al.*, 2005) dando como resultado el plásmido pNXabrA1A2. Con respecto al sistema *abrC1/C2/C3*, debido a que los genes que lo constituyen no parecen formar una unidad transcripcional, se decidió clonar el fragmento formado por los tres genes y sus respectivas regiones intergénicas en el plásmido multicopia pN702GEM3 generando el plásmido pNabrC1C2C3. La construcción de ambos plásmidos se detalla en materiales y métodos, 3.

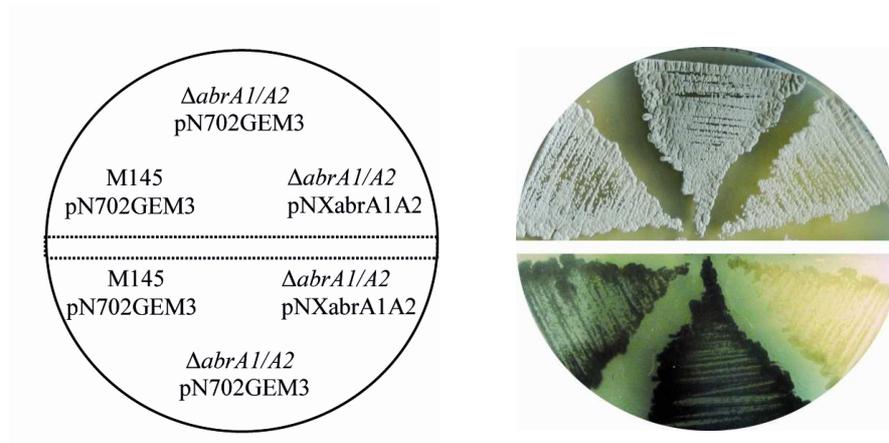
Para evaluar el efecto de la sobreexpresión del sistema *abrA1/A2*, se transformó la cepa mutante Δ *abrA1/A2* con el plásmido que sobreexpresaba los sistemas *abrA1/A2* (pNXabrA1A2) y con el vector parental (pN702GEM3) como control. A su vez, para ver el efecto multicopia del sistema *abrC1/C2/C3* se transformó el mutante Δ *abrC1/C2/C3* con el plásmido pNabrC1C2C3 y con el control pN702GEM3. Además también se transformó la cepa wt con el plásmido pN702GEM3 para poder comparar fenotipos. Tal y como se había hecho con las cepas mutantes y revertientes se repitieron los estudios fenotípicos en medio sólido.

3.1.1. Análisis fenotípico de la sobreexpresión del sistema *abrA1/A2*

Tras la obtención de esporas de las cepas wt.pN702GEM3, Δ *abrA1/A2*.pN702GEM3 y la Δ *abrA1/A2*.pNXabrA1A2, se inocularon cantidades equivalentes en diferentes medios de cultivo suplementados con neomicina (20 μ g/ml). Por un lado se sembraron dichas cepas en sectores en medio NMMP, para comparar tanto la producción de actinorrodina (vista inferior de la placa) como la diferenciación (vista superior). Por otro lado se inocularon 10^3 esporas por gota (5 μ l) en medio PGA para analizar la producción de undecilprodigiosina y en AN para

realizar los bioensayos con *B. subtilis* que permiten detectar la producción de CDA. También se analizó la diferenciación mediante un ensayo en gota idéntico al anterior, en medio NMMP. Los resultados obtenidos se muestran en la figura R.12.

A.



B.

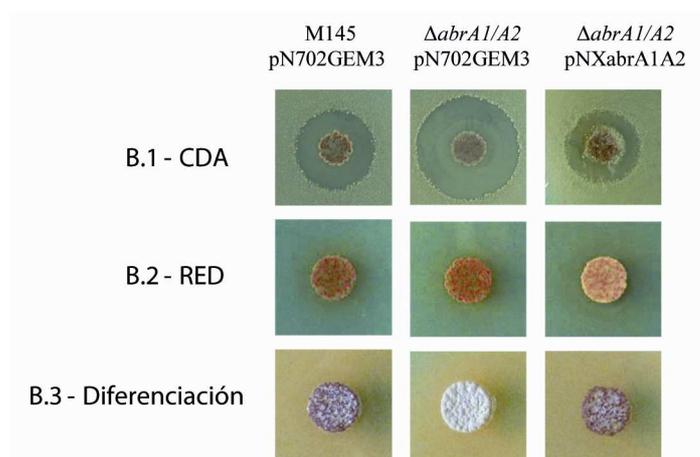


Figura R.12. Ensayo de sobreexpresión del sistema *abrA1/A2*. Cepas utilizadas: M145.pN702GEM3, $\Delta abrA1/A2$.pN702GEM3 y $\Delta abrA1/A2$.pNXabrA1A2. (A) Cepas sembradas en sectores en placas NMMP+neo 20 μ g/ml. Diferenciación visible en la parte superior de la placa y producción de actinorrodina en la parte inferior (B) Producción de CDA en AN + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (60 mM) (B.1), producción de undecilprodigiosina (RED) en medio PGA+neo 20 μ g/ml (B.2) y diferenciación en NMMP+neo 20 μ g/ml (B.3).

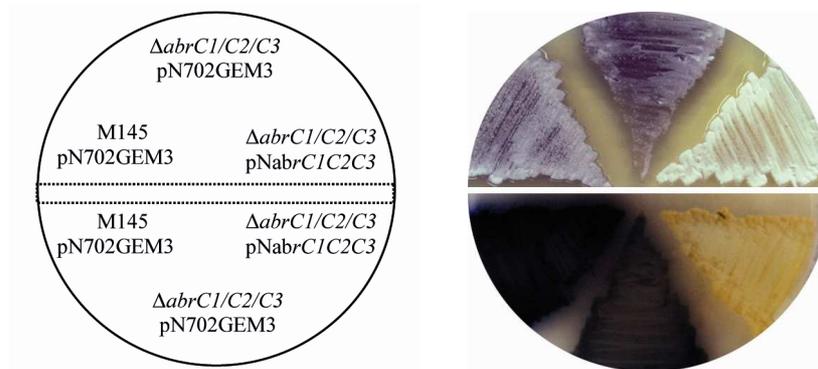
La sobreexpresión del sistema *abrA1/A2* eliminaba el efecto de aceleración en la diferenciación de la cepa mutante carente de los genes, revertiéndose el fenotipo presentado por la cepa mutante (figura R.12.A y 12.B.3) lo que confirmaba de nuevo el papel negativo de los genes de este sistema regulador sobre los procesos de diferenciación. Respecto a la producción de antibióticos no sólo se suprimía el efecto hiperproductor de actinorrodina observado en la cepa mutante $\Delta abrA1/A2$, si no que la biosíntesis de ACT quedaba anulada cuando la cepa $\Delta abrA1/A2$ sobreexpresaba el sistema. Además, como cabía esperar, el efecto no era exclusivo de la biosíntesis de actinorrodina, si no que la producción de CDA y de undecilprodigiosina (RED) también se reducían de forma significativa (figura R.12.B.1 y R.12.B.2) en la cepa

$\Delta abrA1/A2$.pNXabrA1/A2, incluso por debajo de los niveles de producción de la cepa silvestre. Estos experimentos son una evidencia más de que el TCS formado por los genes *abrA1/A2* es un regulador negativo pleiótropico y que su acción afecta tanto de la producción de los tres antibióticos producidos por *S. coelicolor* M145 como a su desarrollo morfológico.

3.1.2. Análisis fenotípico del sistema *abrC1/C2/C3* en multicopia

De la misma manera que en el apartado anterior, cantidades idénticas de esporas de las cepas wt.pN702GEM3, $\Delta abrC1/C2/C3$.pN702GEM3 y $\Delta abrC1/C2/C3$.pNabrC1C2C3, se sembraron en sectores y en gota en los medios AN y PGA suplementados con neomicina (20 μ g/ml). A continuación se analizó de nuevo la producción de los tres antibióticos en las cepas en estudio así como la diferenciación. Los resultados obtenidos se resumen en la figura R.13.

A.



B.

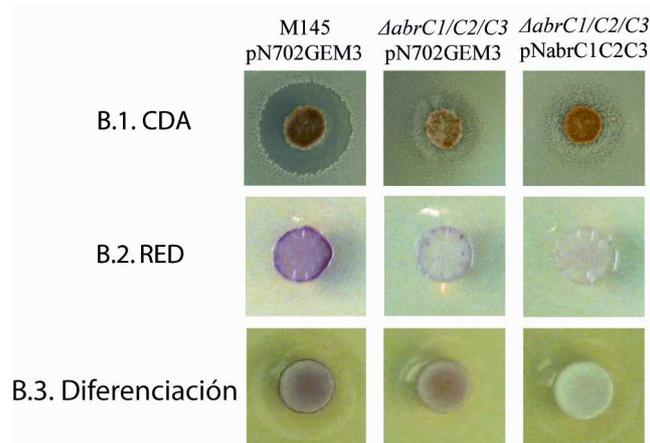


Figura R.13. Fenotipos del sistema *abrC1/C2/C3* en multicopia. Cepas ensayadas: M145.pN702GEM3, $\Delta abrC1/C2/C3$.pN702GEM3 y $\Delta abrC1/C2/C3$.pNabrC1C2C3. (A) Cepas sembradas en sectores en placas AN+neo 20 μ g/ml crecidas durante 3 días. Diferenciación visible en la parte superior de la placa y producción de actinorrodina en la parte inferior. (B) Producción de CDA en medio AN + Ca(NO₃)₂ (60 mM) (B.1), producción de undecilprodigiosina (RED) en medio PGA+neo 20 μ g/ml (B.2) y diferenciación en AN+neo 20 μ g/ml (B.3).

Tal y como se aprecia en las fotografías, el efecto del sistema *abrC* en multicopia en la cepa mutante $\Delta abrC1/C2/C3$, no solo no restauraba el fenotipo silvestre con una producción normal de antibióticos, sino que sorprendentemente originaba una inhibición de la producción de actinorrodina más drástica que en su delección. En cuanto a la producción de CDA y RED, el efecto de incrementar la dosis génica era similar al que causaba la delección del sistema, viéndose ambos antibióticos reducidos en las dos situaciones. El efecto sobre la diferenciación, no obstante, era el esperado en inicio, la cepa mutante portadora del plásmido multicopia aceleraba la diferenciación superando los niveles de la cepa wt (se aprecia por el color blanquecino del micelio) (figura R.13.A y R.13.B). Los mismos fenotipos se obtuvieron al introducir el plásmido pNabrC1C2C3 en la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 (datos no mostrados) lo que excluía la posibilidad de algún efecto polar de la cepa mutante sobre la expresión de los genes en el plásmido multicopia.

Debido al inesperado efecto descrito cuando se aumentaba el número de copias del sistema *abrC1/C2/C3* utilizando como vector el pN702GEM3 (derivado del pIJ702, 40-100 copias (Katz, 1983), se quiso evaluar qué ocurría si se clonaba el mismo inserto formado por las regiones codificantes y promotoras de los genes *abrC1/C2/C3* en un plásmido de bajo número de copias. Para ello, se utilizó el vector pHJL401 (derivado del SCP2, 5-10 copias por genoma (Larson, 1986) y al plásmido resultante se le denominó pHJLabrC1C2C3 (materiales y métodos, 3). Tras la transformación de las cepas wt y $\Delta abrC1/C2/C3$ con el plásmido vacío y con el pHJLabrC1/C2/C3 y la posterior purificación de las esporas, se sembraron las cepas en sectores en medio AN para observar la producción de actinorrodina. Los resultados (figura R.14.) demostraron el efecto positivo del sistema *abrC* sobre la producción de ACT tanto en la cepa $\Delta abrC1/C2/C3$ (mitad izquierda de las placas) como en la wt (mitad derecha de las placas).

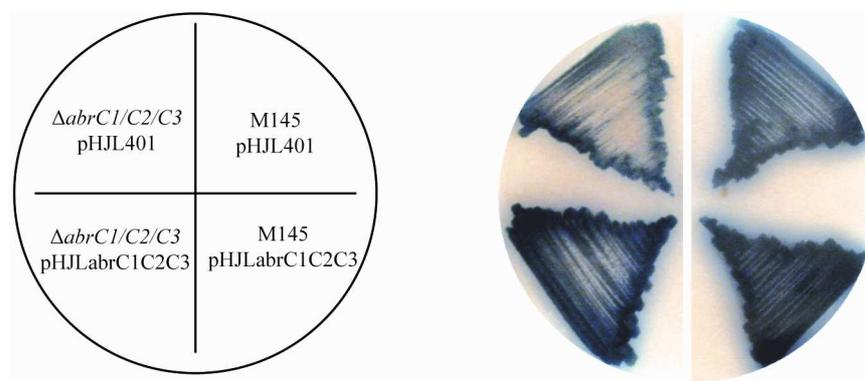


Figura R.14. Producción de ACT en las cepas $\Delta abrC1/C2/C3$.pHJL401, M145.pHJL401, $\Delta abrC1/C2/C3$.pHJLabrC1C2C3 y wt.pHJLabrC1C2C3 sembradas en sectores en placas AN+tsr 10 μ g/ml crecidas durante 3 días.

Se quiso evaluar también el efecto de la reducción del número de copias del sistema *abrC1/C2/C3* sobre la producción de undecilprodigiosina y CDA. Los resultados obtenidos fueron similares a aquellos derivados del pN702GEM3 (resultados no mostrados), por lo que el efecto negativo de la delección del sistema y del incremento del número de copias del mismo sobre los antibióticos undecilprodigiosina y CDA era equivalente.

Del conjunto de resultados anteriores, se puede concluir: (1) que el sistema *abrC1/C2/C3* necesita estar en una dosis génica adecuada para que el proceso de producción de actinorrodina tenga lugar satisfactoriamente, inhibiéndose con un elevado número de copias de los genes, (2) cuando se aumenta el número de copias del sistema *abrC* o por el contrario se eliminan los genes, el efecto sobre la producción de undecilprodigiosina y CDA es negativo en todos los casos y (3) el efecto ejercido por el sistema *abrC1/C2/C3* sobre la diferenciación cuando se encuentra en multicopia es positivo y la delección decelera el proceso. Esto indica que ambos procesos, producción de antibióticos y diferenciación, aún siendo regulados por el mismo TCS, siguen distintas vías de señalización.

3.2. SOBREEXPRESIÓN DE LOS RRs *abrA2* y *abrC3*

Teniendo en cuenta que los sistemas de dos componentes están constituidos por dos o incluso tres genes, los efectos observados sobre la producción de antibióticos y la diferenciación podían deberse a la acción del RR o a un efecto de las quinasas (sobre el mismo RR o sobre otras rutas de señalización). Por lo tanto, con el objetivo de examinar qué ocurriría con la sobreexpresión única de los RRs, se realizaron construcciones donde los reguladores de respuesta, *abrA2* y *abrC3*, se clonaron bajo el control del promotor *xysA* y se etiquetaron con una cola de histidinas dando lugar a los plásmidos multicopia pTX*abrA2* y pNX*abrC3*, respectivamente (materiales y métodos, 3). El objeto de la construcción de estos plásmidos, era analizar el efecto de su sobreexpresión cuando los niveles de sus histidín quinasas específicas eran fisiológicos, introduciendo los plásmidos en la cepa silvestre y también en ausencia de las mismas, en las cepas Δ *abrA1/A2* y Δ *abrC1/C2/C3*. Adicionalmente, la finalidad de estas construcciones, era purificar las correspondientes proteínas etiquetadas con la cola de histidinas por cromatografía de afinidad de metales, para su posterior utilización en la caracterización molecular de los RRs y en la búsqueda de dianas moleculares (ver apartado 1 y 2 del capítulo II.2).

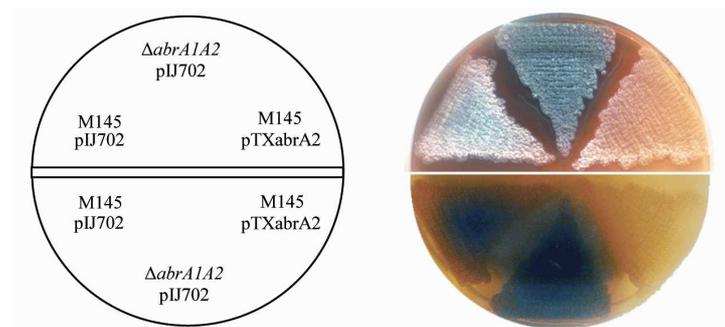
3.2.1. Análisis fenotípico de la sobreexpresión del RR *abrA2*

Para analizar el efecto de la sobreexpresión del RR *abrA2* en presencia de su HK *AbrA1* en condiciones fisiológicas, la cepa *S. coelicolor* M145 se transformó con el vector vacío pIJ702 y el plásmido que sobreexpresaba el RR, pTX*abrA2*. Para compararlo con la cepa mutante Δ *abrA1/A2* también se transformó ésta con el plásmido control pIJ702. Tras el crecimiento

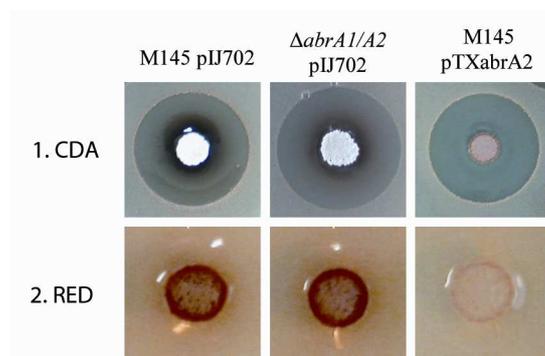
normal de las colonias transformantes se obtuvieron esporas de las nuevas cepas. Para realizar el ensayo fenotípico se sembraron las esporas de las tres cepas en sectores y en gota en los medios YEPD, AN y PGA suplementados con tioestreptona (10 µg/ml). En esta ocasión no se utilizó el medio NMMP para ver producción de actinorrodina porque ninguna de las cepas sembradas sobre este medio se coloreaba de azul (efecto del marcador de resistencia a tioestreptona utilizado).

Como se aprecia en la figura R.15. el fenotipo de la sobreexpresión de *abrA2* en la cepa wt originaba un bloqueo en la producción de ACT y RED similar al obtenido con la sobreexpresión de todo el sistema (HK+RR). Respecto a la diferenciación, la cepa que sobreexpresaba el RR (M145.pTXabrA2) sufría un retraso en la formación del micelio aéreo respecto a las cepas wt y $\Delta abrA1/A2$ (parte superior de la placa de la figura R.15.A.). En el caso del CDA, la sobreexpresión del RR *abrA2* causaba un ligero descenso en su síntesis respecto a la estirpe wt aunque no era muy significativo (figura R.15.B.1 y C).

A.



B.



C.

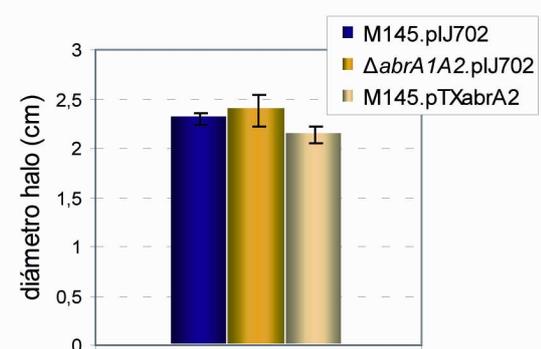
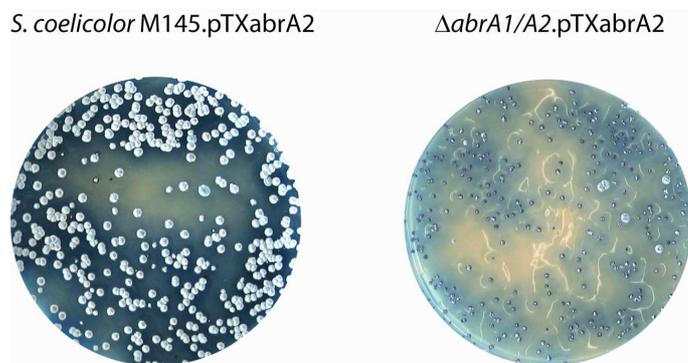


Figura R.15. Ensayo de sobreexpresión del RR AbrA2. Cepas ensayadas: M145.pIJ702, $\Delta abrA1A2$.pIJ702 y M145.pTXabrA2. (A) Cepas sembradas en sectores en placas YEPD+tsr 10 µg/ml. Diferenciación visible en la parte superior de la placa y producción de actinorrodina en la parte inferior. (B) Producción de CDA en medio AN+ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 60 mM (B.1) y producción de undecilprodigiosina (RED) en medio PGA+tio 10 µg/ml (B.2). (C) Cuantificación del diámetro de halo de inhibición (cm) en el ensayo CDA frente a *Bacillus subtilis* donde N=4 y las barras de error corresponden al error típico.

Comprobado el efecto de la sobreexpresión del RR *abrA2* sobre la cepa wt se decidió realizar el experimento equivalente sobre la cepa $\DeltaabrA1/A2$, condiciones donde su HK asociada *AbrA1* no estaba presente. Para ello se transformó la cepa $\DeltaabrA1/A2$ con el vector vacío pIJ702 y el plásmido que sobreexpresaba el RR, pTXabrA2. Para comparar los fenotipos resultantes se repitieron de nuevo las transformaciones de la cepa wt con los mismos plásmidos pIJ702 y pTXabrA2. Curiosamente los transformantes $\DeltaabrA1/A2$.pTXabrA2 presentaron un fenotipo muy llamativo. El tamaño de las colonias se reducía drásticamente respecto a las cepas $\DeltaabrA1/A2$.pIJ702 y wt.pTXabrA2 (figura R.16.A). Además estas colonias presentaban un desarrollo morfológico aberrante no siendo capaces de formar un micelio aéreo uniforme tal y como queda reflejado en las fotografías de la figura R.16.B.

A.



B.

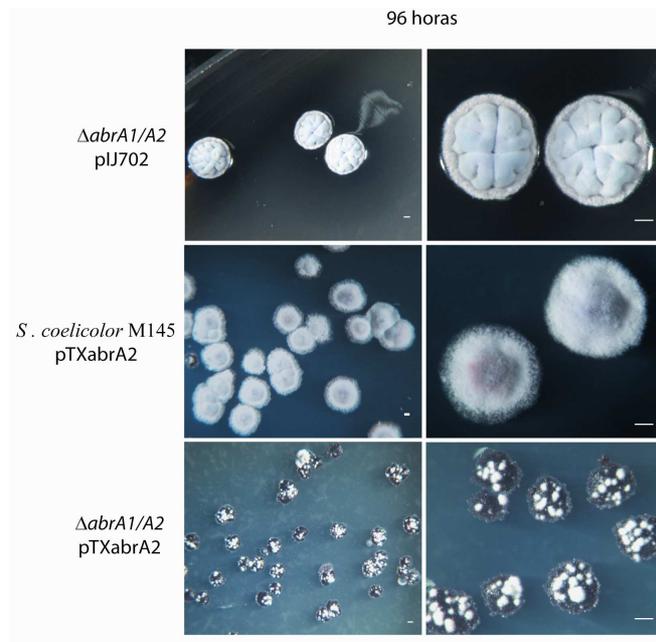


Figura R.16. (A) Transformación de las cepas *S. coelicolor* M145 y $\DeltaabrA1/A2$ con el vector de sobreexpresión (pTXabrA2) en placas de R2YE+tio 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (B). Imágenes a la lupa de la morfología y tamaño de las colonias de los transformantes $\DeltaabrA1/A2$.pIJ702, wt.pTXabrA2 y los transformantes $\DeltaabrA1/A2$.pTXabrA2 a 96 horas de crecimiento. La línea blanca indica el tamaño de la escala correspondiente a 0,1 cm.

Tras comprobar el efecto “tóxico” que causaba la sobreexpresión del RR cuando su HK no estaba presente, se decidió cuantificar las diferencias de tamaño midiendo el diámetro de 20 colonias utilizando el *software ImageJ*. Los resultados mostraron una disminución en el diámetro aproximadamente del 50 % (figura R.17.). Tales diferencias fenotípicas en la sobreexpresión del RR *abrA2* ante la presencia o la ausencia de su HK asociada, revelaba el papel regulador de la misma sobre la activación del regulador, indicando muy probablemente una actividad fosfatasa encargada de controlar la activación del RR ante su sobreexpresión.

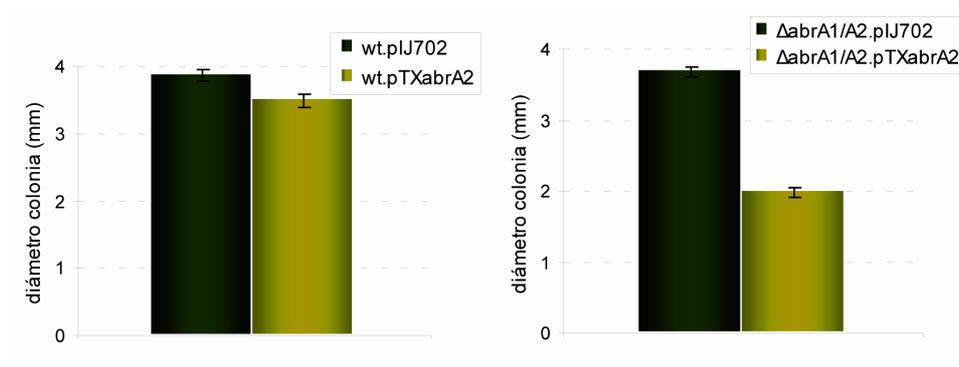


Figura R.17. Representación de la media del diámetro (mm) de las colonias transformantes wt.pIJ702, wt.pTXabrA2, Δ abrA1/A2.pIJ702 y Δ abrA1/A2.pTXabrA2. Las barras corresponden al error típico de la media cuando N=20.

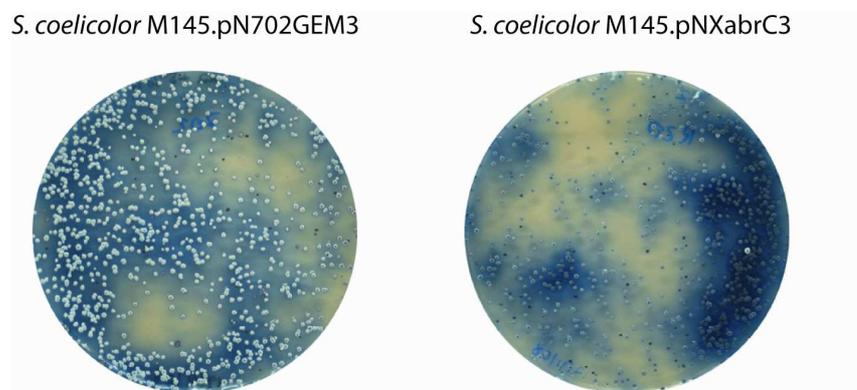
Como la sobreexpresión del regulador se debía en parte al promotor de la xilanasa (promotor reprimible por glucosa (Rodríguez, 2005), se intentó rescatar parcialmente el fenotipo utilizando para la transformación R2YE con un suplemento de glucosa del 5 %. Sin embargo, los resultados no mostraron mejora en cuanto a la capacidad de crecimiento de la cepa M145.pTXabrA2 y en cuanto a diferenciación (datos no mostrados). Estos resultados apuntaban a que la expresión basal del RR y el alto número de copias del plásmido hacían que el RR estuviese en cantidad suficiente para ejercer el efecto observado.

3.2.2. Análisis fenotípico de la sobreexpresión del RR *abrC3*

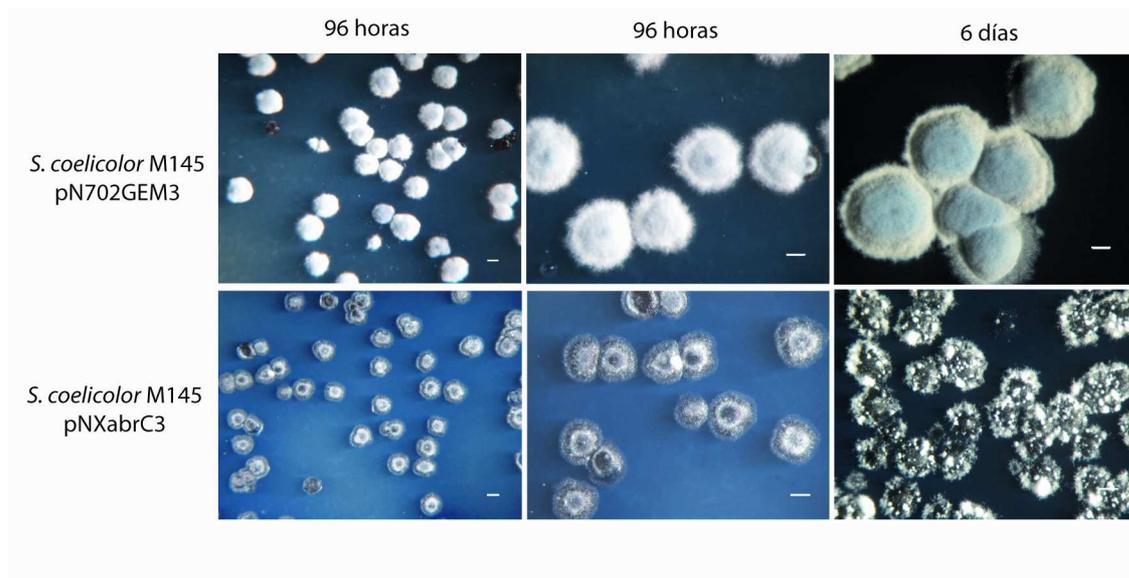
Para analizar que ocurría cuando el RR *abrC3* se sobreexpresaba de forma independiente de sus HKs se procedió a la obtención de transformantes de la cepa *S. coelicolor* M145 con el plásmido pNXabrC3 y con el plásmido control pN702GEM3. El efecto de la transformación de la cepa wt con esta nueva construcción pNXabrC3 resultó muy perjudicial para las bacterias recordando al fenotipo de la cepa Δ abrA1/A2.pTXabrA2, presentado en el apartado anterior. Como se muestra en la figura R.18.A. la eficiencia de la transformación era similar para ambos plásmidos, pNXabrC3 o pN702GEM3, sin embargo, las colonias que sobreexpresaban el RR AbrC3 apenas aumentaban su tamaño y presentaban un desarrollo morfológico lento y aberrante

(figura R.18.B). Los transformantes wt.pNXabrC3, no obstante, conservaban la capacidad de producir actinorrodina (figura R.18.A) y este fenotipo era el opuesto a lo que ocurría con la cepa que sobreexpresaba en alto número de copias el sistema *abrC* completo (HKs y RR) descrito anteriormente en el apartado 3.1.2. Por ello, para cuantificar la producción de antibióticos de la cepa wt.pNXabrC3 respecto a la wt control, se intentó obtener esporas pero no resultó posible, ya que la cepa apenas crecía cuando se reestriaba de nuevo, ya fuera en el mismo medio R2YE o en otros medios como SFM. (figura R.18.C).

A.



B.



C.

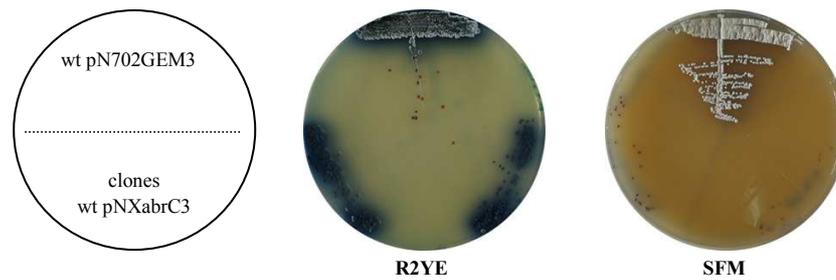
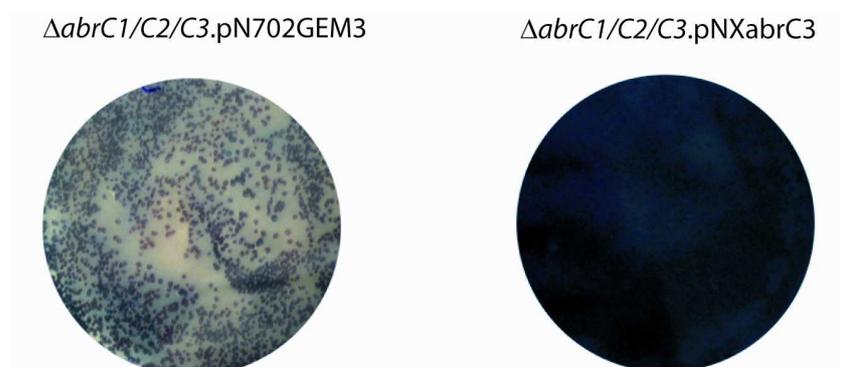


Figura R.18. (A) Transformación de la cepa M145 con el vector vacío (pN702GEM3) a la izquierda y con el vector de sobreexpresión (pNXabrC3) a la derecha en placas de R2YE+neo 20 $\mu\text{g/ml}$. (B) Imágenes a la lupa de la morfología y tamaño de las colonias de los transformantes con el plásmido vacío (fila superior) y los transformantes que sobreexpresan el RR *abrC3* (fila inferior) a distintos tiempos de crecimiento (96 horas y 6 días). La línea blanca indica el tamaño de la escala correspondiente a 0,1 cm. (C) Transformantes *S.coelicolor* M145 (plásmido control y pNXabrC3) reestriados en medio R2YE y SFM suplementados con neomicina 20 $\mu\text{g/ml}$.

A continuación se realizó la sobreexpresión de *abrC3* sobre la cepa mutante $\Delta\text{abrC1/C2/C3}$ donde sus HKs emparejadas no estaban presentes. Para ello se llevó a cabo la transformación con los plásmidos pNXabrC3 y pN702GEM3 sobre el mutante $\Delta\text{abrC1/C2/C3}$. Tal y como queda reflejado en la figura R.19, la sobreexpresión del RR *abrC3* en ausencia de sus HKs en la cepa $\Delta\text{abrC1/C2/C3}$, producía un efecto positivo sobre la producción de actinorrodina incluso más drástico que en M145.pNXabrC3 (figura R.19.A). Además los defectos morfológicos que se observaban al sobreexpresar *abrC3* en la cepa wt se suavizaban en la cepa mutante, llegando ésta a emitir un micelio aéreo de forma más uniforme y no parcheada por toda la colonia (figura R.19.B.).

A.



B.

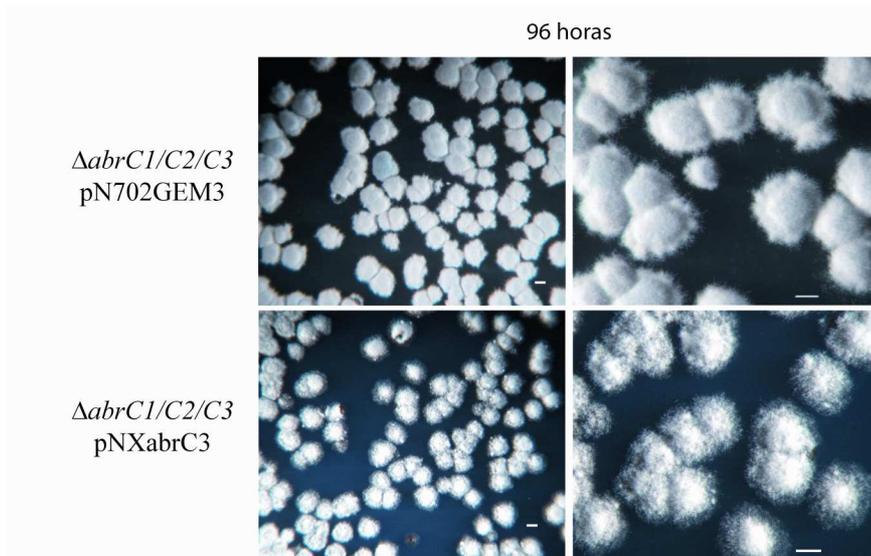
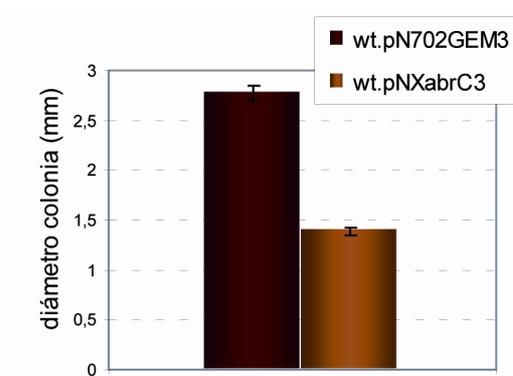


Figura R.19. (A). Resultado de la transformación de la cepa $\Delta abrC1/C2/C3$ con el vector vacío (pN702GEM3) a la izquierda y con el vector de sobreexpresión (pNXabrC3) a la derecha en placas de R2YE+neo 20 $\mu\text{g/ml}$. (B). Imágenes a la lupa de la morfología y tamaño de las colonias de los transformantes $\Delta abrC1/C2/C3.pN702GEM3$ (fila superior) y los transformantes $\Delta abrC1/C2/C3.pNXabrC3$ (fila inferior) a 96 horas de crecimiento y distintos aumentos. La línea blanca indica el tamaño de la escala correspondiente a 0,1 cm.

Las alteraciones del crecimiento de las colonias desaparecían, tal y como queda reflejado en las gráficas de medición de los diámetros en la figura R.20, las cuales se hicieron midiendo los diámetros de 20 colonias de los transformantes wt.pN702GEM3, wt.pNXabrC3, $\Delta abrC1/C2/C3.pN702GEM3$ y $\Delta abrC1/C2/C3.pNXabrC3$ con el *software ImageJ*.

A.



B.

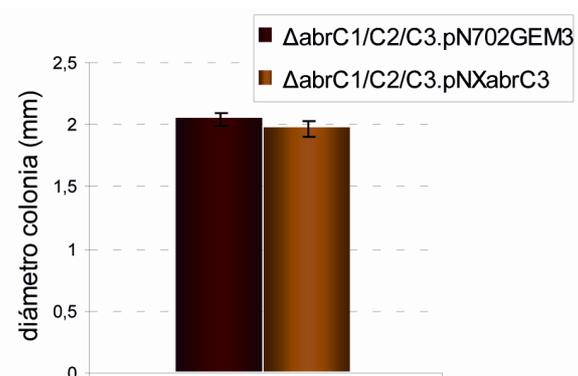
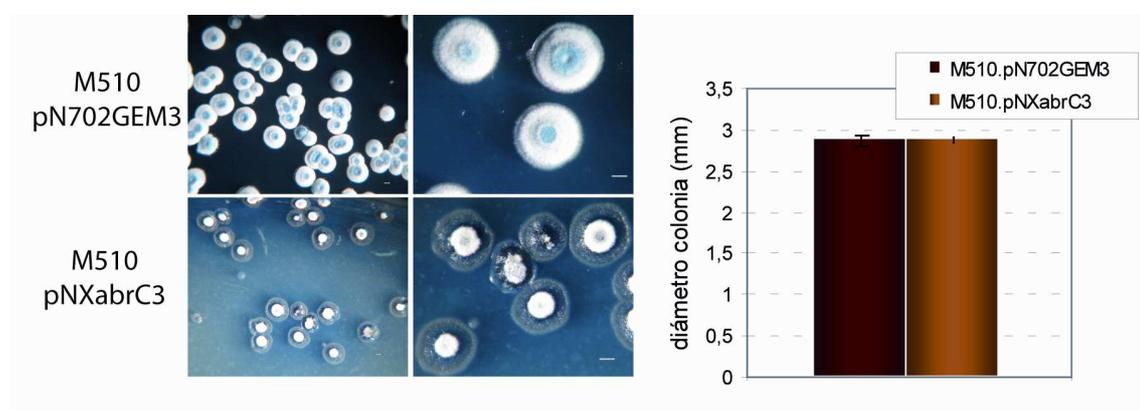


Figura R.20. Representación de la media del diámetro (mm) de las colonias transformantes: (A) wt.pN702GEM3 y wt.pNXabrC3. (B) $\Delta abrC1/C2/C3.pN702GEM3$ y $\Delta abrC1/C2/C3.pNXabrC3$. En todas los casos se cuantificaron 20 colonias (N=20). Las barras corresponden al error típico de las mediciones.

Observando las gráficas se puede concluir que el crecimiento de las colonias *S. coelicolor* M145.pNXabrC3 estaba severamente afectado, viéndose reducido el diámetro de las mismas a la mitad. Por el contrario, la cepa $\Delta abrC1/C2/C3$.pNXabrC3, en la que las histidín quinastas no estaban presentes no presentaba alteraciones de crecimiento significativas. El efecto que se estaba produciendo era completamente opuesto a lo observado con la sobreexpresión del RR *abrA2*, ya que las colonias se recuperaban del efecto deletéreo de la sobreexpresión del RR *abrC3* cuando sus HKs no estaban presentes.

En este caso, tras la observación del fenotipo tan drástico causado por la sobreexpresión del regulador se quiso evaluar si su “toxicidad” dependía de la producción de antibióticos, aunque en principio cabía pensar que la producción de actinorrodina no parecía ser la causa de los defectos en crecimiento y morfología de las cepas transformadas, ya que la cepa $\Delta abrC1/C2/C3$.pNXabrC3 hiperproductora de ACT, era la que presentaba un fenotipo menos acusado. Para ello, se transformaron con el plásmido pNXabrC3 y el control, las cepas M510 ($\Delta redD$) y M511 ($\Delta actII-ORF4$) de *S. coelicolor*, cepas no productoras de undecilprodigiosina y actinorrodina respectivamente (Floriano y Bibb, 1996). Los resultados, reflejados en la figura R.21. demostraron también como el fenotipo de ambas cepas se alteraba fuertemente cuando se sobreexpresaba el RR *abrC3*, viéndose afectada sobre todo la diferenciación. Respecto a la diferencia de tamaño entre las cepas, se realizaron cuantificaciones de los diámetros de las colonias y el resultado reveló que en la cepa M510 la sobreexpresión del RR *abrC3* no afectaba al tamaño total de la colonia aunque parte de la misma correspondía a un micelio sustrato poco denso (figura R.21.A. incluyéndose en la medición el micelio sustrato, halo de la colonia semitransparente). La cepa M511, por el contrario, sí presentaba un menor crecimiento cuando se sobreexpresaba el RR (figura R.21.B).

A.



B.

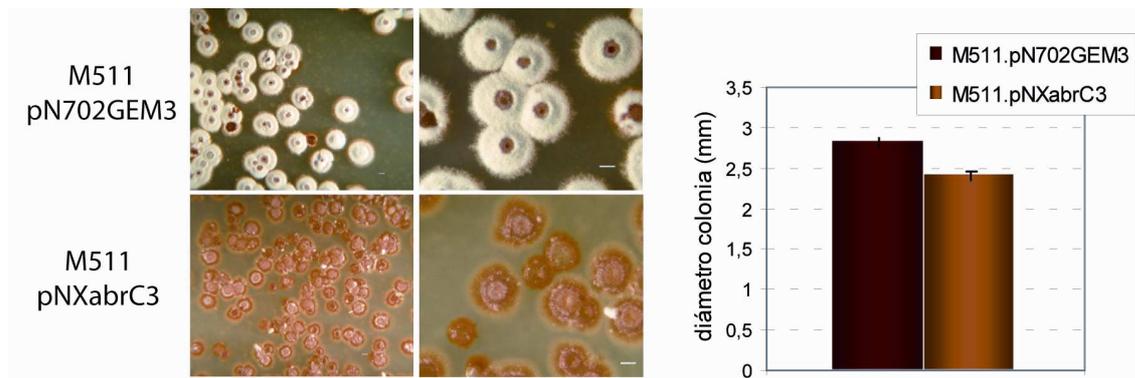


Figura R.21. (A). Imágenes a la lupa de la morfología y tamaño de las colonias de los transformantes M510.pN702GEM3 y M510.pNXabrC3 a 96 horas de crecimiento (izquierda). Media del diámetro (mm) de las colonias transformantes M510.pN702GEM3 y M510.pNXabrC3 (derecha). (B) Imágenes a la lupa de la morfología y tamaño de las colonias de los transformantes M511.pN702GEM3 y M511.pNXabrC3 a 96 horas de crecimiento y distintos aumentos (izquierda). Media del diámetro (mm) de las colonias transformantes M511.pN702GEM3 y M511.pNXabrC3 derecha. Las barras corresponden al error típico de la media cuando $N=20$.

Los resultados obtenidos apuntaban a que la alteración de la diferenciación morfológica de las diferentes cepas causada por la sobreexpresión del RR *abrC3*, era completamente independiente de la producción de los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina. El defecto en crecimiento, sin embargo, se puede considerar parcialmente dependiente de la producción de actinorrodina, ya que la cepa no productora de ACT (M511) transformada con el pNXabrC3 tenía problemas en crecimiento, aunque menos acusados (reducción escasa del 15 %) que la cepa *S. coelicolor* M145.pNXabrC3. Lo mismo ocurría en la cepa M510, no productora de RED, si se considera que pese a no tener diferencias reales en el diámetro de las colonias, se producía igualmente un fenotipo de crecimiento-diferenciación aberrante.

I.2.

DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE LAS CEPAS MUTANTES $\Delta abrC1/C2/C3$ y $\Delta abrA1/A2$ Y LA CEPA SILVESTRE *S. coelicolor* M145

Dadas las diferencias en la producción de antibióticos y diferenciación observadas entre la cepa parental y los mutantes nulos de los TCSs estudiados, se propuso analizar en un contexto global, qué procesos podían estar siendo modificados que causasen ese efecto fenotípico final. Para ello, se decidió realizar una comparación transcriptómica entre cada uno de los mutantes y la cepa wt, utilizando *microarrays* de DNA. La finalidad perseguida era aportar una visión general de la carencia de cada uno de los TCS en *S. coelicolor* M145.

1. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE $\Delta abrC1/C2/C3$ vs. wt: MICROARRAYS cDNA-gDNA

1.1. CONDICIONES Y ELABORACIÓN DE LOS MICROARRAYS

Las diferencias fenotípicas de producción de actinorrodina entre wt y $\Delta abrC1/C2/C3$ en el momento de comenzar los experimentos se habían visto en medio sólido R2YE principalmente (este estudio se realizó de forma simultánea a los experimentos descritos en antecedentes), por ello, el aislamiento de RNA se llevó a cabo en este medio. Con objeto de decidir las condiciones experimentales para el estudio de la expresión diferencial, se hizo un seguimiento en el tiempo de la evolución fenotípica de ambas cepas, wt y $\Delta abrC1/C2/C3$. Tras concluir que las mayores diferencias en producción de actinorrodina se daban principalmente entre las 50 y las 60 horas de crecimiento, se decidió analizar la expresión génica en los tiempos 50 y 56 horas. Para ello, se inocularon $7,5 \cdot 10^6$ esporas pre-germinadas sobre discos de policarbonato colocados sobre el medio R2YE y se incubaron a 30° C. El micelio se recogió a los tiempos indicados y se aisló el RNA (materiales y métodos, 4.2). Por cada tiempo se utilizaron 4 réplicas biológicas de cada una de las cepas. La calidad del RNA se determinó por *Bioanalyzer* 2100 (ver materiales y métodos). Estos RNAs se utilizaron para analizar la expresión génica utilizando *microarrays* de oligonucleótidos en los que se encuentran representados todos los genes de *S. coelicolor* y cuyas características se describen con más detalle en materiales y métodos.

