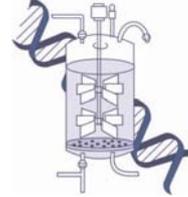




UNIVERSIDAD DE LEÓN  
Departamento de Biología Molecular  
Área de Microbiología

INBIOTEC  
Instituto de Biotecnología de León



Función de genes reguladores de la subfamilia LAL  
(large ATP-binding regulators of the LuxR family) de  
*S. coelicolor* en la producción de metabolitos  
secundarios

Susana Martínez Guerra  
León, 2010



## *Agradecimientos*

*Desco expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han hecho posible la realización de este trabajo.*

*Al Dr. Juan Francisco Martín por permitirme desarrollar este proyecto en INBIOTEC y por su codirección.*

*Al Dr. Jesús Aparicio por su codirección, estímulo y enseñanzas constantes. A tu lado he crecido tanto a nivel científico como personal.*

*A la Universidad de León por la concesión de una beca para la realización de esta tesis doctoral y al Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) por la concesión del proyecto GEN 2003-2045-CO9-08/NAC dentro del cual se enmarca este trabajo.*

*Al Dr. Antonio Rodríguez por sus enseñanzas en el mundo de la transcriptómica, por su eterna paciencia y buena disposición.*

*A Ramiro, Andrea, Maite, Javi, Carmen, Paco, Martita, Javichu, Irene, Kata y Rosma, gracias por vuestros consejos, enseñanzas tanto personales como profesionales, apoyo, constantes ánimos y por brindarme tantos buenos momentos en vuestra compañía. Gracias por vuestra amistad.*

*A mis compañeros de cuarto tanto a los que están, como a los que se han ido. Vosotros sois los que me "soportáis" cada día y los que hacéis el trabajo más llevadero.*

*A mis compañeros y ex compañeros de INBIOTEC, personal administrativo y técnico por crear tan buen ambiente de trabajo y por estar siempre dispuestos a colaborar.*

*A mi familia por su amor, apoyo y comprensión incondicional y por mostrarme que con trabajo todas las metas son alcanzables. Sé que siempre estaréis a mi lado.*

*A Roberto por su fortaleza, estoicismo y sinceridad; por escucharme y por hacerme reír. A Gabriel, que supo desde su primer mes de vida lo que era el sonido de las teclas del ordenador y ahora se abalanza para golpearlas. Gracias por vuestro amor.*



*A mi familia y especialmente,  
a mi abuelo Juan*



## ABREVIATURAS

**aa:** aminoácidos  
**Abs:** absorbancia  
**ADNg:** ADN genómico  
**AMPc/CAP:** complejo formado por AMP cíclico y la proteína de unión a AMP cíclico  
**Amp:** ampicilina  
**BrEt:** bromuro de etidio  
**CIA:** cloroformo:alcohol isoamílico  
**Cm:** cloranfenicol  
**col:** colaboradores  
**Conc:** concentración  
**CRP:** proteína receptora de AMPc  
**DIG:** digoxigenina  
**DMSO:** dimetilsulfóxido  
**DO:** densidad óptica  
**DO<sub>600</sub>:** densidad óptica a 600 nm  
**dsDNA:** ADN bicatenario  
**DTT:** ditioneitol  
**EDTA:** ácido etilendiaminotetracético  
**FRT:** zona que reconoce la FLP-recombinasa  
**GES:** genes estadísticamente significativos  
**kb:** kilobases  
**kDa:** kilodalton  
**Km:** kanamicina

**LAL:** del inglés "Large ATP-binding regulators of the LuxR family"  
**Mal:** maltodextrinas  
**MBP:** proteína de unión a maltosa  
**MOPS:** ácido morfolinopropanosulfónico  
**ORF:** marco de lectura abierta  
**p/v:** relación peso/volumen  
**PEG:** polietilenglicol  
**RR:** regulador de respuesta  
**SAM:** s-adenosil metionina  
**SARP:** del inglés "Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins"  
**SDS:** laurilsulfato sódico  
**SK:** quinasa sensora  
**SSC:** citrato salino estándar  
**ssDNA:** ADN monocatenario  
**TAE:** tris-acetato-EDTA  
**TCS:** sistema de dos componentes, del inglés "two component system"  
**Tm:** temperatura de anillamiento  
**Tris:** tris(hidroximetil)aminometano  
**V.:** voltio  
**v/v:** relación volumen/volumen  
**wt:** cepa silvestre, del inglés "wild type"

## Abreviaturas para aminoácidos

Abreviaturas para aminoácidos		
Ala	Alanina	A
Arg	Arginina	R
Asn	Asparagina	N
Asp	Ácido aspártico	D
Cys	Cisteína	C
Gln	Glutamina	Q
Glu	Ácido glutámico	E
Gly	Glicina	G
His	Histidina	H
Ile	Isoleucina	I
Leu	Leucina	L
Lys	Lisina	K
Met	Metionina	M
Phe	Fenilalanina	F
Pro	Prolina	P
Ser	Serina	S
Thr	Treonina	T
Trp	Triptófano	W
Tyr	Tirosina	Y
Val	Valina	V



## ***Índice***

---



<b>I. Introducción .....</b>	<b>1</b>
I.1. Características generales de <i>Streptomyces</i> .....	3
I.1.1. Hábitat natural de los actinomicetos .....	3
I.1.2. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> .....	4
I.1.3. Producción de metabolitos secundarios .....	5
I.1.4. Características genéticas de las especies de <i>Streptomyces</i> .....	7
I.1.4.1. El cromosoma de <i>Streptomyces</i> .....	7
I.1.4.2. Composición del genoma de <i>Streptomyces</i> .....	9
I.1.4.3. Inestabilidad genética .....	10
I.2. Regulación de la producción de metabolitos secundarios.....	10
I.2.1. Reguladores pleiotrópicos .....	11
I.2.1.1. Sistemas de dos componentes .....	11
I.2.1.2. Reguladores implicados en la diferenciación morfológica y bioquímica .....	14
I.2.1.3. Reguladores implicados en la diferenciación morfológica .....	15
I.2.2. Reguladores específicos .....	16
I.3. Reguladores de la familia LuxR .....	17
I.4. Reguladores LAL .....	18
I.5. <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	21
I.6. Objetivos del presente trabajo .....	26
<b>II. Materiales y Métodos .....</b>	<b>27</b>
II.1. Microorganismos utilizados .....	29
II.2. Vectores plasmídicos .....	29
II.3. Productos y reactivos .....	31
II.3.1. Reactivos específicos para biología molecular .....	31
II.3.1.1. Ácidos nucleicos .....	31
II.3.1.2. Soluciones de antibióticos y otros productos comúnmente utilizados .....	31
II.3.1.3. Enzimas de restricción, modificadoras y otras .....	31
II.3.1.4. Oligonucleótidos .....	32
II.3.1.5. Otros sistemas empleados .....	32
II.4. Medios de cultivo .....	33
II.4.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i> .....	33
II.4.2. Medios de cultivo para <i>S. coelicolor</i> .....	33
II.5. Crecimiento y conservación de los microorganismos.....	35
II.5.1. Crecimiento .....	35
II.5.1.1. Determinación del crecimiento de los microorganismos .....	35
II.5.2. Conservación .....	35
II.5.2.1. Obtención de esporas de <i>Streptomyces</i> .....	36
II.6. Aislamiento de ácidos nucleicos.....	36
II.6.1. Extracción de ADN .....	36
II.6.1.1. Limpieza y precipitación .....	36
II.6.1.2. Eliminación selectiva de ARN .....	37
II.6.1.3. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	37
II.6.1.4. Aislamiento de ADN total de <i>Streptomyces</i> .....	39
II.6.2. Aislamiento de ARN total de <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	40
II.7. Cuantificación y análisis de pureza de ácidos nucleicos.....	41
II.8. Tratamiento enzimático del ADN .....	41
II.8.1. Hidrólisis con endonucleasas de restricción.....	41
II.8.2. Ligación de fragmentos de ADN .....	42
II.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	42

II.10. Electroforesis de ácidos nucleicos .....	44
II.10.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	44
II.10.1.1. Recuperación de fragmentos de ADN separados por electroforesis .....	44
II.10.2. Electroforesis de ARN .....	45
II.10.2.1. Electroforesis de ARN en gel desnaturalizante .....	45
II.10.2.2. Electroforesis de ARN en bioanalizador .....	46
II.11. Transferencia de ADN a membranas .....	47
II.12. Procedimiento para la hibridación de ADN .....	48
II.12.1. Marcaje de sondas de ADN .....	48
II.12.2. Hibridación de ADN .....	48
II.13. Secuenciación de ADN .....	50
II.14. Introducción de ADN en <i>E. coli</i> .....	50
II.14.1. Transformación de <i>E. coli</i> .....	50
II.14.1.1. Inducción del estado de competencia .....	50
II.14.1.2. Procedimiento de transformación .....	51
II.14.2. Electroporación de <i>E. coli</i> .....	51
II.14.2.1. Inducción del estado de electro-competencia .....	51
II.14.2.2. Procedimiento de electroporación .....	51
II.15. Introducción de ADN en <i>S. coelicolor</i> mediante conjugación .....	52
II.16. Interrupción de genes mediante el sistema ReDirect .....	52
II.16.1. Purificación del casete de resistencia .....	53
II.16.2. Diseño de cebadores para ReDirect .....	53
II.16.3. Amplificación por PCR del casete de inactivación alargado .....	54
II.16.4. Introducción del cósmido de <i>S. coelicolor</i> en la cepa <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790 .....	54
II.16.5. Inactivación del gen de <i>Streptomyces</i> en el cósmido .....	55
II.16.6. Transferencia del cósmido con el gen inactivado a <i>Streptomyces</i> .....	55
II.17. Ensayos de producción de antibióticos .....	56
II.17.1. Ensayos de producción de actinorrodina y undecilprodigiosina .....	56
II.17.2. Ensayos de producción de CDA .....	56
II.18. Técnicas aplicadas en el análisis de la expresión génica .....	57
II.18.1. RT-PCR a tiempo final .....	57
II.18.2. RT-PCR a tiempo real .....	58
II.18.2.1. Retrotranscripción .....	58
II.18.2.2. PCR a tiempo real .....	59
II.18.2.3. Cuantificación de la expresión génica .....	60
II.18.3. Micromatrices .....	60
II.18.3.1. Pretratamiento y prehibridación de micromatrices con PRONTO! .....	61
II.18.3.2. Marcaje y purificación de ácidos nucleicos para micromatrices .....	62
II.18.3.3. Hibridación de las micromatrices .....	64
II.18.3.4. Lavados de las micromatrices hibridadas .....	65
II.18.3.5. Lectura de las micromatrices hibridadas, cuantificación de las señales de fluorescencia y preprocesamiento de los datos .....	66
II.19. Análisis informáticos .....	68
II.19.1. Análisis informático de las secuencias .....	68
II.19.2. Tratamiento estadístico de los datos .....	68
II.19.3. Procesado de los datos de las micromatrices .....	70