En este experimento en concreto, se realizó una hibridación tipo cDNA-gDNA. En este tipo de hibridaciones, se obtiene el cDNA, representativo del transcriptoma de una determinada cepa bajo unas determinadas condiciones de crecimiento a partir del RNA purificado y se marca con un fluoróforo (Cy3). Por otro lado, se obtiene el DNA total de la cepa silvestre (gDNA) y se marca con otro fluoróforo (Cy5), que con una representación equitativa de todos los genes constituye el DNA de referencia y se utiliza para todas las hibridaciones. En el mismo

microarray se hibridan simultáneamente ambos tipos de ácidos nucleicos marcados diferencialmente cDNA-Cy3 vs. gDNA Cy5. De esta forma cada cristal aporta un valor “Mg” para cada gen ($=\log_2$ de las intensidades Cy3/Cy5), que equivale a la abundancia del transcrito en la bacteria. El contraste entre cepas o condiciones se hace comparando los valores Mg entre los distintos cristales. La ventaja de este tipo de enfrentamientos, cDNA-gDNA es que se amplían los contrastes que se pueden realizar, puesto que al utilizar en todos ellos la misma referencia puede obtenerse un valor absoluto “Mg” para cada gen. Por este motivo todas las hibridaciones realizadas de modo independiente pueden ser contrastadas entre ellas.

En este estudio concreto, se realizaron 8 hibridaciones independientes para cada cepa, wt y $\Delta abrC1/C2/C3$ (4 a tiempo 50 horas y 4 a tiempo 56 horas de cultivo) para poder realizar todas las comparaciones que se detallan a continuación. Una vez realizadas las hibridaciones y obtenidos los valores de fluorescencia de cada uno de los puntos (ver materiales y métodos) se procedió al análisis de los datos. En primer lugar los datos se normalizaron y se obtuvieron los valores “Mg” para todos los genes (utilizando el programa R con la librería LIMMA, ver materiales). Seguidamente se procedió al cálculo de las Mc ($\log ratio = M_g$ de la cepa 1 – M_g de la cepa 2) que reflejan la diferencia de transcrito de cada gen entre las diferentes cepas (wt-mutante) o condiciones (50-56 horas). Al hacer la inversa logarítmica del Mc (2^{Mc}) se obtiene el *fold change* que equivale a las veces que un transcrito está sobreexpresado o subexpresado respecto de la cepa control.

Los contrastes que se realizaron fueron los siguientes (esquematisados en la figura R.23.):

- C-A: comparación entre las cepas wt y $\Delta abrC1/C2/C3$ a tiempo 1 (50 horas)
- D-B: comparación entre las cepas wt y $\Delta abrC1/C2/C3$ a tiempo 2 (56 horas)
- B-A: comparación de la cepa wt a los distintos tiempos 1 y 2 (56-50 horas)
- D-C: comparación de la cepa $\Delta abrC1/C2/C3$ a los distintos tiempos 1 y 2 (56-50 horas)
- Inter: comparación del perfil de expresión en el tiempo entre la cepa wt y la cepa $\Delta abrC1/C2/C3$.

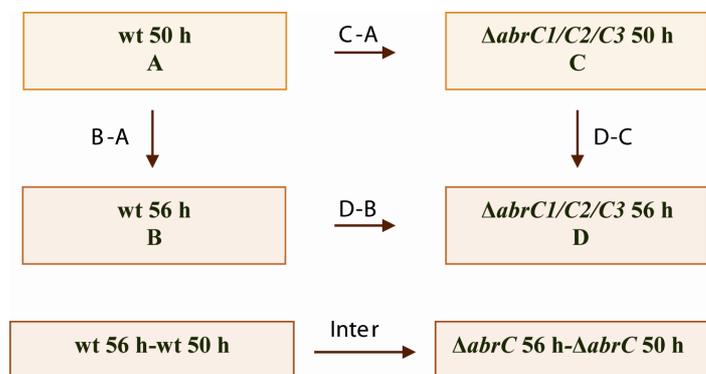


Figura R.23. Esquema de los contrastes realizados tras la normalización de los datos resultantes de los *microarrays*.

El fin que se persiguió con los contrastes mencionados era discernir de la lista total de genes presentes, cuáles de ellos estaban siendo expresados diferencialmente en cualquiera de los contrastes (diferencias entre cepas: C-A, D-B e inter; o diferencias en el tiempo en cada cepa: B-A y D-C). Para alcanzar dicha meta, los resultados deben analizarse bajo una rigurosa estadística. Uno de los valores estadísticos que se utilizan con el fin de saber qué genes están diferencialmente expresados (**DE**) es el “p-valor”. Este parámetro, estadísticamente, indica la probabilidad de cometer un error de tipo I o probabilidad de aceptar falsos positivos. En este contexto, refleja la probabilidad de que la expresión diferencial de un gen haya ocurrido por azar y no por las condiciones experimentales establecidas. En el análisis de datos de *microarrays*, el p-valor asignado a cada contraste individual se somete a su vez a una corrección de comparaciones múltiples (*multiple test*) para asegurar la aceptación estadística y se llama p-valor corregido, ya que al aumentar el número de contrastes realizados también aumenta la probabilidad de tener falsos positivos. Las pruebas de corrección utilizadas en este trabajo son las denominadas: FDR (*False Discovery Rate*) y pfp (*proportion of false positives*). Está generalmente aceptado un p-valor (corregido) < 0,05 como satisfactorio, ya que indica que sólo un 5 % de los genes expresados diferencialmente podrían ser falsos positivos.

1.2. RESULTADOS DE LOS MICROARRAYS

Tras el análisis de los datos se observó que no existían grandes diferencias de expresión entre las cepas silvestre y mutante en las condiciones utilizadas en el diseño experimental. De hecho, teniendo en cuenta los p-valores corregidos por FDR ó pfp inferiores a 0,05, tan sólo se obtuvieron 74 genes DE que cumplieran estos filtros estadísticos, resultado de todas las comparaciones. Estos 74 genes quedan recogidos de la siguiente manera según los diferentes contrastes analizados:

C-A: 8 genes ($\Delta abrC1/C2/C3$ vs. wt, 50 h);

D-B: 2 genes ($\Delta abrC1/C2/C3$ vs. wt, 56 h);

B-A: 28 genes (wt 56 h vs. wt 50 h) (9 en común con D-C);

D-C: 49 genes ($\Delta abrC1/C2/C3$ 50 h vs. $\Delta abrC1/C2/C3$ 56 h)

Inter: 1 gen. (B-A vs. D-C)

Los genes DE de los contrastes C-A, D-B e Inter en los cuales se reflejan las diferencias entre las cepas mutante y wt se recogen en las tablas R.1, R.2 y R.3. Los valores Mc positivos ($Mc > 0$) significan sobreexpresión en la cepa mutante y los Mc negativos ($Mc < 0$) reflejan subexpresión en la cepa mutante en un tiempo concreto (tablas R.1. y R.2.).

Tabla R.1. Genes DE (p-valor FDR/pfp <0,05) resultantes del contraste C-A (wt vs. $\Delta abrC1/C2/C3$ a las 50 horas)

| Contraste C-A | | | |
|---------------|---|-------|-------------------|
| SCO | Función | Mc | p-valor (FDR/pfp) |
| 0122 | monooxigenasa (putativa) | 1,21 | 0,0383 |
| 0277 | ? | 1,50 | 0,0225 |
| 0850 | proteína de membrana (putativa) | 1,69 | 0,000 |
| 3309 | ? | 1,18 | 0,03 |
| 4559 | oxidoreductasa transferente electrones | -1,53 | 0,000 |
| 4612 | transportador de aminoácidos (putativa) | -1,36 | 0,02 |
| 6259 | transportador de azúcar (putativa) | 1,57 | 0,04 |
| 6557 | neuramidasa (putativa) | 1,22 | 0,03 |

Tabla R.2. Genes DE (p-valor FDR/pfp <0,05) resultantes del contraste D-B (wt vs. $\Delta abrC1/C2/C3$ a las 56 horas)

| Contraste D-B | | | |
|---------------|---------------------------------|-------|-------------------|
| SCO | Función | Mc | p-valor (FDR/pfp) |
| 7804 | proteína de membrana (putativa) | -1,61 | 0,025 |
| 0209 | ? | -1,68 | 0,000 |

Tabla R.3. Genes DE (p-valor FDR/pfp <0,05) resultantes del contraste Inter (D-C/B-A)

| Contraste Inter | | | |
|-----------------|---------|------|-------------------|
| SCO | Función | Mc | p-valor (FDR/pfp) |
| 2858 | ? | 1,53 | 0,0000 |

Como se puede observar el resultado del análisis estadístico riguroso resultó demasiado restrictivo. Fueron escasos los genes que se encontraban DE en cualquiera de los contrastes entre la cepa wt vs. $\Delta abrC1/C2/C3$ (C-A, D-B o Inter). Esto pudo deberse en parte, a que el número de réplicas biológicas por condición experimental no era suficiente para superar estos filtros. Por ello, se decidió tener en cuenta los resultados de acuerdo al p-valor sin corregir, que equivalen a un filtro estadístico más laxo. Ante la selección de los genes DE por el p-valor sin corregir <0,05 se suele tener en cuenta otro parámetro, el Mc, para establecer otro límite. Siguiendo estas pautas los datos también se clasificaron considerando aquellos contrastes con un Mc >0,9 ó Mc <-0,9 y un p-valor sin corregir <0,05. Las nuevas tablas de resultados se muestran a continuación:

Tabla R.4. Genes DE (p-valor <0,05 resultantes del contraste C-A “wt vs. $\Delta abrC1/C2/C3$ ” a las 50 horas) con $Mc < -0,9$ en color verde (subexpresados en el mutante) ó $> 0,9$ en rojo (sobrexpresados en el mutante) En negrita aparecen los genes que son DE en base al p-valor corregido. Las casillas de color gris son las de aquellos genes relacionados con la traducción de proteínas. Las interrogaciones (?) indican función desconocida.

| Contraste C-A | | | |
|---------------|---|--------------|---------------|
| SCO | Función | Mc | p-valor |
| 0121 | transportador ABC | -0,96 | 0,0139 |
| 2762 | proteína de secreción | -0,93 | 0,0410 |
| 3425 | proteína ribosomal 30S S18 (putativa) | -1,12 | 0,0285 |
| 3427 | proteína ribosomal 50S L31 (putativa) | -1,13 | 0,0125 |
| 3555 | proteína membrana | -0,91 | 0,0444 |
| 3576 | ? | -1,15 | 0,0026 |
| 3741 | RR (putativa) | -0,94 | 0,0378 |
| 3908 | 30S ribosomal | -1,00 | 0,0130 |
| 4160 | hidrolasa (putativa) | -1,05 | 0,0034 |
| 4559 | oxidorreductasa transferente electrones (putativa) | -1,54 | 0,0053 |
| 4612 | transportador de aminoácidos | -1,36 | 0,0096 |
| 6191 | ? | -0,91 | 0,0485 |
| 6605 | ? | -0,98 | 0,0113 |
| 7196 | transportador membrana de iones | -1,16 | 0,0141 |
| 0097 | proteína integral de membrana (putativa) | 0,98 | 0,0087 |
| 0122 | monooxigenasa (putativa) | 1,21 | 0,0229 |
| 0277 | ? | 1,50 | 0,0012 |
| 0850 | proteína de membrana (putativa) | 1,69 | 0,0003 |
| 1041 | ? | 1,02 | 0,0235 |
| 1641 | proteína de transporte (putativa) | 1,15 | 0,0014 |
| 2481 | ? | 1,05 | 0,0107 |
| 2867 | ? | 1,05 | 0,0291 |
| 3309 | ? | 1,18 | 0,0485 |
| 3488 | transposasa (putativa) | 1,07 | 0,0036 |
| 3625 | ? | 1,00 | 0,0201 |
| 3629 | adenilosuccinato sintetasa (putativa) | 0,91 | 0,0001 |
| 3726 | ? | 0,93 | 0,0114 |
| 3925 | regulador transcripcional (putativa) | 0,94 | 0,0187 |
| 4423 | proteína serin/treonin quinasa | 0,92 | 0,0008 |
| 5126 | ? | 0,92 | 0,0445 |
| 5529 | liasa (putativa) | 0,93 | 0,0178 |
| 6259 | transportador azúcares tipo ABC (putativa) | 1,57 | 0,0029 |
| 6557 | neuramidasa (putativa) | 1,22 | 0,0085 |
| 6662 | transaldolasa | 1,08 | 0,0484 |
| 6923 | ? | 1,35 | 0,0008 |
| 7342 | ? | 0,90 | 0,0004 |
| 7501 | hidrolasa | 0,90 | 0,0328 |

Tabla R.5. Genes DE (p-valor <0,05 resultantes del contraste D-B “wt vs. $\Delta abrC1/C2/C3$ ” a las 56 horas) con $Mc < -0,9$ en color verde ó $> 0,9$ en rojo. En negrita aparecen los genes que son DE en base al p-valor corregido. Las casillas de color gris son las de aquellos genes relacionados con la traducción de proteínas. Las interrogaciones (?) indican función desconocida.

| Contraste D-B | | | |
|---------------|--|--------------|---------------|
| SCO | Función | Mc | p-valor |
| 0084 | ? | -0,94 | 0,0466 |
| 0209 | ? | -1,68 | 0,0000 |
| 1000 | integrasa | -1,21 | 0,0011 |
| 1589 | ? | -1,04 | 0,0158 |
| 2588 | proteína integral de membrana (putativa) | -1,13 | 0,0045 |
| 3733 | ? | -0,92 | 0,0257 |
| 4111 | ? | -1,15 | 0,0089 |
| 7623 | subunidad α NAD(P) transhidrogenasa | -0,91 | 0,0032 |
| 7804 | proteína de membrana (putativa) | -1,61 | 0,0156 |
| 0386 | amidotransferasa (putativa) | 1,08 | 0,0062 |
| 0561 | proteína reguladora | 1,03 | 0,0000 |
| 0762 | precursor inhibidor de proteasas | 0,92 | 0,0010 |
| 1678 | regulador transcripcional | 0,94 | 0,0009 |
| 2145 | proteína de membrana (putativa) | 0,97 | 0,0124 |
| 2518 | HK | 0,91 | 0,0431 |
| 2786 | beta-N-acetilhexosaminidase | 0,94 | 0,0352 |
| 3323 | factor sigma RNA polimerasa (putativa) | 0,96 | 0,0004 |
| 3428 | proteína ribosomal 50S L33 (putativa) | 1,15 | 0,0133 |
| 5149 | proteasa (putativa) | 0,93 | 0,0273 |
| 5372 | cadena gamma ATP sintasa | 0,95 | 0,0010 |
| 5972 | ? | 0,90 | 0,0052 |
| 6748 | enoil coA hidratasa (putativa) | 0,90 | 0,0436 |
| 7306 | proteína reguladora | 1,11 | 0,0099 |

Analizando estos datos resultó llamativo en la comparación C-A (wt vs. mutante a las 50 horas) la presencia de 4 genes subexpresados en la cepa $\Delta abrC1/C2/C3$ relacionados con traducción (codifican proteínas ribosomales ribosomales y un transportador de aminoácidos). Ampliando el filtro de selección se decidió ver qué ocurría con el resto de genes codificantes de proteínas ribosomales de *S. coelicolor*, 61 en total. Entre estos genes muchos otros resultaron estar subexpresados en la cepa mutante a las 50 horas y también salieron algunos otros cuyos productos se relacionaban con la traducción de proteínas (tabla R.6.). Cabe reseñar que el gen que codifica el factor de reciclaje de ribosomas tenía un comportamiento contrario, es decir, se estaba sobreexpresando en la cepa mutante a las 50 horas. Esto sugiere que ante el posible

defecto traduccional a nivel ribosomal, debido a la bajada de muchas de sus proteínas estructurales y del transportador de aminoácidos, las células tratan de compensarlo incrementando los niveles de este factor de reciclaje.

Tabla R.6. Genes cuyos productos se relacionan con el proceso de traducción en *S. coelicolor* y que resultan DE considerando un p-valor sin corregir <0,05 a las 50 h.

| Genes codificantes de proteínas relacionadas con traducción | | | | | |
|--|---|---------------|----------------|---------------|----------------|
| SCO | Nombre ó función | Mc C-A | p-valor | Mc D-B | p-valor |
| 0708 | transportador ABC aminoácidos ramificados | - 0,71 | 0,027 | 0,13 | 0,65 |
| 1599 | RpmI | - 0,84 | 0,0036 | 0,11 | 0,65 |
| 1998 | RpsA | - 0,74 | 0,0252 | - 0,25 | 0,4 |
| 2563 | RspT | - 0,83 | 0,0023 | 0,13 | 0,58 |
| 2596 | RpmA | - 0,68 | 0,0412 | 0,1 | 0,74 |
| 3023 | adenosilhomocisteinasa | - 0,6 | 0,0004 | - 0,11 | 0,43 |
| 3425 | RpsR2 | - 1,12 | 0,082 | 0,66 | - 0,16 |
| 3427 | RpmE | -1,13 | 0,012 | 0,73 | 0,08 |
| 3430 | RpsN | - 0,79 | 0,0074 | 0,28 | 0,3 |
| 3908 | RpsR | - 1,00 | 0,01 | - 0,58 | 0,14 |
| 4612 | transportador de aminoácidos | - 1,36 | 0,0096 | 0,03 | 0,95 |
| 4661 | FusA (factor elongación) | - 0,85 | 0,0039 | - 0,11 | 0,65 |
| 4703 | RplD | - 0,87 | 0,04 | - 0,13 | 0,74 |
| 4718 | RplR | - 0,68 | 0,037 | - 0,33 | 0,24 |
| 4721 | RplO | - 0,7 | 0,045 | - 0,44 | 0,2 |
| 5627 | Frr (Factor reciclaje ribosomas) | 0,85 | 0,0003 | 0,03 | 0,9 |
| 5591 | RpsP | - 0,81 | 0,029 | - 0,48 | 0,16 |

Otra apreciación fue que las diferencias de expresión en muchas de las proteínas ribosomales observadas a las 50 horas (contraste C-A), no persistían en el tiempo, según mostraron los resultados del contraste D-B ($\Delta abrC1/C2/C3$ -wt) a 56 horas. De hecho algunas incrementaban su expresión hasta niveles equivalentes e incluso superiores a la cepa wt, de ahí que aparecieran DE sobreexpresadas en la tabla Inter. R.7.

Analizando el perfil de transcripción de esos genes de proteínas ribosomales a lo largo del tiempo en las dos cepas estudiadas, wt y mutante, se observó cómo unas cuantas respondían a un patrón de expresión similar, un aumento en la transcripción de las mismas en la cepa mutante en el intervalo de tiempo transcurrido (líneas naranjas en la figura R.24) frente a una expresión constante en la cepa wt (líneas azules en la figura R.24). Aquellos genes con diferencias de expresión mayores en el mutante, en el intervalo de tiempo transcurrido, así como con mayores diferencias en el perfil de transcripción respecto de la cepa wt quedan resaltados en la figura R.24.

Tabla R.7. Genes DE (p-valor <0,05 resultantes del contraste **Inter B-A/D-C** “wt vs. $\Delta abrC1/C2/C3$ ”) con Mc <-0,9 en verde ó >0,9 en color rojo. En negrita aparecen los genes que son DE en base al p-valor corregido. Las casillas de color gris son las de aquellos genes relacionados con la traducción de proteínas. Las interrogaciones (?) indican función desconocida.

| Contraste Inter | | | |
|-----------------|--|-------------|---------------|
| SCO | Función | Mc | p-valor |
| 0277 | ? | -1,50 | 0,0147 |
| 0599 | regulador de sig8 (putativa) | -0,99 | 0,0493 |
| 0842 | deoxiribodipirimidina fotoliasa (putativa) | -0,95 | 0,0060 |
| 0850 | proteína de membrana (putativa) | -1,23 | 0,0411 |
| 0897 | proteína integral de membrana (putativa) | -0,97 | 0,0278 |
| 1000 | integrasa | -1,40 | 0,0080 |
| 1041 | ? | -1,21 | 0,0466 |
| 1589 | ? | -1,34 | 0,0313 |
| 1837 | ? | -1,07 | 0,0273 |
| 2316 | ? | -1,10 | 0,0427 |
| 2481 | regulador transcripcional (putativo) | -1,30 | 0,0207 |
| 2668 | proteína serine/treonine kinasa | -1,00 | 0,0110 |
| 2858 | ? | 1,53 | 0,0000 |
| 2868 | ? | -0,97 | 0,0242 |
| 2872 | liasa (putativa) | -0,96 | 0,0303 |
| 3625 | ? | -1,18 | 0,0428 |
| 3629 | adenilosuccinato sintetasa (putativa) | -1,18 | 0,0003 |
| 4055 | alcohol dehidrogenasa (putativa) | -0,94 | 0,0480 |
| 4058 | ? | -0,91 | 0,0090 |
| 4084 | ? | -1,19 | 0,0184 |
| 4088 | ? | -1,01 | 0,0072 |
| 4111 | proteína conservada (hipotética) | -1,53 | 0,0160 |
| 4477 | regulador transcripcional familia merR (putativa) | -0,92 | 0,0051 |
| 5288 | ? | -0,90 | 0,0096 |
| 5502 | proteína integral exporte de membrana (putativa) | -0,99 | 0,0046 |
| 5529 | 2-isopropilmalato sintasa (biosíntesis leu) | -1,42 | 0,0270 |
| 6086 | proteína integral de membrana transporte (putativa) | -0,90 | 0,0127 |
| 6345 | quitinasa secretada (metab carbohidratos) (putativa) | -1,26 | 0,0225 |
| 6486 | proteína asociada de transporte (putativa) | -0,91 | 0,0361 |
| 6662 | transaldolasa (pentosas fostato) | -1,47 | 0,0090 |
| 7623 | subunidad α NAD(P) transhidrogenasa | -1,12 | 0,0114 |
| 0111 | oxidoreductasa (putativa) | 1,14 | 0,0227 |
| 0191 | licopeno ciclasa (putativa) | 1,03 | 0,0470 |
| 0386 | amidotransferasa (putativa) | 1,52 | 0,0079 |
| 0561 | proteína reguladora Fe | 0,96 | 0,0036 |
| 0762 | precursor inhibidor de proteasas | 0,95 | 0,0154 |
| 0788 | ? | 1,01 | 0,0273 |
| 1174 | aldehído dehidrogenasa | 1,18 | 0,0074 |
| 1568 | regulador transcripcional familia tetR (putativa) | 0,99 | 0,0042 |
| 1599 | proteína ribosomal 50S L35 | 0,95 | 0,0140 |
| 1678 | regulador transcripcional (putativa) | 1,08 | 0,0074 |

| SCO | Función | Mc | p-valor |
|-------------|--|-------------|---------------|
| 1971 | ? | 1,33 | 0,0043 |
| 1883 | fragmento de xilanas (putativa) | 0,94 | 0,0051 |
| 2167 | ? | 0,93 | 0,0494 |
| 2168 | ? | 1,03 | 0,0223 |
| 2368 | hipotética proteína conservada | 0,97 | 0,0086 |
| 2563 | proteína ribosomal 30S S20 | 0,97 | 0,0088 |
| 2766 | ribonucleasa secretada (putativa) | 1,22 | 0,0384 |
| 2858 | ? | 1,01 | 0,0000 |
| 3224 | transportador azúcares tipo ABC (putativa) | 1,17 | 0,0174 |
| 3425 | proteína ribosomal 30S S18 (putativa) | 1,78 | 0,0120 |
| 3427 | proteína ribosomal 50S L31 (putativa) | 1,87 | 0,0033 |
| 3428 | proteína ribosomal 50S L33 (putativa) | 1,94 | 0,0048 |
| 3430 | proteína ribosomal 30S S14 (putativa) | 1,07 | 0,0085 |
| 3576 | ? | 1,17 | 0,0221 |
| 3611 | ? | 1,08 | 0,0125 |
| 3748 | proteína de choque térmico (cold shock) | 1,08 | 0,0125 |
| 4559 | proteína de transferencia de electrones | 1,27 | 0,0343 |
| 5570 | ? | 1,41 | 0,0009 |
| 5572 | ribonucleasa III | 1,18 | 0,0019 |
| 6794 | HK (putativa) | 1,16 | 0,0035 |
| 6795 | ? | 1,29 | 0,0228 |
| 7135 | ? | 1,09 | 0,0214 |
| 7196 | putativa proteína integral membrana transporte iones | 1,53 | 0,0179 |
| 7306 | proteína reguladora | 1,65 | 0,0088 |
| 7389 | oxidoreductasa (putativa) | 1,03 | 0,0210 |
| 7400 | proteína de transporte tipo ABC (putativa) | 1,02 | 0,0049 |
| 7578 | ? | 1,49 | 0,0182 |

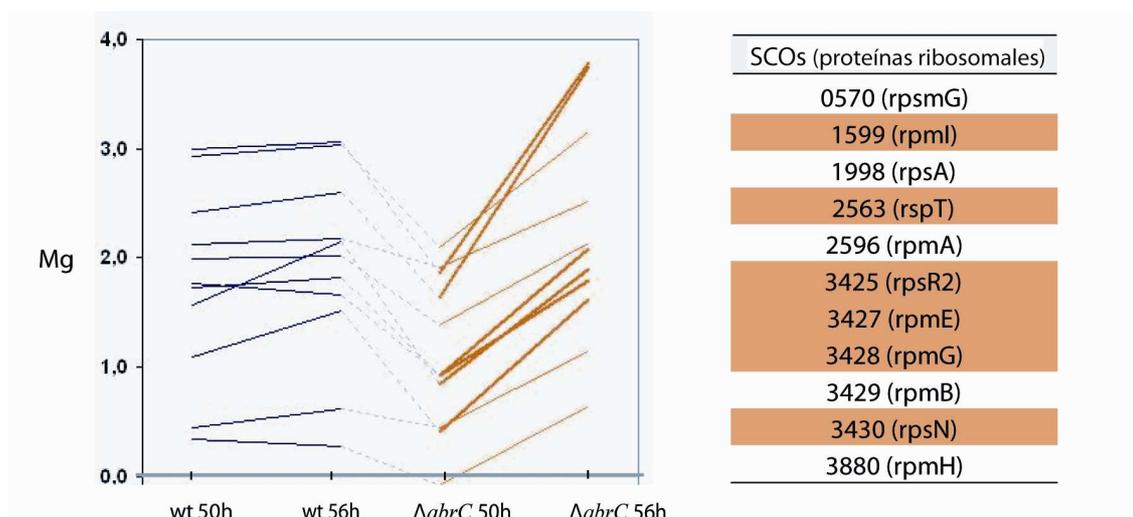


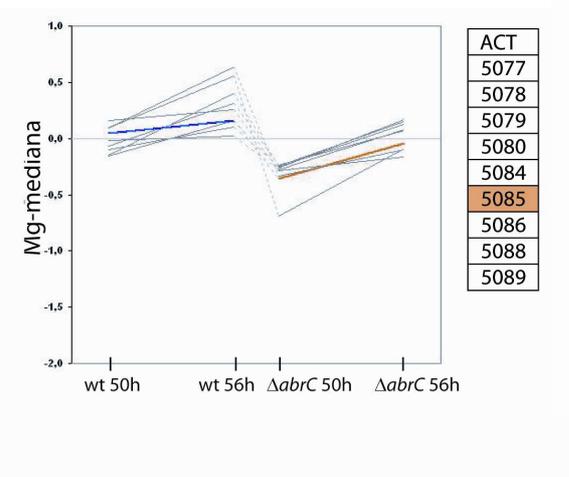
Figura R.24. Perfil de expresión de las proteínas ribosomales con diferencias entre las 56 y 50 horas en el mutante. El gráfico muestra los valores de expresión Mg de los distintos genes en la cepa wt (azul) y en la cepa $\Delta abrC1/C2/C3$ (naranja) a las 50 y 56 horas. Las líneas en naranja fuerte se corresponden con los genes DE (p-valor sin corregir $<0,05$) resultado de la comparación Inter. Los SCO se enumeran en la tabla de la derecha.

El resto de genes DE en los distintos contrastes realizados no pueden conectarse desde el punto de vista biológico con ninguno de los fenotipos observados en la cepa mutante de forma directa, por lo que son difícilmente interpretables. Además no se obtuvieron genes agrupados en operones o relacionados funcionalmente, o al menos no se pueden asociar con la información disponible sobre ellos hasta la fecha. Por lo tanto, los resultados obtenidos no aportaron ningún dato nuevo sobre la ruta de actuación del sistema *AbrC1/C2/C3*.

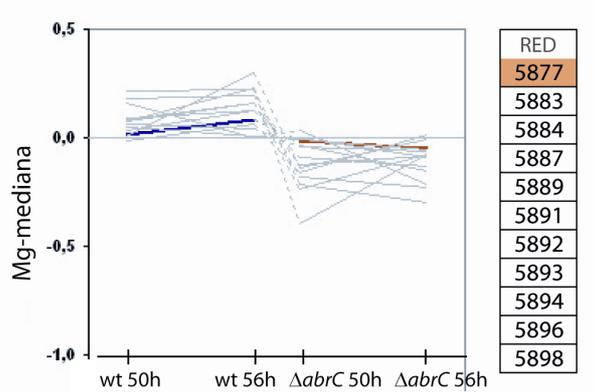
No obstante, dado que este mutante en las condiciones elegidas para el estudio presentaba una menor producción de ACT, se decidió analizar como era la expresión de los genes del *cluster* ACT en cepa mutante $\DeltaabrC1/C2/C3$ respecto de la cepa wt. Asimismo, se examinaron los genes de los *clusters* de los otros dos antibióticos producidos por *S. coelicolor* M145: RED y CDA. Aunque hay que tener en cuenta que las condiciones experimentales no eran las más adecuadas para observar diferencias en la expresión de estos últimos genes, debido al medio de cultivo utilizado y a los tiempos elegidos para la obtención del RNA (tanto RED como CDA se producen antes en el tiempo).

Como cabía esperar, los perfiles de expresión, presentados en la figura R.25, mostraron una clara disminución en la mayoría de genes del *cluster* ACT a los dos tiempos de estudio siendo más pronunciada esta diferencia a las 50 horas, lo cual estaba acorde con el fenotipo del mutante. Respecto al *cluster* RED se pudo apreciar una ligerísima bajada en los genes en la cepa $\DeltaabrC1/C2/C3$. Por último, los componentes del *cluster* CDA no presentaron diferencias de expresión salvo del gen *cdaR* a las 50 horas, el cual codifica el regulador específico de ruta del CDA.

A.



B.



C.

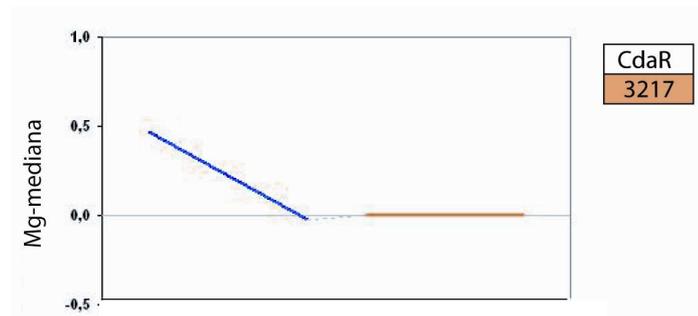


Figura R.25. (A). Perfil de transcripción de varios genes del *cluster* ACT cuyos SCOs aparecen en la tabla derecha adyacente. La expresión del gen del regulador específico de ruta *actII-ORF4* se muestra de color azul en wt y naranja en la cepa mutante. (B). Perfil de transcripción de varios genes del *cluster* RED cuyos SCOs aparecen en la tabla derecha. El nivel de transcrito del gen regulador específico de ruta *redD* se muestra de color azul en wt y naranja en la cepa mutante. (C). Perfil de transcripción del gen *cdaR* en la cepa wt y mutante.

1.3. COMPROBACIÓN DE RESULTADOS MEDIANTE RT-PCR SEMICUANTITATIVA

Para comprobar si los reguladores específicos de ruta de los diferentes antibióticos tenían realmente alterada la expresión se hicieron RT-PCRs semicuantitativas de los genes *actII-ORF4*, *cdaR*, *redD* y *redZ*. Para ello, se escogieron al azar dos de las muestras de RNA que se habían utilizado previamente para la hibridación de los *microarrays* del tiempo 50 horas puesto que era en el que se observaban mayores diferencias de expresión entre la cepa wt y $\Delta abrC1/C2/C3$. Los experimentos se realizaron como se indica en el apartado 4.4.3 de materiales y métodos y los resultados de las amplificaciones se visualizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, tal y como se muestran en la figura R.26.

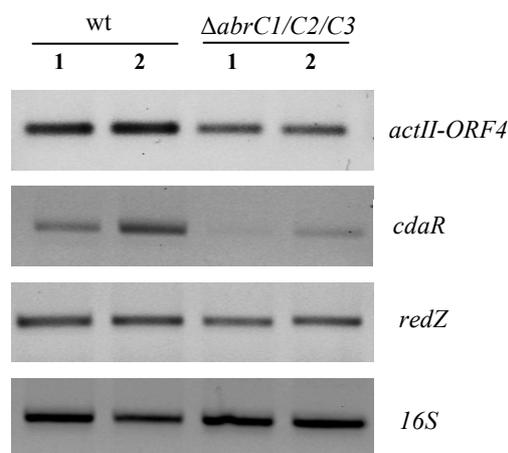


Figura R.26. RT-PCR de los genes reguladores específicos de ruta *actII-ORF4* (25 ciclos), *cdaR* (40 ciclos) y *redZ* (35 ciclos). Como control se amplificó el 16S RNA cuya expresión es constitutiva (25 ciclos). Los números 1 y 2 corresponden a las réplicas biológicas de los RNAs de 50 horas de cultivo.

La diferencia de expresión en los genes *actII-ORF4* y *cdaR* se confirmaron con los resultados de las RT-PCRs, lo cual, a su vez, se veía reflejado en el defecto fenotípico observado en este mutante. La expresión del gen *redD* no se pudo comprobar puesto que no se obtuvo amplificación en ninguna de las cepas. No obstante, el gen *redZ*, que controla a su vez la expresión del gen *redD* (White y Bibb, 1997), no presentaba alteración visible en su expresión, lo cual no sorprendió dado que en este gen concreto tampoco se habían visto diferencias en los *arrays*.

2. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE Δ *abrA1/A2* vs wt: MICROARRAYS cDNA-cDNA

2.1. CONDICIONES Y ELABORACIÓN DE LOS MICROARRAYS

La comparación de la expresión génica entre wt y Δ *abrA1/A2* se llevó a cabo sembrando las cepas en medio sólido basal NMMP. Tras el seguimiento fenotípico de las mismas, se comprobó que la mayor diferencia en la producción de actinorrodina se daba en torno a los 3-4 días. No obstante, como se buscaban alteraciones transcripcionales, se tomó un tiempo de 48 horas, anterior a la alteración en fenotipo, y otro de 80 horas, dentro del margen donde se veían las diferencias en producción. De forma similar a lo descrito en el apartado anterior, se sembraron $7,5 \cdot 10^6$ esporas pre-germinadas por placa, sobre discos de policarbonato y se incubaron a 30° C durante los tiempos escogidos. A continuación se recogió el micelio y se purificó el RNA. Para el tiempo de 48 horas se utilizaron 6 réplicas biológicas y para el de 80 horas se utilizaron 5 réplicas.

Dado el gran consumo de tiempo que supone realizar íntegramente toda la técnica de *microarrays*, desde la obtención del RNA hasta el procesamiento de los resultados, se decidió hacer las comparaciones transcriptómicas de este mutante enviando las muestras de RNA al servicio de genómica del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid (CNB), donde se realizaron las hibridaciones y el análisis informático. Debido a que en este servicio no se realizaban hibridaciones cDNA-gDNA, como las utilizadas en nuestro laboratorio, el procedimiento experimental llevado a cabo fue distinto respecto al descrito en la comparación wt vs. Δ *abrC1/C2/C3*. Los *microarrays* utilizados fueron los mismos (ver materiales y métodos) pero en este caso se hibridaba en el mismo *array* el cDNA de la cepa problema Δ *abrA1/A2* y el cDNA de la cepa wt, cada uno marcado con un fluoróforo distinto. En las distintas hibridaciones se intercambiaron los fluoróforos Cy3 y Cy5 (*dye-swap*) entre los cDNA de las distintas cepas, para evitar un sesgo en los resultados debido al efecto de mayor marcaje con uno de los fluorocromos. Como resultado de este tipo de hibridaciones cDNA-cDNA se obtuvieron directamente valores Mc, que corresponden al contraste entre las dos cepas analizadas (expresión diferencial entre ambas). En este tipo de contrastes hay que tener en

cuenta que se pierde el dato de la expresión de los genes de forma absoluta, el denominado Mg, lo que conlleva no poder comparar la expresión de genes en una misma cepa a los distintos tiempos o ampliar los contrastes con otros experimentos. Por ello, los resultados que se obtuvieron en este estudio se han clasificado únicamente en genes DE a las 48 horas y genes DE a las 80 horas entre las cepas wt y $\Delta abrA1/A2$. Para el procesamiento de los datos y realización de los contrastes se utilizó igualmente el programa R con la librería LIMMA donde los p-valores individuales también son corregidos por FDR.

2.1. RESULTADOS DE LOS MICROARRAYS

A continuación en la tabla R.8. se muestran los resultados obtenidos cuando se aplicaban las restricciones recomendadas (p-valor FDR<0,05). De nuevo, y como puede apreciarse en tabla, fueron muy pocos los genes que mostraron diferencias de expresión en las condiciones experimentales elegidas y que cumplían los requerimientos estadísticos mencionados. De hecho, tan solo 4 genes mostraban expresión diferencial a las 48 horas de estudio y a las 80 horas no se obtenía ningún gen DE al aplicar el filtro estadístico estricto. Cabe señalar que dos de los genes DE resultantes a las 48 horas eran ORFs codificantes de proteínas de unión a calcio (SCO0141 y SCO2435) con un *fold change* de -5,27 y -6,49, respectivamente, los cuales, además seguían presentando estas diferencias a las 80 horas (*fold change* -7,46 y -6,49), aunque sin rigor estadístico.

Tabla R.8. Genes DE (p-valor FDR<0,05) resultantes del contraste wt vs. $\Delta abrA1/A2$ a 48 horas.

| Contraste $\Delta abrA1/A2$ -wt 48 horas | | | |
|--|---|------|---------------|
| SCO | Función | Mc | p-valor (FDR) |
| 0141 | proteína de unión a calcio (putativa) | -2,4 | 0,00172 |
| 2435 | hipotética proteína (similar a proteína unión a calcio de <i>S. ambofaciens</i>) | -2,7 | 0,025 |
| 0268 | ? | -2,3 | 0,0017 |
| 7449 | proteína de secreción | 1,37 | 0,044 |

Dadas las limitaciones en cuanto al número de genes DE, se decidió volver a utilizar filtros estadísticos más laxos como el p-valor sin corregir y un Mc >0,9 ó Mc <-0,9. Se incluyeron también aquellos genes con un Mc >0,6 que bien se relacionaran funcionalmente o bien estuvieran formando parte del mismo operón entre ellos o con otros candidatos preseleccionados. Los resultados quedaron como se muestran en las tablas R.9. (48 horas) y R.10. (80 horas).

Tabla R.9. Genes DE (p-valor <0,05) resultantes del contraste wt vs. $\Delta abrA1/A2$ a las 48 horas con $Mc > 0,9$ en color rojo, con $0,9 > Mc > 0,6$ en rojo con asterisco y los de $Mc < -0,9$ en verde. En negrita aparecen los genes que salen DE en base al p-valor corregido. Las casillas coloreadas en la misma tonalidad se asocian funcionalmente (forman parte de un mismo operón, comparten promotor o intervienen conjuntamente en algún proceso). Las interrogaciones (?) indican función desconocida.

| Contraste $\Delta abrA1/A2$ -wt 48 horas | | | |
|--|---|-------------|-----------------|
| SCO | Función | Mc | p-valor |
| 0055 | oxidoreductasa asociada a membrana (putativa) | -1 | 0,001 |
| 0141 | proteína de unión a calcio (putativa) | -2,4 | 0,00000 |
| 0168 | proteína reguladora (putativa) | -1,38 | 0,007 |
| 0216 | cadena α de la nitrato reductasa | -1,3 | 0,0009 |
| 0231 | hipotética proteína pequeña hidrofóbica | -1 | 0,00006 |
| 0268 | hipotética proteína pequeña | -2,3 | 0,000006 |
| 2435 | hipotética proteína (similar a proteína unión a calcio de <i>S. ambofaciens</i>) | -2,7 | 0,000012 |
| 2850 | 2-hidroxihepta-2,4-dieno-1,7-dioato isomerasa (putativa) | -1 | 0,008 |
| 0585* | proteína de unión a ATP/GTP (putativa) | 0,75 | 0,009 |
| 0586* | ? | 0,69 | 0,002 |
| 0587* | ? | 0,68 | 0,006 |
| 0588* | HK (putativa) | 0,77 | 0,001 |
| 0934 | proteína integral de membrana (putativa) | 0,95 | 0,0008 |
| 2016* | monooxigenasa (putativa) | 0,8 | 0,02 |
| 2017 | descarboxilasa de aminoácidos (putativa) | 1,05 | 0,004 |
| 2528* | 2-isopropilmalato sintasa | 0,64 | 0,03 |
| 2529* | metaloproteasa (putativa) | 0,68 | 0,0006 |
| 2530* | ? | 0,6 | 0,004 |
| 2716* | ChpA | 0,7 | 0,0005 |
| 2719* | RdlB | 0,6 | 0,001 |
| 3474* | quinasa de azúcares (putativa) | 0,86 | 0,02 |
| 3480* | racemasa (putativa) | 0,75 | 0,02 |
| 3481 | ? | 1 | 0,0016 |
| 3484* | proteína de secreción de unión a azúcares (putativa) | 0,63 | 0,005 |
| 3487* | hidrolasa (putativa) | 0,8 | 0,03 |
| 3966* | ? | 0,65 | 0,03 |
| 3968 | proteína integral de membrana (putativa) | 1 | 0,0004 |
| 4564 | NuoC (subunidad NADH dehidrogenasa) | 0,91 | 0,0007 |
| 4566* | Nuo E (subunidad NADH dehidrogenasa) | 0,72 | 0,002 |
| 4570 | NuoI (subunidad NADH dehidrogenasa) | 1,18 | 0,0003 |
| 4571 | NuoJ (subunidad NADH dehidrogenasa) | 0,93 | 0,00012 |
| 4572* | Nuo K (subunidad NADH dehidrogenasa) | 0,87 | 0,0002 |
| 4573* | Nuo L (subunidad NADH dehidrogenasa) | 0,63 | 0,015 |
| 4645* | aspartato aminotransferasa | 0,65 | 0,011 |
| 4653* | RplL, proteína ribosomal 50S L7/L12 | 0,67 | 0,003 |
| 4659* | RpsL, proteína ribosomal 30S S12 | 0,59 | 0,007 |
| 4660* | RpsG, proteína ribosomal 30S S7 | 0,6 | 0,01 |
| 4661* | FusA, factor de elongación G | 0,61 | 0,003 |
| 4989* | regulador transcripcional familia-IclR (putativa) | 0,63 | 0,02 |
| 4990* | ? | 0,63 | 0,01 |
| 7434 | lipoproteína (putativa) | 1 | 0,00009 |

| SCO | Función | Mc | p-valor |
|-------------|---|-------------|----------------|
| 7449 | proteína de secreción | 1,36 | 0,00001 |
| 7514 | proteína integral de membrana (putativa) | 1,17 | 0,0004 |
| 7515* | ? | 0,67 | 0,0009 |
| 7699* | proteína de unión de nucleótidos (putativa) | 0,76 | 0,008 |
| 7700* | ciclasa (putativa) | 0,89 | 0,002 |
| 7765 | regulador transcripcional | 1,1 | 0,00003 |

Entre los genes subexpresados en la cepa $\Delta abrA1/A2$ alrededor de -5 a -8 veces se encontraban los SCOs 0141 y 2435 que codifican dos proteínas relacionadas con la unión a calcio y los genes SCO0231 y SCO0268 que codifican dos pequeñas proteínas de unos 50 aminoácidos de función desconocida. Hasta la fecha se desconoce si existe alguna relación funcional entre ellas.

Entre los genes sobreexpresados en la cepa $\Delta abrC1/C2/C3$ a las 48 horas destacaban los SCOs 2716 y 2719 que codifican dos proteínas relacionadas con la diferenciación, la chaplina ChpA y la rodlinia RdlB, respectivamente. Sin embargo, a las 80 horas (tabla R.10.) estos mismos genes junto con otros dos codificantes de proteínas con la misma función (SCO2705 y SCO2717) se encontraban subexpresados en el mutante. Estos resultados podrían corroborar la aceleración en diferenciación observada en el mutante, el cual a las 48 horas ya habría empezado a sintetizar micelio aéreo, mientras que el wt tendría el pico de expresión de estos genes estructurales a tiempos más largos (~80 horas).

A las 48 horas también se veían sobreexpresados en la cepa $\Delta abrA1/A2$ otros grupos de genes relacionados con transporte de azúcares (SCOs 3474, 3480, 3481 y 3484) y síntesis de aminoácidos (SCOs 2016, 2017, 2528 y 4645). También aparecían sobreexpresados algunos genes codificantes de proteínas ribosomales: RplL (SCO4653), RpsL (SCO4659), RpsG (SCO4660) y el factor de elongación FusA (SCO4661), así como el operón de la NADH deshidrogenasa, que interviene en procesos metabólicos, entre otros, reducción de quinonas y fosforilación oxidativa (SCOs 4564, 4566, 4570, 4571, 4572 y 4573).

Tabla R.10. Genes DE (p-valor <0,05) resultantes del contraste wt vs. $\Delta abrA1/A2$ a 80 horas con $Mc > 0,9$ en color rojo ó $Mc < -0,9$ en verde. Las casillas marcadas corresponden a genes DE conservados en este segundo tiempo (80 horas) y las casillas coloreadas en una misma tonalidad se asocian funcionalmente. Las interrogaciones (?) indican función desconocida.

| Contraste $\Delta abrA1/A2$ -wt 80 horas | | | |
|--|---|-------|---------|
| SCO | Función | Mc | p-valor |
| 0055 | oxidoreductasa asociada a membrana (putativa) | -1,1 | 0,001 |
| 0072 | proteína de secreción (putativa) | -1 | 0,0007 |
| 0141 | proteína de unión a calcio (putativa) | -2,9 | 0,0006 |
| 0177 | proteína de membrana (putativa) | -2,4 | 0,0009 |
| 0261 | acetiltransferasa (putativa) | -1 | 0,005 |
| 0268 | hipotética proteína pequeña | -2,9 | 0,006 |
| 0931 | proteína de secreción rica en prolina (putativa) | -1 | 0,01 |
| 2435 | hipotética proteína (similar a proteína union a calcio de <i>S. ambofaciens</i>) | -2,7 | 0,00014 |
| 2705 | proteína de membrana ChpF | -1,78 | 0,003 |
| 2716 | ChpA | -1,28 | 0,001 |
| 2717 | pequeña proteína de membrana (putativa) | -0,9 | 0,022 |
| 2719 | proteína de secreción (putativa) RdlB | -1,07 | 0,001 |
| 4002 | proteína de secreción | -1 | 0,0004 |
| 4320 | proteína de membrana (putativa) | -1,3 | 0,003 |
| 5249 | proteína de unión de nucleótidos (putativa) | -1,22 | 0,0003 |
| 6073 | ciclasa (putativa) | -1,23 | 0,001 |
| 0569 | proteína ribosomal 50S L36 (putativa) | 1,3 | 0,002 |
| 1919 | hipotética proteína conservada | 1,35 | 0,002 |
| 2690 | proteína de membrana de transporte (putativa) | 0,96 | 0,008 |
| 3108 | hipotética proteína conservada | 1,05 | 0,0011 |
| 3222 | proteína de secreción (putativa) | 0,96 | 0,04 |
| 5073 | oxidoreductasa (putativa) | 1,05 | 0,005 |
| 5083 | transportador de actinorrodina ActII-2 (putativa) | 1,84 | 0,001 |
| 5084 | proteína membrana ActII-3 (putativa) | 1,38 | 0,005 |
| 5085 | <i>actII-ORF4</i> | 1,18 | 0,006 |
| 5389 | ? | 1 | 0,008 |
| 6277 | epóxido hidrolasa (putativa) | 1 | 0,001 |
| 7383 | ? | 0,92 | 0,01 |
| 7514 | proteína integral membrana (putativa) | 1,45 | 0,002 |
| 7515 | ? | 1 | 0,01 |
| 7765 | regulador transcripcional | 0,9 | 0,001 |

A las 80 horas de crecimiento el número de genes DE era menor. Estos resultados podrían ser consecuencia del menor número de réplicas utilizadas (5 frente a las 6 del primer tiempo). Cabe resaltar que en este tiempo volvían a aparecer subexpresados los genes relacionados con el calcio, SCO0141 y SCO2435, así como el SCO0055 y el SCO0268. Además, entre otros, aparece sobreexpresado a los dos tiempos el SCO7765 y aunque su *fold change* a ambos tiempos está alrededor de 2, es decir duplica su expresión, este cambio podría ser importante por tratarse de un regulador transcripcional. Otro grupo de genes sobreexpresados a las 80 horas eran algunos relacionados con la síntesis de actinorrodina, entre ellos el regulador específico de ruta, *actII-ORF4* (SCO5085).

En resumen, a primera vista el conjunto de genes resultantes de los *microarrays* no aporta resultados reveladores, no obstante, en particular los genes relacionados con calcio (subexpresión del orden de unas 6 veces) así como el regulador SCO7765 (sobrexpresado en torno a 2 veces) se analizarán en un futuro ahondando en su relación con este TCS.

2.4. VALIDACIÓN DE RESULTADOS MEDIANTE RT-PCR SEMICUANTITATIVA

Con objeto de validar los resultados de los *microarrays* se decidió ver si la expresión de algunos genes de interés se veía realmente alterada entre las cepas wt y $\Delta abrA1/A2$. Para ello se escogieron dos muestras de RNA al azar de las que se habían utilizado para los *microarrays* de los dos tiempos, 48 y 80 horas. Se llevaron a cabo RT-PCRs semicuantitativas de los genes: SCO0141, SCO2435 y SCO7765. Además se hicieron RT-PCRs de los genes reguladores *actII-ORF4*, *cdaR*, *redD* y *redZ* con las correspondientes parejas de oligonucleótidos recogidos en las tablas del apéndice 1. Los resultados se visualizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio como se muestra en la figura R.27.

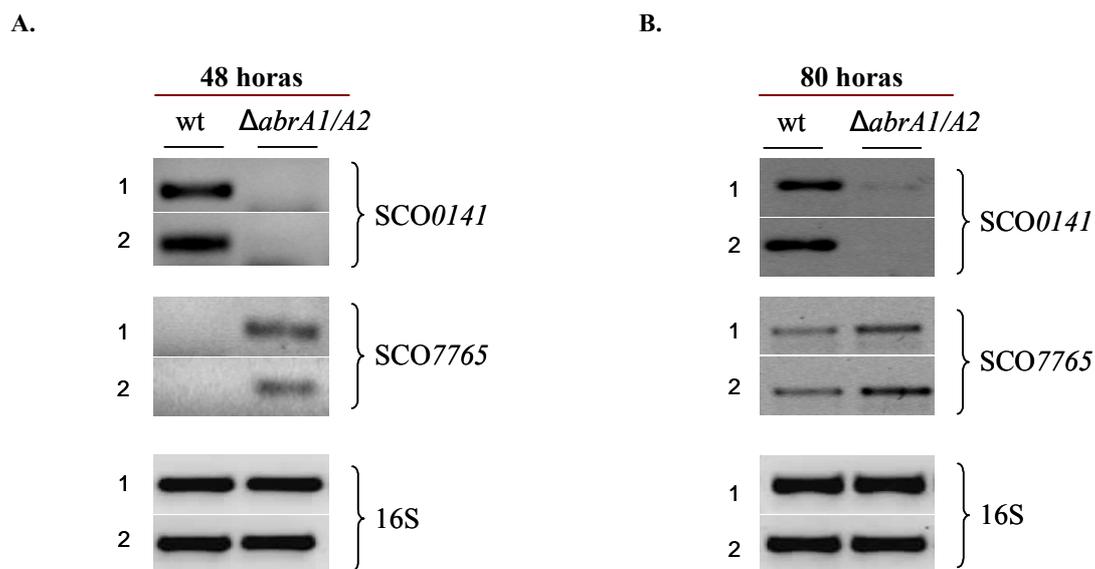


Figura R.27. RT-PCR de los genes SCO0141 (40 ciclos) y SCO7765 (40 ciclos) a las 48 (A) y SCO0141 (40 ciclos) y SCO7765 (32 ciclos) a las 80 horas (B). Como control se amplificó el RNA 16S cuya expresión es constitutiva (32 ciclos). Los números 1 y 2 corresponden a las réplicas biológicas de los RNAs.

Las RT-PCRs para amplificar el SCO2435 y *redD*, llevadas a cabo con varias parejas de oligonucleótidos, no dieron como resultado ninguna banda visible. Por otro lado, las RT-PCRs que amplificaban el *actII-ORF4*, *cdaR* y *redZ* a las 48 horas no aportaron ningún resultado concluyente debido a la no repetitividad entre réplicas. Estas mismas reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo con los RNAs de 80 horas pero no se obtuvieron diferencias de expresión en ninguno de los tres genes reguladores *actII-ORF4*, *cdaR* o *redZ*.

En conclusión, los resultados confirman las pronunciadas diferencias de expresión del gen *SCO0141* entre las dos cepas a los dos tiempos de estudio. También corroboran la sobreexpresión del *SCO7765* principalmente a las 48 horas. El hecho de que los genes reguladores de los distintos *cluster* de antibióticos no presenten diferencias transcripcionales puede deberse a que las posibles diferencias de expresión existentes entre las cepas no sean perceptibles en estos tiempos concretos de estudio.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE LOS SISTEMAS AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3 y BÚSQUEDA DE SUS DIANAS MOLECULARES

II.1

CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE LOS SISTEMAS AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3

En este capítulo se describe la expresión y purificación de las proteínas codificadas por los genes de los sistemas *abrA1/A2* y *abrC1/C2/C3*, junto con las estrategias de fosforilación empleadas para conseguir la activación de los RRs AbrA2 y AbrC3.

1. PURIFICACIÓN DE LOS REGULADORES DE RESPUESTA AbrA2 y AbrC3

Debido a que el estudio de expresión diferencial de genes mediante *microarrays* no aportó información clara sobre las rutas de regulación ejercidas por los sistemas AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3, se decidió abordar el estudio de los TCSs *in vitro*. El objetivo final era la identificación de las dianas moleculares de los RRs mediante diferentes ensayos que se detallarán en los apartados 1 y 2 de la segunda parte de este capítulo. Para poder realizar estas aproximaciones *in vitro* se requerían las proteínas RRs purificadas y activas (fosforiladas).

En principio, con objeto de obtener proteínas funcionales, se procedió a la superproducción de las proteínas reguladoras, AbrA2 y AbrC3, en la cepa silvestre *S. coelicolor* M145. Para ello se utilizaron los vectores pTXabrA2 y pNXabrC3 en los que la expresión de las proteínas quedaba controlada bajo el promotor inducible *xysAp* y además quedaban etiquetadas con una cola de 6 histidinas en su extremo C-t (apartado 3.2. del capítulo I.1. de resultados). Para examinar la producción del regulador AbrA2, la cepa wt.pTXabrA2 y la cepa control (portadora del plásmido vacío) se crecieron en cultivos líquidos de 10 ml en medio mínimo NMMP (donde se sabía que se expresaba de forma natural el RR) y en medio complejo YES (utilizado rutinariamente en el laboratorio para la expresión de proteínas en *Streptomyces* (Díaz, 2008), ambos suplementados con tioestreptona 5 µg/ml y xilosa 1 % para inducir la expresión del RR por el promotor *xysAp*. Se cogieron muestras a diferentes tiempos y se obtuvieron los extractos de las proteínas correspondientes analizándolas posteriormente en geles de poliacrilamida. En medio NMMP se producía una mayor cantidad respecto al YES (figura R.28.A) pero en ambos casos los resultados fueron poco satisfactorios, debido a la escasa cantidad de proteína producida (sólo detectable por western-blot). El seguimiento de la producción de AbrA2 en los cultivos a distintos tiempos y la posterior separación de las fracciones solubles de las insolubles (ver materiales y métodos) permitió comprobar que toda la proteína se quedaba en la fracción insoluble (figura R.28.B). Debido a la escasa producción y al problema de insolubilidad se desestimó la purificación de este regulador a partir de cultivos de *Streptomyces*.

En cuanto a la sobreexpresión del regulador *abrC3* en *S.coelicolor* M145 utilizando el plásmido pNXabrC3, como se ha explicado con detalle en el apartado 3.2.2 de resultados (capítulo I.1.), resultó muy perjudicial para el crecimiento de los microorganismos (figura R.18.) y no fue posible crecer cultivos líquidos de estas cepas.

A.



B.

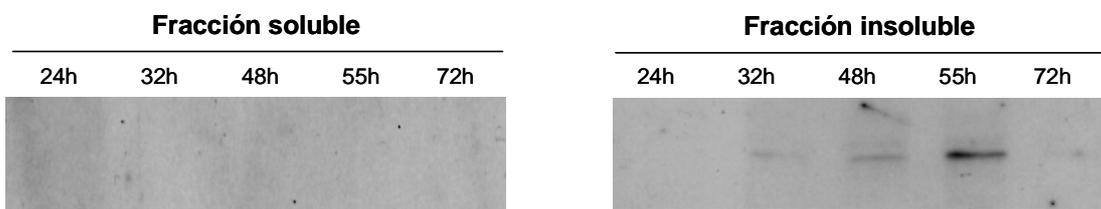


Figura R.28. (A) Detección de la proteína Abr2-His mediante western-blot con anticuerpos anti-His en los medios de cultivo NMMP y YES tras 60 horas de incubación. (B) Solubilidad del RR Abr2-His mediante detección de la proteína por western-blot con anticuerpos anti-His de cultivos líquidos NMMP crecidos a diferentes tiempos. (La cantidad de proteínas cargadas por carril equivalen a 1,3 mg de micelio).

Por los motivos expuestos se decidió obtener los RRs en *E. coli*, aunque ello implicaba la necesidad de una posterior fosforilación de las proteínas purificadas para que se encontrasen en su conformación activa. La construcción de todas las proteínas recombinantes en *E. coli* utilizadas a lo largo de esta tesis doctoral, se ha llevado a cabo utilizando el vector pET22(b) (materiales y métodos). El DNA codificante de los RRs AbrA2 y AbrC3 se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos AY-047/AY-048 y SER-001/SER-002, respectivamente (apéndice 1). Los fragmentos amplificados y digeridos se clonaron en los sitios *NdeI/XhoI* de la región *polilinker* del plásmido pET22(b), quedando ambas proteínas etiquetadas con una cola de 6 histidinas en el extremo C-t. Tras la transformación de *E. coli* BL21 (DE3) con los plásmidos construidos en la cepa *E. coli* DH5 α , pETabrA2 y pETabrC3 (materiales y métodos, tabla M.3), se indujo la expresión de ambas proteínas en cultivos líquidos mediante la adición de IPTG 1 mM. Los cultivos se incubaron aproximadamente durante 4 horas más y luego se procedió a la purificación de las proteínas mediante cromatografía de afinidad de metales, utilizando como matriz agarosa Ni-NTA, tal y como se detalla en materiales y métodos, 7.2.1.

Como puede observarse en la figura R.29. se obtuvo una buena inducción de la producción de ambos reguladores (carril I), sin embargo, el RR AbrA2 (24 kDa) resultó altamente insoluble (figura R.29.A), como había ocurrido en la expresión en *Streptomyces*, encontrándose en una proporción muy pequeña en la fracción soluble (carril FS), por lo que la cantidad de proteína

purificada fue muy escasa. Para conseguir mayor cantidad de proteína soluble y optimizar consecuentemente la purificación, se ensayaron diferentes condiciones de expresión, disminuyendo la cantidad de IPTG añadido (a 0,5 mM) y la T^a de incubación hasta 16° C pero en ningún caso se obtuvo una mejora en el rendimiento. También se probó a expresar la proteína con la etiqueta GST, e incluso sin etiqueta, pero todas sus formas resultaron altamente insolubles. Por último, se intentó purificarla en condiciones desnaturalizantes (con urea 8M en todos los *buffers* de purificación) pero al eliminar la urea progresivamente del *buffer* de diálisis, para la renaturalización de la proteína, ésta volvía a precipitar. Estos resultados negativos no se muestran en la memoria. En el caso del regulador AbrC3 (25,12 kDa), se encontraba mayoritariamente en la fracción soluble tras la lisis celular (Fig. R.29. B- carril FS) por lo que su purificación se llevó a cabo con éxito (Figura R.29.B).

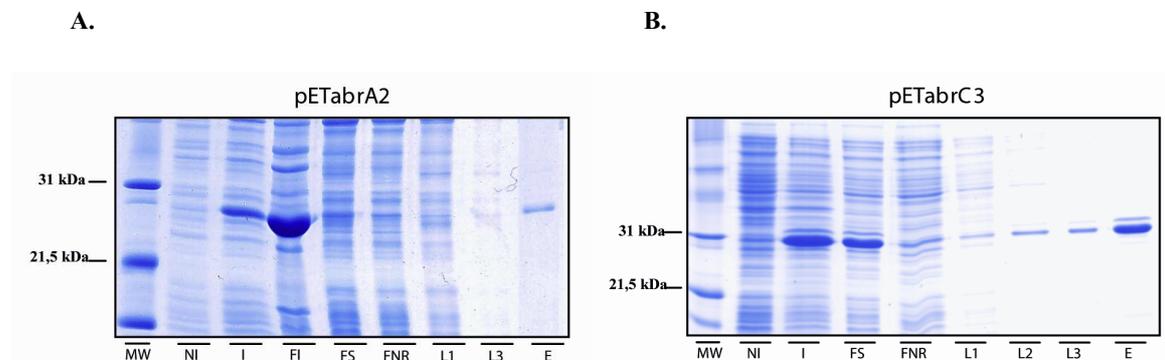


Figura R.29. (A) SDS-PAGE 15 % de las fracciones de purificación de AbrA2 (24 kDa) y AbrC3 (25,12 kDa) (B). MW: marcadores de peso molecular. NI: cultivo no inducido. I: cultivo inducido. FI: fracción insoluble. FS: fracción soluble. FNR: fracción no retenida. L1-L3: lavados 1-3 (20 mM imidazol). E: fracción eluída (1M imidazol). Para la visualización de las proteínas se hizo una tinción con coomassie. En todos los carriles se cargaron cantidades equiparables de proteínas.

Las fracciones eluídas se dializaron y se cuantificó la cantidad de proteína obtenida (ver materiales y métodos, 7.4.) llegando a tener una concentración de 0,05 µg/µl en el caso del RR AbrA2 y 0,94 µg/µl de la proteína AbrC3.

2. FOSFORILACIÓN DE LOS RRs CON FOSFODONADORES DE BAJO PESO MOLECULAR

Los RRs igual que las HKs son proteínas modulares, las cuales tienen dos dominios bien definidos, un dominio receptor donde se sitúa el sitio de fosforilación (REC) y un dominio efector, de unión a DNA (DBD: *D*NA *B*inding *D*omain) en los casos que nos ocupan. Este tipo de proteínas se presentan en dos estados, uno defosforilado e inactivo y otro fosforilado y activo. Se ha descrito que generalmente, el estado fosforilado de éstas les permite cambiar su

conformación, dimerizar y unirse con afinidad a sus regiones diana del DNA al quedar el dominio DBD accesible (representado en la figura R.30.).

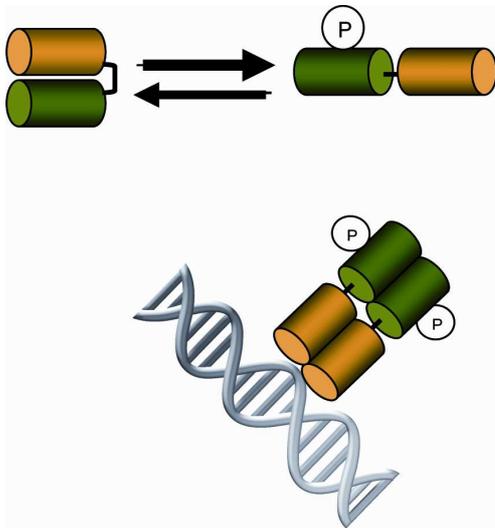


Figura R.30. Representación del cambio conformacional de un RR tras la fosforilación (el símbolo P representa el fosfato). Se muestra como en su conformación abierta y consecuentemente activa puede dimerizar y unirse al DNA. El cilindro verde corresponde al dominio C-t REC y el cilindro amarillo corresponde al dominio de unión a DNA (DBD).

Por este motivo, el principal objetivo perseguido fue lograr que las proteínas RRs se fosforilasen y adquiriesen la conformación adecuada para ser completamente funcionales y así, poder utilizarlas en los experimentos de búsqueda de dianas moleculares. En principio y siguiendo las pautas descritas en otros trabajos de investigación (Lukat *et al.*, 1992; Zapf *et al.*, 1996), se emplearon fosfodonadores de bajo peso molecular y se llevaron a cabo reacciones de fosforilación *in vitro* con los dos RRs AbrA2 y AbrC3 purificados de *E. coli*, según se describe en materiales y métodos (apartado 7.5.1.). En estas reacciones se utilizaron los fosfodonadores acetilfosfato, carbamoylfosfato y fosforamidato, en distintas concentraciones (20, 100 y 150 mM). Como control de fosforilación (figura R.31.A) se utilizó la proteína truncada DrrB_N que fue amablemente proporcionada por la Dra. Anne Marie Stock (New Jersey). Esta proteína corresponde al extremo N-t del RR DrrB, un regulador de respuesta del microorganismo *Thermotoga maritima* (Robinson, 2003). Cada reacción se incubó a una temperatura de 37° C durante 30 minutos, tras la cual se llevó a cabo una electroforesis SDS-PAGE a 4° C para evitar la disociación del fosfato. Finalmente, para visualizar los resultados se realizó una tinción específica de proteínas fosforiladas (Phos-tag, Perkin Elmer), en las que las bandas fosforiladas se observan por la emisión de fluorescencia bajo la luz UV. Posteriormente se realizó una tinción con coomassie para monitorizar la cantidad de proteína presente en los geles. En la figura R.31. se muestran los resultados de las reacciones de fosforilación con los fosfodonadores a una concentración 20 mM, ya que son idénticos a los obtenidos con mayores concentraciones de sustrato.

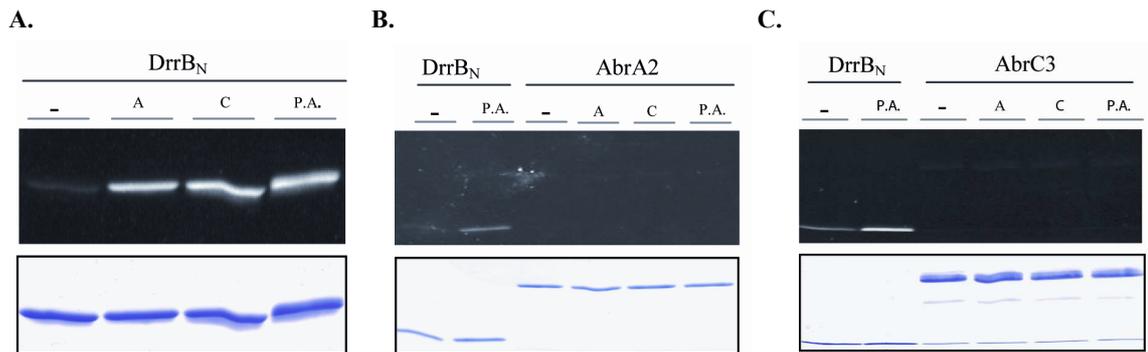


Figura R.31. Resultados de la reacción de fosforilación de los RRs DrrB_N (A), AbrA2 (B) y AbrC3 (C). Los fosfodonadores acetilfosfato, carbamoilfosfato y fosforamidato están representados por “A”, “C” y “P.A.” respectivamente, y su ausencia se indica con el signo “-“. Las imágenes superiores son resultado de la tinción Phos-tag y las inferiores de la tinción con coomassie.

Los resultados mostraron que la proteína control DrrB_N se fosforilaba sin problema con cualquiera de los fosfodonadores utilizados (apreciado por la señal fluorescente de la banda de proteína). Sin embargo, ninguno de los RRs problema, AbrC3 y AbrA2, emitía fluorescencia alguna tras el tratamiento (figura R.31. B y C). Esto podía deberse a tres motivos, (1) que los fosfodonadores utilizados no fueran capaces de donar el fosfato a los RRs (2) que el dominio receptor del fosfato de los RRs no se encontrara asequible y la fosforilación se inhibiese por una interacción conformacional con sus dominios efectores o (3) que la vida media de los RRs fosforilados fuese demasiado corta para apreciarla en este tipo de ensayos.

Para intentar discernir cuál era el motivo del resultado obtenido, se construyeron unas formas truncadas de los RRs que únicamente constaban del dominio N-t de las proteínas (similar a la proteína DrrB_N utilizada como control en los ensayos), ya que se ha comprobado en varios trabajos que el dominio receptor aislado de los RRs, es capaz de fosforilarse con mayor eficiencia que la proteína entera al no estar sometido a ningún tipo de inhibición por interacción de dominios (Robinson *et al.*, 2003). Las proteínas truncadas de ambos RRs, carentes del dominio efector C-t se denominaron: AbrA2_N: 141 aas (15,2 kDa) y AbrC3_N: 137 aas (15,5 kDa) (figura R.32.). El DNA codificante del extremo N-t de las proteínas se amplificó por PCR con los oligonucleótidos AY-047 e AY-102 (apéndice 1), para AbrA2_N y con los oligonucleótidos SER-001 y AY-089 (apéndice 1), para AbrC3_N. Posteriormente se introdujeron los fragmentos amplificados y digeridos, en los sitios *NdeI/XhoI* del vector pET22b, quedando también etiquetadas con cola de histidinas en el extremo C-t. Ambos RRs se expresaron en la cepa *E. coli* BL21(DE3) y se purificaron mediante agarosa Ni-NTA, de la misma forma en que se hizo con los RRs completos. El resultado de la purificación se muestra en la figura R.33. Las fracciones eluidas se dializaron y se cuantificaron las cantidades de proteínas obtenidas llegando a tener una concentración de 1 µg/µl en el caso del RR AbrA2_N y 0,8 µg/µl de la proteína AbrC3_N.

Resultados



Figura R.32. Alineamiento clustalX2 de los RRs AbrA2 y AbrC3. El dominio REC (dominio receptor) se recuadra en verde. Los asteriscos indican identidad y los puntos similitud entre aminoácidos. Las flechas rojas corresponden al último aminoácido que forma parte de las formas truncadas N-t.

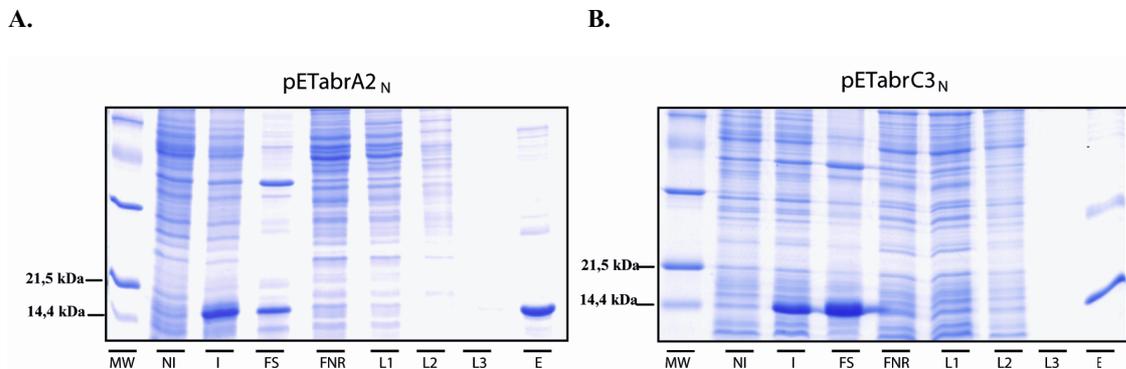


Figura R.33. SDS-PAGE 18 % de las fracciones de la purificación de AbrA2_N (15,2 KDa) (A) y de AbrC3_N (15,5 KDa) (B). MW: marcadores de peso molecular. NI: cultivo no inducido. I: cultivo inducido. FS: fracción soluble. FNR: fracción no retenida. L1-L3: lavados 1-3 (20 mM imidazol). E: fracción eluida (1M imidazol). Para la visualización de las proteínas se hizo una tinción con coomassie.

Como puede observarse en la figura R.33. las dos proteínas AbrA2_N y AbrC3_N se encontraban mayoritariamente en la fracción soluble, lo que permitió su purificación en cantidades suficientes para el ensayo de fosforilación *in vitro*. Una vez se dispuso de las proteínas purificadas amino-terminales truncadas, se repitieron los ensayos de fosforilación con los fosfodonadores. En los resultados obtenidos, visibles en la figura R.34. no se apreció indicio alguno de fosforilación en ninguna de las proteínas, AbrA2_N o AbrC3_N en ninguna de las condiciones ensayadas. Por lo tanto, se descartó que la ausencia de fosforilación observada en los primeros ensayos se debiese a una inhibición por interacción de dominios, lo que probablemente signifique que estos RRs no son capaces de fosforilarse con acetilfosfato, carbamoilfosfato o fosforamidoato. Otras posibilidades son que la fosforilación ocurra con una eficiencia muy baja o que la vida media de la fosforilación de ambos RRs sea muy corta y no puedan verse como moléculas fosforiladas con la tinción Phos-tag. En cualquier caso, el resultado se tradujo en una ausencia de proteína fosforilada.

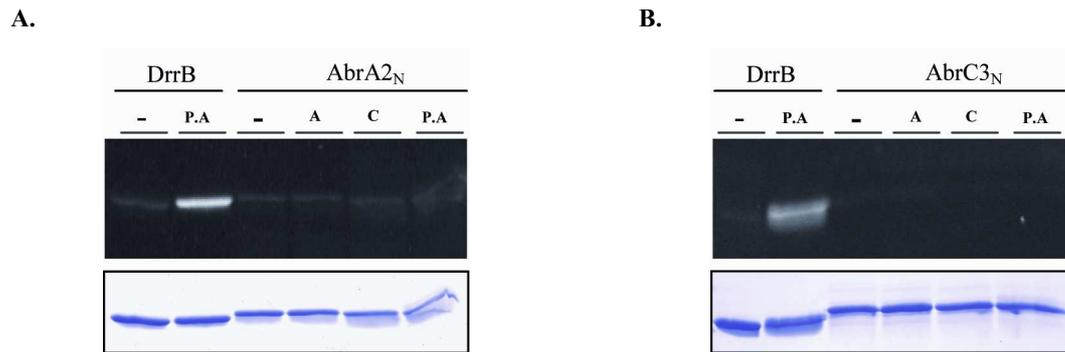


Figura R.34. Resultados de la reacción de fosforilación con de los RRs AbrA2_N (A) y AbrC3_N (B). Los fosfodoadores acetilfosfato, carbamoilfosfato y fosforamidato están representados por “A”, “C” y “P.A.” respectivamente, su ausencia se indica con el signo “-“. Las imágenes superiores son resultado de la tinción Phos-tag y las inferiores de la tinción con coomassie.

Como el objetivo de obtener RRs fosforilados para posteriores experimentos no había dado resultado mediante esta estrategia, se decidió llevarlo a cabo mediante otra alternativa: la transferencia del fosfato a los RRs desde sus HKs específicas.

3. FOSFORILACIÓN DE LOS RRs POR TRANSFERENCIA DEL FOSFATO DESDE SUS HKs ASOCIADAS

Se ha comprobado que la forma más eficiente de fosforilar el RR de un TCS es mediante la transferencia del fosfato desde su HK específica (siendo la constante cinética 100-10.000 superior a la de fosforilación con acetilfosfato (Groban, 2009)). Por este motivo, se procedió a conseguir RRs funcionales mediante la transferencia del fosfato desde sus HKs específicas fosforiladas. Este tipo de ensayo permitía a su vez, la caracterización *in vitro* del funcionamiento de fosforilación-defosforilación de los sistemas de dos componentes AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3.

3.1. PURIFICACIÓN DE LAS HKs AbrA1, AbrC1 y AbrC2

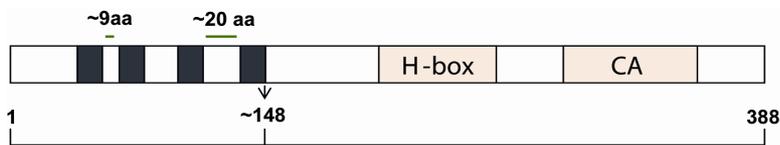
Las HKs son en su mayoría proteínas de membrana y como tales, su producción y purificación es una tarea complicada. Estas proteínas resultan ser insolubles con frecuencia, debido a la presencia de dominios transmembrana altamente hidrofóbicos. Por ello, para expresarlas y purificarlas con éxito, en numerosas ocasiones se eliminan las zonas que constan de los residuos hidrofóbicos y se expresa únicamente la parte citoplásmica de la proteína. Esta parte comprende la “H-box” con la histidina fosforilable y el sitio de unión a ATP por lo que estas formas citoplásmicas son perfectamente funcionales para ser fosforiladas en ensayos *in vitro* como ya se ha demostrado experimentalmente en otros trabajos (Skerker, 2008).

Inicialmente se comenzó a trabajar con las formas enteras de las tres HKs, pero resultaron mayoritariamente insolubles y no pudieron ser purificadas (datos no mostrados). Por este motivo, se generaron las formas citoplásmicas de cada una de las histidín quinatas. El análisis *in silico*

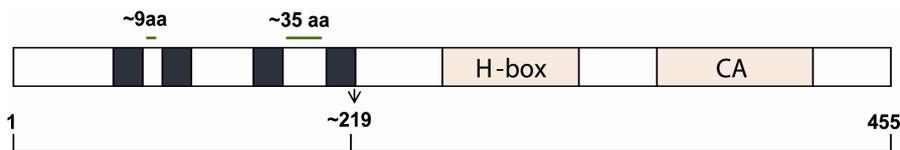
de las proteínas utilizando los programas SOSUI, Phobius y HMMTOP identificó 4 dominios transmembrana en las HKs AbrA1 y AbrC2, (figura R.35.). Respecto a la HK AbrC1 la predicción de los distintos programas presentaba más discrepancia variando los dominios transmembrana propuestos entre 2 y 4 (Figura R.35.). En base a la localización de la última región transmembrana en cada una de las proteínas y la localización de la “H-box” se generaron las siguientes variantes:

- c AbrA1 (25,6 kDa).- desde el aa 153 hasta el último aa (388).
- c AbrC2 (24,9 kDa).- desde el aa 227 hasta el último aa (455).
- c AbrC1 (25,9 kDa).- desde el aa 180 hasta el último aa (407).

A. HK AbrA1



B. HK AbrC2



C. HK AbrC1

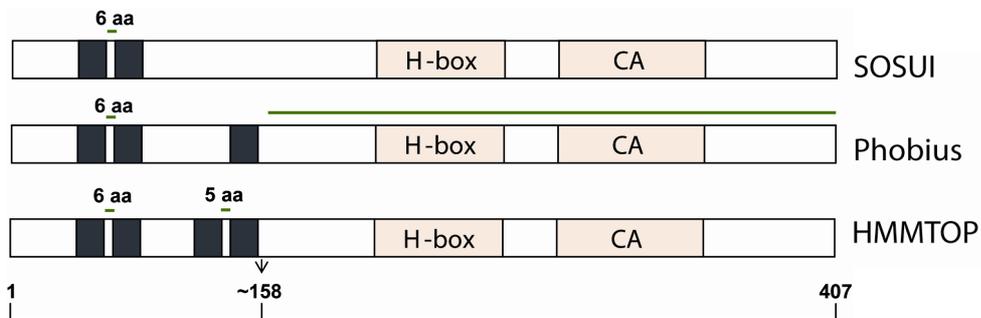


Figura R.35. Representación de las HKs AbrA1 (A), AbrC2 (B) y de los diferentes bocetos de AbrC1 (C) según consenso entre los programas de predicción de dominios transmembrana SOSUI, Phobius y HMMTOP. Los rectángulos negros representan los dominios transmembrana, las líneas negras la longitud de la proteína en aminoácidos y las líneas verdes son la parte extracelular de las proteínas. El segmento H-box y el dominio catalítico (CA) de las proteínas también se representan.

Las secuencias nucleotídicas que codifican las tres proteínas truncadas c AbrA1, c AbrC1 y c AbrC2 se clonaron en los sitios *NdeI/XhoI* del pET22b utilizando los oligonucleótidos AY-099/AY-101, AY-097/AY-098 y AY-095/AY-096, respectivamente (apéndice 1). Las proteínas truncadas quedaron etiquetadas con colas de histidinas en el extremo C-t y fueron expresadas en *E. coli* BL21 (DE3) por el procedimiento detallado previamente. Tras llevar a cabo la inducción

de todas ellas en las condiciones habituales se comprobó que la HK $cAbrA1$ apenas se producía, por lo que no resultó posible su purificación (datos no mostrados). Respecto a las HKs del sistema $AbrC$, los niveles de expresión no fueron elevados pero en ambos casos se logró purificar cantidad suficiente de proteína de cara a los experimentos a realizar (figura R.36.). En la purificación de la HK $cAbrC2$ (24,9 kDa) se observó que la proteína sufría procesamiento, dando como resultado al menos dos proteínas de menor peso molecular, reconocidas por el anticuerpo anti-His (figura R.36.C).

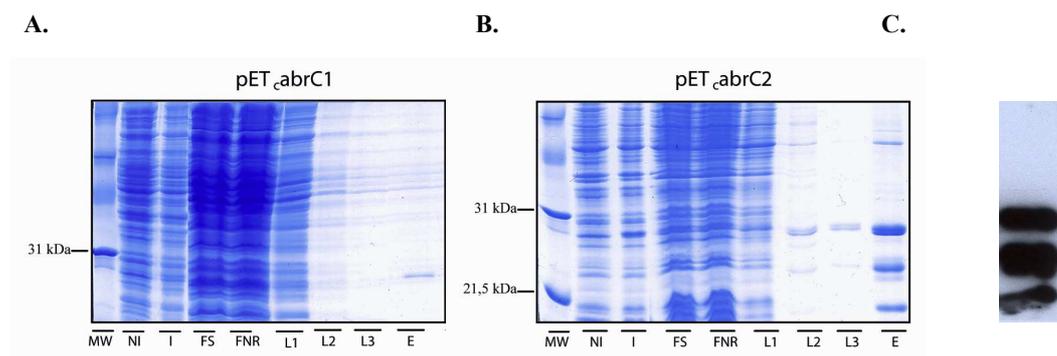


Figura R.36. SDS-PAGE 15 % con fracciones de la purificación de $cAbrC1$ (25,9 kDa) (A) y $cAbrC2$ (24,9 kDa) (B). MW: marcadores de peso molecular. NI: cultivo no inducido. I: cultivo inducido. FS: fracción soluble. FNR: fracción no retenida. L1-L3: lavados 1-3. E: fracción eluída (1M imidazol). Las proteínas de ambos geles, A y B, se visualizaron por tinción con coomassie. (C) western-blot de la fracción eluída de la HK $cAbrC2$ con anticuerpo anti-histidinas.

Las fracciones eluídas se dializaron y se cuantificó la cantidad de proteína obtenida llegando a tener una concentración de 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en el caso de $cAbrC1$ y 0,92 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de $cAbrC2$.

3.2. AUTOFOSFORILACIÓN DE LAS HKs CON (γ - ^{32}P) ATP

El primer paso en la transducción de la señal mediada por un TCS implica la autofosforilación de la HK sensora a partir de ATP. Por ello, para comprobar que las proteínas purificadas eran funcionales, se llevaron a cabo las reacciones de autofosforilación de las HKs del sistema $AbrC$ tras la incubación con fosfato radiactivo, (γ - ^{32}P) ATP, tal y como se detalla en materiales y métodos 7.5.2. Estas muestras se resolvieron en geles de acrilamida y se analizó la presencia de bandas de radiactividad que correspondieran con el tamaño esperado para cada proteína. Mediante los resultados visibles en la autorradiografía, figura R.37., se comprobó que las formas citoplasmáticas de las HKs conservaban la capacidad de autofosforilación. También se observó como aumentando el tiempo de incubación con el (γ - ^{32}P) ATP, de 20 a 40 minutos, se incrementaba ligeramente la señal indicando una mayor fosforilación de las mismas.

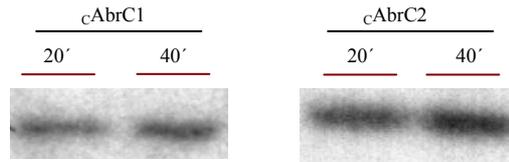


Figura R.37. Fosforilación de la variante citoplásmica de las HKs, *cAbrC1* y *cAbrC2*, a los 20 y a los 40 minutos de incubación con (γ - 32 P) ATP a 30° C.

3.3. MUTACIÓN PUNTUAL DE LOS RESIDUOS HISTIDINA FOSFORILABLES DE LAS HKs

Para corroborar que la autofosforilación observada en los experimentos anteriores era específica del residuo histidina, teóricamente aceptor del fosfato, se obtuvieron variantes proteicas en las cuales la histidina mencionada era reemplazada por un residuo alanina no fosforilable. Estas proteínas se generaron mediante una mutagénesis dirigida *in vitro* de los dos genes que codificaban las HKs *cAbrC1* y *cAbrC2*.

Para determinar cuál era el posible residuo histidina fosfoaceptor se recurrió a la base de datos de dominios conservados CDD (Conserved Domain Database del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml), donde se localizó el dominio de fosforilación y en él la “H-box”. Además se hizo un alineamiento con el mismo dominio de la HK AbsA1, de la que se conoce experimentalmente el residuo histidina que se fosforila (Sheeler *et al.*, 2005). Este alineamiento se representa en la figura R.38. en el cual además de localizar la histidina de interés, se aprecia la identidad absoluta de la “H-box” entre las dos HKs del sistema AbrC. Las posiciones del residuo histidina referidas a la longitud en aminoácidos de las proteínas completas son H214 en la AbrC1, H270 en el caso de la AbrC2 y H202 en AbsA1.

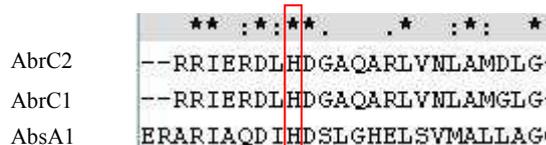


Figura R.38. Alineamiento de la “H-box” de las HKs AbrC2, AbrC1 y AbsA1 mediante clustalX.2. La histidina fosforilable se enmarca en rojo. Los asteriscos indican identidad y los puntos similitud entre aminoácidos.

Para la construcción de las HKs mutadas, se reemplazó la histidina de interés por una alanina introduciendo mutaciones puntuales que cambiaban los nucleótidos “CA” del triplete CAC por “GC” dando como resultado el nuevo triplete GCC. Para dichas mutaciones se utilizaron los oligonucleótidos SRG-05/SRG-06 (apéndice 1) y la *Pfu* Turbo Taq polimerasa (Roche) (ver materiales y métodos 4.6.). Las proteínas resultantes, denominadas *cAbrC1_H* y *cAbrC2_H*, se expresaron y purificaron de manera idéntica a las HKs truncadas originales

(resultados no mostrados) y una vez se dispuso de ellas se llevaron a cabo de nuevo las reacciones de fosforilación. Como se presenta en la figura R.39. se comprobó que la fosforilación de las HKs $cAbrC1$ y $cAbrC2$ ocurría de forma específica en los mencionados residuos histidina no apareciendo dicha fosforilación cuando estos residuos estaban ausentes. En el caso de $cAbrC2_H$, se aprecia una banda tenue que probablemente se deba a una débil fosforilación inespecífica. Quedaba por tanto demostrado que las histidinas fosforilables en las quinasas del sistema $AbrC1/C2/C3$ correspondían a la H214 de $AbrC1$ y a la H270 de $AbrC2$.

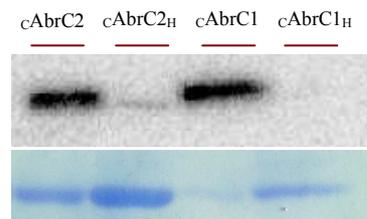


Figura R.39. Autofosforilación de las formas citoplasmáticas de las HKs $AbrC2$, $AbrC1$ y de las HKs mutadas en la histidina $cAbrC2_H$ y $cAbrC1_H$ tras una incubación de 40 minutos con $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})$ ATP a 30°C . En la parte de arriba se muestra la autorradiografía del gel y en la de abajo el mismo gel teñido con coomassie.

3.4. REACCIÓN DE FOSFOTRANSFERENCIA HK ($AbrC1$ o $AbrC2$)-RR ($AbrC3$)

Con el fin de estudiar si las HKs fosforiladas, $cAbrC1$ y $cAbrC2$, eran capaces de transferir el fosfato adquirido en la fosforilación *in vitro* hasta su RR específico, $AbrC3$, se repitieron los ensayos de autofosforilación de idéntica manera a los descritos en el apartado 3.2. de este capítulo I.1. seguidos de una incubación con el RR $AbrC3$. Primero las dos proteínas HKs se fosforilaron durante 40 minutos con el $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})$ ATP, a continuación cada HK fosforilada se incubó con el RR $AbrC3$ para evaluar la fosfotransferencia en las condiciones detalladas en materiales y métodos, parando la reacción bien a los 5 minutos o bien a los 30 minutos mediante la adición de *buffer* SDS-PAGE sin DTT. Como control de la estabilidad de la fosforilación de las HKs a lo largo de la incubación con el RR, una muestra de cada HK fosforilada se incubó durante el tiempo máximo de estudio, 30 minutos, en las mismas condiciones en las que se realizaba la fosfotransferencia sin la adición del RR (figura R.40. carriles $cAbrC2$ y $cAbrC1$). Además, en el estudio se añadió un control en el cual el RR $AbrC3$ se incubaba con $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})$ ATP para eliminar la posibilidad de que existiera una autofosforilación inespecífica (figura R.40. carril $AbrC3$). Finalmente las distintas muestras se analizaron en geles de acrilamida determinándose la presencia de fosfato radiactivo en cada una de las carreras mediante phosphorimager y/o autorradiografía. Geles equivalentes en cantidad de proteínas fueron teñidos con coomassie para poder normalizar los datos respecto a la cantidad de proteína.

Los geles SDS-PAGE autorradiografiados (figura R.40.A) mostraron la existencia de fosfotransferencia desde la HK AbrC2 al RR AbrC3, aunque resultó ser poco eficiente. Se observó la aparición de una banda tenue correspondiente al peso molecular del RR AbrC3 que aparecía a los 5 minutos de incubación cAbrC2-AbrC3 (flecha roja del la figura R.40.A). Incubaciones a tiempos más largos originaban la pérdida de intensidad de la banda correspondiente al RR fosforilado pero también disminuía la correspondiente a la HK fosforilada, lo que implicaba que se estaban perdiendo grupos fosfato a lo largo de la incubación. Distintos grupos han descrito previamente que la fosfotransferencia entre una HK y su RR asociado a veces puede observarse únicamente por la disminución de la banda de fosforilación de la HK debido a la inestabilidad del RR fosforilado (Casino *et al.*, 2007) y en muchos casos consecuencia de una acción fosfatasa de la propia HK predominante sobre la acción fosfotransferasa. Por otro lado, los resultados de transferencia desde la HK cAbrC1 al RR AbrC3 no resultaron concluyentes. Tras la incubación cAbrC1-AbrC3 se apreciaba una considerable disminución en la señal de fosforilación de la HK AbrC1 a lo largo del tiempo lo que podría estar indicando la existencia de fosfotransferencia entre ambas proteínas. Sin embargo, no se llegó a apreciar ninguna banda que correspondiese al RR AbrC3 fosforilado, la cual en sí sería difícil de distinguir debido al tamaño tan similar de ambas proteínas.

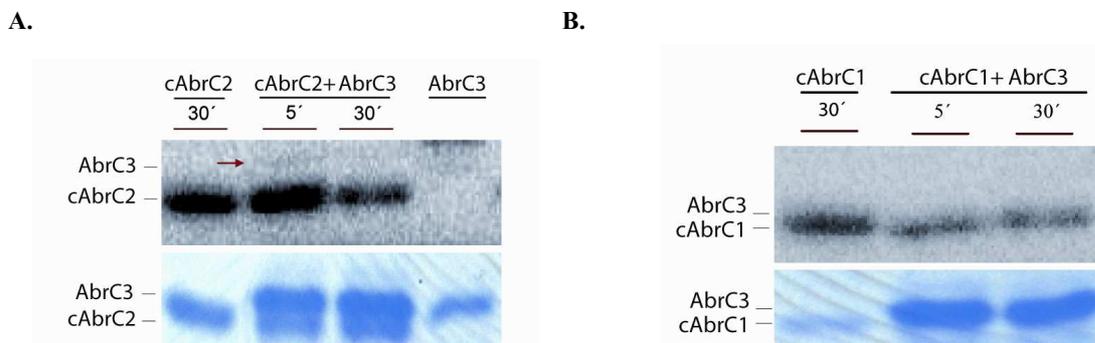


Figura R.40. Reacciones de transferencia de fosfato de las HKs $cAbrC2$ (A) y $cAbrC1$ (B) al RR AbrC3. Las HKs se incubaron 40 minutos con $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})$ ATP a 30°C y posteriormente se dividieron en alícuotas añadiéndose a dos de ellas el RR AbrC3 e incubando otra de ellas sólo con buffer de diálisis. Se continuó la incubación a 30°C parando las reacciones a los 5 y a los 30 minutos. En la parte de arriba se muestra la autorradiografía del gel y en la de abajo un gel equivalente teñido con coomassie. El carril AbrC3 corresponde al control de autofosforilación de AbrC3 con $(\gamma\text{-}^{32}\text{P})$ ATP.

Los resultados, en cualquier caso, no mostraron unos niveles de fosforilación adecuados para realizar posteriores experimentos con el RR activo, ya que la señal de fosforilación del RR AbrC3 era muy tenue en el caso de la transferencia desde la $cAbrC2$ y nula en el caso de la $cAbrC1$.