<b>III. Resultados y Discusión .....</b>	<b>73</b>
III.1. Identificación de genes LAL en el genoma de <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	75
III.2. Estudios de expresión diferencial de genes LAL bajo diferentes condiciones de cultivo	76
III.2.1. Selección de medio y condiciones de cultivo .....	76
III.2.2. Expresión diferencial de genes LAL en las condiciones de cultivo seleccionadas .....	77
III.3. Análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas seleccionadas .....	79
III.4. SCO0877 .....	80
III.4.1. Análisis estructural del gen <i>SCO0877</i> .....	80
III.4.2. Análisis funcional del gen <i>SCO0877</i> . .....	81
III.4.2.1. Inactivación del gen <i>SCO0877</i> .....	81
III.4.2.2. Análisis de la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en el mutante <i>S. coelicolor</i> M145:Δ0877 .....	84
III.4.2.3. Análisis de la producción de CDA en el mutante <i>S. coelicolor</i> M145:Δ0877 .....	86
III.4.2.4. La introducción del vector pSET152neo en las cepas <i>S. coelicolor</i> M145 y <i>S. coelicolor</i> M145:Δ0877 disminuye drásticamente la producción de antibióticos pigmentados .....	86
III.4.2.5. Efectos de la introducción del gen <i>SCO0877</i> en multicopia en las cepas <i>S. coelicolor</i> M145 y <i>S. coelicolor</i> M145:Δ0877 .....	91
III.5. SCO7173 .....	92
III.5.1. Análisis estructural del gen <i>SCO7173</i> .....	92
III.5.2. Análisis funcional del gen <i>SCO7173</i> . .....	93
III.5.2.1. Inactivación del gen <i>SCO7173</i> .....	93
III.5.2.2. Análisis de la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en el mutante <i>S. coelicolor</i> M145:Δ7173 .....	96
III.5.2.3. Análisis de la producción de CDA en el mutante <i>S. coelicolor</i> M145:Δ7173 .....	98
III.5.2.4. Efectos de la introducción del gen <i>SCO7173</i> en multicopia en las cepas <i>S. coelicolor</i> M145 y <i>S. coelicolor</i> M145:Δ0877 .....	98
III.6. SCO7093 .....	103
III.6.1. Análisis estructural del gen <i>SCO7093</i> .....	103
III.6.2. Análisis funcional del gen <i>SCO7093</i> . .....	103
III.6.2.1. Inactivación del gen <i>SCO7093</i> .....	103
III.6.2.2. Análisis de la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en el mutante <i>S. coelicolor</i> M145:Δ7093 .....	106
III.6.2.3. Análisis de la producción de CDA en el mutante <i>S. coelicolor</i> M145:Δ7093 .....	107
III.7. SCO6334 .....	108
III.7.1. Análisis estructural del gen <i>SCO6334</i> .....	108
III.7.2. Análisis funcional del gen <i>SCO6334</i> . .....	108
III.7.2.1. Inactivación del gen <i>SCO6334</i> .....	108
III.7.2.2. Análisis de la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en el mutante <i>S. coelicolor</i> M145:Δ6334 .....	111
III.7.2.3. Análisis de la producción de CDA en el mutante <i>S. coelicolor</i> M145:Δ6334 .....	112
III.8. SCO7143 .....	112
III.8.1. Análisis estructural del gen <i>SCO7143</i> .....	112
III.8.2. Análisis funcional del gen <i>SCO7143</i> . .....	112
III.8.2.1. Inactivación del gen <i>SCO7143</i> .....	112
III.8.2.2. Análisis de la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en el mutante <i>S. coelicolor</i> M145:Δ7143 .....	115
III.8.2.3. Análisis de la producción de CDA en el mutante <i>S. coelicolor</i> M145:Δ7143 .....	116
III.9. Estudio comparativo de expresión génica de las cepas <i>S. coelicolor</i> M145, <i>S. coelicolor</i> M145:Δ0877 y <i>S. coelicolor</i> M145:D7173 mediante el uso de micromatrices .....	116

III.9.1. Diseño experimental .....	116
III.9.2. Identificación de genes con el patrón de expresión alterado en los mutantes LAL .....	116
III.9.2.1. Genes implicados en el metabolismo de aminoácidos, transcripción y traducción .....	122
III.9.2.2. Genes implicados en el metabolismo de nucleótidos y coenzimas, y en la replicación, recombinación y reparación del ADN .....	123
III.9.2.3. Genes relacionados con la respiración y la producción de energía .....	123
III.9.2.4. Genes relacionados con la biosíntesis de la envuelta celular y la diferenciación morfológica ..	123
III.9.2.5. Genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos .....	124
III.9.2.6. Genes relacionados con el metabolismo de lípidos .....	124
III.9.2.7. Genes relacionados con la respuesta a la escasez de fosfato .....	124
III.9.2.8. Genes relacionados con la biosíntesis de antibióticos .....	126
III.9.2.9. Genes reguladores .....	128
III.9.2.10. Diferencias entre los genes afectados por los dos mutantes .....	129
III.10. Validación de los resultados de las micromatrices mediante RT-PCR a tiempo real ..	129
<b>IV. Visión general .....</b>	<b>133</b>
<b>V. Conclusiones .....</b>	<b>139</b>
<b>VI. Bibliografía .....</b>	<b>143</b>
<b>VII. Anexo .....</b>	<b>169</b>
VII.1. Genes estadísticamente significativos de los contrastes mutantes-silvestre .....	171
<b>VIII. Material suplementario (CD adjunto)</b>	
VIII.1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	
VIII.2. Principales objetos en el espacio R.	
VIII.3. Estimación del peso de los puntos en el análisis de los datos de las micromatrices.	
VIII.3.1. Calidad de las etiquetas.	
VIII.3.2. Estimación empírica de los pesos por punto.	
VIII.4. Normalización y análisis estadístico en el entorno R: procedimiento con los comandos detallados.	
VIII.4.1. Introducción de datos.	
VIII.4.1.1. Archivos preparados con otros programas en el directorio de trabajo de R.	
VIII.4.1.2. Inicio del entorno e introducción de datos.	
VIII.4.2. Estimación de los pesos por punto.	
VIII.4.2.1. Normalizaciones para estimar los pesos.	
VIII.4.2.2. Construir el modelo lineal para la estimación de pesos de punto.	
VIII.4.3. Procedimientos una vez estimados los pesos de los puntos.	
VIII.4.3.1. Normalizaciones con pesos.	
VIII.4.3.2. Ajuste del modelo lineal.	
VIII.4.3.3. Crear y guardar los archivos de resultados.	
VIII.4.4. Procedimientos paso a paso para el análisis con Rank Products.	
VIII.4.4.1. Cálculo de los productos de rango y valores pfp.	
VIII.4.4.2. Guardar el espacio de trabajo y los resultados combinados limma y Rank Products.	
VIII.4.4.3. Procedimiento para incorporar los resultados en el archivo Excel.	
VIII.5. Libro de visualización de resultados transcriptómicos de las micromatrices.	

## Índice de Figuras

### Introducción

I.1. Ciclo de vida de <i>Streptomyces</i> spp .....	4
I.2. Representación circular del cromosoma de <i>Streptomyces coelicolor</i> .....	8
I.3. Modelo básico de transducción de señal de un TCS y reacciones implicadas .....	12
I.4. Modelo de transducción de señales AfsK-AfsR-AfsS .....	14
I.5. Transporte de glucosa vía EIICB de la fosfotransferasa .....	19
I.6. Señales de transducción que inducen la regulación de los genes <i>mal</i> .....	20
I.7. Estructura química de algunos antibióticos y metabolitos secundarios producidos por <i>S. coelicolor</i> .....	25

### Materiales y Métodos

II.1. Electroferograma de muestras de ARN de <i>S. coelicolor</i> obtenido en el bioanalizador ...	46
II.2. Gel de muestras de ARN de <i>S. coelicolor</i> obtenido en el bioanalizador.....	47
II.3. Esquema del fragmento pIJ773 <i>EcoRI-HindIII</i> .....	53
II.4. Esquema del diseño de los cebadores para la construcción del casete de inactivación .	54
II.5. Esquema de las micromatrices de ADN para <i>S. coelicolor</i> .....	61
II.6. Imagen del visor tríptico del libro de procesado de datos transcriptómicos .....	70
II.7. Imagen del gráfico múltiple Mg-Mg A del libro de procesado de datos transcriptómicos .....	71
II.8. Imagen del gráfico múltiple del libro de procesado de datos transcriptómicos .....	71

### Resultados y Discusión

III.1. Curva de crecimiento de la cepa <i>S. coelicolor</i> M145 a 30 °C y 300 rpm, en medio MG complejo y definido con maltosa o glucosa como fuente de carbono .....	77
III.2. Producción de antibióticos de la cepa <i>S. coelicolor</i> M145 a 30 °C y 300 rpm, en medio MG complejo y definido con maltosa o glucosa como fuente de carbono .....	77
III.3. Análisis de la expresión de los hipotéticos genes LAL mediante RT-PCR a tiempo final .....	78
III.4. Análisis de la expresión de los genes LAL seleccionados y del gen <i>SCO5820</i> .....	79
III.5. Dominios estructurales y alineamientos de parte de las secuencia aminoacídica de los genes LAL seleccionados y de otros reguladores .....	80
III.6. Estrategia seguida para la inactivación del gen <i>SCO0877</i> de <i>S. coelicolor</i> .....	82
III.7. Análisis por PCR para comprobar la existencia del gen <i>SCO0877</i> en el cósmido StM1 y su inexistencia en las colonias Apra <sup>R</sup> Km <sup>S</sup> .....	83
III.8. Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen <i>SCO0877</i> en <i>S.coelicolor</i> .....	83
III.9. Comprobación mediante Southern de los posibles exconjugantes $\Delta$ 0877 .....	84
III.10. Curvas de crecimiento y producción de antibióticos de las cepas parental y <i>S. coelicolor</i> M145: $\Delta$ 0877 .....	85
III.11. Esquema de la construcción del plásmido pSET152neo-P0877 .....	87
III.12. PCR para la comprobación de la incorporación de las construcciones en diferentes cepas .....	88
III.13. Curvas de crecimiento y producción específica de antibióticos de las cepas <i>S. coelicolor</i> M145, $\Delta$ 0877, M145/pSET152neo y $\Delta$ 0877/pSET152neo .....	90
III.14. Esquema de la construcción del plásmido pSOK201-P0877 .....	91
III.15. Curvas de crecimiento y producción específica de antibióticos de las cepas <i>S. coelicolor</i> M145/pSOK201, $\Delta$ 0877/pSOK201 y $\Delta$ 0877/pSOK201-P0877 .....	92
III.16. Estrategia usada para la inactivación del gen <i>SCO7173</i> de <i>S. coelicolor</i> .....	93

III.17. Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen <i>SCO7173</i> en el cósmido St9A4.....	94
III.18. Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen <i>SCO7173</i> en alguno de los exconjugantes de <i>S. coelicolor</i> .....	95
III.19. Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen <i>SCO7173</i> en el exconjugante 232 de <i>S. coelicolor</i> .....	95
III.20. Comprobación mediante Southern de la inactivación del gen $\Delta 7173$ .....	96
III.21. Curvas de crecimiento y producción específica de antibióticos de las cepas <i>S. coelicolor</i> M145 y $\Delta 7173$ .....	97
III.22. Esquema de la construcción del plásmido pSOK201-P7173 .....	99
III.23. Curvas de crecimiento y producción específica de antibióticos de las cepas <i>S. coelicolor</i> M145/pSOK201, $\Delta 7173$ /pSOK201 y $\Delta 7173$ /pSOK201-P7173.....	100
III.24. Análisis por RT-PCR para comprobar la transcripción del gen <i>SCO7173</i> en diferentes cepas .....	101
III.25. Esquema de la construcción del plásmido pSOK201-SF7173 .....	102
III.26. Curvas de crecimiento y producción específica de antibióticos de las cepas <i>S. coelicolor</i> M145/pSOK201, $\Delta 7173$ /pSOK201 y $\Delta 7173$ /pSOK201-SF7173 .....	103
III.27. Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen <i>SCO7093</i> en el cósmido St3A4.....	104
III.28. Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen <i>SCO7093</i> en <i>S. coelicolor</i> ..	105
III.29. Comprobación mediante Southern de la inactivación del <i>SCO7093</i> .....	106
III.30. Curvas de crecimiento y producción específica de antibióticos de las cepas <i>S. coelicolor</i> M145 y $\Delta 7093$ .....	107
III.31. Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen <i>SCO6334</i> en el cósmido St10H5.....	109
III.32. Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen <i>SCO6334</i> en <i>S. coelicolor</i> ..	110
III.33. Comprobación mediante Southern de la inactivación del gen <i>SCO6334</i> .....	110
III.34. Curvas de crecimiento y producción específica de antibióticos de las cepas <i>S. coelicolor</i> M145 y $\Delta 6334$ .....	111
III.35. Dominios estructurales de <i>SCO7143</i> .....	112
III.36. Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen <i>SCO7143</i> en el cósmido St9A4.....	113
III.37. Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen <i>SCO7143</i> en <i>S. coelicolor</i> ..	114
III.38. Comprobación mediante Southern de la inactivación del gen <i>SCO7143</i> .....	114
III.39. Curvas de crecimiento y producción específica de antibióticos de las cepas <i>S. coelicolor</i> M145 y $\Delta 7143$ .....	115
III.40. Modelo lineal seguido en el diseño experimental para el análisis con micromatrices	116
III.41. Diagrama de Venn de los diferentes contrastes .....	117
III.42. Diagrama de Venn de los mutantes respecto a la cepa parental .....	117
III.43. Perfil de transcripción de los genes <i>afsS</i> y <i>afsR</i> .....	125
III.44. Comparación del perfil de transcripción de algunos genes de respuesta a la escasez de fosfato .....	126
III.45. Perfil de transcripción de algunos genes de la agrupación de actinorrodina .....	128
III.46. Representación gráfica en escala logarítmica de los niveles de expresión relativa de 11 genes en <i>S. coelicolor</i> M145: $\Delta 0877$ respecto a la cepa parental .....	130
III.47. Representación gráfica en escala logarítmica de los niveles de expresión relativa de 11 genes en <i>S. coelicolor</i> M145: $\Delta 7173$ respecto a la cepa parental .....	131
III.48. Correlación entre los resultados de qRT-PCR y micromatrices .....	132