3.5. REACCIÓN DE FOSFOTRANSFERENCIA DE LA HK AbrC2 AL REGULADOR HUÉRFANO SCO2281

Tras demostrar que existía transferencia de fosfato desde la HK AbrC2 a su RR específico AbrC3, se decidió comprobar si también existía fosfotransferencia desde la misma HK hacia el RR huérfano SCO2281. Esta idea surgió tras leer el trabajo publicado por Wang y colaboradores (Wang *et al.*, 2009b), donde se estudiaban las posibles quinasas implicadas en la fosforilación de RRs huérfanos. En concreto, en dicho trabajo demostraban por experimentos similares a los descritos en los apartados anteriores, que la quinasa SCO0203, de otro sistema de dos componentes que estaban estudiando (SCOs 0203/04) era capaz de fosforilar específicamente a uno de los RRs huérfanos (SCO3818). Además, en este trabajo observaron que uno de los RRs huérfanos de *S. coelicolor* (SCO2281) compartía un elevado porcentaje de identidad (59 %) con el SCO4596 que corresponde a la proteína que se está estudiando, AbrC3. Esto planteaba la hipótesis de si alguna de las dos quinasas del sistema AbrC sería la responsable de la fosforilación de este regulador huérfano. Para comprobar esta hipótesis, al igual que en los casos anteriores, se clonó el DNA codificante del RR 2281 con los oligonucleótidos SRG-03 y SRG-04 (apéndice 1) en los sitios *NdeI/XhoI* del pET22b, se expresó la proteína etiquetada con cola de histidinas en su extremo C-t y se purificó con Ni-NTA (datos no mostrados). La reacción de fosfotransferencia fue idéntica a la llevada a cabo entre la HK c AbrC2 y el AbrC3 descrita anteriormente. Primero se fosforiló la HK c AbrC2 durante 40 minutos a 30° C con (γ - 32 P) ATP y luego se añadió el RR 2281 y se continuó la incubación. Se puso el control correspondiente a la HK fosforilada sin RR, tratada en las mismas condiciones. Las reacciones se pararon a los 5 y 30 minutos y tras su resolución en gel de poliacrilamida el resultado se visualizó mediante autorradiografía (figura R.41.).

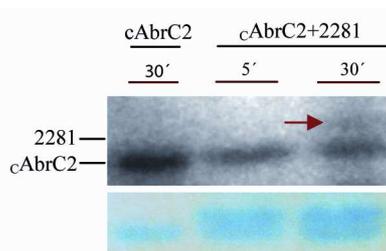


Figura R.41. Reacción de transferencia de fosfato de la HK c AbrC2 al RR huérfano SCO2281. La HK se incubó 40 minutos con (γ - 32 P) ATP a 30° C, posteriormente se dividió en alícuotas añadiéndose a dos de ellas el RR SCO2281 e incubando otra de ellas sólo con *buffer* de diálisis (carril c AbrC2). La incubación a 30° C se continuó, parando las reacciones a los 5 y a los 30 minutos. En la parte de arriba se muestra la autorradiografía del gel y en la de abajo el mismo gel teñido con coomassie.

En este caso a los 30 minutos de incubación HK c AbrC2-RR2281, se pudo apreciar una banda radiactiva correspondiente al RR fosforilado, acompañada además de una bajada en la fosforilación de la propia HK. Estos resultados indicaban que existe una transfosforilación

cruzada *in vitro* entre la ϵ AbrC2 del sistema *abrC1/C2/C3* y el RR huérfano SCO2281, lo cual amplía las posibles rutas de regulación controladas por este sistema AbrC.

La misma reacción de fosfotransferencia se llevó a cabo con la HK ϵ AbrC1 pero no se obtuvieron resultados satisfactorios, debido entre otras cosas, a que ambas proteínas comigraban en el gel. No obstante, estos ensayos se repetirán con una nueva proteína recombinante (con otra etiqueta) AbrC1 que permita diferenciar con claridad ambas proteínas HK y RR.

4. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS FORMAS TRUNCADAS C-t DE LOS RRs AbrA2 y AbrC3 (RRs-DBD)

Debido a que los RRs en estudio no se fosforilaron con los fosfodonadores y debido también a la escasa fosforilación del RR AbrC3 con la HK AbrC2 no se disponía de los RRs en su forma activa para la realización de los ensayos de búsqueda de sus DNA dianas. Se decidió por tanto solventar el problema de la funcionalidad mediante la construcción de unas formas truncadas de los reguladores, correspondientes exclusivamente al dominio de unión a DNA y denominadas a partir de ahora **DBD**. Estos RRs truncados, según trabajos previos, conservaban su capacidad de unión a las regiones específicas de los promotores a los que regulan sin necesidad de fosforilación previa (de hecho carecen del dominio receptor del fosfato). No obstante, en ocasiones la unión al DNA por parte de estas proteínas ocurre con menor afinidad, debido a que carecen de los sitios de dimerización. Se ha descrito que en determinados RRs su extremo N-t es imprescindible para su actividad *in vivo*, puesto que es la región de unión a la RNA-polimerasa (Lacal *et al.*, 2008).

Para determinar la localización de los dominios DBD en la estructura primaria de los RRs completos se consultó la base de datos de dominios conservados CDD del NCBI. Además se hizo un alineamiento con el RR NarL de *E. coli* (figura R.42.), que es la proteína modelo de la familia a la que pertenecen los reguladores AbrA2 y AbrC3, de la cual se había construido previamente una versión truncada NarL^{DBD} y se había comprobado su funcionalidad *in vitro* (Maris, 2002). Los fragmentos de DNA 3' de los ORFs que codificaban los aas del 119 al 221 de la proteína AbrA2 y a los aas del 132 al 223 de la proteína AbrC3, fueron amplificados por PCR con los oligonucleótidos AY-047b/AY-048 y AY-090/SER-002, respectivamente (apéndice 1) y se clonaron en los sitios *NdeI/XhoI* del vector pET22b quedando etiquetados con la cola de histidinas en C-t. De forma análoga a las proteínas enteras originales, las nuevas proteínas generadas AbrA2^{DBD} de 9,6 kDa y AbrC3^{DBD} de 10,8 kDa, se expresaron en *E. coli* BL21 (DE3) y se purificaron utilizando agarosa Ni-NTA. A pesar de que no parecía haber una gran inducción de las proteínas en estos ensayos, ambas proteínas eran solubles y las fracciones eluidas en la purificación resultaron altamente enriquecidas AbrA2^{DBD} y AbrC3^{DBD} (Figura

R.43.). Las fracciones eluidas se dializaron y se cuantificó la cantidad de proteína obtenida llegando a tener una concentración de 0,82 µg/µl en el caso del RR AbrA2^{DBD} y 0,92 µg/µl de la proteína AbrC3^{DBD}.



Figura R.42. Alineamiento clustalX2 de los RRs AbrA2, AbrC3 y NarL de *E. coli*. Los dominios característicos de estas proteínas, REC (dominio receptor) y LuxR (dominio de unión a DNA) se recuadran en verde y rojo, respectivamente. Los asteriscos indican identidad y los puntos similitud entre aminoácidos. La flecha en naranja constituye el nuevo extremo N-t de las proteínas truncadas NarL^{DBD} y AbrA2^{DBD}. La flecha en rojo es el nuevo extremo N-t de la proteína AbrC3^{DBD}.

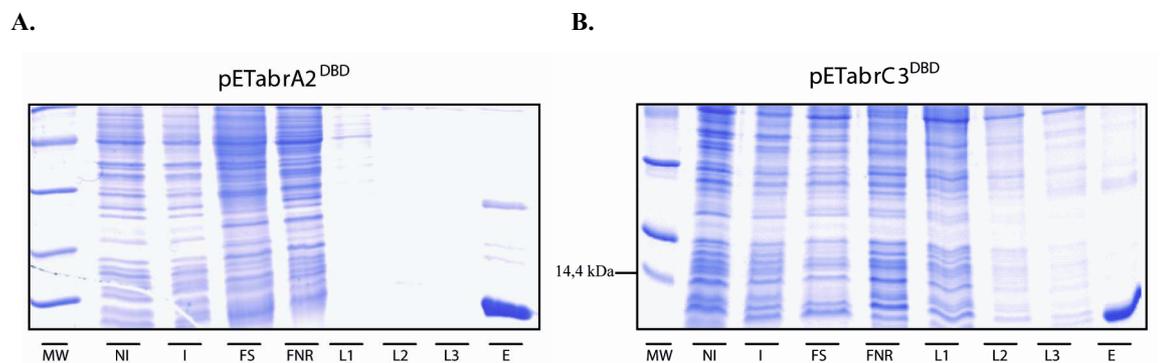


Figura R.43. SDS-PAGE 18 % de las fracciones de la purificación de AbrA2^{DBD} (9,6 kDa) (A) y de AbrC3^{DBD} (10,8 kDa) (B). MW: marcadores de peso molecular. NI: cultivo no inducido. I: cultivo inducido. FS: fracción soluble. FNR: fracción no retenida. L1-L3: lavados 1-3 (imidazol 20mM). E: fracción eluida (1M imidazol). Para la visualización de las proteínas se hizo una tinción con coomassie.

Estas proteínas DBD, AbrA2^{DBD} y AbrC3^{DBD}, que en teoría mantienen siempre su capacidad de unirse al DNA, se utilizaron en los experimentos dirigidos hacia la búsqueda de dianas moleculares de los RRs, los cuales se reflejan en los siguientes apartados.

II.2

BÚSQUEDA DE LAS DIANAS MOLECULARES DE LOS RRs AbrA2 y AbrC3

Los principales métodos empleados para abordar este objetivo fueron: (1) el SELEX y (2) la captura *in vitro* de promotores diana de los reguladores de respuesta. La comprobación de los resultados obtenidos en los citados experimentos se hicieron mediante ensayos de retardo en gel (EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay).

1. SELEX

Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Kenneth McDowall en la Universidad de Leeds (UK) y en concreto se realizaron con el regulador AbrA2.

El nombre de esta técnica viene del inglés: *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*. Este método consiste en seleccionar moléculas de DNA, denominadas aptámeros, que se unen específicamente a una molécula diana, en este caso a reguladores transcripcionales. Para ello, la proteína debe marcarse con una etiqueta que permita tanto su purificación como su posterior inmovilización. En los casos que se presentan a continuación se utilizaron colas de 6 histidinas como etiqueta. Una vez inmovilizada la proteína de interés en bolas magnéticas con afinidad por las colas de histidinas (ver materiales y métodos), se incubaba con una librería de DNA compuesta por una población de 10^{15} - 10^{16} oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos constan de una región central sintetizada al azar de un tamaño de 30 nucleótidos, flanqueada por extremos de secuencia conocida que permiten su posterior amplificación por PCR. En teoría esta población de moléculas de DNA es lo suficientemente extensa como para que queden representadas todas las combinaciones posibles en el espacio de 30 nucleótidos, de forma que es representativa de la población de posibles secuencias de unión de una determinada proteína. Cada incubación va seguida de una serie de lavados que arrastran aquellas moléculas de DNA que no se han unido específicamente a la proteína. Posteriormente se eluye el DNA que estaba unido con más afinidad a la proteína y se amplifica mediante PCR. El DNA obtenido en esta reacción de PCR se somete de nuevo a una incubación con la proteína y así, sucesivamente, se repiten las rondas de incubación-selección durante unas diez veces hasta que se obtiene una batería de aptámeros (ligandos) altamente enriquecida en una determinada secuencia (figura R.44) (ver materiales y métodos).

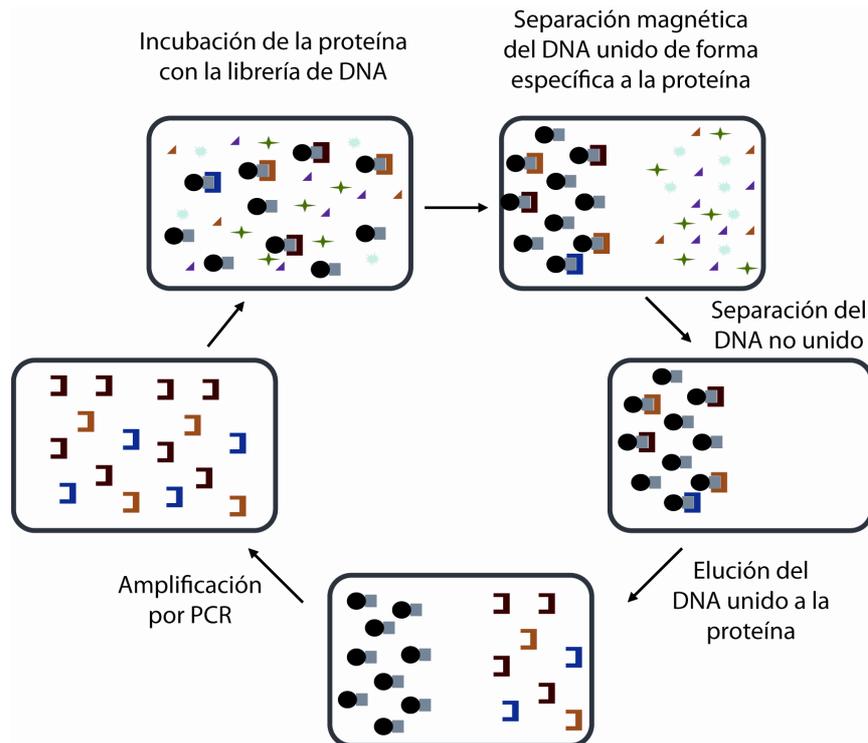


Figura R.44. Esquema de la sucesión de las rondas del SELEX. La proteína unida a las bolas magnéticas se representan con la bolita negra y el rectángulo gris. El resto de figuras representan las diferentes moléculas de DNA que forman la librería de DNA.

Para la secuenciación de los clones se suelen utilizar aquellas fracciones resultantes que provienen de los últimos ciclos de amplificación. En este trabajo se hicieron 10 ciclos de incubación-selección-amplificación por cada proteína. Como control positivo se utilizó la proteína de *S. coelicolor* AtrA, un regulador transcripcional de la familia TetR (ver introducción 3.3.), en el que se habían definido secuencias de unión a DNA localizadas en el promotor y en la región codificante del regulador específico de ruta de la actinorrodina, *actII-ORF4* (Uguru, 2005). Como problema se utilizó el RR AbrA2 tanto en su versión completa (defosforilada) como en su versión truncada AbrA2^{DBD}.

1.1. INMOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AbrA2, AbrA2^{DBD} y AtrA

Para llevar a cabo las rondas del SELEX, las distintas proteínas AbrA2, AbrA2^{DBD} y AtrA, etiquetadas todas ellas con cola de histidinas, se inmovilizaron en bolas magnéticas con iones cobalto (ver materiales y métodos). La unión se llevó a cabo durante 2 horas a 4° C. A continuación se hicieron un par de lavados con el mismo *buffer* utilizado en la unión para eliminar la proteína no unidas. Para comprobar que se había producido realmente la unión, se tomaron muestras de cada una de las fracciones del proceso y se sometieron a SDS-PAGE como se muestra en la figura R.45. Como puede apreciarse la unión fue adecuada en los tres casos.

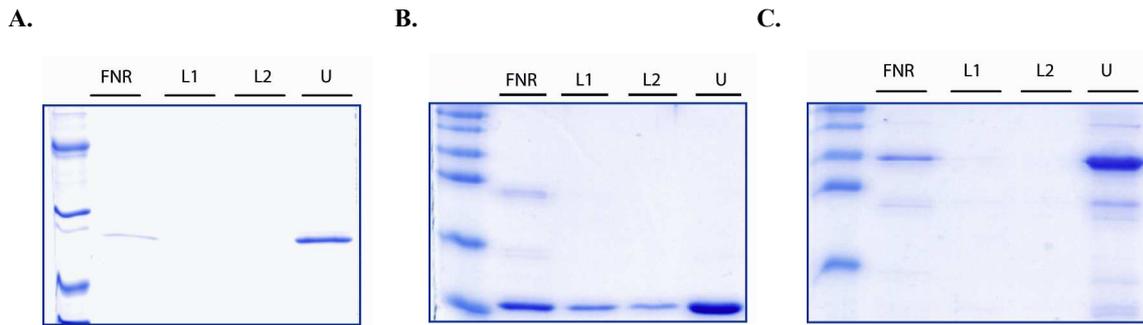


Figura R.45. Unión de las distintas proteínas a las bolas magnéticas (A) 15 % SDS-PAGE unión de AbrA2. (B) 18 % SDS-PAGE AbrA2^{DBD}. (C) 15 % SDS-PAGE AtrA. FNR: fracción no retenida. L1-L2: lavados 1-2. U: fracción unida.

1.2. SELEX: CICLOS DE SELECCIÓN-AMPLIFICACIÓN

Una vez comprobada la inmovilización de las proteínas se iniciaron las rondas de selección y amplificación para enriquecer la población de aptámeros que se unían a los reguladores. En total se llevaron a cabo 10 ciclos con cada proteína, los detalles de los mismos se describen en el apartado 9.2. de materiales y métodos. Trascurrida cada ronda de PCR se tomaron muestras de 10 µl y se corrieron alícuotas en gel de acrilamida 5 % para ver la progresión de los diferentes ciclos de amplificación. Los resultados de las últimas 5 PCRs mostraron lo siguiente:

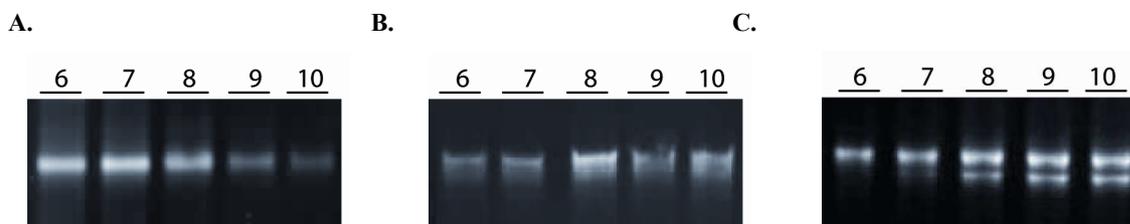


Figura R.46. Electroforesis en gel de acrilamida 5 % de las últimas 5 rondas de amplificación por PCR del AbrA2 (A), AbrA2^{DBD} (B) y AtrA (C).

Las PCRs resultantes no dieron un patrón de amplificación claramente definido en el caso del RR AbrA2^{DBD}, sin embargo, con las otras proteínas AbrA2 entera y AtrA, se obtuvieron dos patrones claros pero opuestos, uno decreciente en la cantidad de DNA amplificado, en el caso del RR AbrA2 y otro creciente en el caso de AtrA (figura R.46.). Ambos podían ser igual de válidos puesto que son dependientes de la especificidad del reconocimiento entre las distintas moléculas de DNA y proteína. Continuando con el protocolo se quiso evaluar mediante ensayo de retardo en gel (EMSA), si existía una unión real entre las diferentes proteínas y el conjunto de aptámeros amplificados en cada caso. Para la realización de este ensayo se amplificó de nuevo el último conjunto de aptámeros obtenidos (ronda 10 del SELEX) por PCR, utilizando

uno de los oligonucleótidos de la pareja usada para la amplificación (P1, ver apéndice 1) marcado con fluoresceína en su extremo 5'. La posterior incubación DNA marcado-proteína se llevó a cabo en el *buffer* de unión detallado en el apartado 8 de materiales y métodos. Para ello se utilizaron 0,35 µg de proteína y 10 ng de DNA marcado. Transcurridos 20 minutos de incubación a T^a ambiente se añadió el *buffer* de carga y las muestras se sometieron a una electroforesis en gel nativo de acrilamida 5 %. Los resultados se muestran en la figura R.47.

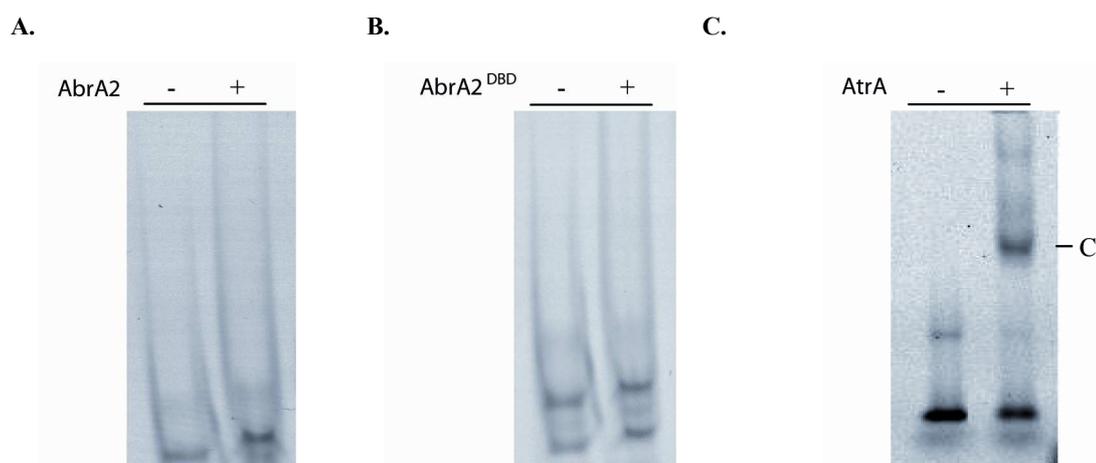


Figura R.47. EMSAs con los aptámeros de la ronda 10 del AbrA2 (A), AbrA2^{DBD} (B) y AtrA (C). Los carriles marcados con – corresponden al DNA sin proteína y los marcados con + al DNA con la proteína específica (~ 1,2 pmol proteína/ng DNA) de cada selección. La C señala el complejo “DNA-proteína”.

Como puede apreciarse en la figura, los aptámeros recuperados en los procesos del SELEX llevado a cabo con las proteínas AbrA2 y AbrA2^{DBD}, no parecían unirse a su proteína específica de selección ya que no se observaban complejos DNA-proteína. En el caso de AtrA sí se observó retardo en la migración del DNA, lo cual estaba indicando que sí había unión entre aptámeros y proteína, y que la técnica había funcionado. A pesar que no se obtuvo retardo del DNA con las proteínas de interés, se decidió secuenciar el conjunto de aptámeros de cada SELEX.

1.3. SECUENCIACIÓN DE LOS APTÁMEROS

Para la secuenciación de los aptámeros, la mezcla de los fragmentos de DNA obtenidos en la última PCR se clonaron en el plásmido pGEMTeasy y el DNA plasmídico presente en las colonias obtenidas se secuenció utilizando el oligonucleótido universal (LUP: *Long Universal Primer*). En total se secuenciaron 24 clones de los obtenidos con el producto del SELEX AbrA2, 27 clones del AbrA2^{DBD} y 10 clones del control AtrA, y se analizaron con el programa EditSeq. En la figura R.48. se resumen los resultados de secuenciación obtenidos. Como secuencias erróneas se entienden aquellas que por defectos del DNA o de secuenciación no fueron óptimas para su lectura.

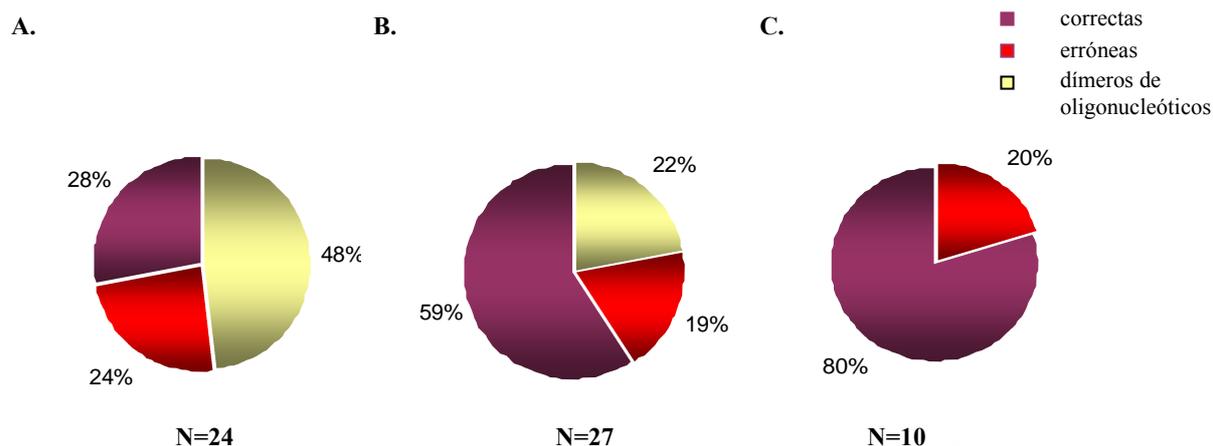


Figura R.48. Diagramas indicativos del tipo de secuencias obtenidas del SELEX del AbrA2 (A), AbrA2^{DBD} (B) y AtrA (C). N es el número de clones secuenciados.

1.3.1. Secuencias diana de DNA de la proteína AtrA

Para verificar la validez del proceso se comenzó con la comprobación de las secuencias obtenidas con la proteína control AtrA. Al compararlas a primera vista resultó que 4 aptámeros eran idénticos en secuencia (secuencias grises) y el resto presentaba un patrón común correspondiente a la región subrayada (la secuencia AtrA3 y AtrA7 muestran las secuencias complementarias al resto):

```

GTG GAA TGG TTC GTT CCG CTT ATG CCG TGG (AtrA1)
GAT ATG ATA AGT GGA ATG TAC CGT TCC GCT (AtrA3)
GTG GAA TGG TTC GTT CCG CTT ATG CCG TGG (AtrA4)
GTG GAA TGG TTC GTT CCG CTT ATG CCG TGG (AtrA5)
CTG GAC GTA AAC GGA ATG TAT GAT TCC GCG (AtrA6)
GCG GAA CCT CCC ATT CCG CTT AAT (AtrA7)
GTG GAA TGG TTC GTT CCG CTT ATG CCG TGG (AtrA8)
G GAA CGG CCC ATT CCG TTT ATA CAA CAG (AtrA9)
    
```

Para tener una apreciación más exacta de la secuencia se utilizó el programa de búsqueda de motivos MEME (<http://meme.nbcr.net/meme4/cgi-bin/meme.cgi>) y se obtuvo el siguiente consenso (figura R.49).

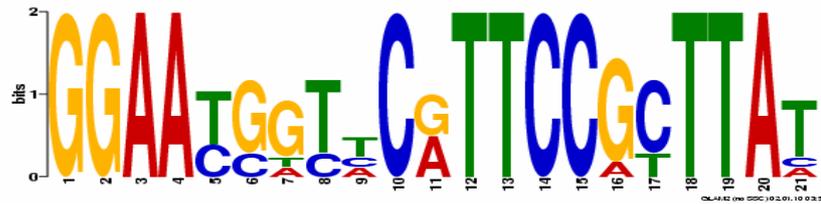


Figura R.49. Representación gráfica de la secuencia consenso obtenida mediante la búsqueda de motivos conservados en los aptámeros del SELEX AtrA con el programa MEME. En el eje de abscisas se señala la posición de cada nucleótido en la secuencia y el eje de ordenadas indica la probabilidad de aparición correspondiendo el 2 al 100 %.

Al comparar la secuencia resultante del SELEX con las secuencias de unión de AtrA al *actIIORF4* descritas por *foot-printing* (FP) (Uguru *et al.*, 2005), se apreció la similitud entre los sitios de unión “naturales” y el consenso SELEX:

| | |
|---|-------------|
| SELEX: GGAA YSDSHCR TTCC RYTTA | Y= C ó T |
| FP1: C AGGA ATGCCAG ATTCT ATtga | S= C ó T |
| FP2: GC GGG ATGTGTA ATTCC GCTTA | H= C, T ó A |
| | R= G ó A |
| | D= A, G ó T |

Con las tres secuencias se estableció una secuencia consenso final SELEX-FP (figura R.50.) que se empleará más adelante para realizar búsquedas de secuencias consenso de unión del factor de transcripción AtrA en determinadas regiones del genoma de *S. coelicolor* (ver apartado resultados 2.3 de este mismo capítulo II.2.).

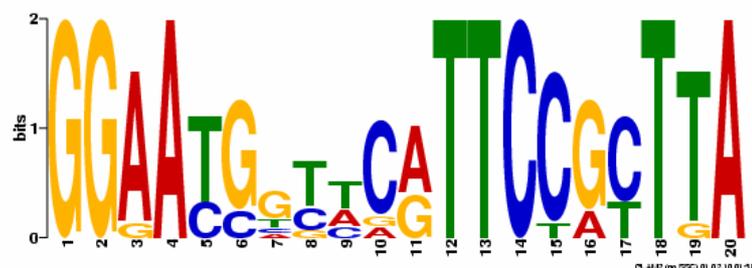


Figura R.50. Representación gráfica de la secuencia consenso obtenida mediante la búsqueda de motivos conservados entre las secuencias diana naturales de AtrA y la resultante del SELEX mediante el programa MEME. En el eje de abscisas se señala la posición de cada nucleótido en la secuencia y el eje de ordenadas indica la probabilidad de aparición correspondiendo el 2 al 100 %.

1.3.2. Secuencias dianas de DNA del RR AbrA2 y AbrA2^{DBD}

A pesar del amplio porcentaje de secuencias erróneas y dímeros de oligonucleótidos obtenidos de los aptámeros de las dos proteínas problema, se obtuvo un porcentaje de secuencias correctas a comprobar y comparar entre sí. A primera vista no se encontró ningún patrón conservado por lo que se hizo una búsqueda más minuciosa con la base de datos *rsa-tools* (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>) y el programa MEME. Se hicieron búsquedas de secuencias consenso seguidas, denominadas *words*, así como secuencias separadas por espacios, más típicas estas últimas de los factores de transcripción que actúan como dímeros. El mejor resultado en el caso de la proteína truncada AbrA2^{DBD} se obtuvo como una secuencia sin espacios representada como tal en la figura R.51.A y localizada sobre los aptámeros en figura R.51.B:

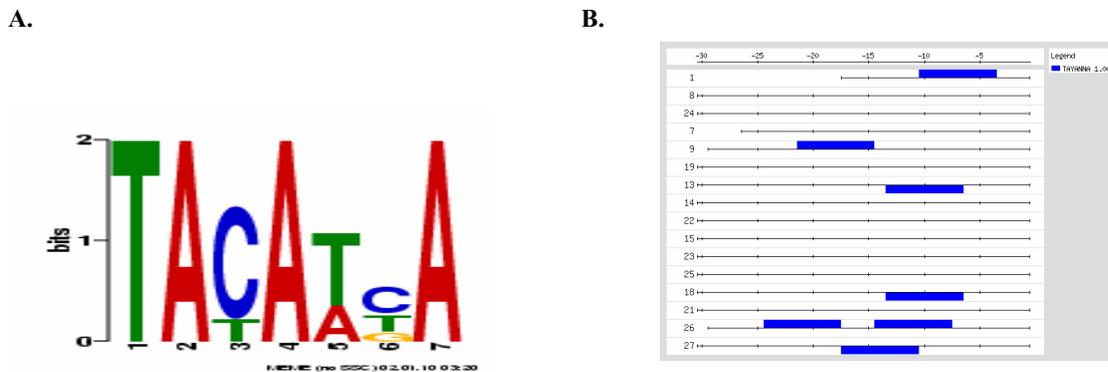


Figura R.51. (A) secuencia consenso resultante de la búsqueda de motivos en MEME. (B) Distribución de la secuencia “TAYAWNA”, rectángulos azules, en los aptámeros del SELEX AbrA2^{DBD} (resultado de la búsqueda con *rsa-tools*).

Al no ser una secuencia bien definida y sólo estar presente en 6 de los 16 aptámeros secuenciados, no se puede determinar si en realidad corresponde a una secuencia diana del AbrA2^{DBD}. Al hacer una búsqueda de esta secuencia en el genoma de *S. coelicolor* con el programa *rsa-tools*, el número de promotores que la contenían era demasiado elevado lo cual no aportaba ningún indicio sobre la posible actuación del regulador. También se intentó encontrar una secuencia común en los aptámeros recuperados con el RR AbrA2, pero no se consiguió una predicción de secuencia fiable. Esta falta de consenso y el hecho de que los gels de retardo hubiesen dado negativos, sugería que el experimento SELEX no había funcionado para estas proteínas en concreto, aunque sí se había resuelto con éxito en el caso de AtrA, ayudando a redefinir la secuencia consenso de unión de este factor de transcripción.

2. CAPTURA DE PROMOTORES POR INTERACCIÓN DNA-PROTEÍNA

Debido a que la determinación de una secuencia consenso de unión del RR AbrA2 mediante SELEX no fue posible, se decidió abordar el mismo propósito final de identificar genes diana de este RR, mediante ensayos *in vitro* de captura de DNA por afinidad. El objetivo se extendió también al RR AbrC3. Para ello, se utilizaron por un lado los RRs etiquetados con una cola de histidinas y fusionados a bolas magnéticas como en el experimento anterior. Por otro lado, se utilizaron como ligandos problema, fragmentos del genoma de *S. coelicolor* M145 (100-500 pb) resultado de una digestión parcial con la enzima de restricción *Sau3A*. El proceso se detalla en los siguientes apartados.

2.1. INMOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AbrA2^{DBD}, AbrC3^{DBD} y AtrA

Para esta parte del trabajo se emplearon las versiones truncadas de las proteínas reguladoras, AbrA2^{DBD} y AbrC3^{DBD} que mantienen teóricamente su capacidad de unión a secuencias diana del DNA. De nuevo se utilizó como control en el experimento la proteína AtrA. La inmovilización en las bolas magnéticas de todas las proteínas problema usadas como cebo en el proceso, se hizo exactamente en las mismas condiciones que en el experimento del SELEX explicado en los apartados anteriores (ver materiales y métodos).

2.2. CAPTURA DE LAS DIANAS DE LOS RRs Y CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE DNA EN pSK⁺

Para limitar el tamaño del DNA genómico que se iba a incubar con las proteínas, se llevó a cabo una digestión parcial del gDNA de *S. coelicolor* con *Sau3A*, seleccionando las condiciones en las que el tamaño de los fragmentos resultantes oscilase entre 100 y 500 pb mayoritariamente.

El experimento de captura se realizó con las proteínas problema AbrA2^{DBD} y AbrC3^{DBD}, con el control positivo AtrA y con un control negativo correspondiente a la proteína truncada AbrC3_N (sin motivo de unión a DNA). Se inmovilizaron cantidades equimoleculares de proteína en todos los casos y tras la incubación DNA-proteína durante 2 horas a 4° C (ver materiales y métodos), se realizaron varios lavados el mismo *buffer* de unión para eliminar el DNA no unido. Seguidamente se hicieron tres eluciones del DNA unido a las proteínas, aumentando progresivamente en cada elución la concentración de sales del *buffer* de unión: la primera con NaCl 0,1 M, la segunda con NaCl 0,3 M y la tercera con con NaCl 1 M. Las sales se eliminaron utilizando el kit de purificación y limpieza de DNA (*GE Healthcare*) y se clonaron los fragmentos de DNA resultantes de las eluciones 0,3 y 1 M NaCl, en el vector pSK⁺ previamente digerido con *Bam*HI. Posteriormente se transformó con la mezcla de ligación la cepa *E. coli*

DH5 α y se seleccionaron los clones blancos que portaban los insertos (selección blanco-azul con X-Gal, ver materiales y métodos).

2.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS RESULTANTES DE LAS CAPTURAS

El resultado de la transformación resultó similar, respecto al número de unidades formadoras de colonias (ufc) blancas obtenidas, en el caso de las proteínas problema y el control negativo, por lo que en principio se analizaron 10 secuencias de cada transformación, AbrA2^{DBD}, AbrC3^{DBD}, AtrA y AbrC3_N. El resultado del análisis de las secuencias fue alentador, ya que se comprobó que aquellas que procedían de la incubación del DNA con el control negativo, no tenían ningún inserto y correspondían al vector recircularizado. El resto de los plásmidos resultantes sí tenían inserto, por ello en principio se seleccionaron 40 clones más de los obtenidos con la captura de las proteínas problema AbrA2^{DBD} y AbrC3^{DBD} y del control AtrA y todos ellos fueron secuenciados. Haciendo un blastn con las secuencias de los insertos se comprobó que correspondían tanto a regiones intergénicas como a regiones intragénicas del genoma, aunque la proporción entre unas y otras variaba dependiendo de la proteína de unión. En las tablas R.11, R.13 y R.14. se muestran los SCOs cuyas regiones precedentes 5' fueron capturadas.

Al analizar las secuencias resultantes de la captura con la proteína AtrA, se seleccionaron aquellas que correspondían a secuencias intergénicas del genoma, presumiblemente promotoras, un 56 % (28/50). De estas secuencias se obtuvo una sobrerrepresentada localizada aguas arriba del SCO5461 (5461p), encontrándose en 11 clones analizados, lo que aportaba validez a la captura, además, entre los otros promotores capturados se encontró el del *actII-ORF4*, diana conocida de la proteína AtrA. El resto de regiones intergénicas capturadas se enumeran en la tabla R.11.

Asumiendo que entre las secuencias resultantes de la captura existen DNAs seleccionados de forma inespecífica, se quiso establecer un filtro de selección en la búsqueda de secuencias diana del regulador AtrA. El mencionado propósito se llevó a cabo gracias a las secuencias consenso de unión de AtrA previamente definidas, resultado del SELEX (GGAA_n{5}CnTTCC) y del conjunto SELEX-*footprinting* (GGnA_n{7}TTCn). Para no sesgar demasiado la selección se utilizaron dos secuencias consenso degeneradas derivadas de las secuencias consenso anteriores GGAn{0,20}TCC y GGnA_n{0,20}TTC, y se hizo una búsqueda de las mismas sobre todas las regiones de DNA resultantes de la captura. Las secuencias consenso degeneradas que se encontraron se muestran en la tabla R.11, no obstante, en el apéndice 2 se recogen los insertos resultantes de esta captura con AtrA en toda su extensión.

Tabla R.11. (A) Regiones promotoras resultantes de la captura de DNA con el regulador AtrA y presencia de secuencias consenso degeneradas. En la columna de los SCOs de las regiones intergénicas (promotoras) se

muestra entre paréntesis (x N) el número de veces que ese promotor salió representado en el experimento. En negrita se muestran los clones más significativos.

| AtrA | | |
|-------------------------------------|---|---|
| Regiones intergénicas (SCOs) | Función | Secuencia degenerada GGAN{0,20}TCC o GGnAn{0,20}TTC |
| 5461 (x11) | proteína de secreción (putativa) | (GGAGCGACGCATTCC) (GGAGGAGGGGTCTCAGCGGTCC) GGGAAGACCACGTGGTTCC |
| 2286/87 (x3) | fosfatasa alcalina/ oxidorreductasa (putativas) | (GGAATTGCCCCCTCC) (GGACGGATGAGTTCCGGATGTTCC) GGCACCCGTGACGACGGCGACCTTC |
| 7648 | RR (TCS) | (GGACCGGTCCCGGTTCCCGTTCC) |
| 5085 | actIIORF4 | SI (GGACGTGTCC) (GGATGTGTAATTCCGCTTAAATCC) |
| 1714/15 | proteína de secreción/ homogentisato 1,2-dioxigenasa (putativas) | (GGATCCCCCGGGGTCTGGTTCC) (GGAGCGGAGCGGGGAAGTCC) (GGAAACCGCAATCC) |
| 4295 (x2) | proteína de choque frío | (GGAGCGCGTTCC) (GGAATTGCCCCCTCC) GGAATTGCCCCCTCCGTTTC |
| 5502 | proteína integral membrana exporte (putativa) | (GGAAGACCGGGAATGGCCGTCC) |
| 1038 | proteína hipotética | (GGATCATGCTGAGACTCGGAATCC) (GGATCTCC) |
| 1480 | proteína hipotética | (GGAGGCTGACCAGGACTTTTCC) (GGACTTGACCGCTAGTCTCC) |
| 7791a | oxidorreductasa (putativa) | GGATCGAGCCATCCATCC |
| 2442/43 | gntR regulador transcripcional/ proteína de transporte (putativas) | Ninguna secuencia |
| 3522/23 | regulador transcripcional (putativa) / proteína hipotética | Ninguna secuencia |
| 3862/63 | proteína membrana/proteína de secreción (putativas) | Ninguna secuencia |
| 2125 | proteína hipotética | Ninguna secuencia |
| 3219 | lipasa (putativa) | Ninguna secuencia |

Tabla R.12. Región intragénica capturada con el regulador AtrA con secuencias consenso degeneradas.

| AtrA-INTRAGÉNICAS | | |
|--------------------------|-----------------------------------|---|
| SCO | Función | Secuencia degenerada GGAN{0,20}TCC o GGnAn{0,20}TTC |
| 4503 (x2) | proteína hipotética conservada | (GGATCGTCAGATAGCCCTCGTCGTCC) (GGACGACGCCCCCGGCCTGCGGGTCC) (GGACCTGCTCC) |

Respecto a los insertos de las proteínas problema, en el caso de AbrC3^{DBD} se identificó un porcentaje de regiones intergénicas del 58 % (29/50). Para el RR AbrA2^{DBD} se tuvo que ampliar

el número de clones analizados y aun así, el porcentaje de regiones intergénicas resultó ser considerablemente menor que el de AbrC3^{DBD}, de un 27 % (20/75). La alta proporción en promotores (58 %) junto con la aparición de uno de ellos 9 veces hicieron que la captura realizada con la proteína AbrC3^{DBD} se considerase positiva. Además entre los promotores capturados se encontró el del SCO4597, la HK AbrC2 que forma el propio sistema de tres componentes (tabla R.13.).

Con las secuencias promotoras resultantes de la captura se hizo una búsqueda de posibles secuencias consenso utilizando el programa rsa-tools, pero no se pudo determinar ninguna con alta fidelidad.

Tabla R.13. Regiones promotoras resultantes de la captura de DNA con el regulador AbrC3^{DBD}. En la columna de los SCOs de las regiones promotoras se muestra entre paréntesis (x N) el número de veces que ese promotor salió representado en el experimento. En negrita se muestran los clones más significativos.

| AbrC3^{DBD} | |
|-----------------------------------|--|
| Regiones promotoras (SCOs) | Función |
| <i>1376</i> | regulador transcripcional LacI |
| <i>1801</i> | regulador de respuesta (TCS) |
| <i>1810 (x2)</i> | proteína de membrana (putativa) |
| <i>1835</i> | proteína de membrana (putativa) |
| <i>2616</i> | proteína de membrana (putativa) |
| <i>2782</i> | descarboxilasa piridoxal-dependiente (putativa) |
| <i>3166 (x9)</i> | proteína membrana de transporte |
| <i>3146</i> | proteína de secreción (putativa) |
| <i>3936</i> | proteína iniciación de replicación plásmido (putativa) |
| <i>4148x2</i> | proteína de union ATP (transportador ABC) (putativa) |
| <i>4597</i> | HK AbrC2 (TCS) |
| <i>4802/03</i> | proteína hipotética/ proteína hipotética |
| <i>4822/23</i> | proteína integral de membrana (putativa)/desconocida |
| <i>6543/44x2</i> | proteína hipotética / proteína de membrana (putativa) |
| <i>6627</i> | proteína hipotética |

Respecto a captura realizada con la proteína AbrA2^{DBD} (tabla R.14.) todos los indicios apuntaban a que los resultados eran menos fiables debido a la baja proporción de zonas intergénicas capturadas y a la escasa repetitividad de los DNAs retenidos. No obstante, en esta captura también salieron un conjunto de promotores que había que comprobar mediante otra técnica para confirmar si la unión DNA-proteína era real o eran meros artefactos. Como en el caso anterior, de las secuencias que se unían a AbrA2^{DBD} no fue posible identificar ninguna patrón conservado común y tampoco se encontró la secuencia “consenso” determinada por SELEX para este RR AbrA2.

Tabla R.14. Regiones promotoras resultantes de la captura de DNA con el regulador AbrA2^{DBD}. En la columna de los SCOs de las regiones promotoras se muestra entre paréntesis (x N) el número de veces que ese promotor salió representado en el experimento.

| AbrA2 ^{DBD} | |
|----------------------------|---|
| Regiones promotoras (SCOs) | Función |
| 0192 | oxidoreductasa (putativa) |
| 0842 | deoxiribodipirimidina fotoliasa (putativa) |
| 1344 | lipoproteína transporte (putativa) |
| 1773 | L-alanina dehidrogenasa (putativa) |
| 2614 (x2) | folilpoliglutamato sintasa |
| 2835 | proteína membrana (putativa) |
| 4134/35 | lipoproteína (putativa) |
| 4468 | proteína hipotética |
| 4729 | cadena alfa RNA polimerasa |
| 5495 | fosfodiesterasa (putativa) |
| 5721 | proteína hipotética conservada |
| 5836/37 (x2) | proteína DNA girasa-like /zinc proteasa |
| 6089 | rRNA adenina metiltransferasa (resistencia antibióticos) (putativa) |
| 6622 | proteína de unión a ATP/GTP (putativa) |
| 6990/91 | proteína de transporte membrana (putativa) |
| 7085 | proteína hipotética |
| 7136 | proteína hipotética conservada |
| 7722 | proteína hipotética conservada |

3. COMPROBACIÓN DE LAS POSIBLES DIANAS MOLECULARES MEDIANTE ENSAYOS DE RETARDO EN GEL (EMSA)

Para comprobar si existía una unión real *in vitro* entre las regiones promotoras y las proteínas problema, se decidió llevar a cabo la técnica de retardo en gel o EMSA, que permite comprobar eficientemente uniones DNA-proteína. Para ello, se amplificaron por PCR los fragmentos seleccionados resultantes de la captura con los reguladores utilizando los oligonucleótidos que se recogen en las tablas del apéndice 1 y tras la incubación con las proteínas, tal y como se detalla en materiales y métodos, las bandas de DNA se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida 5 % que posteriormente fueron teñidos con bromuro de etidio para visualizar la migración del DNA (ver materiales y métodos, 8.2.).

Los primeros DNAs en los que se comprobó si había retardo fueron los de aquellos promotores capturados con la proteína AtrA que tenían alguna secuencia consenso degenerada tipo “GGAN{0,20}TTC” ó GGnAn{0,20}TTC: 5461p, 2286/87p, 7648p, 1715p, 4295p, 5502p, 1038p, 1480p y 7791p. Como control negativo en los ensayos de retardo se utilizó un fragmento del promotor *xyxA* de *S. halstedii* JM8. Como controles positivos se utilizaron dos fragmentos,

uno correspondiente a la secuencia del promotor del gen *actII-ORF4* (*actII-4p*), que había salido en la propia captura y otro dentro de la secuencia codificante de dicho gen (*actII-4*) y que se conocía por ser diana del regulador AtrA (Uguru, 2005).

En la figura R.52. se puede observar el claro retardo en la migración del DNA en los promotores de los SCOs *5461*, *2286/87*, *1715* y en el utilizado como control positivo, *actIIORF4p* (*5085p*). En el caso de los promotores *7648p*, *5502p* y *1038p*, la proteína AtrA también era capaz de unirse a ellos, desapareciendo la banda correspondiente al DNA sin proteína, sin embargo, la banda de DNA retardado no se resolvía tan nítida como las otras. En cuanto a la movilidad de otros promotores que también presentaban secuencia degenerada, como el *4295p* y el *7791p*, no resultó alterada en absoluto, indicando la no interacción DNA-proteína igual que en el caso del promotor utilizado como control negativo (*xysAp*). También se dio el caso de algunos resultados de retardo dudosos, por ejemplo el observado con el promotor *1480p*, en el que aproximadamente la mitad del DNA marcado desaparecía en el gel tras incubarse con la proteína, lo que podría indicar una posible interacción aunque no se observe la banda de retardo en el DNA.

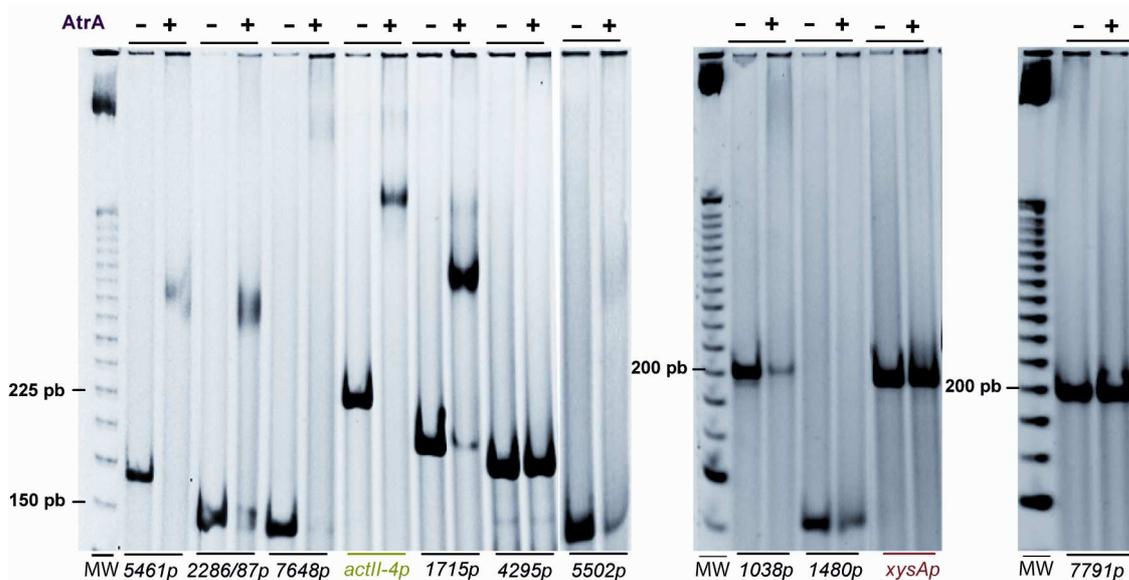


Figura R.52. EMSAs con las diferentes regiones de DNA resultantes de la captura de promotores con el regulador transcripcional AtrA que presentaban alguna secuencia GGAN{0,20}TTC y/o GGnAn{0,20}TTC. El símbolo (+) encima del carril significa incubación con proteína (~ 0,5 pmol proteína/ng DNA) y el símbolo (-) incubación sin proteína. El *actII-4p* y el *xysAp* son los controles positivo y negativo, respectivamente. El carril marcado con MW corresponde a los marcadores de peso molecular (25 bp *DNA ladder*, invitrogen).

También se comprobó qué ocurría con alguno de los promotores resultantes de la captura que no presentaban las secuencias señaladas como consenso, ni siquiera degeneradas. Para ello se escogieron dos promotores sin secuencias consenso, *2442p* y *3522/23p*, localizados aguas

arriba de dos reguladores transcripcionales (SCOs: 2442 y 3522). En la figura R.53. A. se observa como ninguno de los dos DNAs alteraba su movilidad, lo cual indicaba ausencia de interacción entre dichos DNAs y el regulador transcripcional AtrA. La última cuestión que quedaba por responder era qué ocurría con aquellas regiones intragénicas que presentaban alguna secuencia consenso degenerada y que *a priori* no se consideraban secuencias promotoras. De todas las secuencias intragénicas identificadas (datos no mostrados) se escogió la perteneciente al gen *SCO4503* (tabla R.12.), por tener dos secuencias consenso degeneradas y haber salido dos veces en la captura. Los resultados (R.53. B.) demostraron que aunque esta región intragénica tenía secuencias consenso similares a otras encontradas en promotores, no se apreciaba retardo en los geles, lo que indicaba que no se formaban complejos DNA-proteína.

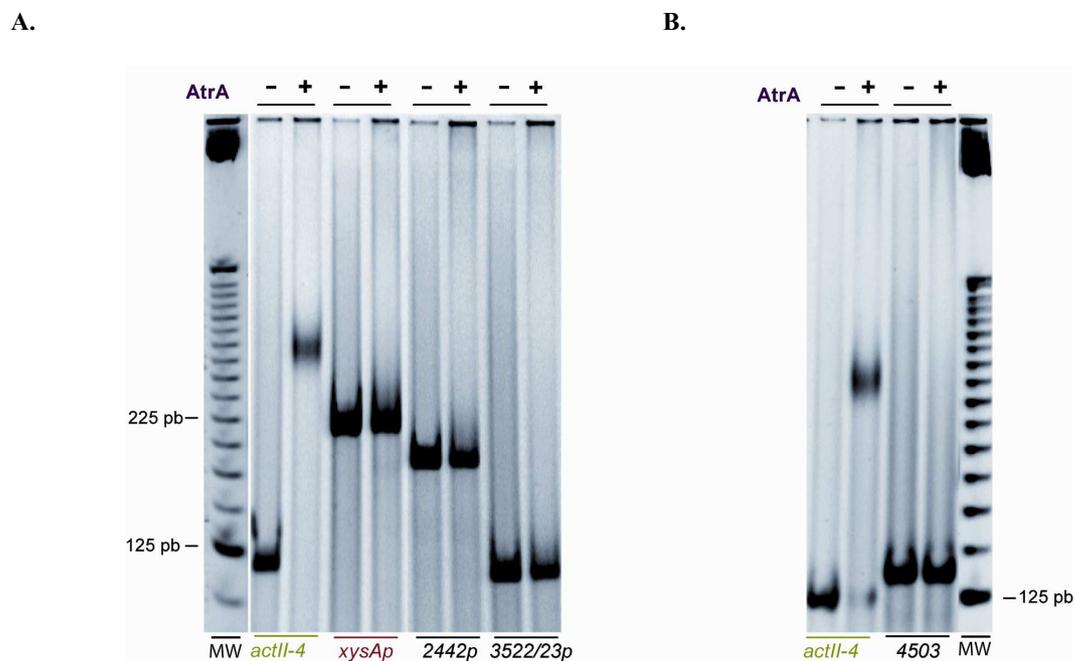


Figura R.53. (A). EMSAs de las regiones promotoras sin secuencia consenso degenerada. (B). EMSA de la región consenso no promotora con secuencia consenso degenerada. El símbolo (+) encima del carril significa incubación con proteína (~ 0,5 pmol proteína/ng DNA) y el símbolo (-) incubación sin proteína. El *actII-4* y el *xysAp* son los controles positivo y negativo, respectivamente. El carril marcado con MW corresponde a los marcadores de peso molecular (25 bp *DNA ladder*, invitrogen).

A continuación se resumen todos los resultados de los DNAs capturados con el AtrA (tabla R.15.).

Tabla R.15. Resumen de los resultados de los EMSAs con los diferentes DNAs capturados con el regulador transcripcional AtrA.

| AtrA-PROMOTORES | | | |
|-----------------------------------|--|-------------------------------|--|
| Regiones promotoras (SCOs) | Función | EMSA | Secuencia degenerada GGAN{0,20}TCC o GGnAn{0,20}TTC |
| 5461 (x11) | proteína de secreción (putativa) | SÍ | (GGAGCGACGCATTCC) (GGAGGAGGGGTCTCAGCGGTCC) GGGAAGACCACGTGGTTC |
| 4295 (x2) | proteína de choque frío | NO | (GGAGCGCGTTCC) (GGAATTGCCCCCTCC) GGAATTGCCCCCTCCGTTTC |
| 2286/87 (x3) | fosfatasa alcalina/ oxidoreductasa (putativas) | SÍ | (GGAATTGCCCCCTCC) (GGACGGATGAGTTCCGGATGTTCC) GGCACCCGTGACGACGGCGACCTTC |
| 3522/23 | regulador transcripcional (putativa) / proteína hipotética | NO | NINGUNA |
| 7648 | putative RR (TCS) | SÍ (no se ve complejo) | (GGACCGGTCCCGGTTCCCGTTCC) |
| 5085 | actIIORF4 | SI | (GGACGTGTCC) (GGATGTGTAATTCGCTTAAATCC) |
| 5502 | proteína integral membrana exporte (putativa) | SÍ (no se ve complejo) | (GGAAGACCGGAATGGCCGTCC) |
| 1038 | proteína hipotética | +/- | (GGATCATGCTGAGACTCGGAATCC) (GGATCTCC) |
| 2442/43 | gntR regulador transcripcional/ proteína de transporte (putativas) | NO | NINGUNA |
| 1480 | proteína hipotética | +/- | (GGAGGCTGACCAGGACTTTTCC) (GGACTTGACCGCTAGTCTCC) |
| 1714/15 | proteína de secreción/ homogentisato 1,2-dioxigenasa (putativas) | SÍ | (GGATCCCCCGGGGTCTGGTTCC) (GGAGCGGAGCGGGGAAGTCC) (GGAAACCGCAATCC) |
| 7791a | oxidoreductasa (putativa) | NO | GGATCGAGCCATCCATCC |
| AtrA-INTRAGÉNICAS | | | |
| SCO | Función | EMSA | Secuencia degenerada GGAN{0,20}TCC |
| 4503 (x2) | proteína hipotética conservada | NO | (GGATCGTCAGATAGCCCTCGTCTCC) (GGACGACGCCCCCGGCTGCGGGTCC) (GGACCTGCTCC) |

Respecto a los DNAs capturados con la proteína AbrC3^{DBD} se eligieron aquellos que habían salido más representados (de 2 a 9 veces) para evaluar la unión DNA-proteína mediante EMSA. Estos DNAs son los correspondientes a las regiones promotoras *3166p* (9 veces), *1810p* (2 veces) y *6542/43p* (2 veces). También se escogieron el *abrC2p* y el *1376p*, que pese a haber salido sólo una vez, se consideraban importantes dado que *abrC2p* se localiza aguas arriba de una de las HKs del TCS objeto de este estudio y el *1376p* corresponde a la región 5' que precede a un regulador transcripcional tipo LacI. Como control negativo se utilizó el fragmento de DNA del promotor *xysAp* y un fragmento de DNA codificante del *actII-ORF4*, que a su vez servía como control positivo de la técnica utilizando la proteína AtrA para retardar dicha secuencia. También se utilizó como control positivo de la técnica el promotor *5461p*. En la figura R.54. donde se muestran los resultados de los EMSAs se puede apreciar como los controles correspondientes al *actII-ORF4* se comportaron como se esperaba. Sin embargo, con cuando el control negativo *xysAp* se incubaba con AbrC3DBD se producía un ligero retardo en su movilidad. La secuencia del *actII-ORF4* utilizada no presentaba ningún retardo en su movilidad con la proteína AbrC3^{DBD} pero sí con la proteína AtrA (figura R.54. panel B). Además, se observaba un retardo ligero y difuso con alguna de las secuencias utilizadas, por ejemplo con los promotores *3166p*, *1810p* y *1376p*, sin embargo, en ninguno de los casos fueron tan nítidos como los obtenidos con las dianas de AtrA. En el resto de las secuencias que se ensayaron el retardo resultó tan leve que no se pudieron descartar posibles uniones inespecíficas. El hecho de los cambios tan ligeros en la movilidad del DNA puede ser debido a dos motivos, (1) el pequeño tamaño de la proteína utilizada, 10 kDa frente a 30 kDa de la proteína AtrA, y (2) su posible incapacidad de dimerizar con la consecuente disminución de su capacidad de unión al DNA y formación de complejos proteína-DNA estables. Además de los DNAs capturados, también se evaluó la unión con los promotores de la otra HK y el RR que formaban el sistema completo AbrC (*abrC1p* y *abrC3p*, respectivamente) para ver si todo el sistema estaba autorregulado por el RR AbrC3 (figura R.54. panel B). Adicionalmente se quiso comprobar que ocurría con los promotores de los genes específicos de la biosíntesis de los antibióticos ACT, RED y CDA (*actII-ORF4*, *redD* y *cdaR*, respectivamente) para discernir si la regulación de la producción de antibióticos era una acción directa sobre sus reguladores de ruta (figura R.54. panel C).

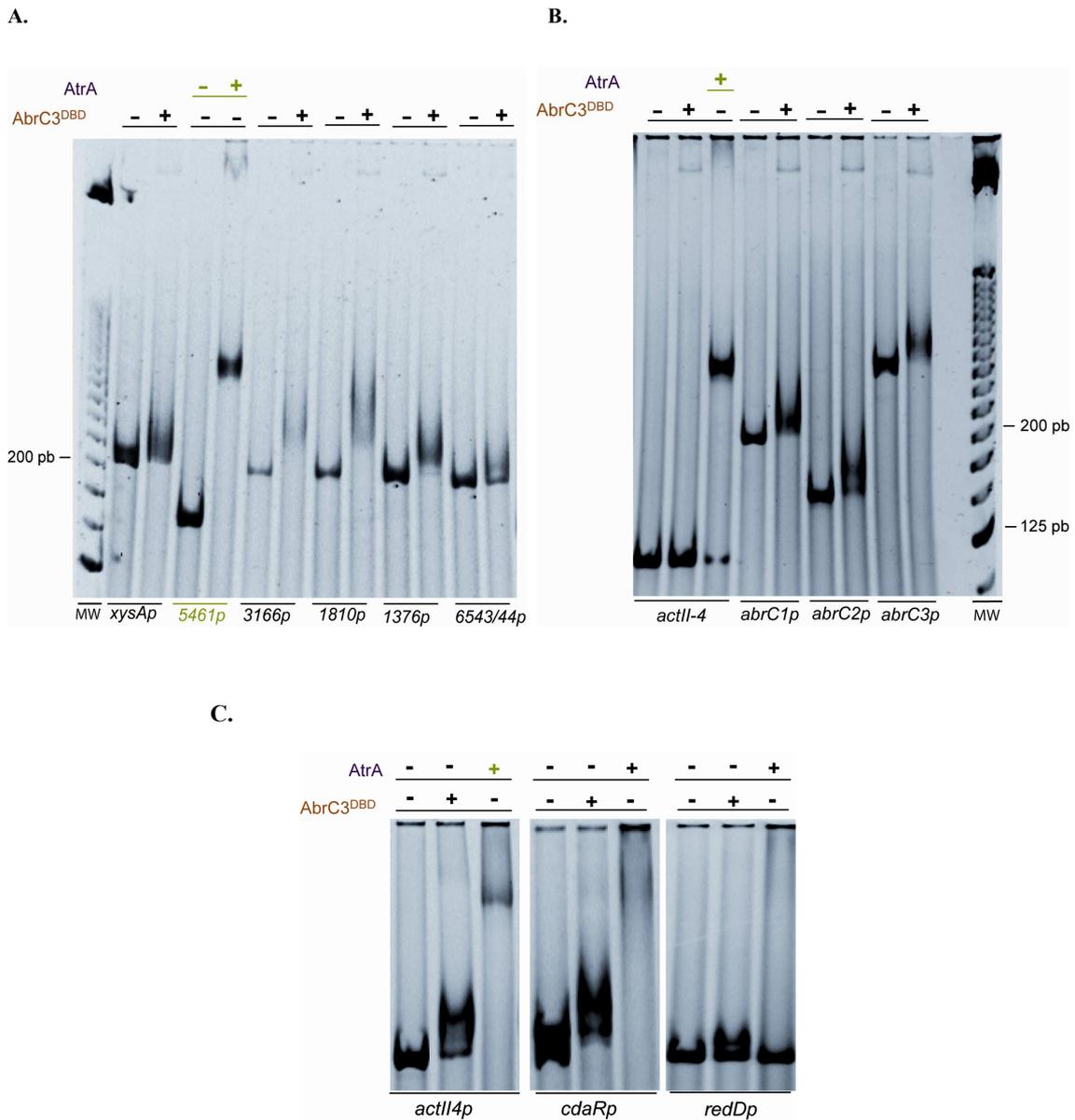


Figura R.54. (A). EMSAs con las diferentes regiones de DNA resultantes de la captura con el RR AbrC3^{DBD}. (B). EMSAs correspondientes a los promotores de los genes del TCS AbrC: *abrC1*, *abrC2* y *abrC3*. (C). EMSAs de las regiones promotoras de los genes reguladores específicos de ruta: *actII-ORF4* (*actII4p*), *cdaR* y *redD*. El símbolo (+) encima del carril significa incubación con la proteína indicada a la izquierda (~ 0,5 pmol proteína/ng DNA) y el símbolo (-) incubación sin proteína. El carril marcado con MW corresponde a los marcadores de peso molecular (25 bp *DNA ladder*, invitrogen).

Dentro de la imposibilidad para ver un retardo adecuado y consecuentemente no poder afirmar categóricamente el mismo, se evaluaron las uniones DNA-proteína como un (+) si se apreciaba más retardo y un +/- cuando no era un resultado claro (tabla R.16.).

Tabla R.16. Resumen de los resultados de los EMSAs con el RR AbrC3 y los diferentes DNAs incluidos en el ensayo de retardo en gel.

| AbrC3 ^{DBD} | | |
|------------------------------|---|------|
| Regiones intragénicas (SCOs) | Función | EMSA |
| 3166 (x9) | proteína membrana de transporte | + |
| 1810 (x2) | proteína de membrana (putativa) | + |
| 1376 | regulador transcripcional LacI | +/- |
| 6543/44 (x2) | proteína hipotética / proteína de membrana (putativa) | - |
| <i>abrC1</i> | HK (TCS) | +/- |
| <i>abrC2</i> | HK (TCS) | + |
| <i>abrC3</i> | RR | +/- |
| <i>actIIORF4</i> | proteína activadora cluster actinorrodina | +/- |
| <i>cdaR</i> | proteína activadora cluster CDA | +/- |
| <i>redZ</i> | RR | - |

En resumen, parece ser que dos de los promotores capturados *3166p* y *1810p* presentan un retardo de su movilidad electroforética cuando se incuban con AbrC3^{DBD}. A su vez no puede descartarse que dicha proteína pueda unirse tanto a los promotores de su propio sistema de regulación como a los de los reguladores de ruta *actII-ORF4* y *cdaR*, así como al regulador transcripcional LacI *1376p*. La relevancia de estas uniones requiere un análisis más profundo utilizando proteínas más activas y capaces de dimerizar, por lo que en sucesivos experimentos se repetirán este tipo de ensayos utilizando mutantes fosfomiméticos de estas proteínas esperando que la afinidad por sus DNA dianas mejore.

Por último y aunque los resultados de la captura con la proteína AbrA2^{DBD} parecían menos fiables, se comprobaron algunas posibles dianas del RR mediante EMSAs. Entre los promotores resultantes de la captura se seleccionaron el *4729p*, *6089p* y el *5836/37p*. Los dos primeros se escogieron por la función del SCO que precedían, cadena α de la RNA polimerasa y una metiltransferasa relacionada con la resistencia a antibióticos, respectivamente. El tercer promotor se eligió porque salió dos veces tras secuenciar los insertos capturados. Así mismo se quiso comprobar una posible unión entre el promotor del “operón” del que forma parte el propio TCS AbrA1/A2 (*1742p*) y con los promotores de dos de los genes subexpresados en los *microarrays* en torno a - 6 veces: *0141p* y *2435p*, ambos SCOs relacionados con el transporte de calcio. En los resultados de los EMSAs ninguno de los promotores ensayados sufrió retardo en su movilidad electroforética (figura R.55.A). Finalmente también se evaluó la unión del RR AbrA2 a los promotores de los genes reguladores específicos de ruta: *redDp*, *cdaRp* y *actII-ORF4p* y tal y como muestra la figura R.55.B se pudo descartar con confianza la unión DNA-proteína en todos los casos.

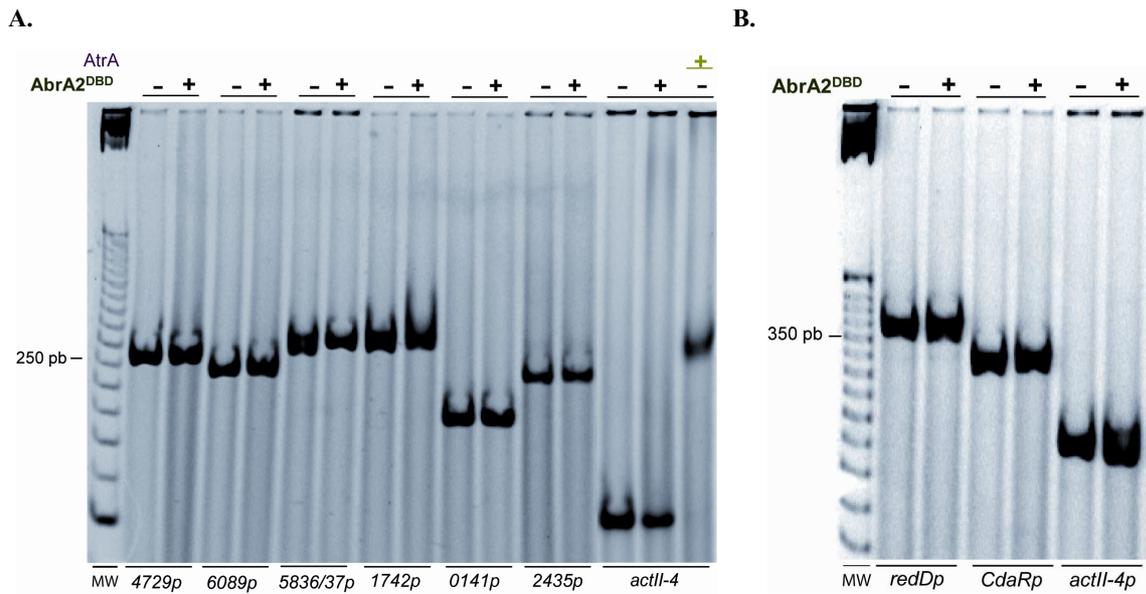


Figura R.55. (A) EMSAs con las diferentes regiones de DNA resultantes de la captura de promotores con el RR AbrA2^{DBD} y otros candidatos diana derivados de esta tesis: *1742p*, *0141p* y *2435p*. (B). EMSAs de las regiones promotoras de los genes reguladores específicos de ruta: *actII-ORF4* (*actII-4p*), *cdaR* y *redZ*. El símbolo (+) encima del carril significa incubación con proteína indicada a la izquierda (~ 0,5 pmol proteína/ng DNA) y el símbolo (-) incubación sin proteína. El carril marcado con MW corresponde a los marcadores de peso molecular (25 bp DNA ladder, invitrogen).

En conclusión, tal y como se sospechaba debido a los diferentes controles, tras la incubación de tres de las secuencias capturadas con el RR AbrC2^{DBD} no se observaron complejos DNA-proteína en ninguno de los casos. Con respecto a los promotores de los reguladores específicos de ruta así como del *SCO0141* y *SCO2435* aunque la unión con esta proteína resultó claramente negativa, realmente no puede descartarse que sean dianas de este RR. Esto es debido a que la falta de al menos un control positivo (una diana conocida) no permite discernir entre si realmente no hay unión entre los DNAs ensayados y la proteína, o si la probable conformación monomérica del AbrA2^{DBD} es incapaz de unirse con afinidad a sus regiones diana del DNA.

La necesidad de conseguir una proteína completa que mimetice el estado fosforilado de los RRs es un requerimiento indispensable a la vista de todos los resultados obtenidos en este último apartado. Una vez que se disponga de estas proteínas fosfomiméticas, se repetirán estos ensayos de captura con el objetivo de llegar a confirmar alguna diana de los RRs y poder definir, en la medida de lo posible, sitios consenso de unión.

DISCVSIÓN

Los sistemas de dos componentes constituyen la vía principal de señalización en los microorganismos del género *Streptomyces*. En los genomas de estas bacterias secuenciados y anotados hasta la fecha, se han identificado una media de 80 TCSs, lo que supone en torno a un 1 % de todos los genes (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/RRcensus.html). El hecho de que sea un número tan elevado, comparándolo con el número de TCSs de otras bacterias de vida libre (con una media en torno al 0,65 %) pone de manifiesto su importancia fisiológica, dejando entrever que constituyen la vía principal de adaptación de estos microorganismos a su hábitat natural, el suelo. No obstante, el número de TCSs presente en el género *Streptomyces* es incluso superado por otro microorganismo del suelo como es *Myxococcus* (por ejemplo *M. xanthus* tiene 139 HKs y 136 RRs) (<http://www.p2cs.org/>). Actualmente poco se conoce acerca de la función de los TCSs y de los genes diana que controlan en las cascadas de regulación en *Streptomyces*. Algunos de estos sistemas descritos en *S. coelicolor* se han relacionado con diversas funciones celulares tales como osmorregulación, metabolismo, diferenciación morfológica y resistencia a antibióticos. No obstante, la mayoría de los estudiados hasta la fecha han sido asociados directa o indirectamente con la producción de antibióticos, ejemplo de ello son los sistemas AbsA1/A2 (McKenzie y Nodwell, 2007), AfsQ1/Q2 (Shu *et al.*, 2009), RapA1/A2 (Lu *et al.*, 2007) y EcrA1/A2 (Li *et al.*, 2004), lo cual revela la compleja regulación en la síntesis de metabolitos secundarios y una conexión significativa entre los TCSs y dichas rutas metabólicas.

En esta tesis doctoral se ha intentado asignar una función a dos sistemas de dos componentes desconocidos hasta la fecha, AbrA1/A2 (SCO1744 y SCO1745) y AbrC1/C2/C3 (SCO4598, SCO4597 y SCO4596). Partiendo de su homología con el sistema AbsA1/A2 (Adamidis *et al.*, 1990) y habiendo hecho un análisis fenotípico detallado de los distintos mutantes construidos, se ha comprobado su estrecha relación con la producción de antibióticos y se ha encontrado también la implicación de ambos sistemas en el proceso de diferenciación morfológica en *S. coelicolor*.

A continuación se discutirán los aspectos más relevantes de los resultados de esta tesis doctoral.

1. SISTEMAS AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3: PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS Y DIFERENCIACIÓN EN *S. coelicolor*

1.1. SISTEMA AbrA1/A2

El sistema de dos componentes AbrA1/A2 es un sistema muy poco conservado (sólo se ha encontrado un ortólogo en *S. lividans*). Esta pareja de genes parece estar formando parte de un operón junto con otros dos genes que constituyen un sistema de transporte tipo ABC, ya que entre otras evidencias, no existen regiones intergénicas que separen los 4 ORFs, es más, los marcos de lectura de los 3 últimos genes están solapados en unos 4 nucleótidos (Charaniya *et al.*, 2007). A lo largo de este trabajo de tesis se ha intentado en repetidas ocasiones comprobar la existencia de un

transcrito policistrónico formado por los RNAs de las regiones codificantes de los 4 genes SCO1742-SCO1745, amplificando mediante RT-PCR las regiones de unión de los SCOs 1742/43, 1743/44 y 1744/45, pero sólo se ha podido amplificar la unidad transcripcional 1742/43, no resultando posible ver amplificación entre los genes 1743/44 ni 1744/45. Sin embargo, se cree que la no detección de los transcritos 1743/44 y 1744/45 puede ser debido a la inestabilidad de las distintas formas procesadas provenientes del mRNA policistrónico, ya que tampoco resulta posible detectar el transcrito de la HK *abrA1* (SCO1744) aunque sí se ha conseguido amplificar débilmente el mRNA del RR *abrA2* (SCO1745) (resultados no mostrados). La existencia de este operón (operonID 1294) tampoco pudo verificarse por los autores Charaniya y colaboradores mediante el uso de RT-PCR en su estudio global de predicción de operones (Charaniya *et al.*, 2007). Sin embargo, un dato que apoya la organización real de los cuatro genes en un operón es que la región que precede al SCO1742 ha sido utilizada en este trabajo como región promotora en el plásmido de complementación pHabrA1A2, dirigiendo con éxito la expresión del TCS *abrA1/A2*, de manera que la cepa revertiente recobraba el fenotipo de la estirpe parental. En resumen, la organización génica y la funcionalidad de la región 1742p como promotora de los genes *abrA1/A2*, sugieren que los 4 genes están constituyendo una unidad transcripcional.

Entre los TCSs bacterianos es habitual encontrar RRs que controlan la propia expresión del sistema mediante retroalimentación positiva frecuentemente aunque también se dan casos de retroalimentación negativa (Himpens *et al.*, 2000; Goulian, 2010), incluso cuando el operón esta constituido por más genes aparte de la HK y el RR (He *et al.*, 2008). En este trabajo no ha resultado posible identificar la unión del RR *AbrA2* a la región 1742p, mediante ensayos de retardo en gel (EMSA), sin embargo, no se descarta que la haya (ver más adelante).

En el desarrollo de este trabajo se ha mostrado como la función del TCS *AbrA1/A2* repercute en la producción de actinorrodina, undecilprodigiosina y CDA, así como sobre la diferenciación morfológica, actuando como un regulador pleiotrópico negativo de estos procesos. El efecto final del sistema *abrA1/A2* sobre la producción de estos antibióticos se desconoce si lo realiza controlando la expresión de los genes reguladores específicos de ruta ya que no se ha podido hallar expresión diferencial de los mismos en los tiempos concretos de 48 y 80 horas en NMMP. No obstante, reflejo de los ejemplos de otros reguladores pleiotrópicos, se cree que la regulación de la producción de antibióticos, sí se lleva a cabo modificando la expresión de los genes reguladores específicos de cada *cluster* biosintético, independientemente de que sea directa o indirectamente. Esta es una característica común entre otros reguladores pleiotrópicos, donde existen ejemplos de regulación indirecta como PhoP (Santos-Beneit *et al.*, 2009), de regulación desconocida como AfsQ (Shu *et al.*, 2009) y RapA2 (Lu *et al.*, 2007) o de regulación directa, como el regulador AbsA2 (McKenzie y Nodwell, 2007). Además de la influencia del TCS *AbrA1/A2* sobre la producción de antibióticos, se ha comprobado en nuestro laboratorio que el

sistema de transporte tipo ABC codificado por los SCOs 1742/43 también ejerce un papel negativo y específico sobre la producción de CDA. Las alteraciones en la producción de CDA ocasionadas por ambas parejas de proteínas parecen ser independientes, ya que el efecto es aditivo tanto en la delección (Krause, 2009) como en la sobreexpresión conjunta ABC+TCS (SCOs 1742/43/44/45) (resultados no mostrados en la tesis).

Los resultados fenotípicos de la sobreexpresión del RR *abrA2* en las cepas wt y mutante Δ *abrA1/A2* sugieren que la proporción de AbrA2-P (activo) y AbrA2 (inactivo) se encuentra controlada eficazmente por la HK AbrA1. Esto indica una función dual quinasa-fosfatasa de la HK AbrA1 sobre el RR AbrA2, común en otros TCSs como *AbsA1/A2* (Sheeler *et al.*, 2005) y que constituye un mecanismo adicional para controlar la interacción cruzada entre las HKs y RRs de distintos TCSs (Kenney, 2010). Los resultados del efecto perjudicial de la sobreexpresión de *abrA2* en el mutante Δ *abrA1/A2*, sugieren que este RR en ausencia de su HK específica, está constitutivamente activo (fosforilado), lo cual conduce a pensar que existen mecanismos alternativos de fosforilación de AbrA2, pero no de defosforilación. De manera adicional, teniendo en consideración los resultados negativos de la fosforilación *in vitro* de AbrA2 con acetilfosfato, su fosforilación *in vivo* en la cepa mutante Δ *abrA1/A2* apunta a ser mediada por otra HK y no por el acetilfosfato como se ha comprobado en otro tipo de reguladores como VanR de *S. coelicolor* (Hutchings *et al.*, 2006).

El análisis fenotípico del mutante carente de los genes *abrA1/A2* ha permitido caracterizar al sistema *AbrA1/A2* como un sistema condicional que actúa bajo una serie de condiciones nutricionales específicas, lo cual, concuerda con que reconozca y responda ante una determinada señal del medio. Esta característica recuerda, entre otros, al sistema *AfsQ1/Q2* también relacionado condicionalmente con la producción de antibióticos y la diferenciación en *S. coelicolor* (Shu *et al.*, 2009). De todos los TCSs descritos en *Streptomyces* hasta la fecha sólo se conoce la señal activadora de unos pocos pero en todos estos se puede apreciar la relación entre la señal y la respuesta iniciada por el sistema en cuestión. Por ejemplo el sistema *VanR/S* responde a la vancomicina y media la resistencia a este antibiótico (Hong *et al.*, 2004); *PhoP/R* responde ante una bajada de fosfato inorgánico y media una respuesta para adaptarse a la carencia de dicho compuesto (Sola-Landa *et al.*, 2003) y *ChiR/S* se activa ante la presencia de quitina en el medio activando la síntesis de una quitinasa (Homerova *et al.*, 2002).

Los experimentos realizados en este trabajo sugieren que tanto el $MgSO_4$ como el $FeSO_4$ podrían actuar como señales activadoras del sistema *abrA1/A2*, bien directamente o por medio de otra proteína. Esta hipótesis se apoya en la observación de que la cepa wt no produce ACT hasta tiempos muy tardíos, mientras que la cepa Δ *abrA1/A2* produce este antibiótico de forma temprana y en mayor cantidad en el medio basal NMMP. Esta diferencia temporal entre ambas cepas desaparece cuando en el medio se elimina $FeSO_4$ y/o $MgSO_4$, y la cepa wt, al igual que la mutante

$\Delta abrA1/A2$, se convierte en productora de actinorrodina a tiempos cortos de cultivo (3 días). Parece ser, por tanto, que la no producción de ACT en la cepa wt es por efecto de la actuación represora de AbrA1/A2. Ante un requerimiento de estudio más profundo del dominio sensor y de la señal que lo activa, se podrían dar varias situaciones. El magnesio podría actuar bien como señal activadora o bien como requerimiento para el funcionamiento del TCS, ya que ante una situación limitante, el escaso magnesio del medio quedaría secuestrado por proteínas esenciales para el crecimiento del microorganismo. De esta forma, las proteínas no esenciales que requieran magnesio para su activación, entre ellas la HK AbrA1 y el RR AbrA2, podrían verse limitadas por este catión y no ser funcionales. Aunque por el momento tampoco se puede descartar que el magnesio constituya una de las señales activadoras. Por otro lado, se ha descrito una relación entre el hierro y la síntesis de ACT, en la que *S. coelicolor* presenta un aumento de este antibiótico en ausencia de hierro en medio mínimo (Coisne *et al.*, 1999). En este caso los TCSs no requieren hierro para su activación, lo cual apunta a que el sistema AbrA1/A2 podría estar mediando esa relación hierro-ACT. El planteamiento propuesto sería el más simple pero también podría tratarse de una conexión entre distintos TCSs como ocurre con el TCS PhoP/Q y el sistema PmrA/B de *Salmonella enterica*, donde la HK PhoQ que siente una bajada de magnesio es necesaria para la activación de los genes diana de PmrB que a su vez necesita activarse por respuesta a hierro (Mitrophanov y Groisman, 2008). Actualmente no se puede descartar ninguna de las dos hipótesis. Al ir eliminando los distintos componentes del NMMP, se observó que tanto la falta de zinc como de casaminoácidos inhibía la síntesis de ACT en las dos cepas, wt y $\Delta abrA1/A2$. En el trabajo de Hesketh y colaboradores (Hesketh *et al.*, 2009) se hizo un estudio detallado de la dependencia de zinc en la producción de ACT en un medio limitante, siendo óptima la síntesis del antibiótico a una concentración entre 3,5 y 175 μM . Se cree que es debido a que el zinc actúa como cofactor de algunas proteínas esenciales para la síntesis de ACT, como la enzima ciclasa/dehidratasa (SCO5090) pero aún no se ha demostrado. Por otro lado, la inhibición de la síntesis de ACT en ausencia de casaminoácidos parece coherente ya que algunos de ellos son componentes básicos de los precursores de este antibiótico (ej. leucina, isoleucina y valina) (Sprusansky *et al.*, 2005). Todo este planteamiento queda plasmado en la figura D.1.

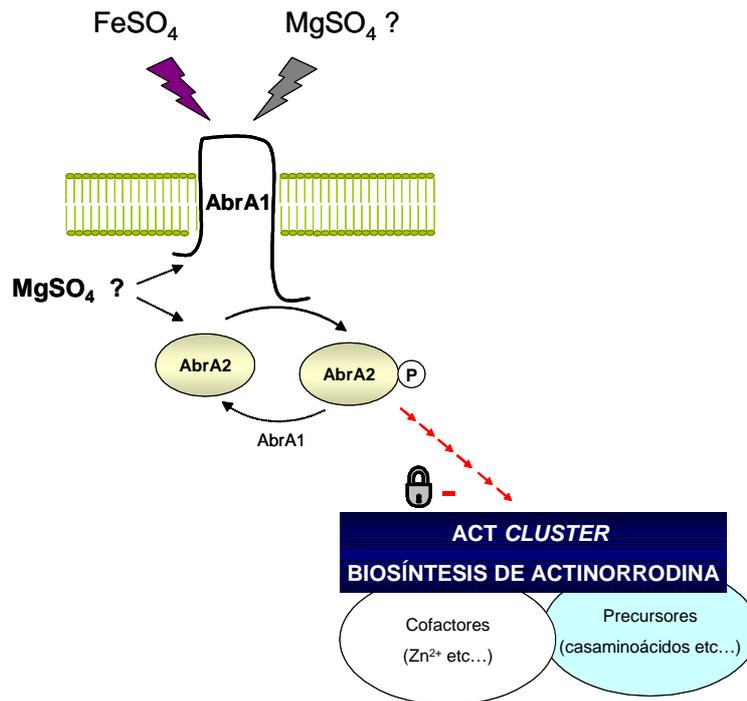


Figura D.1. Representación esquemática de la hipótesis de actuación del sistema AbrA1/A2.

Frente a la hipótesis expuesta, los resultados del análisis transcriptómico de las cepas wt y $\Delta\text{abrA1/A2}$ llevado a cabo en medio NMMP no dejaron entrever variaciones en la expresión de genes relacionados con el metabolismo/homeostasis del hierro o el magnesio, por lo que no hay datos de otros experimentos que apoyen lo anteriormente expuesto. Lo que sí se puso de manifiesto en los resultados de los *microarrays*, es que el mutante $\Delta\text{abrA1/A2}$ presentaba una considerable subexpresión de dos genes codificantes de proteínas de unión a calcio: *SCO0141* y *SCO2435*. Desafortunadamente se desconoce hasta la fecha si son dianas directamente controladas por el RR AbrA2, ya que aunque los EMSA dieron negativos al enfrentar los promotores de estos genes a la proteína $\text{AbrA2}^{\text{DBD}}$ es muy probable que se deba a una inadecuada conformación de la proteína no apta para la unirse al DNA tal y como se discutirá más adelante.

Los SCOs *0141* y *2435* codifican dos proteínas no caracterizadas actualmente, no obstante, la codificada por el *SCO0141* denominada CabE, contiene 4 motivos de unión a calcio *EF-hands* y se considera homóloga de CabC (*SCO7647*). La disponibilidad de calcio en las células se ha relacionado firmemente con alteraciones en el ciclo de desarrollo en distintas especies de *Streptomyces* (Natsume *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 2008) en los que un aumento intracelular en iones calcio se traduce en una aceleración de la diferenciación. En *S. coelicolor* una de las proteínas que controlan la concentración intracelular de este catión, es CabC. El mutante de delección ΔcabC cuenta con una mayor concentración de Ca^{2+} intracelular y tiene un fenotipo de aceleración de la diferenciación que es similar al del mutante $\Delta\text{abrA1/A2}$. Aunque no hay prueba

de ello, CabE (codificada por el *SCO0141*) podría tener un papel del control del calcio intracelular similar a CabC, de forma que ante un descenso de esta proteína en el mutante $\Delta abrA1/A2$, el Ca^{2+} intracelular aumentaría y el proceso de diferenciación se aceleraría. Prueba molecular de esta aceleración de la diferenciación son los genes *chpA* y *rdlB* sobreexpresados en la cepa mutante a las 50 horas. No obstante, también se ha descrito que concentraciones crecientes de Ca^{2+} repercuten negativamente sobre la producción de actinorrodina (Abbas y Edwards, 1989) por lo que ambos efectos parecen contradictorios.

Respecto a los otros dos antibióticos, CDA y RED, no hay evidencias moleculares que esclarezcan su relación con el TCS *AbrA1/A2*.

1.2. SISTEMA *AbrC1/C2/C3*

El sistema *AbrC1/C2/C3* es un TCS poco habitual ya que está formado por dos HKs y un RR y además sus genes no están constituyendo una unidad transcripcional. Es el único TCS presente en *S. coelicolor* formado por tres genes, no obstante, existen más sistemas complejos formados por más de dos genes en otros microorganismos, como el sistema *redCDEF* de *Myxococcus xanthus* constituido por dos HKs y dos RRs (Jagadeesan *et al.*, 2009). Otra característica destacable del sistema *AbrC1/C2/C3* es su alta conservación como tal en otros *Streptomyces* y una alta conservación de *AbrC3* (70 %) en otros géneros de actinomicetos como *Frankia*, por lo que se cree que debe tener un papel relevante en la fisiología de estos microorganismos.

Con todos los resultados disponibles hasta la fecha, se ha comprobado que el efecto de este sistema sobre la producción de actinorrodina es dependiente de medio de cultivo y de la dosis de los genes componentes del TCS. Estas afirmaciones se apoyan en el efecto activador sobre la síntesis de ACT cuando todo el sistema se encuentra en un número de copias moderado (5-10 copias) y en su efecto inhibitor cuando se deleciona del genoma o incluso una inhibición más drástica cuando el número de copias de los genes es elevado (70-100 copias). El hecho de que la delección y la sobreexpresión, entendiendo esta última por un aumento elevado en el número de copias de los genes, tengan efectos similares, se ha descrito en otros estudios (Scaramozzino *et al.*, 2009), donde la sobreexpresión de una HK tiene el mismo fenotipo que su delección por un desequilibrio en su actividad dual quinasa-fosfatasa. Aunque la situación de *AbrC1/C2/C3* no es directamente comparable, da una idea del complejo comportamiento de estas proteínas.

Los resultados sugieren que el comportamiento original del sistema se altera cuando está presente en un elevado número de copias. Esta alteración podría ser consecuencia de cambios en las actividades enzimáticas de las HKs y/o probablemente de nexos con otras rutas de señalización. En este último caso podrían provocarse interacciones entre las HKs del sistema con otros RRs,

previsibles, por ejemplo la fosforilación del RR huérfano SCO2281 ó desconocidas, hecho que finalmente se traduce en una represión total de la producción de antibióticos.

Respecto a la relación del sistema *AbrC1/C2/C3* con la producción de los antibióticos RED y CDA, no se puede afirmar que la disminución en su producción observada en el mutante nulo $\Delta abrC1/C2/C3$ no se deba a efectos polares de la mutación, puesto que no ha sido posible su medición en las cepas revertientes. Sin embargo, el hecho de que su presencia, tanto en alto como en bajo número de copias, disminuya la producción de estos antibióticos en la cepa silvestre, apoya experimentalmente que el sistema *AbrC1/C2/C3* está también regulando la biosíntesis del RED y del CDA, y que el efecto observado en la delección no es debido a otras causas colaterales.

El efecto del sistema completo *AbrC1/C2/C3* tiene un efecto positivo en diferenciación. Así, el mutante de delección presenta un retraso en el desarrollo morfológico (dependiente de medio) y la presencia del TCS, en medio o elevado número de copias, origina cepas con la diferenciación acelerada. Sin embargo, este efecto positivo cesa cuando se altera la proporción génica del sistema, es decir, cuando se sobreexpresa únicamente el RR sin modificar la dosis de sus quinasas. En este caso el efecto sobre diferenciación es negativo. No obstante, no es un defecto aislado en desarrollo morfológico si no que va acompañado de un menor crecimiento de las colonias, por lo que no se puede descartar que sea un efecto colateral del problema de crecimiento.

Por otra parte, el efecto dañino causado por la sobreproducción del RR *AbrC3* es dependiente de sus HKs asociadas, *AbrC1* y *AbrC2*, pero es totalmente opuesto al observado con la sobreproducción de *AbrA2*. Prueba de ello es que la alteración en crecimiento y diferenciación se minimiza considerablemente cuando se realiza la sobreexpresión del gen *abrC3* sobre el mutante que carece de todo el sistema. Esto apunta a que en un mutante $\Delta abrC1/C2/C3$ con exceso de *AbrC3*, la proporción de RR fosforilado y activo es mucho más baja que en la cepa wt, donde las HKs estarán llevando a cabo la activación de la mayor parte del RR. Además, el fenotipo de toxicidad que presenta la sobreexpresión del RR *abrC3* bajo el control del promotor de la xilanasas se cree que es parcialmente dependiente de la producción de antibióticos. Esto se ve apoyado que en las cepas no productoras de actinorrodina *S. coelicolor* M511 o de undecilprodigiosina *S. coelicolor* M510, la deficiencia en crecimiento no es tan acusada como en la cepa M145. Por todo esto se cree que el control de la diferenciación y de la producción de antibióticos por parte de este sistema sigue rutas de señalización independientes.

Las evidencias moleculares que se relacionan con las visibles alteraciones en el metabolismo secundario y la diferenciación son escasas. Se puede corroborar que el efecto final sobre la producción de ACT y CDA se lleva a cabo a través de los genes reguladores específicos de ruta por la tendencia de los *microarrays* y la posterior comprobación por las RT-PCRs. Además se podría relacionar la ausencia del sistema con una alteración en la traducción de proteínas, no obstante, este tema habría que estudiarlo con más detenimiento.

Los pocos resultados ofrecidos por los *microarrays* no han resultado esclarecedores de las rutas de señalización en las que se ven implicados estos dos sistemas de dos componentes. Estos escasos resultados se atribuyen a varios motivos: (1) la necesidad de incrementar el número de réplicas en los experimentos debido a la enorme variabilidad asociada al género *Streptomyces* en particular y (2) la limitación de las condiciones estudiadas en el experimento, solamente dos tiempos de recogida de muestras, mientras que en otros estudios se han ido cogiendo muestras a lo largo del tiempo y se ha hecho un seguimiento más detallado de la progresión transcriptómica (Huang, 2005).

2. FOSFORILACIÓN Y ACTIVACIÓN DE AbrA1/A2 y AbrC1/C2/C3 *IN VITRO*

2.1. FOSFORILACIÓN DE LOS RRs AbrA2 Y AbrC3

En la mayoría de los mecanismos de actuación de los TCSs, la fosforilación de los RRs es una forma de favorecer las interacciones intra e inter-moleculares (dimerización), para dejar expuesto el dominio efector (DBD) y estabilizar la nueva conformación del RR. Una forma de conseguir el mencionado objetivo es fosforilar *in vitro* los RRs mediante distintas moléculas donadoras de fosfato (Lukat *et al.*, 1992).

Los RRs en estudio en este trabajo, AbrA2 y AbrC3, no se han fosforilado con fosfodadores de bajo peso molecular acetilfosfato y carbamoilfosfato. En ocasiones la ausencia de transferencia de fosfato se debe a que los RRs no pueden utilizar como sustratos moléculas con enlaces tipo acilfosfato (enlaces éster CO-PO₃) pero sí fosfodadores con enlace tipo fosforamidato (NH₂-PO₃), como ocurre en Spo0F, un RR de *Bacillus subtilis* (Zapf *et al.*, 1996). En este caso en particular, de acuerdo con los resultados expuestos en la memoria se ha comprobado que los RRs AbrA2 y AbrC3 tampoco se fosforilan con sales de fosforamidato. También se ha demostrado que la fosforilación de los RRs no es impedida por interacciones intramoleculares comunes en este tipo de proteínas modulares (Gao y Stock, 2009), ya que las variantes truncadas equivalentes al dominio receptor (REC), tampoco se fosforilan con estos fosfodadores. A pesar de la cantidad de RRs que sí son fosforilados por los fosfodadores mencionados (Ejs: AbsA1 (McKenzie *et al.*, 2007), Spo0F (Zapf *et al.*, 1996), MtrA (Friedland *et al.*, 2007) etc...), los resultados obtenidos constituyen una evidencia más de que a pesar de las secuencias y estructuras conservadas de los RRs, cada proteína exhibe un comportamiento específico.