---

 Visión global
 

---

VI.1. Modelo de transducción de señales y regulación cruzada entre los sistemas PhoR-PhoP, AfsK-AfsR-AfsS y los reguladores LAL 0877 y 7173 .....	136
---	-----

**Índice de Tablas**

 Introducción
 

---

I.1. Ejemplos de algunos metabolitos producidos por el género <i>Streptomyces</i> .....	6
I.2. Comparación de las características del genoma de algunas especies de <i>Streptomyces</i> ....	9
I.3. Características de algunos reguladores LAL de <i>Streptomyces</i> .....	21
I.4. Características generales del cromosoma de <i>S. coelicolor</i> .....	22

 Materiales y Métodos
 

---

II.1. Componentes y concentraciones de elementos traza del medio MG .....	34
II.2. Concentraciones finales y del stock de los antibióticos utilizados .....	35
II.3. Componentes y concentraciones necesarios para una reacción de PCR .....	43
II.4. Tiempos y temperaturas para una reacción de PCR .....	43
II.5. Concentraciones de agarosa para la resolución de fragmentos .....	44
II.6. Componentes necesarios para una reacción de RT-PCR .....	57
II.7. Tiempos y temperaturas para una reacción de RT-PCR .....	58
II.8. Tiempos y temperaturas para una reacción de PCR a tiempo real .....	59
II.9. Componentes y volúmenes necesarios para la síntesis y marcaje de ADNc con Cy3-dCTP de una reacción .....	63
II.10. Componentes y volúmenes necesarios para la síntesis y marcaje de ADN genómico con Cy5-dCTP de una reacción .....	63

 Resultados y Discusión
 

---

III.1. Reguladores de la familia LuxR identificados en el genoma de <i>S. coelicolor</i> .....	75
III.2. Genes diferencialmente expresados en los mutantes LAL .....	118
III.3. Tabla con los genes de biosíntesis de actinorrindina, su diferencia de expresión respecto a la cepa parental y el valor $p$ .....	127

 Anexo
 

---

VII.1. Genes estadísticamente significativos de los contrastes mutantes-silvestre .....	171
---	-----

 Material suplementario
 

---

VIII.1. Secuencia de los oligonucleótidos y experimento en el que se han utilizado.
VIII.2. Determinación de la etiqueta de calidad para los puntos de las micromatrices.
VIII.3. Pesos asignados a cada etiqueta de punto.



## ***Introducción***

---



## I.1. Características generales de *Streptomyces*.

*Streptomyces* es uno de los más de 120 géneros del orden de los Actinomycetales. Este género está formado por bacterias Gram-positivas, aerobias obligadas, neutrófilas, con una temperatura óptima de crecimiento entre 25-35 °C (Goodfellow, 1989). Los actinomicetos fueron descubiertos a finales del siglo XIX como los organismos causantes de enfermedades mortales como la lepra o la tuberculosis (Hansen, 1874; Koch, 1882, citado por Hopwood, 2007), de hecho *M. tuberculosis* H37Rv fue el primer genoma secuenciado de un actinomiceto (Cole y col., 1998).

La clasificación de los actinomicetos está basada en características morfológicas, químicas, nutricionales o fisiológicas (Williams y col., 1983a; 1983b), de secuenciación (Stackebrandt y col., 1992) y en el estudio de las variaciones en la secuencia del ARNr 16S (Raghava y col., 2000). La taxonomía actual del género *Streptomyces* es la siguiente (Garrity y col., 2004):

Dominio *Bacteria*  
Filo BXIV Actinobacteria  
Clase I Actinobacteria  
Subclase V Actinobacteridae  
Orden I Actinomycetales  
Suborden XIV Streptomycineae  
Familia I Streptomycetaceae  
Género I *Streptomyces*

### I.1.1. Hábitat natural de los actinomicetos.

Los actinomicetos tienen como principal hábitat el suelo (Hagedorn, 1976) y presentan, al igual que los hongos, un crecimiento micelial, pudiendo diferenciarse un micelio sustrato (o vegetativo) y un micelio aéreo, a partir del cual se forman las esporas (exoesporas), las cuales son funcionalmente parecidas a los conidios de los hongos. De hecho *Streptomyces* en Latín significa "hongo retorcido/enrollado" (Hopwood, 2007).

La mayor parte de los actinomicetos del suelo son microorganismos saprófitos, capaces de utilizar una gran variedad de componentes orgánicos como fuente de carbono incluyendo polímeros insolubles como quitina (Ohno y col., 1996), almidón (Williams y Flowers, 1978), pectina (Kaiser, 1971; Jacob y col., 2008), ciertas celulosas y lignina (Thomas y Crawford, 1998; Kukolya y col., 2002). Por esta razón, se requiere la secreción de enzimas extracelulares al tiempo que las hifas que componen la colonia penetran en el sustrato. De este modo, los actinomicetos del suelo participan en procesos de biodegradación a través de la acción de enzimas extracelulares como amilasas, nucleasas, proteasas, celulasas y xilanasas (McCarthy y Williams, 1992).

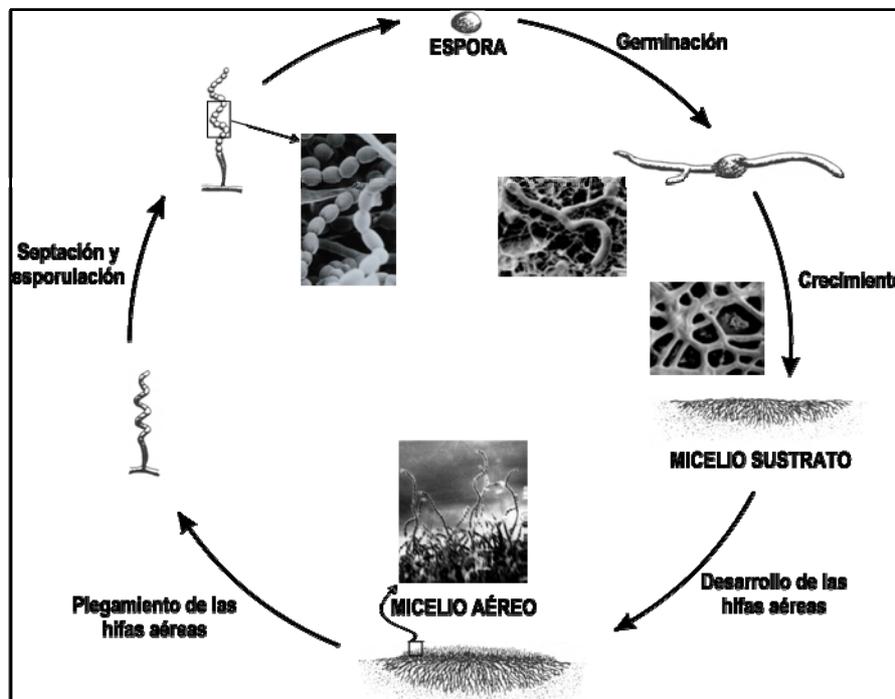
Aunque su pH de crecimiento óptimo se encuentra entre 6,5 y 8, han sido aislados miembros del género capaces de crecer tanto en medios ácidos (3,5-5) (Flowers y Williams, 1978) como en medios con pH 9 ó superiores (Williams y col., 1993; Chaphalkar y Dey, 1998).

### I.1.2. Ciclo de vida de *Streptomyces*.

El ciclo de vida de *Streptomyces* spp. (Figura I.1) se inicia con la germinación de una espора una vez que las condiciones ambientales son favorables. La energía necesaria para el proceso de germinación se consigue a partir de la degradación de las reservas endógenas del disacárido trehalosa (Hirsch y Ensign, 1978). Este es el componente mayoritario de la espора y puede llegar a constituir el 12 % del peso seco de la misma (Ensign, 1978).

Con la germinación de la espора se inicia inmediatamente la síntesis de ARN y proteínas (Hirsh y Ensign, 1978; Mikulik y col., 1984), y con la aparición del tubo germinativo tiene lugar el inicio de la síntesis de ADN (Hardisson y col., 1978). Al crecer, los tubos germinativos originan hifas ramificadas y poco septadas que penetran en el sustrato formando una densa y compleja red que recibe el nombre de micelio sustrato o vegetativo. *Streptomyces* obtiene nutrientes del medio gracias a la acción de numerosas enzimas hidrolíticas extracelulares como proteasas, nucleasas, lipasas, celulasas, amilasas, quitinasas y xilanasas (Williams y col., 1983b), que proporcionan una gran versatilidad en cuanto al uso de nutrientes.

El crecimiento de las hifas es predominantemente lineal y apical, tanto en medio sólido como líquido (Braña y col., 1982; Miguélez y col., 1992). De modo que a medida que avanza el crecimiento hay un incremento del número de ramificaciones, principalmente en las secciones más viejas de la hifa. Esta proliferación de ramificaciones da lugar a una cinética de crecimiento del micelio casi exponencial (Allan y Prosser, 1983). Con el desarrollo de la colonia, las zonas más lejanas a la zona de crecimiento acumulan materiales de reserva como por ejemplo glucógeno, lípidos y polifosfatos.



**Figura I.1:** Ciclo de vida de *Streptomyces* spp. Modificado de Mendes 2002.

Posteriormente, sobre el micelio sustrato se empieza a formar una estructura micelial que deja de estar anclada en el sustrato, a la que se denomina micelio aéreo. La escasez de nutrientes, el estrés fisiológico o determinadas señales extracelulares, parecen ser la orden que

desencadena la expresión de los genes implicados en la formación de dicho micelio. El desarrollo de las hifas del micelio aéreo tiene lugar después de un corto periodo de síntesis de macromoléculas y se produce metabolizando material procedente del micelio sustrato, bien sean macromoléculas como ADN y proteínas o compuestos de reserva (Méndez y col., 1985; Braña y col., 1986). Es por lo tanto normal que las células del micelio sustrato sufran lisis a medida que tiene lugar el crecimiento del micelio aéreo (Wildermuth, 1970).