Otra alternativa a obtener un RR fosforilado es construir proteínas RRs truncadas en el extremo C-t, dando como resultado dominios de unión a DNA aislados (DBD). De acuerdo con lo descrito en la literatura este tipo de truncaciones resultan frecuentemente en RRs constitutivamente activos, como NarL^{DBD} o PhoP^{DBD} (Maris *et al.*, 2002; Sola-Landa *et al.*, 2008). Sin embargo, los

resultados de esta tesis derivados de la utilización de las formas truncadas carboxilo-terminales AbrA2^{DBD} y AbrC3^{DBD} apuntan a que estas proteínas no son completamente funcionales. La falta de resultados del SELEX y de la captura en el caso del RR AbrA2^{DBD} y los resultados poco concluyentes asociados al AbrC3^{DBD}, sugieren que probablemente estas proteínas hayan perdido su capacidad para dimerizar, propia, generalmente, del extremo N-t y consecuentemente no se unan con la afinidad necesaria al DNA para detectarla mediante los experimentos realizados. Al igual que en este trabajo se han dado casos en los que las formas truncadas C-t no son activas, por ejemplo RR Tod-T de *Pseudomonas putida* que aunque es capaz de unirse al DNA no puede unirse a la RNA-polimerasa y no activa la transcripción de sus genes diana (Lacal *et al.*, 2008)

Persiguiendo la finalidad de conseguir RRs funcionales y teniendo en cuenta que las formas DBD truncadas no han resultado totalmente funcionales, se considerarán otras alternativas para conseguir RRs activos en el futuro, como por ejemplo (1) el tratamiento con trifluoruro de berilio (BeF₃⁻), el cual mimetiza un estado fosforilado y ha funcionado para varios RRs tales como NtrC, CheY, OmpR and Spo0F (Scharf, 2010) y (2) el reemplazamiento de aminoácidos clave para mimetizar la conformación de la proteína fosforilada. Por ejemplo, la sustitución del residuo fosforilable aspartato por glutamato conduce a la obtención de las formas constitutivas de los RRs CheY (Bourret *et al.*, 1990), OmpR (Lan y Igo, 1998) y NtrC (Klose *et al.*, 1993), la combinación de mutaciones puntuales dirigidas como en VirG (Gao *et al.*, 2006) y PhoB (Arribas-Bosacoma *et al.*, 2007) u otra serie de truncaciones del extremo N-t (Tapparel *et al.*, 2006). Todo ello conociendo y asumiendo que la activación de proteínas RRs requiere unos precisos requerimientos conformacionales.

2.2. CARACTERIZACIÓN DE LA TRANSFERENCIA DEL FOSFATO EN EL SISTEMA AbrC1/C2/C3

Las dos HKs del sistema AbrC1/C2/C3 contienen el conjunto de aminoácidos que definen la especificidad HK-RR prácticamente idéntico (figura D.2.), por lo que probablemente ambas se emparejan funcionalmente con el mismo RR AbrC3 contiguo en el genoma.



H-box

Figura D.2. Región DHp (dominio de dimerización y de localización de la histidina aceptora del fosfato).

En esta tesis se ha corroborado la actividad quinasa de la forma citoplásmica de las dos HKs cAbrC1 y cAbrC2 y su capacidad de autofosforilación. Además se han verificado *in vitro* que los aminoácidos histidina 214 de la HK AbrC1 y histidina 270 de la HK AbrC2 (señalados en la figura

D.2.) son los aceptores del fosfato cuando se da la autofosforilación de las HKs. También se ha probado que la HK AbrC2 es capaz de fosforilar al RR AbrC3, hecho que se ha detectado a los 5 minutos de incubación HK-RR, no obstante este estudio se continuará con incubaciones HK-RR a tiempos más cortos para determinar la eficiencia en la reacción de fosfotransferencia. Los resultados de transferencia de fosfato con la otra HK del sistema, AbrC1, no han resultado esclarecedores, ya que la no visualización de RR fosforilado no implica que no se esté dando transferencia del fosfato. Como se ha demostrado en otros TCSs (Casino *et al.*, 2007), esto puede ser debido a la alta velocidad de defosforilación del RR, ya sea intrínseca (del propio RR) o resultado de la actividad fosfatasa de la HK. En esta ocasión no se puede discernir entre ambas opciones por no poder llevar a cabo reacciones de defosforilación al no haber RR fosforilado.

Entre los diferentes TCSs presentes en el genoma de *S. coelicolor* hay 13 RRs huérfanos de los cuales 7 contienen bolsillo ácido con los residuos aminoácidos característicos de fosforilación y que, salvo excepciones, serán fosforilados por HKs. Entre ellos el codificado por el SCO2281 comparte una gran similitud con el RR AbrC3 (71 %) y se ha comprobado en esta tesis que es capaz de fosforilarse mediante fosfotransferencia cuando se incuba con la HK AbrC2 fosforilada. La fosforilación del RR se detecta a los 30 minutos pero no a los 5 minutos por lo que la cinética de la reacción es aparentemente más lenta que en la transferencia HK_cAbrC2 - RR AbrC3. Actualmente, es ampliamente discutido el significado biológico de transferencias con cinéticas lentas ya que una reacción catalítica ocurrirá siempre con el sustrato más adecuado (Casino *et al.*, 2007; Groban *et al.*, 2009). No obstante, es difícil poner límite al significado biológico de estas reacciones “lentas” de fosfotransferencia en base a resultados *in vitro*, ya que existen ejemplos de sistemas naturales, como TcrX/Y de *Mycobacterium tuberculosis* (Bhattacharya *et al.*), en el cuál no se aprecia fosfotransferencia hasta las 2 horas de incubación. En principio cabe pensar que las cinéticas lentas de fosforilación no estarán propiciadas *in vivo* a menos que no se encuentre otro sustrato mejor. Sin embargo, en situaciones donde un miembro del sistema, ya sea HK o RR, no está presente o donde se ha roto el equilibrio en su proporción, no se descarta que ocurran este tipo de reacciones cruzadas. De hecho el caso de que el sistema *abrC1/C2/C3* no esté constituyendo una unidad transcripcional sugiere que los constituyentes del mismo pueden tener una regulación de su expresión independiente y que posiblemente se den situaciones en las que se esté expresando unos componentes del sistema pero no otros, lo que podría propiciar activaciones cruzadas, por ejemplo del RR huérfano SCO2281. Actualmente se desconoce si también se da transferencia del fosfato entre la HK AbrC1 y el RR SCO2281 pero no se descarta esta posibilidad, por lo que se continuará con estos experimentos.

3. REGULADOR AtrA

En este trabajo se ha ampliado el conocimiento sobre las secuencias consenso de unión del factor de transcripción AtrA. Se ha definido una secuencia de unión “artificial” que concuerda casi perfectamente con la secuencia de unión natural definida por *footprinting* (Uguru *et al.*, 2005). La disposición de una secuencia consenso de unión de AtrA, definida por los resultados del SELEX junto con las secuencias previamente conocidas de unión al promotor del *actII-ORF4*, han permitido realizar una búsqueda de las mencionadas secuencias consenso en todo el genoma de *S. coelicolor*. De esta forma se ha contribuido a ampliar el conocimiento de la repercusión de este factor de transcripción, no limitado a la regulación específica de la actinorrodina como ya se ha podido intuir en el trabajo de (Nothhaft *et al.*, 2010). Además se han identificado en esta tesis dianas desconocidas hasta la fecha, por ejemplo el gen de una proteína de secreción (SCO5461), una región intergénica de una oxidorreductasa (SCO2286) y una fosfatasa alcalina (SCO2287), una región intergénica que precede dos genes divergentes uno codificante de una proteína de secreción (SCO1714) y el otro de una homogentisato 1,2-dioxigenasa que interviene en el metabolismo de la tirosina y degradación del estireno (SCO1715), el gen de una proteína de exporte (SCO5502) y de un RR (SCO7648). Aunque se requieren estudios de afinidad en la unión de AtrA a estos promotores y conocer por *footprinting* las regiones exactas de unión, los resultados sugieren que este regulador puede unirse a secuencias degeneradas de las previamente definidas por *footprinting* y SELEX. Por tanto los resultados de AtrA obtenidos en este trabajo han contribuido en la ampliación del conocimiento de una secuencia consenso de unión, así como en el hallazgo de varias dianas moleculares que se escapan al patrón tan definido de la secuencia consenso identificada.

En resumen, la identificación de dos nuevos sistemas reguladores del metabolismo secundario en esta tesis doctoral, ha constituido el inicio de un trabajo dirigido hacia la ampliación del conocimiento sobre la compleja regulación de la producción de antibióticos en microorganismos del género *Streptomyces*. Uno de los objetivos futuros es disponer de cepas mejoradas para la producción heteróloga de metabolitos secundarios de interés. Este objetivo, con expectativas aplicadas, ya se está poniendo en práctica por otros investigadores, como McKenzie y colaboradores, los cuales utilizando cepas con alelos mutados de la HK AbsA1 han conseguido una mejora en la activación del *cluster* biosintético del antibiótico pulvoricina en *S. coelicolor* (McKenzie *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

- 1.- El sistema de dos componentes AbrA1/A2, codificado por los SCOs 1744 y 1745, es un regulador pleiotrópico cuya acción produce una reducción en la biosíntesis de antibióticos y en la diferenciación morfológica en *Streptomyces coelicolor* M145. Los efectos positivos exhibidos por el mutante $\Delta abrA1/A2$ sobre ambos procesos, se deben exclusivamente a la delección del sistema y no a efectos polares derivados de la mutación.
- 2.- El sistema de dos componentes AbrC1/C2/C3 codificado por los SCOs 4596, 4597 y 4598 es un regulador pleiotrópico cuya acción produce un efecto positivo en la biosíntesis de antibióticos y en la diferenciación morfológica en *Streptomyces coelicolor* M145. Los efectos negativos exhibidos por el mutante del sistema de dos componentes $\Delta abrC1/C2/C3$ sobre la biosíntesis de actinorrodina así como sobre la diferenciación morfológica se deben exclusivamente a su delección y no a efectos polares derivados de la mutación.
- 3.- El efecto causado por el sistema de dos componentes AbrC1/C2/C3 sobre la diferenciación morfológica y sobre la biosíntesis de actinorrodina se produce a través de rutas independientes, como demuestra el hecho de que la variación en la dosis génica del sistema produce efectos diferentes en ambos procesos.
- 4.- La sobreexpresión de los reguladores de respuesta *abrA2* y *abrC3* produce un efecto deletéreo sobre el crecimiento y sobre la diferenciación, dependiente de la presencia de las histidín quinasa asociadas a cada regulador.
- 5.- Las variaciones en el transcriptoma entre las cepas mutantes $\Delta abrA1/A2$, $\Delta abrC1/C2/C3$ y la cepa silvestre M145 son reducidas a pesar de las diferencias fenotípicas existentes en ambos mutantes.
- 6.- Los RRs AbrA2 y AbrC3 no son fosforilados por los fosfodadores acetilfosfato, carbamoilfosfato y fosforamidato. Esta incapacidad de fosforilación no es debida a una interacción intramolecular de sus dominios.
- 7.- La histidina 214 de cAbrC1 y la histidina 270 de cAbrC2 son los sitios específicos de autofosforilación de estas proteínas histidín quinasa.
- 8.- La histidín quinasa cAbrC2 es capaz de transferir *in vitro* el fosfato a su regulador de respuesta asociado, AbrC3 y al regulador huérfano SCO2281.
- 9.- Los promotores de los SCOs: 5461, 2286/87, 1715, 7648 y 5502 constituyen nuevas dianas del regulador transcripcional AtrA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Los microorganismos utilizados en el presente trabajo se detallan en la **Tabla M.1**:

Tabla M.1. Cepas de microorganismos utilizadas.

| CEPA | GENOTIPO | REFERENCIA |
|-----------------------------|---|--------------------------------|
| <i>S. coelicolor</i> M145 | SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ | (Kieser <i>et al.</i> , 2000) |
| <i>S. coelicolor</i> M510 | SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ $\Delta redD$ | (Floriano y Bibb, 1996) |
| <i>S. coelicolor</i> M511 | SCP1 ⁻ SCP2 ⁻ $\Delta actII-ORF4$ | (Floriano y Bibb, 1996) |
| <i>S. lividans</i> 1326 | SLP1 ⁺ SLP2 ⁺ | (Hopwood <i>et al.</i> , 1983) |
| <i>E. coli</i> BW25113 | Derivada de <i>E. coli</i> K12: $\Delta araBAD$, $\Delta rhaBAD$ | (Datsenko y Wanner, 2000) |
| <i>E. coli</i> ET12567 | <i>Dam</i> , <i>dcm</i> , <i>hsdS</i> , <i>cat</i> , <i>tet</i> | (MacNeil <i>et al.</i> , 1992) |
| <i>E. coli</i> BT340 | DH5 α con pCP20 | (Datsenko y Wanner, 2000) |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | <i>F</i> ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) gal λ (DE3) | (Studier y Moffatt, 1986) |
| <i>E. coli</i> DH5 α | <i>F</i> ⁻ , $\phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYAargF)U169$, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁺), <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi</i> -1, <i>gyrA</i> , <i>relA1</i> | (Hanahan, 1983) |
| <i>B. subtilis</i> | cepa silvestre | CECT 4522 |

Tabla M.2. Cepas de microorganismos generadas en este trabajo.

| CEPA | GENOTIPO | REFERENCIA |
|---|---|--------------|
| <i>S. coelicolor</i> Δ abrA1/A2 | Derivada de <i>S.coelicolor</i> M145: Δ SCO1744/1745 | Este trabajo |
| <i>S. coelicolor</i> Δ abrC1/C2/C3 | Derivada de <i>S.coelicolor</i> M145: Δ SCO4596/4597/4598 | |
| <i>S. coelicolor</i> M145.pKC796Hyg | M145 con pKC796Hyg insertado en el genoma | |
| <i>S. coelicolor</i> Δ abrA1/A2.pHabrA1A2 | Δ abrA1/A2 con pHabrA1A2 insertado en el genoma | |
| <i>S. coelicolor</i> Δ abrC1/C2/C3.pHabrC1C2C3 | Δ abrC1/C2/C3 con pHabrC1C2C3 insertado en el genoma | |
| <i>S. coelicolor</i> M145.pN702GEM3 | M145 con pN702GEM3 | |
| <i>S. coelicolor</i> Δ abrA1/A2.pN702GEM3 | Δ abrA1/A2 con pN702GEM3 | |
| <i>S. coelicolor</i> Δ abrA1/A2.pNabrA1A2 | Δ abrA1/A2 con pNabrA1A2 | |
| <i>S. coelicolor</i> Δ abrC1/C2/C3.pN702GEM3 | Δ abrC1/C2/C3 con pN702GEM3 | |
| <i>S. coelicolor</i> M145.pNabrC1C2C3 | M145 con pNabrC1C2C3 | |
| <i>S. coelicolor</i> Δ abrC1/C2/C3 pNabrC1C2C3 | Δ abrC1/C2/C3 con pNabrC1C2C3 | |
| <i>S. coelicolor</i> M145.pHJL401 | M145 con pHJL401 | |
| <i>S. coelicolor</i> M145.pHJLabrC1C2C3 | M145 con pHJLabrC1C2C3 | |
| <i>S. coelicolor</i> Δ abrC1/C2/C3.pHJL401 | Δ abrC1/C2/C3 con pHJL401 | |
| <i>S. coelicolor</i> Δ abrC1/C2/C3 pHJLabrC1C2C3 | Δ abrC1/C2/C3 con pHJLabrC1C2C3 | |
| <i>S. coelicolor</i> M145.pIJ702 | M145 con pIJ702 | |
| <i>S. coelicolor</i> M145.pTXabrA2 | M145 con pTXabrA2 | |
| <i>S. coelicolor</i> Δ abrA1/A2.pIJ702 | Δ abrA1/A2 con pIJ702 | |
| <i>S. coelicolor</i> Δ abrA1/A2.pTXabrA2 | Δ abrA1/A2 con pTXabrA2 | |
| <i>S. coelicolor</i> M145.pNXabrC3 | M145 con pNXabrC3 | |
| Δ abrC1/C2/C3.pNXabrC3 | Δ abrC1/C2/C3 con pNXabrC3 | |
| <i>S. coelicolor</i> M510.pN702GEM3 | M510 con pN702GEM3 | |
| <i>S. coelicolor</i> M511.pNXabrC3 | M511 con pNXabrC3 | |
| <i>S. coelicolor</i> M511.pN702GEM3 | M511 con pN702GEM3 | |
| <i>S. coelicolor</i> M511.pNXabrC3 | M511 con pNXabrC3 | |
| <i>S. lividans</i> 1326.pN702GEM3 | <i>S. lividans</i> 1326 con pN702GEM3 | |
| <i>S. lividans</i> 1326.pNXabrC3 | <i>S. lividans</i> 1326 con pNXabrC3 | |
| <i>S. lividans</i> 1326.pNabrC1/C2/C3 | <i>S. lividans</i> 1326 con pNabrC1C2C3 | |

2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS

2.1. MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en el autoclave.

2.1.1. Medios para *Escherichia coli*

- Medio **LB** (Sambrook *et al.*, 1989): bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l. pH 7.5. Este medio se empleó tanto en forma líquida como sólida añadiendo agar 2 %. De uso general para el crecimiento de *E. coli*.
- Medio **SOB** (Sambrook *et al.*, 1989): bacto triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 0,5 g/l, KCl 2,5 mM. pH 7.0. Antes de usar añadir MgCl₂ 10 mM. Utilizado para obtener mayor masa celular.

2.1.2. Medios para *Streptomyces*

- Medio **TSB** (Hopwood *et al.*, 1985a): peptona de caseína 17 g/l, peptona de soja 3 g/l, NaCl 5g/l, K₂HPO₄ 5 g/l, dextrosa 2,5 g/l. Medio rico utilizado para crecer cultivos y aislar posteriormente el DNA.
- Medio **YES**: extracto de levadura 10 g/l, sacarosa 10,3 %. Suplementado con glucosa 0,5 %, glicina 0,5 % y MgCl₂ 5 mM. Medio utilizado para la obtención de protoplastos.
- Medio **R2YE (R5)** (Kieser *et al.*, 2000): sacarosa 103 g/l, K₂SO₄ 0,25 g/l, Cl₂Mg.6H₂O 10 g/l, glucosa 10 g/l, casaminoácidos 0,1 g/l, elementos traza* 2 ml, extracto de levadura 5 g/l, TES 5,73 g/l, agar 2 %, pH 7.2. Justo antes de utilizarlo, añadir por cada 100 ml: KH₂PO₄ 0,5 %, 1 ml; CaCl₂.2 H₂O 5 M, 0,4 ml; L-prolina 20 %, 1,5 ml.
*Elementos traza (en un litro de agua): ZnCl₂ 40 mg, FeCl₃.6H₂O 200 mg, CuCl₂.2H₂O 10 mg, MnCl₂.4H₂O 10 mg, Na₂B₄O₇.10H₂O 10 mg y (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O 10 mg. Medio sólido de uso general y para la regeneración de protoplastos.
- Medio **PGA** (Coco *et al.*, 1991): bacto peptona 5 g/l, pH 7. Una vez autoclavado añadir glicerol 1 %. Este medio se empleó tanto en forma líquida como sólida añadiendo agar 2 %. Medio para la visualización y cuantificación de undecilprodigiosina.
- Medio **SFM (MSA)** (Kieser *et al.*, 2000): manitol 20 g/l, harina de soja 20 g/l, agar 2 %. Medio de esporulación.
- Medio **YEPD** (Rose *et al.*, 1990): extracto de levadura 10 g/l, glucosa 10 g/l, peptona 20 g/l, agar 2 %. Medio para el recuento de esporas viables.
- Medio **AN** (Hopwood, 1985a): extracto de levadura 2 g/l, extracto de carne 1 g/l, peptona 5 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7.4. Este medio se empleó tanto en forma líquida como sólida, añadiendo agar 2 %, para ver y cuantificar producción de actinorrodina. También se empleó en forma

semisólida (**agar nutritivo blando**) añadiendo agar 0,5 %. Este última variante se utilizó para el inóculo de *Bacillus subtilis* en el ensayo de actividad CDA.

- Medio **NMMP** (Hopwood *et al.*, 1985a): $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 2g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,6 g/l, casaminoácidos 5 g/l, elementos traza* 1 ml/l, pH 7.2. Después de autoclavar, añadir: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M pH 6,8 15ml/l, glucosa 0,5 %. Este medio se empleó tanto en forma líquida como sólida añadiendo agar 2 %. Medio utilizado para ver y cuantificar producción de actinorrodina.

*Elementos traza (en un litro de agua): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1g, CaCl_2 1g.

2.1.3. Aditivos para medios de cultivo

Los antibióticos utilizados y las concentraciones empleadas para la selección o mantenimiento de los plásmidos empleados se recogen en la siguiente tabla:

Tabla M.3. Concentraciones de los antibióticos utilizados en este trabajo.

| Antibiótico solución stock (mg/ml) | Concentración final ($\mu\text{g/ml}$) <i>E.coli</i> | Concentración final ($\mu\text{g/ml}$) <i>Streptomyces</i> |
|------------------------------------|--|--|
| Ampicilina (amp: 100) | 100 | - |
| Kanamicina (kan: 50) | 50 | - |
| Apramicina (apra: 200) | 50 | 10 |
| Neomicina (neo: 50) | 50 | 20 |
| Higromicina (hyg: 200) | 200 | 20 |
| Cloranfenicol (cln: 34) | 25 | - |
| Tioestreptona (tsr: 50) | - | 10 |

- X-Gal (Sigma): Se preparó una solución stock a 25 mg/ml en dimetilformamida. La concentración final utilizada fue de 40 $\mu\text{g/ml}$ para los experimentos de selección blanco-azul de clones de *E. coli*.
- IPTG (Sigma): La solución stock se preparó a 1 M en agua. Para los experimentos de selección blanco-azul de clones de *E. coli* se utilizó a una concentración final de 100 μM . Para la inducción de la expresión de proteínas recombinantes se utilizó a una concentración final de 1 mM.

2.2. CONDICIONES DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Los cultivos de *Streptomyces* en medio líquido se llevaron a cabo en matraces de vidrio indentados ocupando 1/10 del volumen total del matraz con medio de cultivo. El inóculo se hizo en todos los casos con suspensiones de esporas (e) cuantificadas. Normalmente la concentración final de esporas por matraz fue de 4×10^6 e/ml. La incubación se realizó a 28° C y a 200 r.p.m. en un incubador orbital (Adolf Kuhner).

Los cultivos sólidos de *Streptomyces* se incubaron en placas Petri en estufa a 30° C. Las condiciones de cultivo para *E. coli* fueron las descritas por Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989).

Las cepas de *E. coli* se conservaron en glicerol al 20 % y congeladas a -80° C. Las diferentes cepas de *Streptomyces* utilizadas en el presente trabajo se mantuvieron en forma de suspensiones de esporas congeladas en glicerol al 20 % a -20° C.

3. VECTORES UTILIZADOS

Todos los fragmentos de PCR utilizados en las clonaciones fueron previamente secuenciados para comprobar la ausencia de mutaciones.

Los plásmidos integrativos **pHabrA1/A2** y **pHabrC1C2C3** utilizados en los experimentos de complementación son derivados del plásmido pKC796Hyg (multicopia en *E. coli* e integrativo en *Streptomyces*) con el sitio de integración del fago ϕ C31. A continuación se detallan los diferentes pasos seguidos en la obtención de dichos plásmidos.

El plásmido **pHabrA1/A2** se obtuvo clonando en *E. coli* DH5 α la pareja de genes *abrA1/A2*, obtenida por PCR utilizando los oligonucleótidos AY-035 (añade un sitio *NdeI*) y AY-036 (añade un sitio *XhoI*), bajo la expresión de su propio promotor (región aguas arriba del gen *SCO1742*), también obtenido como producto de una reacción de PCR realizada con los oligos AY-033 (añade un sitio *EcoRI*) y AY-034 (añade un sitio *NdeI*) (apéndice 1), en el plásmido bifuncional pKC796Hyg (multicopia en *E. coli* e integrativo en *Streptomyces*). Para ello se crearon dos plásmidos intermediarios. El pAY001 en el que se clonó el fragmento de PCR del promotor utilizando los sitios *NdeI* y *EcoRI* presentes en el plásmido pXHis1 utilizado como receptor (Adham *et al.*, 2001), y el pAY002 derivado del anterior reemplazando el fragmento del plásmido pAY001 *NdeI/XhoI* por el fragmento de PCR que contenía los genes *abrA1/A2* digerido con los mismos sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* (figura M.1). Por último, se clonó el fragmento *BglII/BglII* del pAY002 que contenía los dos genes con su región promotora en el plásmido pKC796Hyg, previamente digerido con *BglII* y defosforilado, obteniendo finalmente el plásmido pHabrA1A2, utilizado para la complementación del mutante *S. coelicolor* M145 Δ *abrA1/A2*.

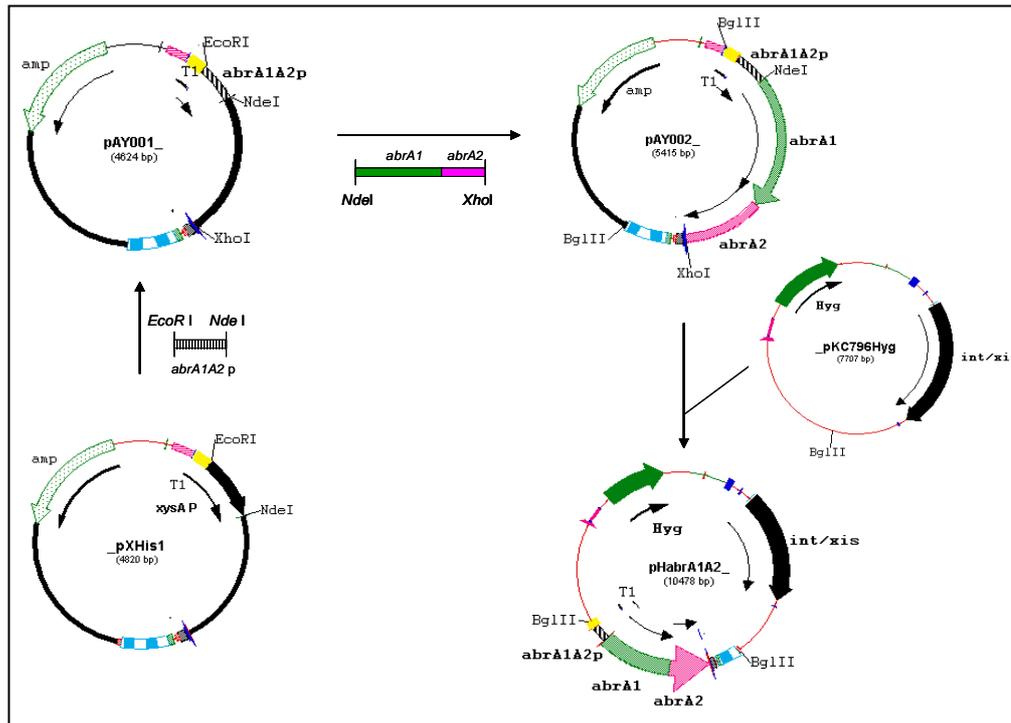


Figura M.1. Construcción del plásmido integrativo pHabrA1A2

Para obtener el plásmido integrativo **pHabrC1C2C3** se partió del plásmido multicopia bifuncional construido con anterioridad para el estudio del efecto de la sobreexpresión de estos, denominado pNabrC1C2C3 (ver figura M.4.). Este plásmido se digirió con *HindIII*, se rellenaron los extremos cohesivos con el fragmento klenow (K) de la DNA polimerasa I y se digirió de nuevo con *BglIII*. El fragmento generado se clonó en los sitios *BglIII/EcoRV* del plásmido pKC796Hyg dando lugar al plásmido final pHabrC1C2C3 (figura M.2.).

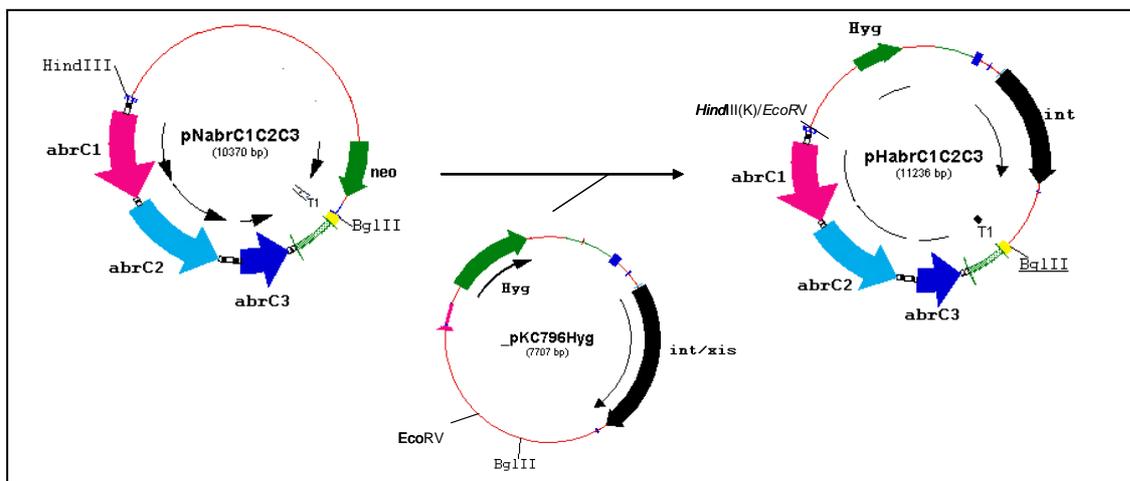


Figura M.2. Construcción del plásmido integrativo pHabrC1C2C3.

Los plásmidos multicopia utilizados para la sobreexpresión de los sistemas derivan del plásmido bifuncional multicopia pN702GEM3 de *E. coli/Streptomyces* y se obtuvieron mediante las siguientes estrategias:

Para la obtención del plásmido **pNXabrA1A2** se clonó el fragmento *NdeI/HindIII* del plásmido pAY002 en los mismos sitios de restricción del plásmido pNX24, derivado a su vez del pN702GEM3. De esta manera la expresión de los genes del sistema *abrA1/A2* quedaron bajo el promotor de la xilanasa (anotado como *xysAp*) (figura M.3.).

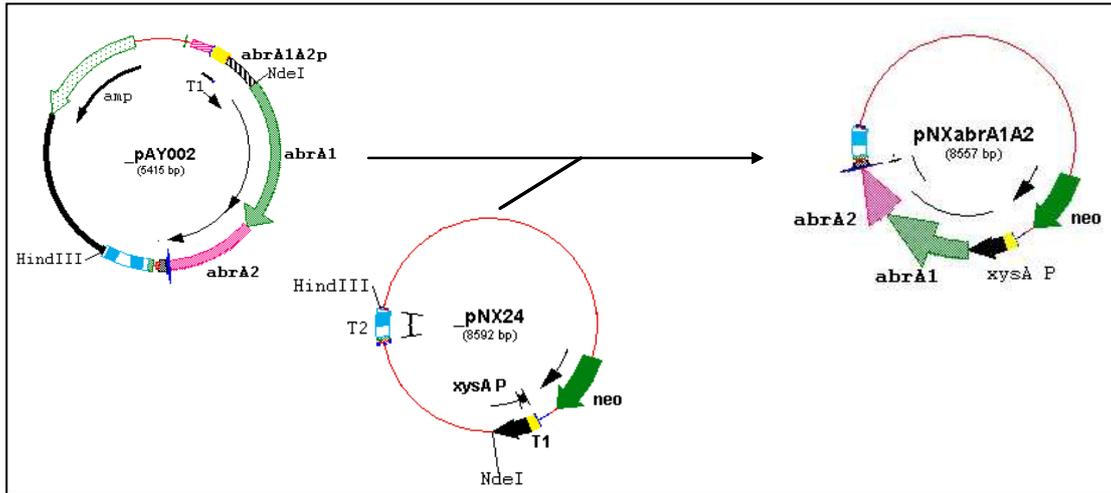


Figura M.3. Plásmidos utilizados en la construcción de pNXabrA1A2.

El plásmido **pNabrC1C2C3** se obtuvo en varios pasos. El primer intermediario denominado pSCD20 se obtuvo clonando el fragmento de DNA *BspEI/PmII* del cósmido SCD20 que contiene los tres genes de sistema con sus correspondientes regiones intergénicas en los sitios *BspEI/Ecl136II* del plásmido pHJL401. A continuación el fragmento *EcoRV/HindIII* del pSCD20 se introdujo en los sitios *EcoRI(K)/HindIII* del plásmido bifuncional pN702GEM3 y se obtuvo el plásmido de sobreexpresión del sistema *abrC1/C2/C3* (figura M.4.).

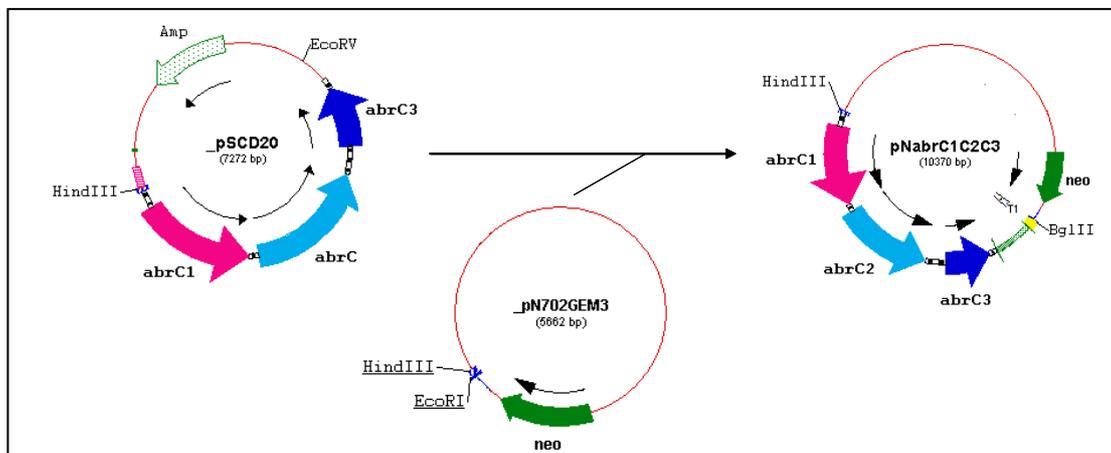


Figura M.4. Plásmidos utilizados en la construcción de pNabrC1C2C3.

Los plásmidos multicopia utilizados para la sobreexpresión del RR *abrA2* (pTXabrA2) y del RR *abrC3* (pNXabrC3) fueron derivados de los plásmidos pIJ702 (monofuncional de *Streptomyces*) y pN702GEM3 (bifuncional *E. coli-Streptomyces*), respectivamente.

El plásmido **pTXabrA2** se obtuvo en dos pasos sucesivos. En primer lugar se clonó el gen *abrA2*, amplificado en una reacción de PCR con los oligonucleótidos AY-047 (incorpora un sitio *NdeI*) e AY-048 (incorpora un sitio *XhoI*), en los sitios *NdeI/XhoI* del plásmido pXHis1 creando el plásmido intermediario pXabrA2His, donde el gen del regulador queda bajo el control del promotor *xysAp* y etiquetado con una cola de 6 histidinas. A partir de este plásmido se obtuvo el fragmento de interés mediante digestión con *BglIII* y se clonó en el vector pIJ702 previamente digerido con *BglIII* y defosforilado mediante transformación directa de la ligación en *Streptomyces* (figura M.5.).

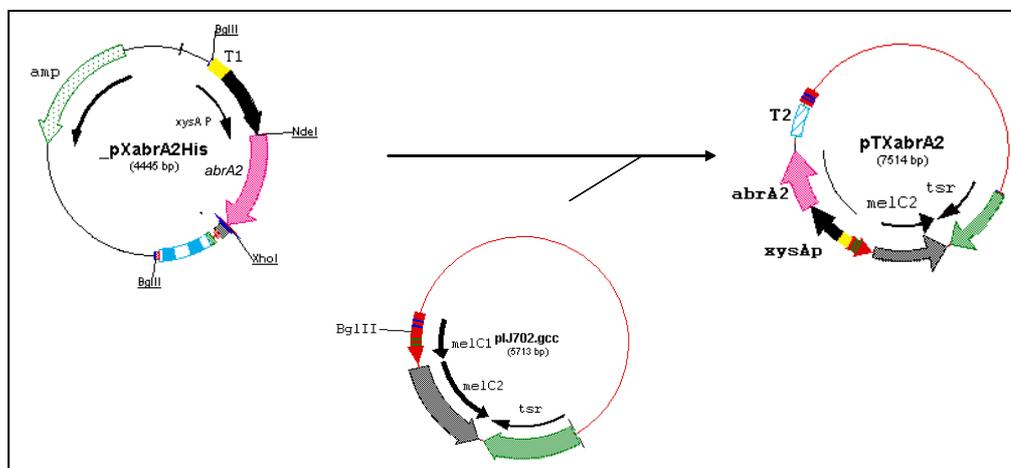


Figura M.5. Plásmidos utilizados en la construcción de pTXabrA2 (*melC1* y *melC2* son genes del operón de síntesis de melanina, *tsr*=tioestreptona).

La estrategia seguida para la obtención del plásmido **pNXabrC3** fue muy similar a la anterior. De nuevo se amplificó el fragmento de DNA de interés utilizando los oligonucleótidos SER-001 y SER-002 que introducían sitios *NdeI* y *XhoI* respectivamente y se clonó el gen en los sitios *NdeI/XhoI* del plásmido pXHis1. Digiriendo este intermediario, pXabrC3His, con *NdeI* y *HindIII* se clonó finalmente en los mismos sitios del plásmido pNX24, derivado del pN702GEM3 (figura M.6.).

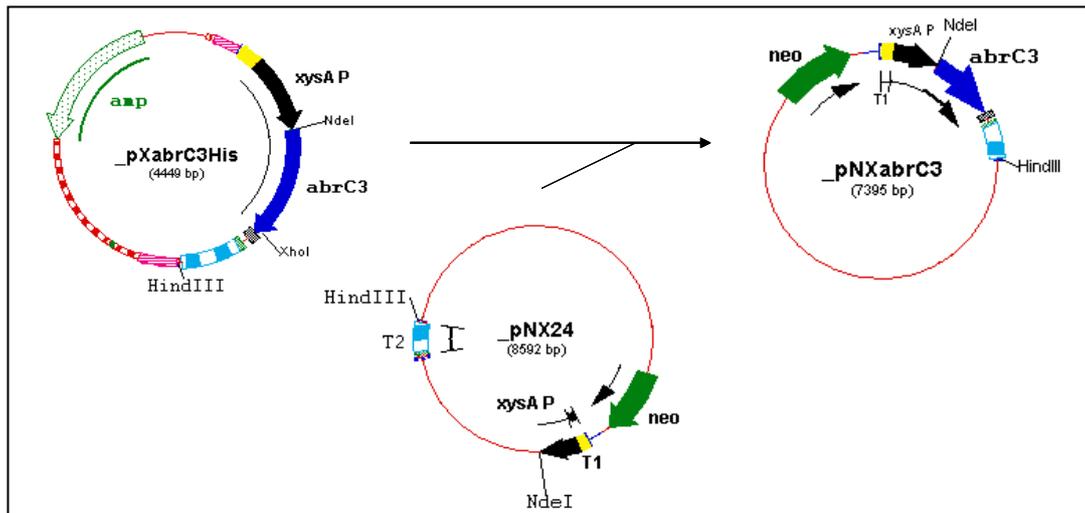


Figura M.6. Plásmidos utilizados en la construcción de pNXabrC3.

El plásmido utilizado para expresar el sistema *abrC1/C2/C3* en un número de copias moderado se llevó a cabo partiendo del plásmido bifuncional *E. coli/Streptomyces* pHJL401. Primero se digirió el DNA del plásmido pNSCD20 con *BglIII/HindIII* y el fragmento que portaba los genes de interés se clonó en los sitios con *BamHI/HindIII* del plásmido pHJL401 dando como resultado el plásmido pHJLabrC1C2C3 (figura M.7.).

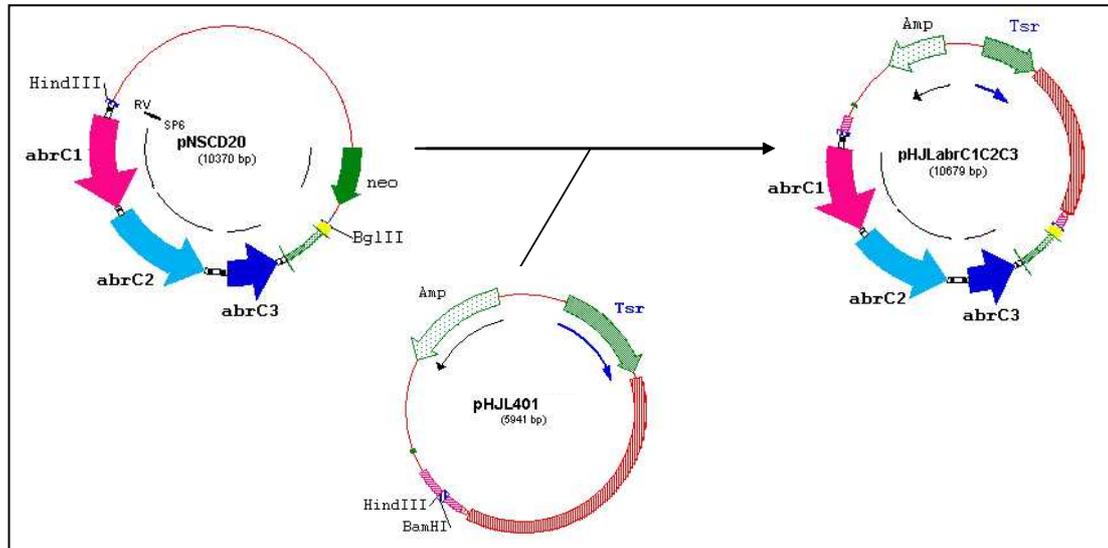


Figura M.7. Plásmidos utilizados en la construcción de pHJLabrC1C2C3.

Todos los vectores utilizados derivados del pET22(b) se obtuvieron clonando la región génica de interés, previamente amplificada por PCR con los oligonucleótidos correspondientes en cada caso (tablas de oligonucleótidos, apéndice 1), en los sitios *NdeI/XhoI* de su región *polilinker*.

A continuación se muestra una tabla-resumen de todos los vectores utilizados en este trabajo:

Tabla M.3. Vectores utilizados en este trabajo.

| VECTOR | CARACTERÍSTICAS | REFERENCIA | |
|-------------------------|--|---|----------------------------------|
| pIJ790 | λ -RED (<i>gam</i> , <i>beta</i> , <i>exo</i>), <i>cat</i> (<i>cln^R</i>), <i>araC</i> , <i>rep101^{ts}</i> | (Gust <i>et al.</i> , 2003) | |
| pIJ773 | <i>aac(3)IV</i> (<i>apra^R</i>)+ <i>oriT</i> , sitios FRT(reconocimiento de la recombinasa FLP) | (Gust <i>et al.</i> , 2003) | |
| pUZ8002 | <i>tra</i> , <i>neo</i> , RP4 | (Paget <i>et al.</i> , 1999) | |
| pCP20 | <i>flp</i> , <i>bla</i> (<i>carb^R</i>), <i>cat</i> , <i>rep101^{ts}</i> | (Cherepanov y Wackernagel, 1995) | |
| pSK+ | Promotor <i>lac</i> , <i>bla</i> , fragmento α de la β galactosidasa | Stratagene | |
| pGEMTeasy | Promotores T7 y SP6, <i>bla</i> | Promega | |
| pET22b | Promotor T7, <i>lacI</i> , etiqueta 6xHis, <i>bla</i> | Novagen | |
| pETabrA1 | Derivado del pET22b que expresa HK AbrA1 (His) ₆ | Este trabajo | |
| pET _c abrA1 | Derivado del pET22b que expresa HK _c AbrA1 (His) ₆ | | |
| pETabrA2 | Derivado del pET22b que expresa RR AbrA2 (His) ₆ | | |
| pETabrA2 ^{DBD} | Derivado del pET22b que expresa RR AbrA2 ^{DBD} (His) ₆ | | |
| pETabrB2 _N | Derivado del pET22b que expresa RR AbrB2 _N (His) ₆ | | |
| pETabrC1 | Derivado del pET22b que expresa HK AbrC1(His) ₆ | | |
| pET _c abrC1 | Derivado del pET22b que expresa HK _c AbrC1 (His) ₆ | | |
| pETabrC1 _H | Derivado del pET22b que expresa HK AbrC1 _H (His) ₆ | | |
| pETabrC2 | Derivado del pET22b que expresa HK AbrC2 (His) ₆ | | |
| pET _c abrC2 | Derivado del pET22b que expresa HK _c AbrC2 (His) ₆ | | |
| pETabrC2 _H | Derivado del pET22b que expresa HK AbrC2 _H (His) ₆ | | |
| pETabrC3 | Derivado del pET22b. que expresa RR AbrC3(His) ₆ | | |
| pETabrC3 ^{DBD} | Derivado del pET22b que expresa RR AbrC3 ^{DBD} (His) ₆ | | |
| pETabrC3 _N | Derivado del pET22b que expresa RR AbrC3 _N (His) ₆ | | |
| pET2281 | Derivado del pET22b que expresa RR SCO2281 (His) ₆ | | |
| Cósmido SCI11 | Derivado del Supercos-1: <i>bla</i> , <i>neo</i> . Genes de interés: <i>abrA2</i> y <i>abrA2</i> (SCOs 1744/45) | | (Redenbach <i>et al.</i> , 1996) |
| Cósmido SCD20 | Derivado del Supercos-1: <i>bla</i> , <i>neo</i> . Genes de interés: <i>abrC1</i> , <i>abrC2</i> y <i>abrC3</i> (SCOs 4596/97/98) | | |
| pKC796Hyg | Vector bifuncional <i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> integrativo en ϕ C31, <i>hyg</i> | (Fernández-Ábalos <i>et al.</i> , 2003) | |
| pIJ702 | Vector monofuncional <i>Streptomyces</i> de alto número de copias, <i>tsr</i> (<i>tsr^R</i>) y genes <i>mel</i> (síntesis de melanina) | (Kieser <i>et al.</i> , 1982) | |

| VECTOR | CARACTERÍSTICAS | REFERENCIA |
|---------------|--|-----------------------------|
| pN702GEM3 | Vector bifuncional <i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> , de alto número de copias, <i>neo</i> | (Díaz <i>et al.</i> , 2005) |
| pHJL401 | Vector bifuncional <i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> , de bajo número de copias, <i>bla</i> y <i>tsr</i> | (Larson y Hersherger, 1986) |
| pHabrA1A2 | Derivado del pKC796Hyg. Plásmido integrativo con los genes <i>abrA1/A2</i> clonados bajo su propio promotor | Este trabajo |
| pNXabrA1A2 | Derivado del pN702GEM3. Plásmido multicopia con los genes <i>abrA1/A2</i> clonados bajo el promotor de la xilanasa <i>xysA</i> | |
| pHabrC1C2C3 | Derivado del pKC796Hyg. Plásmido integrativo con los genes <i>abrC1/C2/C3</i> clonados bajo sus propios promotores | |
| pNabrC1C2C3 | Derivado del pN702GEM3. Plásmido multicopia con los genes <i>abrC1/C2/C3</i> clonados bajo sus propios promotores | |
| pHJLabrC1C2C3 | Derivado del pHJL401. Plásmido de bajo número de copias con los genes <i>abrC1/C2/C3</i> clonados bajo sus propios promotores | |
| pTXabrA2 | Derivado del pIJ702 que expresa el RR <i>abrA2(His)₆</i> clonado bajo el promotor <i>xysA</i> | |
| pNXabrC3 | Derivado del pN702GEM3, contiene el RR <i>abrC3(His)₆</i> clonado bajo el promotor <i>xysA</i> | |

4. MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.1. AISLAMIENTO DE DNA

4.1.1. Aislamiento de DNA plasmídico y de cósmidos de *E. coli*

La obtención de DNA plasmídico de *E. coli* se llevó a cabo siguiendo el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). Para la preparación de aquellas muestras que posteriormente fueron secuenciadas se utilizó el kit comercial de minipreps “NucleoSpinR® Plasmid” (Macherey-Nagel). La obtención del DNA de los cósmidos se realizó siguiendo el mismo método de lisis alcalina e introduciendo un paso de fenolización previo a la precipitación del DNA.