Cuando el crecimiento de las hifas aéreas cesa, se produce la formación de septos a lo largo de las mismas. El septo de esporulación es morfológicamente distinto de los septos que se encuentran en las hifas vegetativas y está formado por dos capas de membrana separadas por una doble capa de peptidoglicano, permitiendo la separación de esporas adyacentes. Cada compartimento resultante es unigenómico y originará una spora (Hardisson y Manzanal, 1976), inmóvil, pigmentada e hidrofóbica no resistente al calor pero adaptada para la dispersión a través del aire, agua o incluso por vía de transmisión animal (McCarthy y Williams, 1992). Se pueden formar cadenas con varias decenas de esporas; éstas constituyen una fase semidurmiente en el ciclo de vida y tienen la capacidad de sobrevivir durante largos periodos de tiempo (Ensign, 1978). Con la spora se cierra el ciclo de diferenciación morfológica de *Streptomyces* (Figura I.1). Este proceso está íntimamente asociado con el proceso de diferenciación fisiológica (producción de metabolitos secundarios), siendo controlado por mecanismos reguladores, en gran parte, comunes.

### **I.1.3. Producción de metabolitos secundarios.**

Los actinomicetos destacan por su producción de metabolitos secundarios ya que alrededor del 60 % son producidos por ellos (Baltz y Seno, 1988; Chater, 1990; Kieser y col., 2000) y de este porcentaje entre el 70-80 % son producidos por las especies de *Streptomyces* (Challis y Hopwood, 2003). Muchos de estos metabolitos secundarios poseen una enorme variedad estructural (macrólidos, tetraciclinas, aminoglicósidos,  $\beta$ -lactamas, oligopéptidos). Estas bacterias producen también otros compuestos de gran interés como pueden ser inmunosupresores, antivíricos, insecticidas, herbicidas, antiparasitarios, inhibidores de enzimas, pigmentos, estimuladores del crecimiento vegetal e inmunomoduladores (Martín, 1989; Tabla I.1). Además, también están implicados en la producción de agentes antitumorales, siendo productores de más del 90 % de todos los fármacos antitumorales producidos por microorganismos (Méndez y Salas, 2003). Debido a ello, la investigación genética de este género ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años, en los que se han aislado y analizado una gran cantidad de genes implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, así como otros muchos implicados en mecanismos de resistencia y regulación (Hopwood y col., 1986a)

Los metabolitos secundarios se caracterizan por: no ser esenciales para el crecimiento del organismo, ser específicos de cada cepa, poseer una gran variedad de estructuras químicas y de actividades biológicas, ser sintetizados a partir de precursores procedentes del metabolismo primario por medio de vías únicas y por tener su síntesis dirigida por agrupaciones de genes con mecanismos reguladores que coordinan el nivel de expresión con la fase fisiológica del organismo productor (Vining, 1992; Martín y col., 2000).

Uno de los metabolitos secundarios de mayor importancia producidos por *Streptomyces* son los antibióticos (Tabla I.1), compuestos químicos de bajo peso molecular capaces de eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos a concentraciones bajas (Demain, 1999).

Metabolito	Principal organismo productor	Diana	Aplicación
Anfotericina	<i>S. nodosus</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Avermectina	<i>S. avermitilis</i>	Neurotransmisores de invertebrados	Antiparásito
Bleomicina	<i>S. verticillus</i>	Replicación del ADN	Anticancerígeno
Clavulánico (ácido)	<i>S. clavuligerus</i>	Inhibidor $\beta$ -lactamasa	Antibacteriano combinado con penicilinas
Cloranfenicol	<i>S. venezuelae</i>	Ribosoma bacteriano	Antibacteriano
Estreptomina	<i>S. griseus</i>	Ribosoma bacteriano	Antibacteriano
Filipina	<i>S. avermitilis</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Fosfomicina	<i>S. wedmorensis</i>	Pared celular bacteriana	Antibacteriano
Kanamicina	<i>S. kanamyceticus</i>	Ribosoma bacteriano	Antibacteriano
Nistatina	<i>S. noursei</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Novobiocina	<i>S. niveus</i>	Girasa bacteriana	Antibacteriano
Oleandomicina	<i>S. antibioticus</i>	Ribosoma bacteriano	Antibacteriano
Oxitetraciclina	<i>S. rimosus</i>	Ribosoma bacteriano	Antibacteriano
Pimaricina	<i>S. natalensis</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Rapamicina	<i>S. hygroscopicus</i>	Linfocitos	Inmunosupresor
Tacrolimus	<i>S. tsukubaensis</i>	Linfocitos	Inmunosupresor
Tilosina	<i>S. fradiae</i>	Ribosoma bacteriano	Antibiótico y promotor del crecimiento para uso veterinario

**Tabla I.1:** Ejemplos de algunos metabolitos producidos por el género *Streptomyces*. Modificada de Hopwood, 2007.

El metabolismo secundario es específico para cada especie y está influenciado por las condiciones de crecimiento a que está sometido el organismo. A pesar de ser más especializado, este tipo de metabolismo está íntimamente relacionado con el primario dado que todos los metabolitos secundarios derivan de metabolitos primarios o de intermediarios de los mismos (como por ejemplo ácidos carboxílicos, aminoácidos o azúcares). La distinción entre metabolito primario y secundario, sin embargo, no siempre es clara. Por ejemplo, hay metabolitos primarios (como algunos aminoácidos en corinebacterias) que se acumulan en cantidades no fisiológicas, comportándose por lo tanto como metabolitos secundarios.

La producción de metabolitos secundarios tiene lugar después del periodo de crecimiento vegetativo durante el cual tiene lugar un metabolismo fundamentalmente asimilativo. Este metabolismo primario coincide con la fase de crecimiento exponencial del microorganismo, y es esencialmente semejante para todos los sistemas vivos, pudiéndose definir como una serie de reacciones enzimáticas interrelacionadas que facilitan la energía, los intermediarios biosintéticos y las macromoléculas clave (como las proteínas y los ácidos nucleicos) necesarias para las células vivas (Turner, 1973). Como resultado de un sistema metabólico finamente regulado, los metabolitos primarios raramente se acumulan.

Tras la fase de crecimiento exponencial, surge un periodo donde la tasa de crecimiento del organismo disminuye (fase estacionaria). En la transición entre las dos fases de crecimiento, se inicia normalmente la producción de metabolitos secundarios, coincidiendo este periodo con la diferenciación morfológica del microorganismo. Existe una conexión temporal entre la diferenciación morfológica y la producción de metabolitos secundarios ejercida a través de determinados genes reguladores. En mutantes *bld* de *S. coelicolor* (incapaces de desarrollar micelio aéreo) se ha verificado que el metabolismo secundario se encuentra afectado de alguna manera, incluso hasta el extremo de que la mayoría de los mutantes son defectivos en este tipo de metabolismo (Merrick, 1976). Tanto la diferenciación como el metabolismo secundario, se desencadenan en respuesta a condiciones de escasez de nutrientes, donde los metabolitos secundarios actuarían como mecanismo de ventaja selectiva frente a otros microorganismos

competidores, especialmente en condiciones en las que el organismo productor es más vulnerable debido al gasto energético dedicado a la formación del micelio aéreo y a la esporulación. Otro de los factores que estimula la diferenciación en *Streptomyces* son las señales extracelulares causadas por compuestos como las  $\gamma$ -butirolactonas, entre ellas la más estudiada es el factor A (2-isocaproil-3R-hidroximetil- $\gamma$ -butanolida) de *S. griseus* (Khokhlov y col., 1973).

La biosíntesis de metabolitos secundarios es un proceso bastante complejo que se puede dividir en cuatro fases diferentes (Martín y col., 2000):

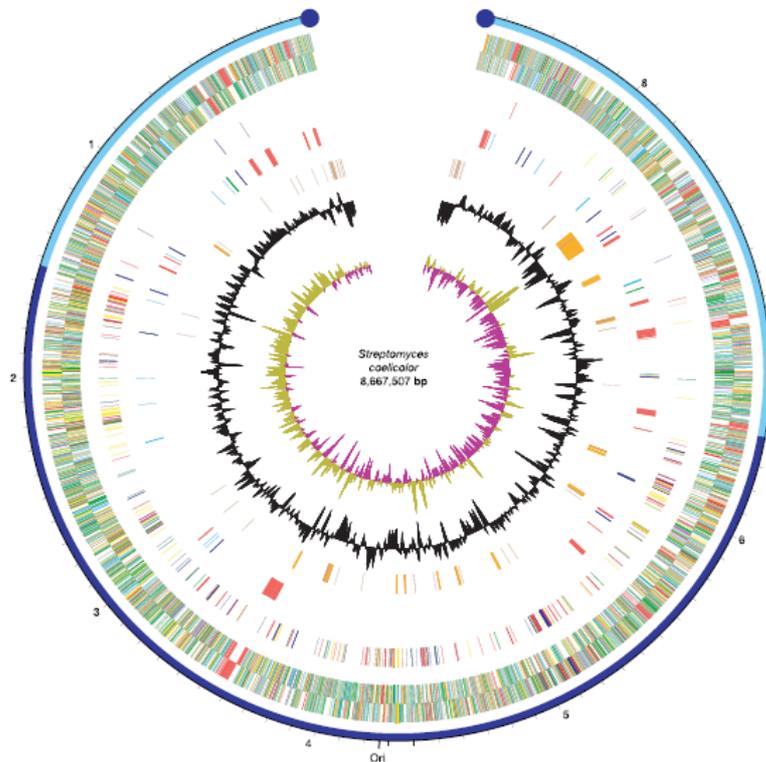
1. La conversión de metabolitos primarios en precursores específicos de los metabolitos secundarios. Como precursores son utilizadas mayoritariamente unidades de 3 a 5 átomos de carbono.
2. Activación o modificación de los precursores de manera que puedan ser utilizados en la síntesis de los metabolitos secundarios. Estas alteraciones son normalmente modificaciones en el esqueleto del precursor, como puede ser el grado de oxidación-reducción de la molécula o ciclaciones de la misma.
3. Reacciones de polimerización y condensación que originan policétidos, péptidos, isoprenoides, etc...
4. Reacciones de modificación tardías que incluyen glicosilaciones, metilaciones, oxidaciones o epoxidaciones, entre otras.

Los genes implicados en biosíntesis, resistencia y regulación de antibióticos suelen encontrarse asociados en agrupaciones génicas, denominadas en inglés "cluster" (Martín y Liras, 1989); en varias agrupaciones de biosíntesis de antibióticos, tal como la de puromicina en *S. alboniger* no se ha podido asociar a la agrupación un gen regulador, por lo que se supone que poseen algún sistema inespecífico de regulación.

#### **I.1.4. Características genéticas de las especies de *Streptomyces*.**

##### **I.1.4.1. El cromosoma de *Streptomyces*.**

Hasta los años noventa se creía que *Streptomyces* presentaba un cromosoma circular, como la mayoría de organismos procariotas; sin embargo, Lin y col. en 1993 utilizando la técnica de electroforesis en campo pulsante demostraron que el cromosoma de *S. lividans* 66 era una estructura lineal formando una estructura telomérica en los extremos con dos extremos 5' libres idénticos, cada uno de ellos con secuencias repetidas e invertidas, unidos covalentemente a proteínas. Posteriormente fue observado este mismo modelo de disposición cromosómica lineal en otras especies de *Streptomyces*: *S. moderatus* ATCC 23443, *S. parvulus* ATCC 12434, *S. rochei* 7434-AN4, *S. antibioticus* IMRU 3720, *S. coelicolor* A3(2) cepa M130, *S. lipmanii* ATCC 27357, *S. argenteolus* ATCC 11009 (Huang y col., 1998), *S. clavuligerus* ATCC 27064, *S. hydrogenans* ATCC 19631, *S. ambofaciens* (Leblond y col., 1996), *S. griseus* (Lezhava y col., 1995) y *S. rimosus* (Pandza y col., 1997), lo que sugiere que puede tratarse de un fenómeno común a todo el género (Salas, 1988; Chen y col., 1993; Wu y Roy, 1993).



**Figura I.2:** Representación circular del cromosoma de *Streptomyces coelicolor* tomada de Bentley y col. (2002). La escala exterior está numerada en megabases en sentido contrario a las agujas del reloj y se indican el núcleo (azul oscuro) y los brazos (azul claro) del cromosoma. Del exterior al interior, los círculos 1 (reverso) y 2 (directo) muestran todos los genes con el siguiente código de colores: negro—metabolismo energético; rojo —transferencia de información y metabolismo secundario; verde oscuro —asociado a la superficie; cian —degradación de macromoléculas; magenta —degradación de moléculas pequeñas; amarillo —metabolismo central o intermediario; azul claro —reguladores; naranja —proteínas hipotéticas conservadas; marrón —pseudogenes; verde claro —proteínas no conocidas; gris —miscelánea. El círculo 3 muestra genes esenciales seleccionados con funciones en la división celular, la replicación de ADN, la transcripción, la traducción y la biosíntesis de aminoácidos con el mismo código de colores que los círculos 1 y 2. El círculo 4 muestra genes seleccionados de "contingencia" con el siguiente código de colores: rojo —metabolismo secundario; azul claro —exoenzimas; azul oscuro —conservón; verde —proteínas de vesículas de gas. El círculo 5 muestra elementos móviles, en marrón las transposasas y en naranja genes hipotéticamente adquiridos lateralmente. El círculo 6 muestra el contenido de G+C. El círculo 7 muestra la tendencia de GC (G-C/G+C), indicando en caqui los valores >1 y en púrpura los valores <1. Se indican el origen de replicación (Ori) y las proteínas terminales (círculos azules).

En el centro de los cromosomas de *S. coelicolor* (Kieser y col., 1992) y *S. lividans* (Zakrzewska-Czerwinska y Schrempf, 1992; Leblond y col., 1993) se ha localizado la presencia de un origen de replicación, *oriC*, a partir del cual tiene lugar una replicación bidireccional (Musialowski y col., 1994). Cuando el proceso de replicación alcanza los extremos libres, las proteínas actuarían como cebadores para la síntesis del último fragmento de Okazaki de la cadena retrasada (Chang y Cohen, 1994). La mayoría de los genes conservados entre los estreptomicetos y otros géneros se encuentran en la zona central del cromosoma, por ejemplo el núcleo de *S. coelicolor* y *S. avermitilis* muestra una elevada sintenia que implica alrededor de 4000 genes, sólo han tenido lugar un pequeño número de intercambios simétricos (en mayor o menor medida) entre los brazos de los cromosomas respecto al origen de replicación (Ikeda y col., 2003).

#### I.1.4.2. Composición del genoma de *Streptomyces*.

Usando la técnica de electroforesis en campo pulsante fue posible determinar el tamaño aproximado del genoma de *Streptomyces*. Se ha estimado un tamaño de 8 Mb en las especies de *Streptomyces* analizadas, como por ejemplo *S. coelicolor* A3(2) (Kieser y col., 1992), *S. ambofaciens* (Leblond y col., 1990b y 1996), *S. lividans* 66 (Leblond y col., 1993) o *S. griseus* IFO03237 (Lezhava y col., 1995).

En la actualidad se encuentran secuenciados en su totalidad los genomas de *S. coelicolor* A3(2) (Bentley y col., 2002), *S. griseus* (Ohnishi y col., 2008), *S. avermitilis* (Omura y col., 2001; Ikeda y col., 2003), *S. scabies* ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_scabies/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scabies/)) y *S. peucetius* (Parajuli y col., 2004) y están disponibles gran parte de los genomas de otros *Streptomyces* lo que ha aportado un gran avance en el conocimiento de la organización génica del género (Tabla I.2).

Organismo	Cromosoma (Mb)	% G+C	Genes codificantes para proteínas	Fuente
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	8,67	72,1	7825	<a href="http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/">http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/</a>
<i>S. griseus</i> IFO 13350	8,55	72,2	7138	<a href="http://streptomyces.nih.go.jp/griseus/">http://streptomyces.nih.go.jp/griseus/</a>
<i>S. avermitilis</i>	9,03	70,7	7582	<a href="http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/">http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/</a>
<i>S. scabies</i>	10,15	71,45	8984	<a href="http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scabies/">http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scabies/</a>
<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	6,73	68	6448	The Broad Institute Genome Sequencing Platform

**Tabla I.2:** Comparación de las características del genoma de algunas especies de *Streptomyces*.

En relación a la composición nucleotídica del genoma de *Streptomyces*, se observa un alto contenido en G+C que oscila entre el 68 % y el 74 % (Tabla I.2), porcentajes muy cercanos al límite superior encontrado en la naturaleza (Enquist y Bradley, 1971). Precisamente por el alto porcentaje en guanina y citosina, *Streptomyces* utiliza preferentemente codones que contienen estos nucleótidos en la tercera posición, lo que convierte en raros a los codones TTA (leucina), CTA (leucina) y TTT (fenilalanina) (Wright y Bibb, 1992). De hecho, estos codones están normalmente ausentes en genes implicados en el crecimiento vegetativo (Leskiw y col., 1991) y sólo aparecen en determinados genes implicados en la resistencia a antibióticos, regulación o diferenciación celular. Respecto al inicio de la traducción en *Streptomyces*, el codón utilizado mayoritariamente es AUG (metionina) aunque también es frecuente encontrar GUG (valina).

En las especies de *Streptomyces* son muy frecuentes los elementos extracromosomales, siendo los plásmidos los más usuales, en forma circular covalentemente cerrada (Hopwood y col., 1987) o en forma lineal con proteínas asociadas a sus extremos (Kinashi y col., 1987; Kinashi y Shimaji-Murayama, 1991). La composición nucleotídica no difiere significativamente de la del ADN cromosómico del hospedador.

Se han descrito plásmidos capaces de integrarse en sitios específicos del cromosoma del hospedador (*attB*) por recombinación con el sitio *attP* (sitio de integración del plásmido). Este tipo de plásmidos se encuentran integrados en el cromosoma del hospedador original, pero se

comportan como elementos extracromosomales con replicación autónoma en otros hospedadores diferentes. Cuando se secuenció el sitio de integración en el cromosoma se dedujo que el plásmido se integra en genes que codifican para un ARNt (Brown y col., 1988; Reiter y col., 1989; Mazodier y col., 1990). Algunos ejemplos de plásmidos capaces de integrarse son: SLP1 de *S. coelicolor* A3(2) (Bibb y col., 1981), pSAM2 de *S. ambofaciens* (Pernodet y col., 1984), pIJ101 de *S. parvulus* (Hopwood y col., 1984) y pSG1 de *S. griseus* (Cohen y col., 1985).

Los miembros del género pueden ser también hospedadores de fagos de ADN de doble cadena. Estos pueden integrarse en el cromosoma o mantenerse libres (Chater, 1980). Uno de los actinofagos más conocidos es el fago  $\phi$ C31 (41,4 kb) de amplio rango de huésped, a partir del cual se han construido numerosos vectores de clonación para *Streptomyces* (Kieser y col., 2000).

En algunos de los miembros del género se han identificado pequeños fragmentos del genoma que podrían comportarse como transposones: *IS110* (Chater y col., 1985), *Tn4556* (Chung, 1987), *IS493* (Solenberg y Burgett, 1989), *IS117* (Henderson y col., 1990), *IS116* (Leskiw y col., 1990) y *Tn4811* (Chen y col., 1992).

### **I.1.4.3. Inestabilidad genética.**

En las especies de *Streptomyces* se ha constatado la existencia de inestabilidad genética. Estas especies sufren mutaciones espontáneas en determinados *loci* con tasas de mutación 3 ó 4 órdenes de magnitud superiores a las tasas de los genes estables. Las mutaciones suelen ser pleiotrópicas y afectan sobre todo al metabolismo secundario y a la diferenciación: la formación de micelio aéreo y la esporulación, la producción de pigmentos y enzimas extracelulares, y la biosíntesis y resistencia a antibióticos (Chen, 1995). La variabilidad en la producción de antibióticos por distintos clones dentro de una cepa de *Streptomyces* es un hecho bien conocido en la industria y es una muestra más de la inestabilidad genética.

Se ha comprobado que la inestabilidad se debe frecuentemente a la delección de fragmentos de ADN y a un proceso asociado con la amplificación de secuencias vecinas (Cullum y col., 1986; Birch y col., 1990; Leblond y col., 1990a). Las delecciones pueden llegar a abarcar 2,5 Mb (Leblond y col., 1991) y las amplificaciones pueden contener varios cientos de copias.

## **I.2. Regulación de la producción de metabolitos secundarios.**

El mecanismo de regulación general de la biosíntesis de metabolitos secundarios es el que ejercen las fuentes nutricionales y los factores de estrés, como el choque térmico, las radiaciones, concentraciones de oxígeno demasiado bajas o altas y la acidificación del medio. Además de este control general existen otros grados de regulación mucho más específicos.

El metabolismo secundario en *S. coelicolor* A3(2) parece estar influenciado por sistemas reguladores independientes como los genes *bld* (Chater, 1993), ppGpp (Chakraborty y Bibb, 1997; Martínez-Costa y col., 1996), sistemas reguladores de dos componentes (Anderson y col., 2001; Ishizuka y col., 1992), reguladores del tipo  $\gamma$ -butirolactona (Onaka y col., 1998; Takano y col., 2001), AMPc (Horinouchi y col., 2001; Süssstrunk y col., 1998) y por el sistema AfsK-AfsR. Teóricamente, estos sistemas detectan condiciones nutricionales como disponibilidad de carbono, nitrógeno y fosfato así como condiciones ambientales como temperatura, osmolaridad y otra serie de condiciones estresantes. Algunos de los estímulos detectados por estos sistemas son transmitidos a activadores específicos, como *actI-ORF4* y *redD*, viéndose afectada la producción

de antibióticos. Otros estímulos son transferidos a algunos grupos de genes necesarios para el crecimiento y la diferenciación morfológica en el ecosistema que les rodea.

Estos genes reguladores pueden estar involucrados en varias rutas de biosíntesis (pleiotrópicos) o afectar únicamente a la síntesis de una de ellas (específicos de ruta). Los primeros tienden a encontrarse en regiones del cromosoma alejadas de las agrupaciones biosintéticas por lo que reciben el nombre de genes reguladores de alto nivel, los segundos en cambio se ubican dentro de las agrupaciones biosintéticas y también se les conoce como genes reguladores de bajo nivel.

Trabajos recientes parecen mostrar que los reguladores específicos de ruta pueden también controlar otras agrupaciones biosintéticas y por lo tanto tener efectos pleiotrópicos. Se ha observado que algunos de los reguladores específicos de ruta pueden controlar a miembros de la cascada reguladora de una jerarquía "alta" como puede ser *afsR/afsS* (Huang y col., 2005). Conforme aumentan los datos respecto a la regulación en *Streptomyces* se va apreciando cada vez más su complejidad y la idea de una regulación de tipo jerárquico va dando lugar a la de una red donde la regulación cruzada, la retroalimentación y la versatilidad parecen ser las que permiten a la bacteria adaptarse de una forma muy precisa a los cambios que se producen en su medio ambiente (Sawai y col., 2004).

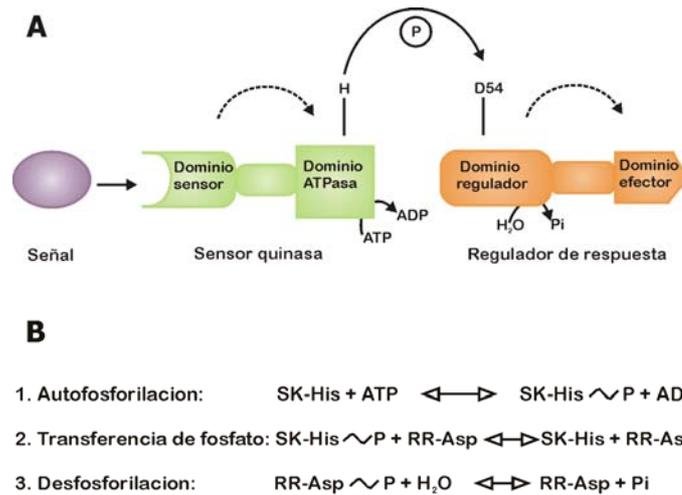
## **I.2.1. Reguladores pleiotrópicos.**

### **I.2.1.1. Sistemas de dos componentes.**

Los sistemas de dos componentes (TCS, del inglés *Two Component System*) se encuentran presentes en los organismos de todos los dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya. Sin embargo, los sistemas en los que se fosforilan los residuos His-Asp predominan en las cascadas de señalización de las bacterias y los que se fosforilan en Ser/Thr y Tyr son más abundantes en eucariotas.