4.1.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *Streptomyces*

En este caso se utilizó una modificación del método de Birnboim publicado por (Hopwood *et al.*, 1985a). El micelio (~0,1 g) se incubó en 500 µl de *buffer* de lisis (lisozima 2 mg/ml, sacarosa 0,3 M, EDTA 25 mM, RNasa 50 µg/ml, Tris-HCl pH 8.0) a 37° C durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo se añadieron 250 µl de la solución NaOH 0.3M-SDS 2 % precalentada y se incubó a 70° C durante 30 minutos. Se agitó por inversión y se añadió un volumen de fenol:cloroformo (5:1) pH 4,5. Se recuperó la fase acuosa tras la centrifugación repitiendo este

paso de fenolización 3 veces. Una vez se dispuso de la fase acuosa definitiva se llevó a cabo la precipitación del DNA con un volumen de isopropanol en presencia de 0,1 volumen de sales (AcNa 3M pH 4.8). Para finalizar se hizo un lavado con etanol al 70 % y se resuspendió el DNA plasmídico en agua.

4.1.3. Obtención de DNA cromosómico de *Streptomyces*

El DNA cromosómico (gDNA) de *Streptomyces* se obtuvo siguiendo el método modificado de lisis neutra descrito por Kieser (Kieser *et al*, 2000). Se partió de un gramo de micelio (peso húmedo) a partir de un cultivo en medio TSB líquido, que se resuspendió en 10 ml de *buffer* de lisis (L): lisozima 2 mg/ml, sacarosa 0,3 M, EDTA 25 mM, Tris-HCl pH 8.0. Tras incubar a 37° C durante 30 minutos, se añadieron 5 ml de SDS 2 %. Se agitó con un agitador tipo vortex y se añadieron 5 ml de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) pH 7,7-8,3. Para facilitar la recuperación de la fase acuosa tras la centrifugación, se emplearon los tubos de resina *phase lock gel* (Eppendorf). Este paso de fenolización se repitió hasta que la interfase quedó limpia (aproximadamente tres veces). A continuación se procedió a la precipitación del DNA con un volumen de isopropanol en presencia de 0,1 volumen de sales (AcNa 3M pH 4.8) y a su posterior lavado con etanol al 70 %. El último paso fue resuspender el gDNA en TE ó H₂O, en un volumen aproximado de 1-2 ml.

4.2. AISLAMIENTO DE RNA

El RNA se obtuvo a partir de cultivos en medio sólido, por lo que para poder recoger el micelio del que posteriormente se aislaría el RNA, las cepas de interés se sembraron sobre discos de policarbonato (E Water & Process Technologies) previamente esterilizados en autoclave, hidratados y colocados sobre el correspondiente medio de cultivo sólido, R2YE o NMMP, en placas Petri. Las cepas se inocularon como esporas pre-germinadas (10 minutos a 50° C) en una cantidad final de $7,5 \cdot 10^6$ esporas/placa (extendidas en un volumen de 400 µl de H₂O). El micelio, recién recogido, se trató con *RNA Protect* (Qiagen) previamente a su congelación. Dependiendo del tiempo de crecimiento de los cultivos, se partió de un número variable de placas que osciló entre 2-6 placas Petri por muestra. El objetivo era alcanzar una masa celular aproximadamente de 200 mg para obtener la cantidad de RNA necesaria para experimentos posteriores (*microarrays* y RT-PCRs). La lisis del micelio se llevó a cabo resuspendiéndolo en *buffer* TE con lisozima (10 mg/ml) e incubando la solución 20 minutos a T^a ambiente. La extracción de RNA se llevó a cabo siguiendo el protocolo recomendado en el *kit* de purificación *RNeasy® Midi* (Quiagen).

4.3. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Han sido varios los métodos de cuantificación de ácidos nucleicos que se han utilizado a lo largo de la tesis debido a su disponibilidad:

Espectrofotómetro U-2000 Hitachi: Se realizó una medida de la absorbancia de las muestras a 260 nm. La concentración de DNA ó RNA se obtiene sabiendo que una muestra de 50 µg/ml ó 40 µg/ml, respectivamente, tiene una absorbancia de 1. El grado de pureza de la preparación se estimó considerando la relación de absorbancia 260/280.

Espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific): Crea un barrido espectrofotométrico que cubre un amplio rango de longitud de onda (UV-vis). El software acoplado proporciona directamente todos los parámetros de interés: concentración del ácido nucleico que se esté valorando, coeficiente de pureza (A_{260}/A_{280}) etc...

Qubit® (Invitrogen): Es un tipo de cuantificación fluorométrica. Se utilizan colorantes selectivos que reaccionan específicamente con DNA o RNA. El resultado es una lectura de la fluorescencia que refleja exactamente la cantidad de DNA o RNA en la muestra.

Bioanalyzer 2100 (Agilent): Se utilizó específicamente para medir la cantidad y la calidad de los RNAs utilizados para la hibridación de los *microarrays*.

4.4. MANIPULACIÓN ENZIMÁTICA DEL DNA

4.4.1. Técnicas básicas de ingeniería genética del DNA

Todas las técnicas básicas de biología molecular e ingeniería genética como digestión con enzimas de restricción, defosforilación de extremos cohesivos y relleno de extremos 5' protuberantes se llevaron a cabo siguiendo los protocolos descritos en el manual de Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989). La utilización de todas las enzimas se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones de las casas comerciales suministradoras.

4.4.2. PCR

Durante este trabajo se han utilizado varios *kits* comerciales de amplificación atendiendo a la aplicación posterior del producto amplificado siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Para PCRs de comprobación rutinaria de comprobaciones plasmídicas se utilizó el *kit* “Taq DNA polimerasa” de Biotools y para los productos de PCR que se fueran a clonar posteriormente y comprobar por secuenciación se utilizó el *kit Triple Master PCR System* (Eppendorf) debido a su mayor fidelidad en la reacción. Para las PCRs de la mutagénesis dirigida se utilizó la “Pfu Turbo Taq polimerasa” (Roche). Los oligonucleótidos empleados se diseñaron utilizando el programa *Gene Construction Kit* y su utilización se detalla en las tablas del apéndice 1.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

1. 95° C, 5 minutos
- 30-35 ciclos (2-4):**
2. 95° C, 20 segundos
3. T^a variable (específica para cada pareja de oligos), 20 segundos
4. 72° C, tiempo dependiente de la longitud a amplificar (1 min por 1 Kb)
5. 72° C, 7 minutos

La temperatura de hibridación de cada oligonucleótido se determinó mediante la siguiente fórmula (donde G, C, A y T son las guaninas, citosinas, adeninas y timinas respectivamente que están presentes en el oligonucleótido): $T_m = 4(GC) + 2(AT) - 10$.

4.4.3. RT-PCR semicuantitativa

Para llevar a cabo las reacciones de RT-PCR semicuantitativa se utilizó el *kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity* (Invitrogen). Tras la obtención del RNA, todas las muestras se trataron al menos dos veces con DNasa (RQ1 *RNase-free DNase*, Promega) con el objetivo de eliminar completamente cualquier contaminación existente con DNA. En cada reacción de RT-PCR se utilizaron 200 ng de RNA en un volumen final de 20 µl. Los ciclos programados se especifican a continuación:

1. 55° C, 30 minutos (síntesis de cDNA)
2. 95° C, 2 minutos
- 25-40 ciclos (3-5):**
3. 95° C, 45 segundos
4. 65° C, 30 segundos
5. 65° C, 40 segundos
6. 72° C, 10 minutos

Los oligonucleótidos que se emplearon con este fin también se recogen en las tablas del apéndice 1.

4.5. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

La separación de los fragmentos de DNA en función de su tamaño se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. La concentración de agarosa empleada fue generalmente de 0,8 % (p/v), exceptuando aquellos casos en los que las bandas de DNA a visualizar eran de tamaños pequeños (100-200 pb), en cuyo caso se utilizó un porcentaje del 1,6 %. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante (80-100 V) en *buffer* TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM)

(Sambrook *et al.*, 1989) Las bandas se observaron sobre un transiluminador de luz ultravioleta (acoplado a un sistema digital fotográfico Gel Doc 2000 de BIO-RAD) gracias al bromuro de etidio presente en el gel (0,5 µg/ml). Los tamaños de los fragmentos de DNA se estimaron por comparación con el marcador de referencia 1Kb *Plus Ladder* (Invitrogen).

4.5.1. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

El aislamiento y purificación de fragmentos específicos de DNA a partir de geles de agarosa se realizó cortando el bloque de agarosa en el que estaba incluida la banda de interés después de haber realizado una electroforesis. A continuación dicho fragmento se trató con el *kit* de purificación *GFX™ PCR DNA and gel band* (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante. El mismo *kit* fue utilizado para la limpieza de reacciones enzimáticas.

4.6. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

Los ensayos de mutagénesis se realizaron sobre los genes de las HKs citoplasmáticas: *cabrC1* (derivado del *abrC1*) y *cabrC2* (derivado del *abrC1*), presentes en los plásmidos pET_cabrC1 y pET_cabrC2, respectivamente. Las mutaciones fueron realizadas mediante PCR utilizando dos oligonucleótidos totalmente solapantes que introducían la mutación en dirección 5'-3' y 3'-5' y que amplificaban todo el vector parental (apéndice 1). Los tiempos y temperaturas de los ciclos varían respecto a una PCR normal:

1. 95° C, 1 minuto
- 15 ciclos (3-5):**
2. 95° C, 30 segundos
3. 55° C, 1 minuto
4. 68° C (2 minutos por 1 Kb)
5. 72° C (3 minutos x tiempo de extensión)

Posteriormente, el resultado de la PCR se digirió con la enzima de restricción *DpnI* (1 U/µL) durante 90 minutos a 37° C. *DpnI* digiere tan sólo DNA metilado, que se corresponde con las cadenas molde del vector parental proveniente (sin la mutación) proveniente de *E. coli*, por lo que el vector que contiene la mutación, amplificado por PCR, está protegido de la digestión. Seguidamente, se transformó *E. coli* DH5α con 1 µL del producto de la digestión. Finalmente, se seleccionaron diferentes colonias producto de la transformación y se secuenciaron para confirmar que eran correctas (figura M.8.).

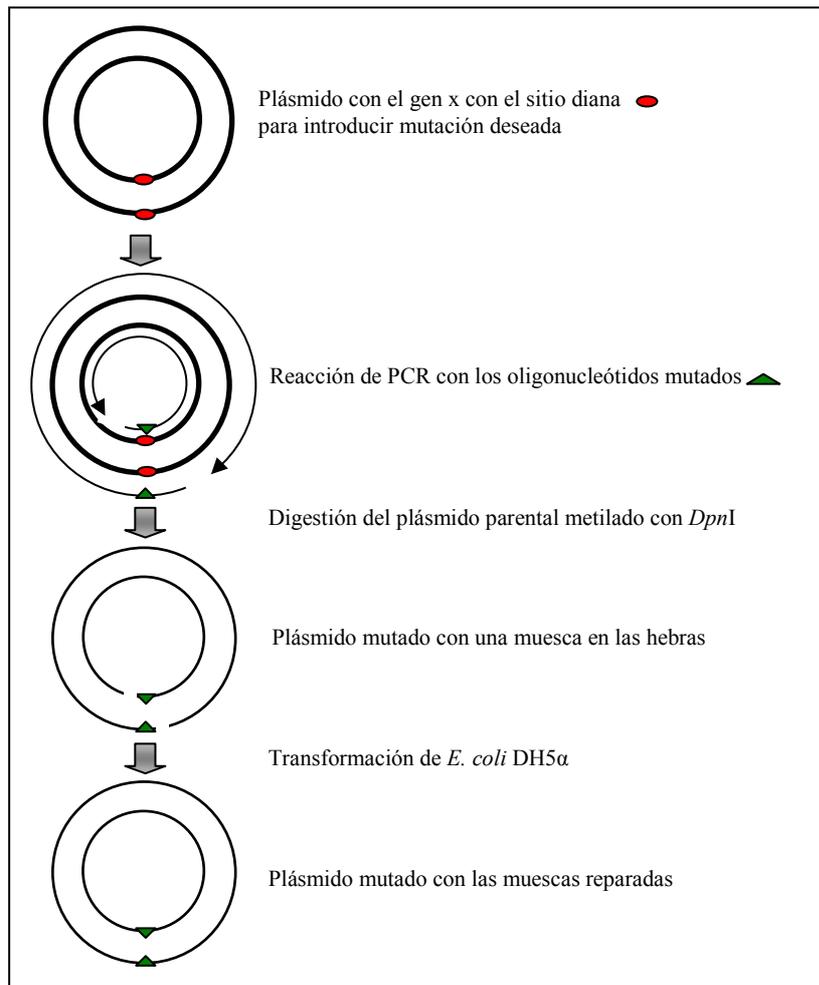


Figura M.8. Esquema del proceso de obtención de mutaciones puntuales.

4.7. CONSTRUCCIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES SIN MARCADOR DE RESISTENCIA (*Scar*) EN *S. coelicolor*

La construcción de estas cepas en *S. coelicolor* consiste en eliminar el *cassette* de resistencia a antibióticos de las cepas mutantes dejando sólo 81 pb (cicatriz o *scar*) en fase con los ORFs adyacentes. Para entender este paso hay que tener en cuenta la forma de obtención de mutantes por el método REDIRECT (Gust *et al.*, 2002). De forma breve, este método consiste en que, el reemplazamiento de los genes problema por el correspondiente *cassette* mutagénico (con apramicina como marcador de resistencia en este caso), se lleva a cabo inicialmente sobre el cósmido que porta la región genómica de interés. La manipulación genética para la obtención de la mutación en el cósmido se realiza en cepas apropiadas de *E. coli*. Una vez que se obtiene el cósmido mutado, se traspa por conjugación *E. coli-Streptomyces*, donde tiene que darse una doble recombinación homóloga para reemplazar la región de interés en el genoma de esta bacteria. De esta forma se obtuvieron los mutantes $\Delta abrA1/A2::accIV$ y $\Delta abrC1/C2/C3::accIV$ con el

marcador de resistencia a apramicina (*aacIV*) reemplazando a los genes correspondientes en cada caso.

Para la obtención de las cepas *scar* en *Streptomyces*, de igual forma que en lo previamente descrito, primero hay que conseguir eliminar el *cassette* mutagénico del cósmido en *E. coli* para luego traspasárselo a *Streptomyces*. Para ello se introdujo el cósmido mutado en la cepa de *E. coli* DH5 α /pBT30 (portadora del gen flipasa, *flp*). En esta cepa tiene lugar la recombinación de los sitios FRT que flanquean el *cassette* mutagénico y la consecuente eliminación del marcador de resistencia y del oriT. Una vez se dispuso del cósmido *scar*, se transfirió al correspondiente mutante de *Streptomyces*, por transformación de protoplastos (puesto que se pierde el origen de transferencia para la conjugación) y se seleccionaron los clones resistentes a neomicina reflejo de una recombinación sencilla. Finalmente se seleccionaron aquellos clones sensibles a neomicina y apramicina en los que hubiera tenido lugar la doble recombinación obteniéndose las cepas $\DeltaabrA1/A2$ y $\DeltaabrC1/C2/C3$. La pérdida del marcador de resistencia de las nuevas cepas se comprobó por PCR.

5. INTRODUCCIÓN DE DNA EN MICROORGANISMOS

5.1. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*

Las transformaciones se llevaron a cabo utilizando células competentes de *E. coli* DH5 α , ET12567 y BL21 (DE3) y siguiendo el protocolo descrito por (Hanahan y Meselson, 1983) en el cual se introduce el DNA mediante un choque térmico.

5.2. TRANSFORMACIÓN DE *Streptomyces*

El método utilizado para transformar *Streptomyces* fue el basado en la obtención de protoplastos y su posterior regeneración (Kieser *et al*, 2000). Para la obtención de los protoplastos las células se cultivaron en medio YES. Éstos fueron transformados con los distintos vectores y se regeneraron en placas de R2YE. Tras 12 horas de crecimiento se añadió en una cobertera de 400 μ l de H₂O el antibiótico correspondiente para la selección de los transformantes.

6. HIBRIDACIÓN Y PROCESAMIENTO DE MICROARRAYS (cDNA vs gDNA)

6.1. MARCAJE DE cDNA Y gDNA

Tras el aislamiento y cuantificación del RNA se procedió a la síntesis del cDNA y a su marcaje mediante el uso del reactivo fluorescente Cy3 (Cy3-dCTP, Amersham Biosciences). Para la síntesis de cDNA se utilizó la enzima *Superscript III* (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo con 4,2 μ g de RNA utilizando hexanucleótidos al azar como cebadores (invitrogen) y Cy3-dCTP

formando parte de los dNTPs para el marcaje del cDNA. Para el marcaje de gDNA se utilizaron 3 µg de DNA y se marcaron con el fluoróforo Cy5 (Cy5-dCTP, Amersham Biosciences), de forma similar al marcaje de cDNA se utilizaron cebadores aleatorios y el fragmento klenow de la DNA polimerasa I (Promega). Los detalles del protocolo están registrados en la siguiente dirección web <http://www.surrey.ac.uk/SBMS/Fgenomics>.

La eficiencia de los marcajes se cuantificó mediante espectrofotometría (U-2000 Hitachi) midiendo cada fluoróforo con la longitud de onda correspondiente (Cy3 $\lambda=550$ y Cy5 $\lambda=650$). Sabiendo el coeficiente de extinción molar de ambos fluoróforos ($\epsilon_{550}\text{Cy3}=0,15$ y $\epsilon_{650}\text{Cy5}=0,25$) se calculó la concentración de nucleótidos marcados:

- Cy3: $A_{550}/0,15$ (pmoles/µl)
- Cy5: $A_{650}/0,25$ (pmoles/µl)

6.2. PREHIBRIDACIÓN E HIBRIDACIÓN DE LOS MICROARRAYS

Los *microarrays* utilizados se denominan *Streptomyces coelicolor* SCp40 y han sido fabricados por una empresa inglesa asociada a un laboratorio de genómica funcional de la Universidad de Surrey (Reino Unido) (<http://www2.surrey.ac.uk/fhms/microarrays/>). Estos *microarrays* contienen representados como oligonucleótidos largos (50 nucleótidos) todos los ORFs de *S. coelicolor*, incluidos los del plásmido SCP1.

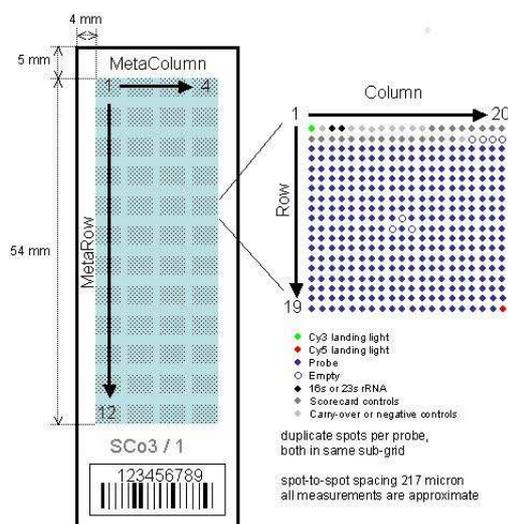


Figura M.9. Representación de un *microarray* *Streptomyces coelicolor* SCp40.

El *kit* comercial utilizado tanto para la prehibridación como para hibridación es el *Pronto! Universal Microarray Hybridization kit* (Corning). Ambos procesos se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante. Para llevar a cabo la hibridación se mezclaron 10 pmol de Cy5-gDNA con 80 pmol de Cy3-cDNA y se secaron en una centrifuga de vacío. Las muestras se disolvieron en 40 µl de solución de hibridación *Pronto!*. Después de 5 minutos a 95° C para desnaturalizar el

cDNA, se aplicó la solución a los cristales y se protegieron con un cobertor del tamaño del porta (*Hybri-slips*, Sigma). Los cristales cubiertos se introdujeron en una cámara de hibridación Corning y se incubaron a 42° C durante 72 horas, evitando su exposición a la luz. Transcurrido este tiempo se eliminó el plástico cobertor y se realizaron hasta 5 lavados de 15 minutos con agitación suave en SSC 2x SDS 0,5 % (p/v) pre-calentado a 42° C los dos primeros, en SSC 0,5x SDS 0,1 % (p/v) pre-calentado a 42° C, el tercero y el cuarto, y en SSC 0,5x DTT 0,2M a T^a ambiente el quinto lavado. Por último, los cristales se secaron mediante centrifugación y se procedió a la detección de las imágenes.

6.3. DETECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE DATOS

Para ver los resultados obtenidos, los portas se escanearon en un escáner tipo *Genepix DNA Microarray 4000B* en la Unidad de Genómica del Centro del Cáncer (CIC, Salamanca). Las imágenes se procesaron mediante el programa informático Genepix Pro 5.0. Los datos de intensidades se trataron estadísticamente utilizando la librería LIMMA 2.8.1 (*linear models for microarray analysis*) dentro del *software* del paquete de programas Bioconductor en entorno R 2.4. Se utilizaron para determinar la significación estadística de los datos obteniéndose los p-valores que a su vez se corrigieron por FDR (*false discovery rate*) y por el método *ppf* (*proportion of false positives*). Un gen se consideró diferencialmente expresado cuando al menos uno de estos p-valores corregidos era menor al 0,05 (p-valor FDR ó $ppf < 0.05$).

6.4. MICROARRAYS cDNA vs. cDNA

Para este tipo de hibridación de los *microarrays*, las muestras de las cepas a comparar se mandaron al servicio de genómica del CNB (Madrid) (<http://www.cnb.uam.es/~genomica>) donde se realizaron los marcajes y las hibridaciones. Los *microarrays* fueron Scp40 idénticos a los utilizados en experimentos cDNA vs. gDNA.

7. MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

7.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE)

La separación de proteínas en función de su tamaño se realizó mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida según el método publicado por Laemmli (Laemmli, 1970), con un sistema vertical de minigeles MiniProtean II (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones de la marca comercial. Los geles de separación se prepararon a una concentración final de acrilamida que osciló entre el 15-18 % según el tamaño de la proteína de interés; los de empaquetamiento se utilizaron a una concentración del 4 %. Las muestras de proteína se

prepararon en un volumen total de 10 o 20 μ l con *buffer* de carga 4x (glicerol 40 %, Tris HCl 0,25 M pH 6.8, SDS 8 %, azul de bromofenol 0,05 % y DTT 0,05 M). Antes de la electroforesis las muestras se hirvieron durante 5 minutos. La electroforesis se llevó a cabo en *buffer* de carrera 1 X (Tris HCl 30 g/l, glicerol 14,4 %, SDS 5 g/l) a un amperaje constante de 30 mA/gel. Los tamaños aproximados de las proteínas se determinaron por comparación con marcadores de bajo peso molecular (*Low molecular Weight Markers*, Bio-Rad).

Para la visualización de las proteínas se utilizó la tinción con coomassie según Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles se tiñeron 20 minutos con la solución colorante (0,5 % coomassie R, 10 % ácido acético y 50 % metanol) y se destiñeron con una solución que contiene un 10 % ácido acético y 25 % metanol.

7.2. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

7.2.1. Expresión y purificación en *E. coli*

Las proteínas de interés se clonaron en el plásmido pET22b bajo el control de promotor de la T7 polimerasa y se etiquetaron con colas de 6 histidinas en su extremo C-terminal.

Su expresión y posterior purificación se llevó a cabo creciendo cultivos de *E. coli* BL21 (DE3), que portaban la construcción de interés, en LB+ ampicilina 100 μ g/ml. El volumen de los cultivos fue de 1 l en la mayoría de los casos o de 500 ml si la expresión y solubilidad de las proteínas de interés eran apropiadas. Cuando el cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ entre 0,4-0,6 se añadió IPTG 1 mM para inducir la expresión de la proteína y se continuó la incubación durante 4 horas más. Tras el periodo de inducción se recogieron las células y se lavaron con H₂O autoclavada. Se resuspendieron en un *buffer* de lisis (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Triton X100 0,1%, Imidazol 5 mM, al cual se añadió un cóctel de inhibidores de proteasas, *Complete EDTA-free* de Roche) echando la cantidad recomendada por el fabricante. Seguidamente se procedió a la lisis del cultivo utilizando una presión de 14000 psi (*French® Pressure cell press*). A continuación se añadió DNasa I (Roche) para disminuir la viscosidad del lisado y evitar la pérdida de proteínas de unión a DNA. Finalmente se separó la fracción soluble de la insoluble mediante ultracentrifugación a 100.000xg durante 30 minutos (Ultracentrífuga Beckman coulter Optima™ L-80).

La purificación de las proteínas de interés se realizó mediante cromatografía de afinidad de metales en condiciones nativas. Para ello la fracción soluble recuperada se pasó por una matriz de níquel (NTA-Ni, Qiagen) que había sido previamente equilibrada e inmovilizada en una columna cromatográfica (Bio-Rad). A continuación se lavó la columna, al menos 4 veces, con 10 ml de *buffer* de lavado para eliminar la unión de proteínas inespecíficas (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Triton X100 0,1 % e imidazol 20 mM). La elución de la proteína de interés se hizo en dos veces, con 1 ml de *buffer* de elución 1 (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM,

Triton X100 0,1 % e imidazol 250 mM) y con 1 ml de *buffer* de elución 2 (de igual composición al primero pero con imidazol 1 M). Las distintas fracciones recogidas se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida para comprobar cuál de ellas contenía la proteína de interés.

7.2.2. Expresión y purificación en *Streptomyces*

Las proteínas de interés para expresar en *Streptomyces* se clonaron bajo el promotor *xysA*, promotor fuerte e inducible por xilosa. Los cultivos que se utilizaron para probar la expresión fueron de 30 y 170 ml en matraces indentados en los medios de cultivo NMMP o YES suplementados con tioestreptona 5 µg/ml y xilosa 1 %. Transcurrido un tiempo apropiado de crecimiento (generalmente 48-72 horas) se procedió a la recogida del micelio y a su lavado con sacarosa 10,3 %. A continuación se lisaron mecánicamente las células (~100 mg micelio) mediante 4 pulsos en la *Fast-prep* con bolitas de vidrio de tamaño mediano (0,40-0,60 mm de diámetro, *B. Braun Biotech International*). Seguidamente se resuspendieron en *buffer* de lisis ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, NaCl 300 mM, Triton X100 0,1% con inhibidores de proteasas, *Complete EDTA-free* de Roche) (1 ml) y se separaron la fracción soluble e insoluble mediante ultracentrifugación a 100.000xg durante 30 minutos (Ultracentrífuga Beckman coulter Optima™ L-80). Seguidamente las proteínas de ambas fracciones se cargaron en un gel SDS-PAGE 15 % y se procedió a su tinción con coomassie o a su transferencia a membrana para posteriormente hacer un western-blot, según lo apropiado.

7.2.3. Diálisis

La diálisis de las distintas proteínas se hizo utilizando los tubos de diálisis *D-Tube™ Dialyzer Maxi* de Novagen. El tamaño de poro de los mismos varió según el tamaño de la proteína a dializar, utilizando los de límite de peso molecular 6-8 para las proteínas de 30 kDa y los de 3,5 para las proteínas de 10 kDa. El proceso de diálisis se llevó a cabo en un volumen de 2 l de *buffer* de diálisis (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM y glicerol 10 %), procediendo a la renovación del *buffer* dos veces cada 24 horas.

7.3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOT

Una vez que las proteínas fueron separadas en los SDS-PAGE se electrotransfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) empleando el sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad) y siguiendo el protocolo de Matsudaira (Matsudaira, 1987). Tras la transferencia la membrana se bloqueó con seroalbúmina bovina (BSA) al 1% en *buffer* TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,05 %, pH 7,6) durante al menos 1 hora. A continuación se incubó la membrana durante 1 hora con el anticuerpo primario monoclonal antiHis (Santa Cruz) (dilución 1/200) a Tª ambiente y

en agitación. Tras los lavados con TBST (3 de 10 minutos), para eliminar los restos de anticuerpo primario no unido, se incubó de nuevo la membrana 30 minutos con el anticuerpo secundario (IgG contra ratón-HRP) diluido 1/ 5000. El exceso de anticuerpo se eliminó con tres nuevos lavados con TBST. Para la detección se utilizó el *kit Novex®ECL HRP Chemiluminiscent substrate reagent* (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

7.4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas en las diferentes muestras se determinó por un ensayo colorimétrico derivado del método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) utilizando el *kit “DC Protein Assay”* de Bio-Rad y siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.5. ENSAYOS Y DETECCIÓN DE FOSFORILACIÓN Y FOSFOTRANSFERENCIA

7.5.1. Fosforilación de los RR con fosfodonadores de bajo peso molecular

Este tipo de reacción de fosforilación se llevó a cabo en *buffer* de fosforilación (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM) al cual se añadió acetilfosfato, carbamoilfosfato o fosforamidato a una concentración final 20 mM, 100 mM y 150 mM. Los dos primeros fosfodonadores estaban disponibles comercialmente (Sigma), sin embargo, el fosforamidato se obtuvo mediante síntesis química según se describe en (Sheridan *et al.*, 1971). Las cantidades de proteínas a fosforilar oscilaron entre 1 y 2,5 µg. La incubación se hizo a 37° C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió *buffer* SDS-PAGE sin DTT añadido. Las muestras, sin hervirlas, se sometieron a electroforesis SDS-PAGE, la cual se realizó a 4° C. Las proteínas fosforiladas se visualizaron con el producto “Phos-tag™ 300/460 Phosphoprotein Gel Stain” (Perkin Elmer) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

7.5.2. Autofosforilación de las HKs con γ 32 ATP

Los ensayos de autofosforilación de las HKs se realizaron con 10 µCi de [γ -³²P] ATP (6000 Ci/mmol Perkin Elmer, Willsley, MA) en *buffer* de fosforilación (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM) en un volumen final de 20 µl. Tras añadir 0,5-2 µg de proteína (por disponibilidad de la misma), las muestras se incubaron durante 40 minutos a 30° C. Las reacciones de fosforilación se pararon al añadir a las muestras *buffer* de carga SDS-PAGE sin DTT. Las muestras se cargaron en geles de acrilamida 15 % y se llevó a cabo la electroforesis. Para visualizar las bandas fosforiladas los geles se cubrieron con film transparente y se revelaron mediante autorradiografía utilizando una película fotográfica kodak o bien una pantalla BAS-IP MP (Fujifilm) adquirida posteriormente en el fosforimager BAS-1500.

7.5.3. Fosfotransferencia HK-RR

Las proteínas HKs se autofosforilaron tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se añadió un exceso de ATP frío (0,5 mM) y se tomaron alícuotas en tantos tubos como reacciones de fosfotransferencia se iban a realizar. A las diferentes alícuotas se añadieron aproximadamente 3 µg de los RRs (AbrC3 y SCO2281) para iniciar la reacción de fosfotransferencia o *buffer* de diálisis a la fracción HK que serviría luego como referencia de fosforilación. Posteriormente se incubaron de nuevo a 30° C. Las reacciones se fueron parando a distintos tiempos añadiendo *buffer* de carga SDS-PAGE y se mantuvieron en hielo hasta que se cargaron en el gel SDS-PAGE al 15 %.

8. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL (EMSA)

Durante esta tesis se han llevado a cabo dos tipos de geles de retardo. Los primeros, se realizaron en el laboratorio del Dr. Kenneth McDowall (Universidad de Leeds, Reino Unido). En este tipo de ensayos el DNA utilizado en las incubaciones con las proteínas se marcó con fluoresceína utilizando en la PCR el oligonucleótido directo P1 marcado en su extremo 5'. Las cantidades de DNA marcado y proteína que se utilizaron fueron aproximadamente de 10 ng y 12 pmol, respectivamente. En el otro tipo de ensayo de retardo, llevado a cabo en nuestro laboratorio, no se utilizó DNA marcado *a priori* sino que fue posteriormente teñido después de la electroforesis con bromuro de etidio. Por ello al ser éste un método de detección menos sensible que el anterior las cantidades finales de DNA (obtenido por PCR) y proteína se modificaron. La cantidad de DNA utilizada osciló entre 150-200 ng y fue incubada aproximadamente con 100 pmol de proteína.

En ambos ensayos las incubaciones DNA-proteína se hicieron en *buffer* Tris pH 8,0 50 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y glicerol 10 % al que se añadió como competidor DNA de salmón (2 µg). La incubación se llevó a cabo durante 20 minutos a T^a ambiente. Transcurrido el tiempo se añadió *buffer* de carga (sacarosa 40 %, xilencianol 0,17 % azul de bromofenol 0,17 %, Ambion) y las muestras se sometieron a electroforesis en geles nativos de poliacrilamida 5 % (acrilamida:bisacrilamida 19:1) corridos a 180 V durante 5-6 horas o bien a 50 V durante 12-14 horas en *buffer* TBE. El resultado de los geles con los DNAs marcados con fluoresceína se visualizaron con un escaner de fluorescencia (Bio-Rad FX Pro). Y el resultado de los geles con los DNAs sin marcar se visualizó mediante la tinción del gel con bromuro de etidio (0,5 µg/ml *buffer* TBE).

Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los promotores de interés se recogen en las tablas del apéndice 1.

9. SELEX (“*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*”)

9.1. INMOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PURAS EN BOLAS MAGNÉTICAS

Para llevar a cabo el SELEX se utilizaron unas bolas magnéticas (*Talon beads* de Invitrogen) que llevan unidas iones cobalto y retienen por interacciones iónicas proteínas marcadas con colas de histidinas. Por experimento se inmovilizaron 7 y 15 µg de proteína previamente purificada, de 10 y 30 kDa respectivamente. Para ello, siguiendo las indicaciones del fabricante, se utilizaron 1,2 mg de *Talon beads* y se llevó hasta un volumen de 700 µl con el *buffer* de unión Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Triton X100 0,1 %. La unión se comprobó corriendo un gel SDS-PAGE con alícuotas de las distintas etapas del proceso.

9.2. SELEX: CICLOS DE SELECCIÓN-AMPLIFICACIÓN

Las proteínas inmovilizadas se incubaron con una librería de DNA compuesta aproximadamente por 10¹⁶ moléculas de secuencias flanqueantes conocidas y una región central de 30 nucleótidos sintetizada al azar: 5′ GATAATACGACTCACTATAGGGAATGGATCCA CATCTACGAATTC-N30-TTCACTGCAGACTTGACGAAGCTT-3′. Tras una incubación a T^a ambiente de 5 minutos se separó magnéticamente el sobrenadante no unido a la proteína y a continuación se realizaron dos lavados con el *buffer* de unión. Tras los lavados se procedió a la elución del DNA retenido incubando la proteína inmovilizada con agua pura durante 15 minutos a 95° C. Con la fracción de DNA recuperado se hizo una PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos P1 y P2 (apéndice 1) que hibridaban con las secuencias flanqueantes. El conjunto de secuencias resultantes de la PCR se utilizaron como ligandos en la siguiente ronda de selección. Así sucesivamente se hicieron hasta 5 ciclos de incubación-selección-amplificación. Todos estos procesos están robotizados y se llevaron a cabo en un *Biomek 2000 Automated Workstation* (Beckman Coulter) bajo la supervisión de los doctores Kenneth McDowall y David Bunka en la Universidad de Leeds (Reino Unido).

9.3. CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL DNA OBTENIDO

El conjunto de aptámeros obtenidos en la ronda de amplificación 10 se sometió a otra PCR de 10 ciclos. El producto obtenido se purificó y se clonó en el vector pGEMTeasy (Promega). Posteriormente se transformó *E. coli* DH5α y se seleccionaron aquellos clones que no tenían pigmentación azul (selección blanco-azul con X-Gal como se describe en el manual de Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1989). A continuación se hicieron minipreps de los clones y se secuenció el DNA resultante con el oligonucleótido universal directo.

10. INCUBACIÓN RR- gDNA DE *Streptomyces coelicolor*

10.1. INMOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PURAS EN BOLAS MAGNÉTICAS

El proceso de inmovilización de las proteínas en las bolas magnéticas es idéntico al descrito en el apartado 9.1.

10.2. DIGESTIÓN PARCIAL DE gDNA DE *S. coelicolor* CON *Sau3A*

Para la digestión parcial del genoma *S. coelicolor* M145, se partió de 750 µg de gDNA el cual se alicuoteó en 25 µg por tubo y se incubó a 37° C durante 3 minutos con 0,5 µl (2,5 U) de *Sau3A*. La batería de fragmentos resultantes osciló mayoritariamente entre 100 y 600 pb.

10.3. UNIÓN RR-gDNA, RECUPERACIÓN DEL DNA UNIDO, CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN

La incubación gDNA-RR se hizo en *buffer* Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM pH 7,5 a T^a ambiente durante 30 minutos. A continuación se realizaron dos lavados de 500 µl con el mismo *buffer* utilizado en la unión. Tras los lavados se hicieron tres eluciones de 50 µl en las que se fue incrementando la concentración de NaCl del buffer fosfato: 0,1 M en la primera elución, 0,3 M en la segunda y 1 M en la tercera y última elución.

Los fragmentos de DNA presentes en las dos últimas eluciones (NaCl 0,3 y 1M) se purificaron y se clonaron en el vector pSK+ previamente digerido con *Bam*HI. Posteriormente se transformó *E. coli* DH5α y se seleccionaron los clones con inserto (selección blanco-azul con X-Gal). Por último se hicieron minipreps de colonias blancas y se secuenciaron con el oligonucleótido universal directo.

11. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

En todos los ensayos se partió de una suspensión de esporas conocida de las distintas cepas, sembrando en los medios de cultivo sólido 10³ esporas por gota de agua (5 µl). Si se estriaban las cepas en sectores se partía igualmente de una solución de esporas equivalente en todas las cepas ensayadas (10⁸ e/ml).

11.1. BIOENSAYO EN MEDIO SÓLIDO: PRODUCCIÓN DE CDA

Este ensayo fue modificado del descrito en el trabajo de Uguru y colaboradores (Uguru *et al.*, 2005). Las esporas se inocularon como gotas (10³/5 µl) sobre medio sólido AN y se incubaron a 30° C durante 2 días. A continuación las placas se cubrieron con 5 ml de agar nutritivo blando + Ca(NO₃)₂ 60 mM que contenía *Bacillus subtilis* (D.O.₆₀₀ 0,25) como microorganismo sensible y se

incubaron de nuevo a 30° C durante 20 horas aproximadamente. Como control negativo se hizo una réplica del experimento añadiendo una cobertera de agar nutritivo blando sin $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ya que el calcio induce la actividad de este antibiótico.

11.2. ENSAYO EN MEDIO SÓLIDO: PRODUCCIÓN DE ACTINORRODINA Y UNDECILPRODIGIOSINA

En este ensayo los medios de cultivo empleados fueron PGA para la undecilprodigiosina y AN y NMMP sólido para la actinorrodina. El nivel de producción de undecilprodigiosina se observó transcurridos 2-3 días de crecimiento a 30° C. La detección de actinorrodina se realizó tras la incubación durante 2- 4 días (dependiendo del medio de cultivo) a 30° C.

11.3. ENSAYO EN MEDIO LÍQUIDO: CUANTIFICACIÓN DE ACTINORRODINA Y UNDECILPRODIGIOSINA

Para cuantificar la producción de antibióticos en medio líquido se realizaron cultivos por duplicado de cada cepa. Se emplearon matraces indentados de 100 ml los cuales se inocularon con 15 ml de medio de cultivo con una concentración final de 4×10^6 e/ml por cada cepa. Se tomaron muestras por duplicado de cada matraz a tiempos variables según el antibiótico a determinar y el medio de cultivo utilizado. El método de cuantificación de actinorrodina y undecilprodigiosina se modificó ligeramente del descrito por Kieser (Kieser *et al*, 2000):

- Para cuantificar la cantidad total de actinorrodina, los cultivos fueron tratados con KOH (1 N). Se incubaron las muestras O/N a 4° C, se centrifugó la mezcla (15000xg, 10 minutos) y se midió la absorbancia del sobrenadante de cada muestra a 640 nm.

- Para medir la undecilprodigiosina el precipitado de células se lavó dos veces con HCl 0,5 M, y se resuspendió en HCl-metanol 0,5 N. Tras una incubación de 2 horas, se centrifugó (15000xg, 5 minutos) y se midió la absorbancia a 530 nm.

A continuación, conociendo el coeficiente de extinción molar para ambos compuestos en dichos solventes, **actinorrodina** $\epsilon_{640} = 25320$, y **undecilprodigiosina** $\epsilon_{530} = 100500$ y aplicando la ley de Lambert-Beer se obtuvieron los datos de la concentración de los dos antibióticos para cada muestra.

12. CURVAS DE CRECIMIENTO

Las curvas de crecimiento de las diferentes cepas se hicieron mediante la cuantificación del peso seco del micelio. Para ello se inocularon 4×10^6 e/ml en 160 ml de medio líquido (AN, NMMP y PGA) y se incubaron en agitación a 28° C durante 68 horas. En cada tiempo se filtraron 10 ml del cultivo y se estimó el peso seco equivalente. Todas las muestras se hicieron por duplicado para calcular la media del peso seco y el error típico.

13. ANÁLISIS Y PRESENTACIÓN DE DATOS

13.1. SOPORTES INFORMÁTICOS DE ANÁLISIS DE DNA Y PROTEÍNAS

El programa *Gene Construction Kit* v2.5 (Textco, Inc) fue utilizado para la representación gráfica de plásmidos, el diseño de estrategias de clonación, la determinación de sitios de restricción y tamaño de los fragmentos digeridos, así como para el diseño de oligonucleótidos sintéticos.

El programa CLUSTAL X2 se utilizó para establecer comparaciones tanto de secuencias de nucleótidos como de aminoácidos.

Los programas *SeqMan*, *Edit view* y *EditSeq* se utilizaron para el análisis de fragmentos secuenciados de DNA.

El programa *ImageJ* 1.43m se utilizó para la medición del diámetro de las colonias.

13.2. BASES DE DATOS ONLINE

La búsqueda y comparación de secuencias de DNA o de proteínas se efectuó en varias bases de datos.

- General: NCBI (*National Centre of Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

- Específica del genoma de *Streptomyces coelicolor*: *Sanger Institute* (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/).

Para las comparaciones entre secuencias de nucleótidos y aminoácidos se utilizaron las aplicaciones del BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) de la página web del NCBI. Las predicciones *in silico* de los dominios transmembrana se hicieron con los programas SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>), Phobius (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/phobius/>) y HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>).

Para la búsqueda de referencias se utilizó PubMed (NCBI) en la base de datos Medline.

Para las predicciones *in silico* de dominios en proteínas se utilizó la base de datos de dominios conservados del NCBI (CDD): (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>).

Para encontrar similitud entre distintas secuencias y definir un patrón consenso se utilizaron los programas *rsa-tools* (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>) y MEME (<http://meme.nbcr.net/meme4/cgi-bin/meme.cgi>).

13.3. PRESENTACIÓN DE DATOS

Las representaciones gráficas existentes en este trabajo se han elaborado con Excel (*Microsoft office* 2002). Las imágenes de geles, membranas, autorradiografías se digitalizaron con un escáner *SnapScan* 1236 de Agfa. Las imágenes de las placas se han obtenido por fotografía

digital con una cámara Canon (*Power shot G3*). Las ilustraciones se han realizado con *Microsoft PowerPoint 2002*, *Adobe Illustrator CS4* y *Adobe® Photoshop CS4*.

Las citas bibliográficas se procesaron con *EndNote X (Niles and associates)*.