El modelo básico de TCS está formado por dos proteínas (Figura I.3A): una proteína quinasa sensora (SK, del inglés *Sensor Kinase*) sensible a algún parámetro ambiental, y una proteína reguladora de la respuesta (RR, del inglés *Response Regulator*) que ejecuta cambios en la expresión génica en respuesta a las señales recibidas (Parkinson y Kofoid, 1992).

Estos sofisticados sistemas de señalización se caracterizan por poseer una arquitectura modular que se ha adaptado e integrado a una gran cantidad de circuitos celulares de señalización (Figura I.3B). En bacterias, las SK están compuestas por un dominio sensor extracitoplasmático que responde a estímulos externos específicos; esta señal induce un cambio conformacional en el dominio citoplasmático de la SK que lleva consigo una autofosforilación en un residuo de histidina. Posteriormente, en una reacción catalizada por el propio RR, se transfiere este grupo fosforilo al ácido aspártico del RR. Finalmente, el grupo fosforilo es transferido desde este residuo al agua en una reacción de hidrólisis. Estas reacciones requieren la presencia de iones divalentes, siendo el  $Mg^{2+}$  el predominante (Stock y col., 2000). La fosforilación del dominio regulador lleva consigo un cambio conformacional en un segundo dominio del RR, el efector. Entonces, el RR en su estado activo se unirá a los diversos promotores de sus genes diana induciendo o reprimiendo así su transcripción (Hakenbeck y Stock, 1996).



**Figura I.3:** Representación esquemática del modelo básico de transducción de señal de un sistema de dos componentes (A) y las reacciones implicadas (B). Modificada de Hutchings y col. (2004). SK, quinasa sensora; RR, regulador de respuesta.

Este es el modelo general de TCS pero también existen sistemas sin dominio extracelular que responden a señales citoplasmáticas o bien a otras SK; también existen varias SK que fosforilan el mismo RR o una única SK que controla varios RR (Stock y col., 2000), incluso existen sistemas en los que dos SK (NarX y NarQ) regulan dos RR (NarL y NarP) mostrando preferencias en la interacción (Li y col., 1995; Noriega y col., 2010). Esta adaptabilidad confiere a los organismos los mecanismos necesarios para amoldarse a multitud de variaciones en el medio, haciendo de los TCS un mecanismo fundamental para comprender la regulación en bacterias.

El genoma de *Streptomyces coelicolor* posee hasta 67 sistemas de dos componentes, a los que hay que unir 17 SKs y 13 RR huérfanos (Hutchings y col., 2004). Se considera que en bacterias el rango de señales medioambientales al que cierta especie puede responder está directamente relacionado con el número de SKs que contiene su genoma. A su vez el número de SKs codificados por un genoma es proporcional al tamaño de este, de tal forma que en bacterias patógenas obligadas que generalmente tienen genomas menores el porcentaje de SKs y RR en relación con el número total de genes es bastante pequeño, 0,26 % comparado con el 0,65 % de bacterias de vida libre. En *S. coelicolor* este porcentaje se dispara hasta el 0,86 %, un 25 % más que las bacterias no patógenas de vida libre (Kim y Forst, 2001).

Un ejemplo de TCS es el operón *absA*, está formado por los genes *absA1* (que codifica una quinasa sensora) y *absA2* (que codifica un regulador de respuesta) y se encuentra situado en la agrupación de genes de biosíntesis de CDA (del inglés, *Calcium Dependent Antibiotic*) pero regula varias rutas de síntesis de antibióticos (Adamidis y col., 1990). La delección de cualquiera de los dos genes conlleva una superproducción de los cuatro antibióticos producidos por la cepa pero no afecta a su esporulación, lo que indica que el operón *absA* ejerce un control negativo únicamente sobre los genes de síntesis de antibióticos (Anderson y col., 2001). Dicho operón es muy peculiar al actuar como regulador negativo ya que la mayoría de los sistemas de dos componentes inducen la activación de sus genes diana (Brian y col., 1996; Hutchings y col., 2004).

Otro ejemplo es el caso del sistema *afsQ* compuesto por la proteína sensora AfsQ2 y la proteína reguladora AfsQ1. En *S. lividans* se observó un aumento de la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina al introducir este sistema en multicopia. Sin embargo, en *S. coelicolor* no se observó ningún cambio ni en el crecimiento ni en la producción de antibióticos

cuando se deletó dicho sistema (Ishizuka y col., 1992). Recientemente (Shu y col., 2009), se ha demostrado una regulación de la producción de antibióticos llevada a cabo por este TCS en *S. coelicolor* pero únicamente dependiente del medio. Curiosamente, al cultivar los mutantes  $\Delta$ afsQ en un medio mínimo con glutamato como fuente de nitrógeno, se observó una disminución significativa de la producción de los cuatro antibióticos y un rápido crecimiento del micelio aéreo. Además cuando se cultivó en el mismo medio el mutante del gen *sigQ* (que codifica un factor sigma) se observó una precoz hiperproducción de los antibióticos y un retraso de la esporulación del micelio aéreo (Shu y col., 2009). Estos resultados experimentales sugieren un trabajo en conjunto de los genes *afsQ* y *sigQ* en la regulación de la biosíntesis de antibiótico y en el desarrollo morfológico. Además dicho estudio muestra que la regulación dependiente de medio ejercida por AfsQ1-Q2-SigQ tiene lugar afectando a la transcripción de los activadores específicos *actI-ORF4*, *redD* y *cdaR*.

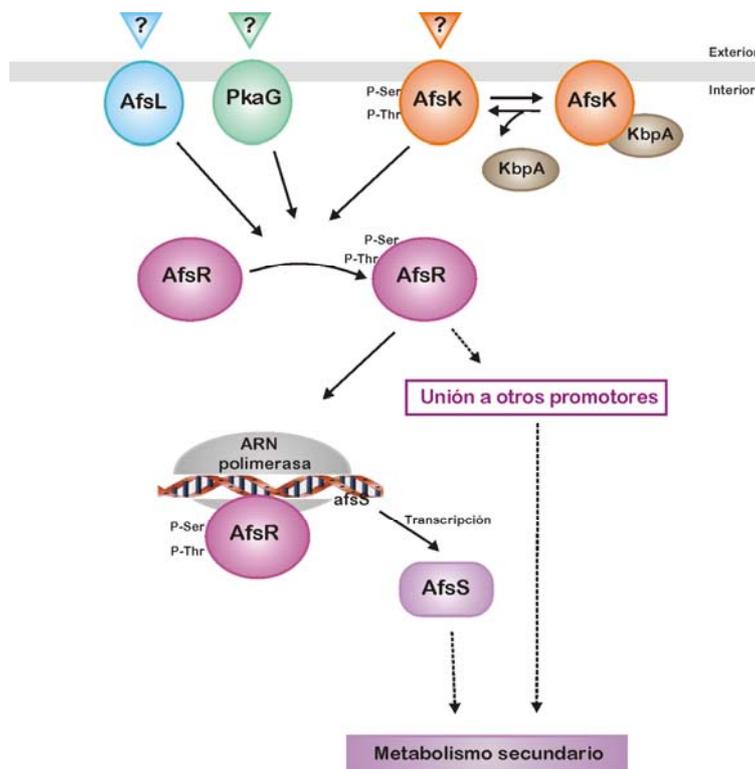
El fosfato regula la biosíntesis de diferentes tipos de antibióticos y de otros metabolitos secundarios, de tal modo que en condiciones de escasez de fosfato se desencadena la producción de estos compuestos (Martín, 2004). El control de la respuesta a la escasez de fosfato inorgánico está mediado por el sistema de dos componentes **PhoR/PhoP** (Sola-Landa y col., 2003; 2005; Mendes y col., 2007) que cuenta con una proteína sensora quinasa (PhoR) que activa mediante fosforilación la proteína reguladora PhoP cuando existen condiciones de fosfato limitantes. En *S. coelicolor* se ha demostrado la unión del regulador de respuesta PhoP a unas secuencias específicas denominadas cajas PHO situadas en las regiones promotoras de una gran variedad de genes regulados por fosfato (Sola-Landa y col., 2005). Mediante estudios transcriptómicos y proteómicos se ha demostrado que PhoP induce la expresión de genes tanto del metabolismo primario como del secundario, así como la existencia de una regulación cruzada entre la escasez de fosfato y el metabolismo del nitrógeno, lo cual demuestra una vez más la importancia de este tipo de sistemas para la supervivencia del microorganismo (Rodríguez-García y col., 2007). Sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto a través del cual el sistema PhoR/PhoP regula el metabolismo secundario en condiciones de escasez de fosfato, aunque se ha demostrado que PhoP no interacciona directamente con los promotores de los reguladores específicos *actI-ORF4* ni *redD* (Santos-Beneit y col., 2009b).

El sistema **AfsK-AfsR-AfsS** controla de forma global la producción de antibióticos bajo unas condiciones determinadas (Umeyama y col., 2002; Horinouchi, 2003). Cuando se autofosforila AfsK, una de las numerosas serina/treonina quinazas de *S. coelicolor* presente en la cara interna de la membrana, fosforila a su vez a AfsR (regulador multidominio con un dominio SARP en la zona N-terminal) presente en el citoplasma, que a su vez activa *afsS* y posiblemente regula su propia transcripción (Figura I.4). La forma en la que AfsS regula la producción de antibióticos todavía se desconoce, pero estudios recientes han descubierto parte de los mecanismos que conducen a la activación de la cascada de señalización (Lian y col., 2008). Por ejemplo, se ha propuesto que unos niveles elevados de SAM (un factor de señalización intracelular) provocan la autofosforilación de AfsK (Park y col., 2005; Lee y col., 2007) y que dicha fosforilación es modulada por la proteína KbpA (Umeyama y Horinouchi, 2001; Umeyama y col., 2002).

La proteína reguladora AfsR está implicada en el metabolismo secundario de *S. coelicolor* A3(2) (Matsumoto y col., 1994) y en la diferenciación morfológica en *S. griseus* (Umeyama y col., 1999). Además, también se ha demostrado la fosforilación de AfsR por otras serina/treonina quinazas como son PkaG y AfsL (Sawai y col., 2004). Si cada una de estas quinazas responde a estímulos ambientales diferentes, AfsR puede ser un punto de regulación central donde confluyan varias cascadas de señalización inducidas por diversas señales e integradas por distintas

serina/treonina quinasas. Otro punto de control se encuentra en la modulación de estas SK, ya que se ha demostrado que la actividad quinasa de AfsK se inhibe mediante la unión a la proteína KbpA (Umeyama y Horinouchi, 2001).

La sobreexpresión de *afsS* en *S. coelicolor* y *S. lividans* produce un aumento significativo de la producción de actinorrodina (Horinouchi y col., 1989a; Vogtli y col., 1994; Floriano y Bibb, 1996) mientras que la disrupción de *afsS* disminuye la producción de dicho antibiótico (Lee y col., 2002). Un estudio reciente llevado a cabo con micromatrices sugiere la implicación de *afsS* no sólo en la modulación de la síntesis de antibióticos sino en el control de los genes de respuesta a la escasez de fosfato y en los genes del metabolismo de nitrógeno y azufre (Lian y col., 2008), lo cual sugiere una conexión más entre el estrés nutricional y la activación de las rutas de producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor*.



**Figura I.4:** Modelo de transducción de señales que implica a las proteínas AfsK, KbpA, PkaG, AfsL, AfsR y AfsS. El modelo tiene en cuenta datos de Horinouchi (2003).

### I.2.1.2. Reguladores implicados en la diferenciación morfológica y bioquímica.

Los reguladores de acción pleiotrópica implicados tanto en la producción de antibióticos como en el proceso de diferenciación morfológica, operan a distintos niveles en una cascada de señales cuya diana final sería toda una serie de genes implicados en ambos procesos.

Un ejemplo de genes pleiotrópicos son los genes *bld* que reciben este nombre debido a que su inactivación anula la formación de micelio aéreo dando lugar a un fenotipo calvo (*bald*, en inglés). Hasta ahora se han descrito doce genes *bld* (*A, B, C, D, G, H, I, J, K, L, M, N*) (Chater, 2006). Estos genes regulan los puntos de control que permiten iniciar el crecimiento aéreo provocando la producción de compuestos que reducen la tensión superficial del medio acuoso en el que se encuentra la bacteria y hacen posible que las hifas crezcan hacia la atmósfera. Los genes *bld* parecen también necesarios para un desarrollo total de las hifas. Los mutantes *bld* no son capaces de desarrollar micelio aéreo ni esporas y la mayoría de ellos (con excepción del mutante de *bldC*) carecen de la capacidad de sintetizar antibióticos.

Un aspecto muy llamativo de la diferenciación morfológica de *Streptomyces* es la necesidad de establecer una comunicación intercelular. La formación de micelio aéreo en los mutantes *bld* puede ser restaurada si se crecen estos mutantes cerca de una cepa silvestre de *S. coelicolor*. Cada señal actúa como punto de control, asegurándose las bacterias de que todas las condiciones son las idóneas para iniciar el proceso de crecimiento del micelio aéreo. Esta complementación extracelular parece ser resultado (al menos en parte) de la difusión de una pequeña proteína hidrofóbica denominada SapB de la cepa silvestre a la mutante (Chater y Horinouchi, 2003; Takano y col., 2003).

Dentro de los diferentes mecanismos de regulación aparece un elemento muy interesante: las  **$\gamma$ -butirolactonas**, que funcionan como hormonas microbianas actuando en diferentes niveles de control de la formación de antibióticos en *Streptomyces* y probablemente también en otras actinobacterias como *Amycolatopsis*, *Actinoplanes* y *Micromonospora* (Choi y col., 2003). Son pequeñas moléculas de señalización intercelular, eficaces a muy bajas concentraciones y en un pequeño rango molar (0,25-0,5  $\mu$ M). Se unen a receptores citoplasmáticos muy específicos e inhiben la unión de estos a secuencias específicas del ADN que actúan mayoritariamente como represores, de tal manera que, la unión de  $\gamma$ -butirolactonas a sus receptores induce la expresión de sus genes diana (Takano, 2006). La primera  $\gamma$ -butirolactona descubierta fue el factor-A de *S. griseus* que controla tanto la formación de antibiótico como la diferenciación morfológica (Khokhlov y col., 1967) y cuya síntesis depende de AfsA (Kato y col., 2007).

El factor-A se va acumulando desde el comienzo de la fase exponencial hasta que alcanza una concentración crítica en la que se une a su proteína receptora ArpA, lo cual provoca un cambio conformacional en la proteína que incapacita la unión de ArpA al promotor de un gen que codifica para el factor transcripcional AdpA produciéndose la transcripción y traducción de dicho factor que activa una gran variedad de genes de múltiples funciones que son requeridos para el metabolismo secundario y el desarrollo morfológico (Ohnishi y col., 2005).

En *S. coelicolor* hasta la fecha se han descrito tres  $\gamma$ -butirolactonas: SCB1, SCB2 y SCB3, siendo la primera de ellas la más abundante que regula positivamente la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina (Takano y col., 2000; 2005).

Para que una molécula sea considerada como una señal química genuina debe cumplir una serie de requisitos: la producción de la señal debe tener lugar durante una fase específica del crecimiento, bajo unas determinadas condiciones fisiológicas o en respuesta a unos cambios ambientales; la señal debe acumularse extracelularmente y ser reconocida por un receptor específico; la acumulación de la señal debe generar una respuesta concreta una vez alcanzado un umbral crítico; y por último la respuesta celular debe extenderse más allá de los cambios fisiológicos requeridos para metabolizar o detoxificar la señal (Winzer y col., 2002).

### **1.2.1.3. Genes implicados en la diferenciación morfológica.**

Existen genes que están únicamente involucrados en procesos de diferenciación morfológica. La proliferación de *Streptomyces coelicolor* ocurre gracias a la formación de largas cadenas de esporas derivadas de hifas aéreas. Un paso crucial en este proceso es la subdivisión del compartimento multigenómico apical en muchos compartimentos unigenómicos precedentes a las esporas. En el genoma han sido identificados seis ORFs indispensables para la septación de las esporas (*whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH*, *whiI* y *whiJ*) aparte de los genes responsables del crecimiento vegetativo como *fts* (Aínsa y col., 2000).

En 1999 se propuso un modelo secuencial donde las nuevas hifas entran en un proceso de crecimiento específico para la esporulación inducido por *whiG* (que codifica para un factor sigma), que finalmente cesa debido a la acción de WhiA y WhiB, los cuales también inducen el fin de la replicación del ADN (Aínsa y col., 1999; Aínsa y col., 2000). Posteriormente, el cese del crecimiento dispararía otras señales que activarían *whiH* y *whiI* que a su vez inducirían la septación. Los genes *whiD*, *whiE* y *sigF* son responsables de la maduración de las esporas (Chater, 2006). La agrupación génica *whiE* ORFI-VIII codifica una polícétido sintasa del tipo II responsable de la producción del pigmento gris asociado a las esporas maduras (Davis y Chater, 1990; Hopwood y Sherman, 1990).

### **I.2.2. Reguladores específicos.**

Las primeras proteínas reguladoras específicas de ruta caracterizadas en los Actinomicetos pertenecen a la familia de las **SARPs** (*Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins*) (Wietzorrek y Bibb, 1997). Generalmente se encuentran localizadas en agrupaciones de biosíntesis de antibióticos y su descubrimiento supuso uno de los mayores avances en el conocimiento de los procesos de regulación de la biosíntesis de antibióticos (Bibb, 1996). Estos reguladores actúan en la mayoría de los casos como activadores transcripcionales (Chater y Bibb, 1997). La manipulación genética de estos genes reguladores específicos de ruta puede conducir a una sobreproducción del antibiótico sobre el que actúan, por lo cual supone una circunstancia muy interesante desde el punto de vista de la industria.

Los miembros de esta familia se caracterizan porque su zona N-terminal muestra identidad con la región C-terminal de unión a ADN de la familia OmpR (Mizuno y Tanaka, 1997), presentando un dominio de unión al ADN constituido por un motivo de unión HTH con alas (Wietzorrek y Bibb, 1997; Bibb, 2005).

Entre los miembros de la familia SARP destacan los genes de *S. coelicolor* *actII-ORF4* (regulador específico de la biosíntesis de actinorrodina, Fernández-Moreno y col., 1991), *redD* y *redZ* (reguladores específicos de la ruta de biosíntesis de undecilprodigiosina, Narva y Feitelson, 1990, White y Bibb, 1997) y *cdaR* (regulador específico de la ruta de biosíntesis de CDA, Ryding y col., 2002); *dnrI* de la agrupación génica de la daunorubicina en *Streptomyces peucetius* (Madduri y Hutchinson, 1995); el activador *ccaR* de las rutas de la cefamicina y el ácido clavulánico en *S. clavuligerus* (Pérez-Llarena y col., 1997); *mtmR*, regulador de la síntesis de mitramicina en *Streptomyces argillaceus* (Lombó y col., 1999); y *tyIS* de la ruta de la tilosina en *S. fradiae* que controla la expresión de un regulador global (*tyIR*) y *tyIT* que parece no ser esencial para la biosíntesis de antibiótico (Bate y col., 2002), entre otros.

Curiosamente en la agrupación de genes de la tilosina se han encontrado genes reguladores de diferentes familias (Bate y col., 1999), ya que *tyIT* y *tyIS* codifican para reguladores SARP, mientras que *tyIP* codifica para un receptor de  $\gamma$ -butirolactonas lo cual es un reflejo de la gran variedad de reguladores existentes en *Streptomyces*.

Estudios realizados con estas proteínas han demostrado que una mutación en dichos genes genera un fenotipo no productor del antibiótico, así como su expresión en multicopia da lugar a un incremento de la producción del mismo. El análisis de la transcripción de los genes *actII-ORF4* y *redD* demostró que ésta solo ocurre durante la transición a la fase estacionaria y que inmediatamente después se produce la expresión de los genes estructurales correspondientes. Si forzamos de alguna manera la expresión de los genes reguladores durante la fase exponencial se produce una transcripción prematura de los genes biosintéticos así como una producción adelantada del antibiótico (Gramajo y col., 1993).

En lo que se refiere al mecanismo de acción de estos reguladores, Arias y col., en 1999, mostraron que la proteína ActII-ORF4 se unía a las regiones promotoras de los genes de expresión temprana y tardía de la agrupación. En el caso de los genes *redD* y *redZ*, se sabe que el producto génico de este último ejerce su función a través de la regulación de la transcripción del gen *redD* ya que, mutantes en *redZ* ven severamente afectada la transcripción de *redD* (White y Bibb, 1997). Es interesante destacar que el gen *redA* posee un codón TTA que le hace estar bajo el control del gen regulador pleiotrópico *bldA*, ya nombrado.

Además, en las especies del género *Streptomyces* se han descrito reguladores específicos de ruta pertenecientes a otras familias de reguladores transcripcionales como LysR (Henikoff y col., 1988; ClaR de *S. clavuligerus*; Paradkar y col., 1998, Pérez-Redondo y col., 1998; ThnI de *S. cattleya*, Rodríguez y col., 2008) o LuxR (FomR de *S. fradiae*, Woodyer y col., 2006; PldR de *S. platensis* Mer-11107, Machida y col., 2008).

### I.3. Reguladores de la familia LuxR.

La familia de reguladores transcripcionales LuxR la constituyen generalmente aquellas proteínas que actúan como elementos de respuesta específicos para autoinductores. Las proteínas que sintetizan estos autoinductores constituyen otra familia: LuxI (Kendall y Garey, 2001).

El fenómeno de *quorum sensing* se describió por primera vez en el sistema LuxI/LuxR de la bacteria *Vibrio fischeri* (Nealson y Hastings, 1979). Algunas bacterias usan señales químicas que funcionan de una forma similar a las hormonas (autoinductores) para regular procesos fisiológicos como la producción de factores de virulencia, motilidad, nodulación, transferencia de plásmidos, producción de antibióticos, bioluminiscencia y formación de biofilms en respuesta a variaciones en la densidad celular (Bassler, 2002; Water y Bassler, 2005; Whitehead y col., 2001). Cuando la concentración de una molécula señal aumenta al mismo tiempo que se incrementa la densidad celular y una vez alcanzado un umbral de concentración, la señal interacciona con reguladores de respuesta específicos formando un complejo que se une a una secuencia de ADN localizada antes del promotor del gen diana produciéndose una regulación transcripcional (Fuqua y col., 2001; Whitehead y col., 2001).

Las bacterias usan una gran variedad de moléculas autoinductoras: oligopéptidos, son usados principalmente por bacterias Gram-positivas (Lyon y Novick, 2004); homoserina lactonas con grupos acilo, son las señales generalmente usadas para la comunicación intercelular en bacterias Gram-negativas (Fuqua y col., 2001); moléculas AI-2 derivadas de S-4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona, son consideradas las moléculas de señalización universal usadas para la comunicación entre especies (Vandeville y col., 2005). Aunque estas moléculas poseen diferentes propiedades químicas y estructurales, todas ellas tienen un punto en común: su unión a reguladores de respuesta mediando así en la transcripción.