APÉNDICES

APÉNDICE 1: Tablas de oligonucleótidos

| Oligonucleótidos | Secuencia (5'-3') | Función |
|------------------|----------------------------------|--|
| AY-033 | TTTTTTGAATTCTCACGTCCTCCTGTGGGGGG | Oligo directo con sitio de corte <i>EcoRI</i> para amplificar el "promotor" <i>abrA1A2p</i> |
| AY-034 | TTTTTTCATATGTCCGAAGCCTCCGGTGTGCC | Oligo inverso con sitio de corte <i>NdeI</i> para aplicar el "promotor" de los <i>abrA1A2p</i> |
| AY-035 | TTTTTTCATATGAACGACCTCTTCGGGCGGG | Oligo directo con sitio de corte <i>NdeI</i> para clonar por PCR los ORFs <i>abrA1/A2</i> |
| AY-036 | TTTTTCTCGAGTCAGCCCGTGCCGCCGGGG | Oligo.inverso de corte <i>XhoI</i> para clonar por PCR los ORFs <i>abrA1/A2</i> |
| AY-039 | GGCCGACGACGGTCACGGGG | Secuenciación de los ORFs <i>abrA1/A2</i> amplificados por PCR |
| AY-040 | CGTCGAGGAGGCACTGACCAAC | Secuenciación de los ORFs <i>abrA1/A2</i> amplificados por PCR |
| AY-047 | TTTTTTCATATGACCATCCGCCTGCTGATCG | Oligo directo con sitio de corte <i>NdeI</i> para amplificar el RR <i>abrA2</i> |
| AY-047b | TTTTTTCATATGGCACCGGTCCGGCCGCGGG | Oligo directo con sitio de corte <i>NdeI</i> para para construir la proteína truncada <i>AbrA2^{DBD}</i> |
| AY-048 | TTTTTCTCGAGGCCCGTGCCGCCGGGGAGG | Oligo inverso con sitio de corte <i>XhoI</i> para construir la proteína truncada <i>AbrA2^{DBD}</i> |
| AY-055 | GTCGCGGCCGGTCAGGACGG | Oligo directo para RT-PCR de <i>redD</i> . |
| AY-056 | CGGCTACCTGCTGGAGATCGAC | Oligo inverso para RT-PCR de <i>redD</i> . |
| AY-057 | GCGGCGGAGACCGGGCCCGA | Oligo directo para RT-PCR de <i>redZ</i> . |
| AY-058 | AGAGGAGGACTTCCGTTTCCCG | Oligo inverso para RT-PCR de <i>redZ</i> . |
| AY-059 | CCATCGAAGAGATCGGTCTTGAAC | Oligo directo para RT-PCR de <i>cdaR</i> . |
| AY-060 | GCTGGCGCAGGAACTGGTGGAG | Oligo inverso para RT-PCR de <i>cdaR</i> . |
| AY-077 | ACGGCTGTCTGGAGGAGGAG | Oligo directo para RT-PCR de <i>SCO0141</i> |
| AY-078 | TCGACGGTCTGCGAGAGGTG | Oligo inverso para RT-PCR de <i>SCO0141</i> |

APÉNDICE 1: Tablas de oligonucleótidos

| Oligonucleótidos | Secuencia (5'-3') | Función |
|------------------|------------------------------------|---|
| AY-079 | CACTCGTCGCCTCCGTCAG | Oligo directo para RT-PCR de SCO2435 |
| AY-080 | CGTTCGTCGACCACCACGTC | Oligo inverso para RT-PCR de SCO2435 |
| AY-089 | TTTTTCTCGAGCGCCACCCGCACCACCGCG | Oligo inverso con sitio <i>XhoI</i> para construir la proteína truncada $_N$ AbrC3 |
| AY-090 | TTTTTTCATATGCAGGGCGGTACGGCGCTGGAC | Oligo directo con sitio <i>NdeI</i> para construir la proteína truncada AbrC3 ^{DBD} |
| AY-091 | TTTTCTGCAGATCTACACGTCAGCGTGCCGTGCG | Oligo directo para amplificar el promotor <i>abrC1p</i> (sitios <i>PstI</i> y <i>BglII</i>) |
| AY-092 | TTTTCTGCAGATCTTGCGCCCCTCGCTCCCTGTC | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>abrC1p</i> (sitios <i>PstI</i> y <i>BglII</i>) |
| AY-095 | TTTTTTCATATGGTGCACGGGCTGCTGG | Oligo directo con sitio <i>NdeI</i> para construcción de la proteína truncada cAbrC2 |
| AY-096 | TTTTTCTCGAGGCCGGTGAGCGGCTCGTTCC | Oligo inverso con sitio <i>XhoI</i> para construcción de la proteína truncada cAbrC2 |
| AY-097 | TTTTTTCATATGGTGCGGGGGCTGCTGTC | Oligo directo con sitio <i>NdeI</i> para construcción de la proteína truncada cAbrC1 |
| AY-098 | TTTTTCTCGAGCCCCCTGGGGCGCGAGCC | Oligo inverso con sitio <i>XhoI</i> para construcción de la proteína truncada cAbrC1 |
| AY-099 | TTTTTTCATATGCGGGCGGCTACACCC | Oligo directo con sitio <i>NdeI</i> para construcción de la proteína truncada cAbrA1 |
| AY-101 | TTTTTCTCGAGTGCCGCGTCCCCGGCGTCC | Oligo inverso con sitio <i>XhoI</i> para construcción de la proteína truncada cAbrA1 |
| AY-102 | TTTTTCTCGAGTGCCGCGTCCCCGGCGTCC | Oligo directo con sitio <i>NdeI</i> para construcción de la proteína truncada cAbrA1 |
| AY-117 | TCAGGCGGCACGAGGTGGTGG | Oligo directo para RT-PCR de actII-ORF4 |
| AY-118 | ACCCGGTGCTCCCCAGCAG | Oligo inverso para RT-PCR de actII-ORF4 |
| AY-119 | TTTTCATATGTTGGGACGTGTCCATGTAATCACC | Oligo directo para amplificar la región 2 del ORF <i>actII-ORF4</i> (tomado de Uguru et al, 2005) |

APÉNDICE 1: Tablas de oligonucleótidos

| Oligonucleótidos | Secuencia (5'-3') | Función |
|------------------|------------------------------------|--|
| AY-120 | TTTTCATATGTCGTGCCGCCTGAGGAGCAGCAGC | Oligo inverso para amplificar la región 2 del ORF <i>actII-ORF4</i> (tomado de Uguru <i>et al.</i> , 2005) |
| AY-121 | TTTTCATATGATCCCGGCCGCGGAGCGAC | Oligo directo para amplificar el promotor 5461p |
| AY-122 | TTTTCATATGCTGCTGCCGCGCGGAAGAC | Oligo inverso para amplificar el promotor 5461p |
| AY-123 | TTTTCATATGATCACGTGTCGGACGGATGAG | Oligo directo para amplificar el promotor 2286p |
| AY-124 | TTTTCATATGATCCGGCACCCGTGACGACG | Oligo inverso para amplificar el promotor 2286p |
| AY-127 | TTTTCATATGCCGCTCCGAGCCCGAGTCAG | Oligo directo para amplificar el promotor 7648p |
| AY-128 | TTTTCATATGTCCGTACGGTCCTGGAACCGG | Oligo inverso para amplificar el promotor 7648p |
| AY-129 | TTTTCATATGCCTCCTACATCGACGCCGTG | Oligo directo para amplificar el promotor 3166p |
| AY-130 | TTTTCATATGAGGGCGTACTCCCGGTCAGG | Oligo inverso para amplificar el promotor 3166p |
| AY-131 | TTTTCATATGCGATCGCCTCGCCGTGAGCC | Oligo directo para amplificar el promotor 1810p |
| AY-132 | TTTTCATATGAGTGCCTCCGCTGGTCTTCG | Oligo inverso para amplificar el promotor 1810p |
| AY-133 | TTTTCATATGCCCGGTGCATCACGGGGCCG | Oligo directo para amplificar el promotor 1376p |
| AY-134 | TTTTCATATGTTCCCCACCTCCGCCGACGC | Oligo inverso para amplificar el promotor 1376p |
| AY-135 | TTTTCATATGAAATCGTGTCATGATCGTCGG | Oligo directo para amplificar el promotor 6544p |
| AY-136 | TTTTCATATGCGGTTCCCCCAGTCCTCGC | Oligo inverso para amplificar el promotor 6544p |
| AY-137 | TTTTCATATGCCGACGCCGCGGCTCGC | Oligo directo para amplificar el promotor <i>abrC2p</i> |
| AY-138 | TTTTCATATGCGGTGCCGTCCCTCTCCTCG | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>abrC2p</i> |

APÉNDICE 1: Tablas de oligonucleótidos

| Oligonucleótidos | Secuencia (5'-3') | Función |
|------------------|--------------------------------|--|
| AY-139 | TTTTCATATGCGGCACAGCGGCCCGTGAC | Oligo directo para amplificar el promotor <i>abrC3p</i> |
| AY-141 | TTTTCATATGCGGGCGGTCGACCCCCGTAC | Oligo directo para amplificar el promotor <i>cdaRp</i> |
| AY-142 | TTTTCATATGCTCCCCCTGCCTGCAGTC | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>cdaRp</i> |
| AY-145 | GGATCGTCAGATAGCCCTCGTC | Oligo directo para amplificar el promotor <i>4506p</i> |
| AY-146 | TCCTCGTCGCCGGGGAGCAGG | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>4506p</i> |
| AY-147 | TAGAACACGGGTCCGACAGTCC | Oligo directo para amplificar el promotor <i>1715p</i> |
| AY-148 | ATCGCTCCCTCGCAACCGATTC | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>1715p</i> |
| AY-149 | TCGCGATCAGCCGGGGGATGC | Oligo directo para amplificar el promotor <i>7791p</i> |
| AY-150 | GCTTTCCTTTCTCCGATCACGTTC | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>7791p</i> |
| AY-151 | TGAGCCGCCGTCGGGCGGAG | Oligo directo para RT-PCR de <i>SCO2435</i> |
| AY-152 | ACACCGAGTCGGTGGAGGCGTC | Oligo inverso para RT-PCR de <i>SCO2435</i> |
| AY-153 | AGGGCAAGCTCGGCGCAGGAC | Oligo directo para RT-PCR de <i>SCO7765</i> |
| AY-154 | GGTGTCCACGATGGCGGTGGC | Oligo inverso para RT-PCR de <i>SCO7765</i> |
| AY-155 | GACCACTGCCTCTCGGTAAAATCC | Oligo directo para amplificar el promotor <i>actII-ORF4p</i> |
| AY-156 | GTTGAATCTCATCTGCGCCCCG | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>actII-ORF4p</i> |
| AY-125 | CTTCAGACGGCCACCCCGGAC | Oligo directo para amplificar el promotor <i>4295p</i> |

APÉNDICE 1: Tablas de oligonucleótidos

| Oligonucleótidos | Secuencia (5'-3') | Función |
|-------------------------|---------------------------|---|
| AY-126 | CGCACTTTGGCTGCTTCTTGTCG | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>4295p</i> |
| AY-157 | GGATCTTTGACCGGGAACACCCG | Oligo directo para amplificar el promotor <i>5502p</i> |
| AY-158 | GGATCACTTCTGCCTGCAAGAGTG | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>5502p</i> |
| AY-159 | AGAGAGTATGTCCTAAATGTCCGG | Oligo directo para amplificar el promotor <i>1480p</i> |
| AY-160 | GCCTACGTCACCTCGGATGTCG | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>1480p</i> |
| AY-161 | CGGACTGGTCGCTGGGCAACG | Oligo directo para amplificar el promotor <i>1038p</i> |
| AY-162 | GCGCGGGGAGATCCGTGAC | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>1038p</i> |
| AY-163 | CTCTCGACGGGAGCGTAGCAC | Oligo directo para amplificar el promotor <i>2442p</i> |
| AY-164 | GGGCTCCCGAGTGCTGACCTG | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>2442p</i> |
| AY-165 | GGATCAGTCGACTGACGTGGCG | Oligo directo para amplificar el promotor <i>3522/23p</i> |
| AY-166 | ATCGCTGTCGGCATGCCCGGC | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>3522/23p</i> |
| AY-168 | CACAAGCCCCTTCTCTCGCGG | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>0141p</i> |
| AY-169 | TTCGAAGTGATCGTTCGATATTTCG | Oligo directo para amplificar el promotor <i>2435p</i> |
| AY-170 | CGCTGTCTCCTCGTTCCCCCG | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>2435p</i> |
| AY-171 | GATCAGACGCGACGACGCTTCG | Oligo directo para amplificar el promotor <i>4729p</i> |
| AY-172 | GATCTCCTGGGCCTCCGCCG | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>4729p</i> |
| AY-173 | TGGCAGCTTTCAACGCGATCTTC | Oligo directo para amplificar el promotor <i>6089p</i> |

APÉNDICE 1: Tablas de oligonucleótidos

| Oligonucleótidos | Secuencia (5'-3') | Función |
|------------------|-------------------------------------|--|
| AY-174 | GGCCTGCGGTCCTTGTCTTCC | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>6089p</i> |
| AY-175 | ATCCTGGTGGAGTCACTGGGTG | Oligo directo para amplificar el promotor <i>5836/37p</i> |
| AY-176 | GATCTGACGCCGTCATTGTGG | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>5836/37p</i> |
| AY-177 | GAGGGACGGGTACGGGAGCG | Oligo directo para amplificar el promotor <i>redZp</i> |
| AY-178 | ACGTTGACTTTCGTCCAGGAAGG | Oligo inverso para amplificar el promotor <i>redZp</i> |
| SER001 | TTTTTTCATATGGAGGACAGGGTGCGGGTG | Oligo directo con sitio de corte <i>NdeI</i> para amplificar ORF <i>abrC3</i> |
| SER002 | TTTTTCTCGAGGGAATTGAGATAGGTCAGCACCGC | Oligo directo con sitio de corte <i>XhoI</i> para amplificar ORF <i>abrC3</i> |
| SRG.03 | TTTTTTCATATGGAACGTGACGTGCGGCC | Oligo directo con sitio de corte <i>NdeI</i> para amplificar <i>SCO2281</i> |
| SRG.04 | TTTTTCTCGAGGTGGCGTGGCGCCCGCGCG | Oligo directo con sitio de corte <i>XhoI</i> para amplificar <i>SCO2281</i> |
| SRG.05 | GAGCGCGACCTGGCCGACGGGGCAC | Oligo directo para construir las proteínas truncadas <i>AbrC1_H</i> y <i>AbrC2_H</i> |
| SRG.06 | GTGCCCCGTCGGCCAGGTCGCGCTC | Oligo inverso para construir las proteínas truncadas <i>AbrC1_H</i> y <i>AbrC2_H</i> |
| P1 | GGGAATGGATCCACATCTACGAATTC | Oligo directo para amplificar aptámeros del SELEX |
| P2 | AAGCTTCGTCAAGTCTGCAGTGAA | Oligo inverso para amplificar aptámeros del SELEX |

APÉNDICE 2

Localización de las secuencias consenso degeneradas en los insertos de la captura gDNA-AtrA. Los números entre paréntesis indican la posición de la secuencias respecto al codón de inicio de traducción (en color naranja si se engloba dentro de la secuencia).

5461p

(-8) GATCCCGGCCGCGGAGCGACGCATTCGGATTCTCACCCGTAGGTGGCGTGTCCGT
CGAACCGGTTGATGTCAGCGGCAATGGAGGAGGGTCTCAGCGGTCCAGGACC
CGCATCTCGAACCACGTGGTCTTCCCGCGCGGCAGCAG **(-159)**

4295p

(-315) GATCGGGAGCGCGTTCCCAACTCTACCGCGCTCAACCACATGGAATTGCCCC
TCCGTTTCTCTACGGAGAGGGCAATACGCACTACCAGGTGTATCCGCGGCGAATCAG
CCGCCGGCGACCGCCGGGATGA **(-447)**

2286p

(-57) GATCACGTGTCGGACGGATGAGTTCCGGATGTTCCGCGACCCGTACGCTGCCGA
GTCATGAACACCGTGAGAACCACCGACGAGGAAAGCGCCGGCGCGCGGAAGGTCGCC
GTCGTCACGGGTGCCGGAT **(+73)**

7648p

(-149) CCGCTTCCGAGCCCGAGTCAGGGACCGGTCCCGGTTCCCGTTCCGAGCCCGGTT
CCGGTTCCGGTTCCGGTTCCGAGCCCGGTTCCGGTTCCGGTTCCGGTTCCGGTTCCGGGA
CCGTACGGA **(-26)**

5085p

(-91) GATCGCTTGACGGCAAGCACATTGAAATCTGTTGAGTAGGCCTGTTATTGTCC
CCCCAGGAGACGGAGAATCTCGACGGGGGCGCAGATGAGATTCAACTTATTGGGACG
TGTCATGTAATCACCGATGCGGGATGTGTAATTCGCTTAAATCCTCGAAGGCGACC
CAGTCTCTGGTGCTGCTGCTCCTCAGGCGGCACGAGGTGGTGGGATC **(+129)**

5502p

(-30) GGATCTTTGACCGGGAACACCCGTGAAGCCGGGAAGACCGGGAATGGCCGTCCA
TGGTGCGAACAGACCGCAAAGAACGCATGAGCAATGCGGAATCACTCTTGACGGCAGA
AGTGATCC **(-150)**

1715p

(-200) TAGAACACGGGTCCGACAGTCCGGATCCCCGGGGTCTGGTTCCGGTCATCC
TCGTCATCCTCACGACGGATGCCGGGACGGAGCGGGAAGGCGGGAGCGGAGCGGGG
AAGTCCCTCTTGTGCCCTCTTGCGCGCGGGAAACCGCAATCCTACGGTGTGCCATAGGA
ATCGGGTGGGAATCGGTTGCGAGGGAGCGATC **(-1)**

1038p

(-100) CGGACTGGTCGCTGGGCAACGGGCTGGCTCAGTACGTAGGGTCCGGATCATGCT
GAGACTCGGAATCCCCGTCGCTCGGTGTCACGGATCTCCCCGCGC **(0)**

1480p

(-200) AGAGAGTATGTCCTAAATGTCCGGCCTGGCGGAGGCTGACCAGGACTTTTCCGC
TGTTCTCGCTGACTCTGGCGGACTTGACCGCTAGTCTCCGTCGAGAGTCGTCGGGCGA
GCGTGTGGCCGTGGCTCACCAGGTGAGGGGCGACCAGGTTCCACCGGTCCGTATCC
GACAGTTCGACATCCGAGGTGACGTAGGC **(0)**

BIBLIOGRAFÍA

A

Abbas, A. and C. Edwards. 1989. Effects of metals on a range of *Streptomyces* species. *Appl Environ Microbiol.* 55:2030-2035.

Adamidis, T. and W. Champness. 1992. Genetic analysis of *absB*, a *Streptomyces coelicolor* locus involved in global antibiotic regulation. *J Bacteriol.* 174:4622-4628.

Adamidis, T., P. Riggle and W. Champness. 1990. Mutations in a new *Streptomyces coelicolor* locus which globally block antibiotic biosynthesis but not sporulation. *J Bacteriol.* 172:2962-2969.

Adham, S.A., A.B. Campelo, A. Ramos and J.A. Gil. 2001. Construction of a xylanase-producing strain of *Brevibacterium lactofermentum* by stable integration of an engineered *xysA* gene from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl Environ Microbiol.* 67:5425-30.

Arribas-Bosacoma, R., S.K. Kim, C. Ferrer-Orta, A.G. Blanco, P.J. Pereira, F.X. Gomis-Ruth, B.L. Wanner, M. Coll and M. Sola. 2007. The X-ray crystal structures of two constitutively active mutants of the *Escherichia coli* PhoB receiver domain give insights into activation. *J Mol Biol.* 366:626-41.

B

Baltz, R.H. 1998. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Trends Microbiol.* 6:76-83.

Bao, K. and S.N. Cohen. 2001. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev.* 15:1518-27.

Barakat, M., P. Ortet, C. Jourlin-Castelli, M. Ansaldi, V. Mejean and D.E. Whitworth. 2009. P2CS: a two-component system resource for prokaryotic signal transduction research. *BMC Genomics.* 10:315.

Barbieri, C.M. and A.M. Stock. 2008. Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both *in vitro* and *in vivo* using Phos-tag-based reagents. *Anal Biochem.* 376:73-82.

Bentley, S.D., K.F. Chater, A.M. Cerdeno-Tarraga, G.L. Challis, N.R. Thomson, K.D. James, D.E. Harris, M.A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C.W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C.H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M.A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B.G. Barrell, J. Parkhill and D.A. Hopwood. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417:141-147.

Bhattacharya, M., A. Biswas and A.K. Das. 2010. Interaction analysis of TcrX/Y two component system from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochimie.* 92:263-72.

Bibb, M. 1996. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* 142:1335-1344.

Bibb, M. and A. Hesketh. 2009. Chapter 4. Analyzing the regulation of antibiotic production in streptomycetes. *Methods Enzymol.* 458:93-116.

Bibb, M.J. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol.* 8:208-15.

Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research.* 7:1513-1523.

Bishop, A., S. Fielding, P. Dyson and P. Herron. 2004. Systematic insertional mutagenesis of a streptomycete genome: a link between osmoadaptation and antibiotic production. *Genome Res.* 14:893-900.

Bourret, R.B., J.F. Hess and M.I. Simon. 1990. Conserved aspartate residues and phosphorylation in signal transduction by the chemotaxis protein CheY. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:41-5.

Brian, P., P.J. Riggle, R.A. Santos and W.C. Champness. 1996. Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an *absA*-encoded putative signal transduction system. *J Bacteriol.* 178:3221-3231.

Buelow, D.R. and T.L. Raivio. 2009. Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Mol Microbiol.* 75: 546-66.

C

Capstick, D.S., J.M. Willey, M.J. Buttner and M.A. Elliot. 2007. SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 64:602-13.

Casino, P., A. Fernández-Álvarez, C. Alfonso, G. Rivas and A. Marina. 2007. Identification of a novel two component system in *Thermotoga maritima*. Complex stoichiometry and crystallization. *Biochim Biophys Acta.* 1774:603-9.

Casino, P., V. Rubio and A. Marina. 2009. Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell.* 139:325-336.

Chakraborty, R., J. White, E. Takano and M. Bibb. 1996. Cloning, characterization and disruption of a (p)ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 19:357-368.

Challis, G.L. and D.A. Hopwood. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 Suppl 2:14555-14561.

Chang, H.M., M.Y. Chen, Y.T. Shieh, M.J. Bibb and C.W. Chen. 1996. The *cutRS* signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the

polyketide antibiotic actinorhodin. *Mol Microbiol.* 21:1075-1085.

Charaniya, S., S. Mehra, W. Lian, K.P. Jayapal, G. Karypis and W.S. Hu. 2007. Transcriptome dynamics-based operon prediction and verification in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res.* 35:7222-7236.

Chater, K.F. 2001. Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr Opin Microbiol.* 4:667-673.

Chater, K.F. and S. Horinouchi. 2003. Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. *Mol Microbiol.* 48:9-15.

Chater, K.F. and R. Losick. 1997. Mycelial life style of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its relatives. In *Bacteria as Multicellular Organism*. James A. Shapiro and Martin Dworkin (Eds). New York and Oxford. Oxford University Press.

Cherepanov, P.P. and W. Wackernagel. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene.* 158:9-14.

Chouayekh, H. and M.J. Viroille. 2002. The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol.* 43:919-930.

Claessen, D., W. de Jong, L. Dijkhuizen and H.A. Wosten. 2006. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol.* 14:313-9.

Coco, E.A., K.E. Narva and J.S. Feitelson. 1991. New classes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) mutants blocked in undecylprodigiosin (Red) biosynthesis. *Mol Gen Genet.* 227:28-32.

Coisne, S., M. Bechet and R. Blondeau. 1999. Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in iron-restricted media. *Lett Appl Microbiol.* 28:199-202.

D

Datsenko, K.A. and B.L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:6640-6645.

Díaz, M., A. Esteban, J.M. Fernández-Ábalos and R.I. Santamaría. 2005. The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*. *Microbiology*. 151:2583-2592.

Díaz, M., E. Ferreras, R. Moreno, A. Yepes, J. Berenguer, and R. Santamaría. 2008. High-level overproduction of *Thermus* enzymes in *Streptomyces lividans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 79: 1001-1008.

F

Fabret, C., V.A. Feher and J.A. Hoch. 1999. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J Bacteriol*. 181:1975-1983.

Fernández-Ábalos, J.M., V. Reviejo, M. Díaz, S. Rodríguez, F. Leal and R.I. Santamaría. 2003. Posttranslational processing of the xylanase Xys1L from *Streptomyces halstedii* JM8 is carried out by secreted serine proteases. *Microbiology*. 149:1623-1632.

Fernández-Moreno, M.A., J.L. Caballero, D.A. Hopwood and F. Malpartida. 1991. The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell*. 66:769-780.

Flardh, K. and M.J. Buttner. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat Rev Microbiol*. 7:36-49.

Floriani, B. and M. Bibb. 1996. *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in

Streptomyces coelicolor A3(2). *Mol Microbiol*. 21:385-396.

Friedland, N., T.R. Mack, M. Yu, L.W. Hung, T.C. Terwilliger, G.S. Waldo and A.M. Stock. 2007. Domain orientation in the inactive response regulator *Mycobacterium tuberculosis* MtrA provides a barrier to activation. *Biochemistry*. 46:6733-6743.

G

Galperin, M.Y. 2006. Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol*. 188:4169-4182.

Galperin, M.Y. and A.N. Nikolskaya. 2007. Identification of sensory and signal-transducing domains in two-component signaling systems. *Methods Enzymol*. 422:47-74.

Gao, R., A. Mukhopadhyay, F. Fang and D.G. Lynn. 2006. Constitutive activation of two-component response regulators: characterization of VirG activation in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol*. 188:5204-11.

Gao, R. and A.M. Stock. 2009. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol*. 63:133-154.

Goshi, K., T. Uchida, A. Lezhava, M. Yamasaki, K. Hiratsu, H. Shinkawa and H. Kinashi. 2002. Cloning and analysis of the telomere and terminal inverted repeat of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol*. 184:3411-5.

Gotoh, Y., Y. Eguchi, T. Watanabe, S. Okamoto, A. Doi and R. Utsumi. 2010. Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 13:232-9.

Goulian, M. 2010. Two-component signaling circuit structure and properties. *Curr Opin Microbiol* 13:184-9.

Gravenbeek, M.L. and G.H. Jones. 2008. The endonuclease activity of RNase III is

required for the regulation of antibiotic production by *Streptomyces coelicolor*. *Microbiol.* 154:3547-3555.

Groban, E.S., E.J. Clarke, H.M. Salis, S.M. Miller and C.A. Voigt. 2009. Kinetic buffering of cross talk between bacterial two-component sensors. *J Mol Biol.* 390:380-93.

Gust, B., G.L. Challis, K. Fowler, T. Kieser and K.F. Chater. 2003. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:1541-1546.

Gust, B., T. Kieser and C.K. F. 2002. REDIRECT technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*.

H

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166:557-80.

Hanahan, D., and M. Meselson. 1983. Plasmid screening at high colony density. *Methods in Enzymol.* 100:333-342.

He, X., C. Wu, D. Yarbrough, L. Sim, G. Niu, J. Merritt, W. Shi and F. Qi. 2008. The *cia* operon of *Streptococcus mutans* encodes a unique component required for calcium-mediated autoregulation. *Mol Microbiol.* 70:112-26.

Hempel, A.M., S.B. Wang, M. Letek, J.A. Gil and K. Flardh. 2008. Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 190:7579-83.

Hesketh, A., G. Bucca, E. Laing, F. Flett, G. Hotchkiss, C.P. Smith and K.F. Chater. 2007. New pleiotropic effects of eliminating a rare tRNA from *Streptomyces coelicolor*, revealed by combined proteomic and transcriptomic analysis of liquid cultures. *BMC Genomics.* 8:261.

Hesketh, A., H. Kock, S. Mootien and M. Bibb. 2009. The role of *absC*, a novel

regulatory gene for secondary metabolism, in zinc-dependent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 74:1427-44.

Himpens, S., C. Loch, and P. Supply. 2000. Molecular characterization of the mycobacterial SenX3-RegX3 two-component system: evidence for autoregulation. *Microbiology.* 12:3091-8.

Hirano, S., K. Tanaka, Y. Ohnishi and S. Horinouchi. 2008. Conditionally positive effect of the TetR-family transcriptional regulator AtrA on streptomycin production by *Streptomyces griseus*. *Microbiology.* 154:905-914.

Ho, T.F., C.J. Ma, C.H. Lu, Y.T. Tsai, Y.H. Wei, J.S. Chang, J.K. Lai, P.J. Cheuh, C.T. Yeh, P.C. Tang, J. Tsai Chang, J.L. Ko, F.S. Liu, H.E. Yen and C.C. Chang. 2007. Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53. *Toxicol Appl Pharmacol.* 225:318-328.

Hodgson, D.A. 2000. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol.* 42:238-247.

Homerova, D., R. Knirschova and J. Kormanec. 2002. Response regulator ChiR regulates expression of chitinase gene, *chiC*, in *Streptomyces coelicolor*. *Folia Microbiol (Praha).* 47:499-505.

Hong, H.J., M.I. Hutchings, J.M. Neu, G.D. Wright, M.S. Paget and M.J. Buttner. 2004. Characterization of an inducible vancomycin resistance system in *Streptomyces coelicolor* reveals a novel gene (*vanK*) required for drug resistance. *Mol Microbiol.* 52:1107-1121.

Hopwood, D.A. 1988. The Leeuwenhoek lecture, 1987. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 235:121-138.

Hopwood, D.A., J.M. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward and H.

Schrempf. 1985a. Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual.

Hopwood, D.A., T. Kieser, H.M. Wright and M.J. Bibb. 1983. Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *J Gen Microbiol.* 129:2257-69.

Hopwood, D.A., F. Malpartida, H.M. Kieser, H. Ikeda, J. Duncan, I. Fujii, B.A. Rudd, H.G. Floss and S. Omura. 1985b. Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. *Nature.* 314:642-644.

Hoskisson, P.A. and M.I. Hutchings. 2006. MtrAB-LpqB: a conserved three-component system in actinobacteria? *Trends Microbiol.* 14:444-449.

Hsiao, N.H. and R. Kirby. 2008. Comparative genomics of *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces cattleya*, *Streptomyces maritimus* and *Kitasatospora aureofaciens* using a *Streptomyces coelicolor* microarray system. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 93:1-25.

Huang, J., J. Shi, V. Molle, B. Sohlberg, D. Weaver, M.J. Bibb, N. Karoonuthaisiri, C.J. Lih, C.M. Kao, M.J. Buttner and S.N. Cohen. 2005. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 58:1276-1287.

Hur, Y.A., S.S. Choi, D.H. Sherman and E.S. Kim. 2008. Identification of TmcN as a pathway-specific positive regulator of tautomycin biosynthesis in *Streptomyces sp.* CK4412. *Microbiology.* 154:2912-9.

Hutchings, M.I., H.J. Hong and M.J. Buttner. 2006. The vancomycin resistance VanRS two-component signal transduction system of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 59:923-935.

Hutchings, M.I., P.A. Hoskisson, G. Chandra and M.J. Buttner. 2004. Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* 150:2795-2806.

I

Ikeda, H., J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori and S. Omura. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol.* 21:526-531.

Ishizuka, H., S. Horinouchi, H.M. Kieser, D.A. Hopwood and T. Beppu. 1992. A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces spp.* *J Bacteriol.* 174:7585-7594.

J

Jagadeesan, S., P. Mann, C.W. Schink and P.I. Higgs. 2009. A novel "four-component" two-component signal transduction mechanism regulates developmental progression in *Myxococcus xanthus*. *J Biol Chem.* 284:21435-45.

Jenal, U. and M.Y. Galperin. 2009. Single domain response regulators: molecular switches with emerging roles in cell organization and dynamics. *Curr Opin Microbiol.* 12:152-160.

Jones, G.H. 2010. RNA degradation and the regulation of antibiotic synthesis in *Streptomyces*. *Future Microbiol.* 5:419-429.

Joseph, P., G. Fichant, Y. Quentin and F. Denizot. 2002. Regulatory relationship of two-component and ABC transport systems and clustering of their genes in the *Bacillus/Clostridium* group, suggest a functional link between them. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 4:503-13.

K

Kenney, L.J. 2010. How important is the phosphatase activity of sensor kinases? *Curr Opin Microbiol.* 13:168-76.

Kieser, T., D.A. Hopwood, H.M. Wright and C.J. Thompson. 1982. pIJ101, a multi-copy broad host-range *Streptomyces* plasmid: functional analysis and

- development of DNA cloning vectors. *Mol Gen Genet.* 185:223-8.
- Kieser, T., Hopwood, D.A., Bibb, J.M., Chater, K.F. and Buttner M.J. 2000. Practical *Streptomyces* genetics, Norwich.
- Kim, D. and S. Forst. 2001. Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology.* 147:1197-1212.
- Kitani, S., H. Ikeda, T. Sakamoto, S. Noguchi and T. Nihira. 2009. Characterization of a regulatory gene, *aveR*, for the biosynthesis of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 82:1089-96.
- Klose, K.E., D.S. Weiss and S. Kustu. 1993. Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NTRC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. *J Mol Biol.* 232:67-78.
- Krause, E. 2009. Study of an operon formed by an ABC transporter and a two component system implied in antibiotic regulation in *Streptomyces coelicolor*. Trabajo de Grado.
-
- L**
-
- Lacal, J., M.E. Guazzaroni, P. Gutierrez-del-Arroyo, A. Busch, M. Velez, T. Krell and J.L. Ramos. 2008. Two levels of cooperativeness in the binding of TodT to the *tod* operon promoter. *J Mol Biol.* 384:1037-47.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lakey, J.H., E.J. Lea, B.A. Rudd, H.M. Wright and D.A. Hopwood. 1983. A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity. *J Gen Microbiol.* 129:3565-73.
- Lan, C.Y. and M.M. Igo. 1998. Differential expression of the OmpF and OmpC porin proteins in *Escherichia coli* K-12 depends upon the level of active OmpR. *J Bacteriol.* 180:171-4.
- Larson, J.L. and C.L. Hersherger. 1986. The minimal replicon of a streptomycete plasmid produces an ultrahigh level of plasmid DNA. *Plasmid.* 15:199-209.
- Li, Y.Q., P.L. Chen, S.F. Chen, D. Wu and J. Zheng. 2004. A pair of two-component regulatory genes *ecrA1/A2* in *S. coelicolor*. *J Zhejiang Univ Sci.* 5:173-179.
- Locci, R. 1989. Streptomyces and Related Genera. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. S.T. Williams, editor, Baltimore. 2451-2508.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol chem.* 193(1):265-75.
- Lu, Y., W. Wang, D. Shu, W. Zhang, L. Chen, Z. Qin, S. Yang and W. Jiang. 2007. Characterization of a novel two-component regulatory system involved in the regulation of both actinorhodin and a type I polyketide in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77:625-635.
- Lukat, G.S., W.R. McCleary, A.M. Stock and J.B. Stock. 1992. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:718-722.
-
- M**
-
- MacNeil, D.J., K.M. Gewain, C.L. Ruby, G. Dezeny, P.H. Gibbons and T. MacNeil. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene.* 111:61-68.
- Manteca, A., D. Claessen, C. López-Iglesias and J. Sánchez. 2007. Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiol Lett.* 274:118-25.

- Manteca, A., M. Fernández and J. Sánchez. 2005a. A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology*. 151:3689-97.
- Manteca, A., M. Fernández and J. Sánchez. 2005b. Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves. *BMC Microbiol.* 5:51.
- Manteca, A. and J. Sánchez. 2009. *Streptomyces* development in colonies and soils. *Appl Environ Microbiol.* 75:2920-4.
- Maris, A.E., M.R. Sawaya, M. Kaczor-Grzeskowiak, M.R. Jarvis, S.M. Bearson, M.L. Kopka, I. Schroder, R.P. Gunsalus and R.E. Dickerson. 2002. Dimerization allows DNA target site recognition by the NarL response regulator. *Nat Struct Biol.* 9:771-778.
- Martínez-Antonio, A. and J. Collado-Vides. 2003. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 6:482-489.
- Mascher, T., J.D. Helmann and G. Uden. 2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70:910-938.
- Matsudaira, P. 1987. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *Journal of Biological Chemistry.* 262:10035-10038.
- McKenzie, N.L. and J.R. Nodwell. 2007. Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters. *J Bacteriol.* 189:5284-5292.
- McKenzie, N.L. and J.R. Nodwell. 2009. Transmembrane topology of the AbsA1 sensor kinase of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*.
- McKenzie, N.L., M. Thaker, K. Koteva, D.W. Hughes, G.D. Wright and J.R. Nodwell. 2010. Induction of antimicrobial activities in heterologous streptomycetes using alleles of the *Streptomyces coelicolor* gene *absA1*. *J Antibiot (Tokyo)*.
- Meehl, M., S. Herbert, F. Gotz and A. Cheung. 2007. Interaction of the GraRS two-component system with the VraFG ABC transporter to support vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:2679-89.
- Mehra, S., S. Charaniya, E. Takano and W.S. Hu. 2008. A bistable gene switch for antibiotic biosynthesis: the butyrolactone regulon in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One.* 3:e2724.
- Mendez, C., A.F. Brana, M.B. Manzanal and C. Hardisson. 1985. Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can J Microbiol.* 31:446-450.
- Mitrophanov, A.Y. and E.A. Groisman. 2008. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev.* 22:2601-11.
- Moran, M.A., L.T. Rutherford and R.E. Hodson. 1995. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Appl Environ Microbiol.* 61:3695-3700.

N

- Natsume, M., K. Yasui and S. Marumo. 1989. Calcium ion regulates aerial mycelium formation in actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)*. 42:440-7.
- Neumuller, A.M., D. Konz and M.A. Marahiel. 2001. The two-component regulatory system BacRS is associated with bacitracin 'self-resistance' of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716. *Eur J Biochem.* 268:3180-9.
- Nothhaft, H., S. Rigali, B. Boomsma, M. Swiatek, K.J. McDowall, G.P. van Wezel and F. Titgemeyer. 2010. The permease

gene *nagE2* is the key to N-acetylglucosamine sensing and utilization in *Streptomyces coelicolor* and is subject to multi-level control. *Mol Microbiol.*

O

Ohnishi, Y., J. Ishikawa, H. Hara, H. Suzuki, M. Ikenoya, H. Ikeda, A. Yamashita, M. Hattori and S. Horinouchi. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol.* 190:4050-60.

Ohnishi, Y., H. Yamazaki, J.Y. Kato, A. Tomono and S. Horinouchi. 2005. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69:431-9.

Overgaard, M., S. Wegener-Feldbrugge and L. Sogaard-Andersen. 2006. The orphan response regulator DigR is required for synthesis of extracellular matrix fibrils in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* 188:4384-94.

P

Paget, M.S., L. Chamberlin, A. Atrih, S.J. Foster and M.J. Buttner. 1999. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 181:204-211.

Parajuli, N., D.B. Basnet, H. Chan Lee, J.K. Sohng and K. Liou. 2004. Genome analyses of *Streptomyces peucetius* ATCC 27952 for the identification and comparison of cytochrome P450 complement with other *Streptomyces*. *Arch Biochem Biophys.* 425:233-41.

Pawlik, K., M. Kotowska, K.F. Chater, K. Kuczek and E. Takano. 2007. A cryptic type I polyketide synthase (*cpk*) gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch Microbiol.* 187:87-99.

Podlesek, Z., A. Comino, B. Herzog-Velikonja, D. Zgur-Bertok, R. Komel and

M. Grabnar. 1995. *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol Microbiol.* 16:969-76.

R

Redenbach, M., H.M. Kieser, D. Denapaite, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi and D.A. Hopwood. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol Microbiol.* 21:77-96.

Robinson, V.L., D.R. Buckler and A.M. Stock. 2000. A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat Struct Biol.* 7:626-633.

Robinson, V.L., T. Wu and A.M. Stock. 2003. Structural analysis of the domain interface in DrrB, a response regulator of the OmpR/PhoB subfamily. *J Bacteriol.* 185:4186-4194.

Rodríguez-García, A., C. Barreiro, F. Santos-Beneit, A. Sola-Landa and J.F. Martín. 2007. Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a DeltaphoP mutant. *Proteomics.* 7:2410-2429.

Rodríguez, S., R.I. Santamaría, J.M. Fernández-Ábalos and M. Díaz. 2005. Identification of the sequences involved in the glucose-repressed transcription of the *Streptomyces halstedii* JM8 *xysA* promoter. *Gene.* 351:1-9.

Rose, M.D., F. Winston and P. Hieter. 1990. *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual.*

Ruiz, D., P. Salinas, M.L. López-Redondo, M.L. Cayuela, A. Marina, and A. Contreras. 2008. Phosphorylation-independent activation of the atypical response regulator NblR. *Microbiology.* 154:3002-3015.

Ryding, N.J., T.B. Anderson and W.C. Champness. 2002. Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent

antibiotic by *absA*, encoding a cluster-linked two-component system. *J Bacteriol.* 184:794-805.

S

Sambrook, J., E. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor, N. Y.

San Paolo, S., J. Huang, S.N. Cohen and C.J. Thompson. 2006. *rag* genes: novel components of the RamR regulon that trigger morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 61:1167-1186.

Santos-Beneit, F., A. Rodríguez-García, A. Sola-Landa and J.F. Martín. 2009. Crosstalk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. *Mol Microbiol.*

Scaramozzino, F., A. White, M. Perego and J.A. Hoch. 2009. A unique GTP-dependent sporulation sensor histidine kinase in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.* 191:687-692.

Scharf, B.E. 2010. Summary of useful methods for two-component system research. *Curr Opin Microbiol.* 13:246-52

Sello, J.K. and M.J. Buttner. 2008. The gene encoding RNase III in *Streptomyces coelicolor* is transcribed during exponential phase and is required for antibiotic production and for proper sporulation. *J Bacteriol.* 190:4079-83.

Sheeler, N.L., S.V. MacMillan and J.R. Nodwell. 2005. Biochemical activities of the *absA* two-component system of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 187:687-696.

Sheridan, R.C., McCullough J.F. and Wakefield, Z. T. 1971. *Inorg Synth.* 13: 23-26.

Shu, D., L. Chen, W. Wang, Z. Yu, C. Ren, W. Zhang, S. Yang, Y. Lu and W. Jiang. 2009. *afsQ1-Q2-sigQ* is a pleiotropic but

conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81:1149-1160.

Silversmith, R. E. 2010. Auxiliary phosphatases in two-component signal transduction. *Curr Opin Microbiol.* 13:177-83.

Skerker, J.M., B.S. Perchuk, A. Siryaporn, E.A. Lubin, O. Ashenberg, M. Goulian and M.T. Laub. 2008. Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems. *Cell.* 133:1043-54.

Smith, C.L., J.G. Econome, A. Schutt, S. Klco and C.R. Cantor. 1987. A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome. *Science.* 236:1448-1453.

Sola-Landa, A., R.S. Moura and J.F. Martín. 2003. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:6133-6138.

Sola-Landa, A., A. Rodríguez-García, A.K. Apel and J.F. Martín. 2008. Target genes and structure of the direct repeats in the DNA-binding sequences of the response regulator PhoP in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res.* 36:1358-1368.

Sprusansky, O., K. Stirrett, D. Skinner, C. Denoya and J. Westpheling. 2005. The *bkdR* gene of *Streptomyces coelicolor* is required for morphogenesis and antibiotic production and encodes a transcriptional regulator of a branched-chain amino acid dehydrogenase complex. *J Bacteriol.* 187:664-71.

Steyn, A.J., J. Joseph and B.R. Bloom. 2003. Interaction of the sensor module of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv KdpD with members of the Lpr family. *Mol Microbiol.* 47:1075-1089.

Studier, F.W. and B.A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 189:113-30.

Szurmant, H., R.A. White and J.A. Hoch. 2007. Sensor complexes regulating two-component signal transduction. *Curr Opin Struct Biol.* 17:706-715.

T

Takano, E. 2006. Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr Opin Microbiol.* 9:287-294.

Takano, E., H.C. Gramajo, E. Strauch, N. Andrés, J. White and M.J. Bibb. 1992. Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 6:2797-2804.

Takano, E., M. Tao, F. Long, M.J. Bibb, L. Wang, W. Li, M.J. Buttner, M.J. Bibb, Z.X. Deng and K.F. Chater. 2003. A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 50:475-486.

Tanaka, A., Y. Takano, Y. Ohnishi and S. Horinouchi. 2007. AfsR Recruits RNA Polymerase to the *afsS* Promoter: A Model for Transcriptional Activation by SARPs. *J Mol Biol.* 369:322-333.

Tapparel, C., A. Monod and W.L. Kelley. 2006. The DNA-binding domain of the *Escherichia coli* CpxR two-component response regulator is constitutively active and cannot be fully attenuated by fused adjacent heterologous regulatory domains. *Microbiology.* 152:431-41.

Thomason, P. and R. Kay. 2000. Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *J Cell Sci.* 113 (Pt 18):3141-3150.

Thompson, C.J., D. Fink and L.D. Nguyen. 2002. Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biol.* 3:REVIEWS1020.

Traag, B.A. and G.P. van Wezel. 2008. The SsgA-like proteins in actinomycetes: small proteins up to a big task. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 94:85-97.

Tsujibo, H., N. Hatano, T. Okamoto, H. Endo, K. Miyamoto and Y. Inamori. 1999. Synthesis of chitinase in *Streptomyces thermoviolaceus* is regulated by a two-component sensor-regulator system. *FEMS Microbiol Lett.* 181:83-90.

U

Uguru, G.C., K.E. Stephens, J.A. Stead, J.E. Towle, S. Baumberg and K.J. McDowall. 2005. Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 58:131-150.

Ulrich, L.E. and I.B. Zhulin. 2010. The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Res.* 38:D401-D407.

Urao, T., K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 2000. Two-component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* 5:67-74.

V

van Keulen, G., H.M. Jonkers, D. Claessen, L. Dijkhuizen and H.A. Wosten. 2003. Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 185:1455-1458.

Vicente, C.M., J. Santos-Aberturas, S.M. Guerra, T.D. Payero, J.F. Martín and J.F. Aparicio. 2009. PimT, an amino acid exporter controls polyene production via secretion of the quorum sensing pimaricin-inducer PI-factor in *Streptomyces natalensis*. *Microb Cell Fact.* 8:33.

W

Waksman, S.A. 1967. The Genus *Streptomyces*. In *The Actinomycetes. A Summary of Current Knowledge*, New York. 101-112.

- Wang, S.L., K.Q. Fan, X. Yang, Z.X. Lin, X.P. Xu and K.Q. Yang. 2008. CabC, an EF-hand calcium-binding protein, is involved in Ca²⁺-mediated regulation of spore germination and aerial hypha formation in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 190:4061-8.
- Wang, W., D. Shu, L. Chen, W. Jiang and Y. Lu. 2009. Cross-talk between an orphan response regulator and a noncognate histidine kinase in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiol Lett.* 294:150-156.
- Watanabe, T., A. Okada, Y. Gotoh and R. Utsumi. 2008. Inhibitors targeting two-component signal transduction. *Adv Exp Med Biol.* 631:229-236.
- West, A.H. and A.M. Stock. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci.* 26:369-376.
- White, J. and M. Bibb. 1997. *bldA* dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade. *J Bacteriol.* 179:627-633.
- Wietzorrek, A. and M. Bibb. 1997. A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol Microbiol.* 25:1181-1184.
- Wilson, D.J., Y. Xue, K.A. Reynolds and D.H. Sherman. 2001. Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae*. *J Bacteriol.* 183:3468-75.
- Wiley, J., R. Santamaría, J. Guijarro, M. Geistlich and R. Losick. 1991. Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Cell.* 65:641-50.
- Wiley, J.M., A. Willems, S. Kodani and J.R. Nodwell. 2006. Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 59:731-42.
- Williamson, N.R., P.C. Fineran, F.J. Leeper and G.P. Salmond. 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat Rev Microbiol.* 4:887-99.
- Winkler, M.E. and J.A. Hoch. 2008. Essentiality, bypass, and targeting of the YycFG (VicRK) two-component regulatory system in gram-positive bacteria. *J Bacteriol.* 190:2645-8.
- Wolanin, P.M., P.A. Thomason and J.B. Stock. 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* 3:REVIEWS3013.
- Wolfe, A.J. 2010. Physiologically relevant small phosphodonors link metabolism to signal transduction. *Curr Opin Microbiol.*
- Wood, J.M. 1999. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:230-262.

X

- Xu W., J. Huang, R. Lin, J. Shi and SN. Cohen. 2010. Regulation of morphological differentiation in *S. coelicolor* by RNase III (AbsB) cleavage of mRNA encoding the AdpA transcription factor. *Mol Microbiol.* 75:781-791.
- Xu, Q., B.A. Traag, J. Willems, D. McMullan, M.D. Miller, M.A. Elsliger, P. Abdubek, T. Astakhova, H.L. Axelrod, C. Bakolitsa, D. Carlton, C. Chen, H.J. Chiu, M. Chruszcz, T. Clayton, D. Das, M.C. Deller, L. Duan, K. Ellrott, D. Ernst, C.L. Farr, J. Feuerhelm, J.C. Grant, A. Grzechnik, S.K. Grzechnik, G.W. Han, L. Jaroszewski, K.K. Jin, H.E. Klock, M.W. Knuth, P. Kozbial, S.S. Krishna, A. Kumar, D. Marciano, W. Minor, A.M. Mommaas, A.T. Morse, E. Nigoghossian, A. Nopakun, L. Okach, S. Oommachen, J. Paulsen, C. Puckett, R. Reyes, C.L. Rife, N. Sefcovic, H.J. Tien, C.B. Trame, H. van den Bedem, S. Wang, D. Weekes, K.O. Hodgson, J. Wooley, A.M. Deacon, A. Godzik, S.A.

Lesley, I.A. Wilson and G.P. van Wezel. 2009. Structural and functional characterizations of SsgB, a conserved activator of developmental cell division in morphologically complex actinomycetes. *J Biol Chem.* 284:25268-25279.

Y

Yepes, A. 2006. Estudio de sistemas de dos componentes implicados en la regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor*. Trabajo de Grado. Universidad de Salamanca.

Young, F.E. and W., G.A. 1974. *Bacillus subtilis*. Handbook of genetics. King, R. C.(Ed). New York. 1:69-114.

Z

Zapf, J.W., J.A. Hoch and J.M. Whiteley. 1996. A phosphotransferase activity of the *Bacillus subtilis* sporulation protein Spo0F that employs phosphoramidate substrates. *Biochemistry.* 35:2926-2933.

Zhang, W. and L. Shi. 2005. Distribution and evolution of multiple-step phosphorelay in prokaryotes: lateral domain recruitment involved in the formation of hybrid-type histidine kinases. *Microbiology.* 151:2159-2173.