Los reguladores LuxR están formados por dos dominios funcionales: un dominio de unión al autoinductor en el extremo amino terminal y un dominio de unión al ADN de tipo hélice-giro-hélice en la zona carboxilo terminal (Choi y Greenberg, 1992; Fuqua y col., 2001). La naturaleza de la interacción proteína-ADN determina que el regulador ejerza una función de activador o represor (Luo y Farrat, 1999; Cases y de Lorenzo, 2005; Nasser y Reverchon, 2007). La activación tiene lugar cuando el complejo se une a las denominadas cajas *lux*, situadas por delante del lugar del inicio de la transcripción (-40), y recluta la ARN polimerasa (Whitehead y col., 2001). Sin embargo, en ausencia del autoinductor algunas proteínas de tipo LuxR como

EsaR de *Pantoea stewartii* y ExpR de *Erwinia* sp. actúan como represores bloqueando estéricamente el acceso a la ARN polimerasa. Es decir, que la unión del autoinductor provoca un cambio conformacional que hace accesible el promotor, la ARN polimerasa se une y se lleva a cabo la transcripción (Minogue y col., 2002; von Bodman y col., 2003). Por lo tanto, los reguladores de respuesta de tipo LuxR, bien sea mediante la vía de activación o represión, sirven para modular el comportamiento de la población bacteriana.

La presencia de un mayor número de genomas secuenciados, ha permitido el descubrimiento de reguladores LuxR huérfanos o también denominados "solos" (Subramoni y Venturi, 2009) que no poseen ninguna sintasa de autoinductor asociada (Patankar y González, 2009). Estos reguladores presentan un dominio hélice-giro-hélice en la zona carboxilo terminal y un dominio de unión a señales en el extremo amino terminal (Fuqua, 2006), no controlan directamente la síntesis del autoinductor pero pueden interaccionar entre ellos.

También existen reguladores que presentan el dominio LuxR asociado a otros tipos de dominios, es el caso de PimM que presenta un dominio sensor de tipo PAS (Antón y col., 2007). La mayoría de dominios PAS en procariontes actúan como módulo sensor en los sistemas de dos componentes detectando cambios en la luz, potencial redox, oxígeno, nivel de energía celular y pequeños ligandos (Taylor y Zhulin, 1999) pero no en el caso de esta proteína. PimM actúa como regulador positivo de la biosíntesis de pimáricina en *S. natalensis* siendo sus principales dianas los genes responsables de la iniciación y el primer ciclo de elongación de la cadena policetílica (*pimS0* y *pimS1*). La agrupación de la pimáricina contiene también el regulador PimR que es el arquetipo de una nueva familia de reguladores que combina un dominio regulador de la biosíntesis de antibióticos de *Streptomyces* (SARP) en la zona amino terminal con una región en la zona carboxilo terminal que presenta similitud con proteínas LAL (Antón y col., 2004).

#### **I.4. Reguladores LAL.**

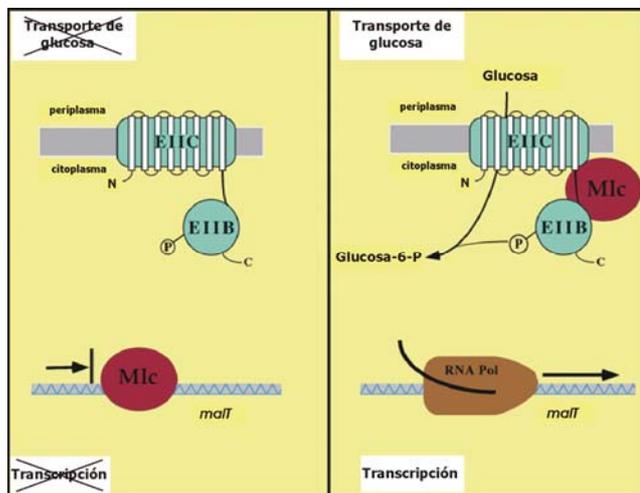
Esta subfamilia de reguladores, incluida dentro de la familia LuxR, fue identificada por De Schrijver y De Mot en 1999. Sus miembros se caracterizan por poseer un gran tamaño, un dominio de unión a ATP/GTP en la zona amino terminal y un motivo hélice-giro-hélice muy conservado (Prosite motif PS00622) localizado en el dominio de unión al ADN presente en el extremo carboxilo terminal, razones por las cuales reciben el nombre de LAL, del inglés *Large ATP-binding regulators of the LuxR family*. Un análisis filogenético detallado ha mostrado que esta subfamilia de proteínas reguladoras pertenece a la clase STAND (*Signal Transduction ATPases with Numerous Domains*) de nucleósido trifosfatasa (Leipe y col. 2004). Sin embargo, publicaciones posteriores siguen refiriéndose a estos reguladores como LAL (Rascher y col., 2005, Knirschová y col., 2007, Hur y col., 2008, Horbal y col., 2010) así que en este trabajo se ha seguido con dicha denominación.

La subfamilia LAL está tipificada por el regulador del regulón de la maltosa de *Escherichia coli*, MalT (Boos y col., 1998). El sistema maltosa de *E. coli* está adaptado para realizar una utilización eficiente de maltosa y maltodextrinas debido a su implicación en el transporte y catabolismo de las maltodextrinas. Dicho regulón consta de 10 genes organizados en cinco operones que codifican para cuatro enzimas, cinco proteínas de transporte y una proteína periplásmica. MalM de función desconocida (Gilson y col., 1986). Las enzimas MalP, MalQ, MalS y MalZ catalizan la degradación de maltosa y maltodextrinas a glucosa y glucosa-1-fosfato. Las proteínas de transporte son receptores  $\lambda$  (maltoporinas) en la membrana externa (Schirmer y col., 1995) y un transportador ABC dependiente de la unión de una proteína, compuesto por una

proteína periplásmica de unión a maltosa (MalE), el complejo de translocación (MalF/G) en la membrana y una subunidad de hidrólisis de ATP (MalK).

Todos los genes *mal* son controlados por MalT, que es el activador transcripcional específico junto con los inductores maltotriosa y ATP (Richet y Raibaud, 1989). MalT está en un equilibrio de monómeros inactivos y multímeros activos estabilizados por la maltotriosa (Schreiber y Richet, 1999). El sistema es inducido por la presencia en el medio de maltosa o alguna maltodextrina pero solo la maltotriosa, que es un intermediario del metabolismo de las maltodextrinas, puede activar MalT (Raibaud y Richet, 1987).

La regulación de MalT tiene lugar a dos niveles. El primero, relacionado con la expresión de *malT*, ya que está sujeto a una represión por catabolito y por tanto depende de la regulación intracelular de los niveles de AMPc (Débarbouillé y Schwartz, 1979; Chapon, 1982; Chapon y Kolb, 1983). Además, el regulador global Mlc es un represor de la transcripción de *malT*. La actividad represora de Mlc está controlada por el estado del transporte de la enzima EIICB, específica de glucosa del sistema fosfotransferasa, que recluta Mlc cuando la glucosa es transportada (Figura I.5).

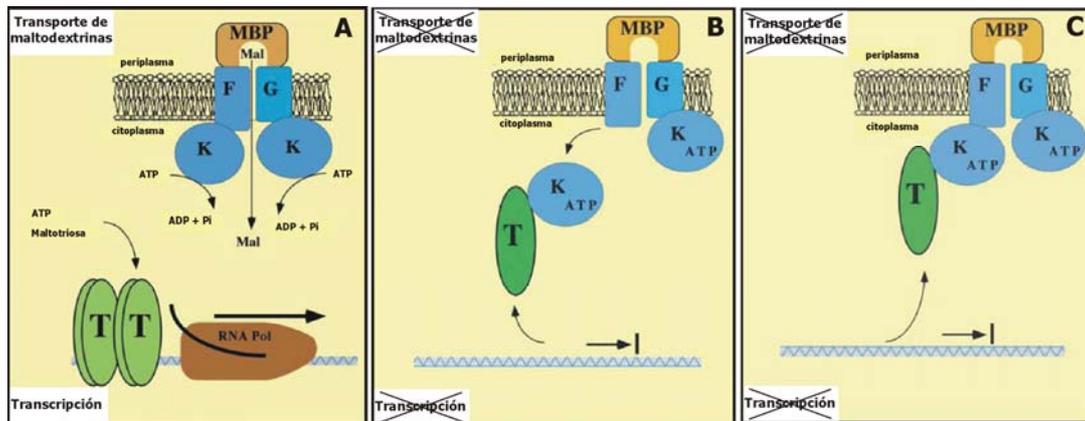


**Figura I.5:** Transporte de glucosa vía EIICB de la fosfotransferasa. Cuando EIICB no transporta glucosa, Mlc se une al promotor de *malT* y reprime su transcripción (izquierda). Durante el transporte de glucosa, Mlc es secuestrada por EIICB no fosforilada y se produce la transcripción de *malT*. Imagen modificada de Schlegel y col., 2002.

El segundo nivel de regulación de la proteína MalT afecta a su actividad. MalT es activada por maltotriosa, la cual es formada por la célula a partir de fuentes de carbono que no sean maltodextrinas o como consecuencia de la degradación de galactosa o trehalosa, pudiendo provocar la activación de los genes *mal*. Se ha visto que la glucosa interna no fosforilada participa en la biosíntesis endógena de maltodextrina y es por tanto un elemento clave en la expresión endógena de los genes *mal* (Leipe y col., 2004).

Además de la activación dependiente de maltotriosa, MalT puede interactuar con tres enzimas diferentes que conducen a su inactivación como activador transcripcional. La primera es MalK, la subunidad que conduce la energía del sistema de transporte de maltodextrinas. El transporte de maltosa controla la interacción de MalK y MalT, y de este modo afecta a la expresión de los genes diana (Figura I.6). La segunda enzima es MalY, una cistationasa que emplea piridoxal fosfato como cofactor. Dicha proteína es un activador dependiente de un segundo activador CRP (la proteína receptora de AMPc); la unión a CRP desencadena un reposicionamiento de MalT lo que permite su interacción con la ARN polimerasa (Rhodius y Busby, 1998), de modo que para que se produzca la activación transcripcional se requiere la unión de MalT con maltotriosa y ATP. Sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto de activación transcripcional que implica múltiples interacciones de MalT con complejos

nucleoproteicos regulatorios. La tercera enzima con la que interactúa MalT es una esterasa soluble de función desconocida.



**Figura I.6:** Señales de transducción que llevan a la regulación de los genes *mal*. (A) Durante el transporte de maltodextrinas MalK y MalT no interactúan; MalT forma dímeros o multímeros y estimula la transcripción a partir de promotores *mal*. Cuando no existe transporte de maltodextrinas, MalT es o secuestrada por la subunidad libre MalK citoplasmática (B) o por la subunidad MalK ensamblada en el transportador ABC (C). Mal: maltodextrinas, MBP: proteína de unión a maltosa (codificada por *malE*). Imagen modificada de Schlegel y col., 2002.

Los reguladores de la subfamilia LAL se caracterizan por su tamaño inusualmente grande (entre 872-1159 aminoácidos), dominios de unión ATP/GTP en sus extremos N-terminales fácilmente identificados por la presencia del motivo conservado Walker A (Walker y col., 1982), y un dominio C-terminal de tipo LuxR caracterizado por un motivo conservado hélice-giro-hélice (HTH, helix-turn-helix). Varios de los reguladores de la subfamilia LAL han sido identificados en algunas agrupaciones génicas responsables de la biosíntesis de antibióticos en actinomicetos (Tabla I.3), incluyendo PikD de la ruta biosintética de la picromicina en *S. venezuelae* (Wilson y col., 2001), RapH de la ruta biosintética de la rapamicina en *S. hygroscopicus* (Aparicio y col., 1996; Molnar y col., 1996) o NysRI y NysRIII de la ruta biosintética de la nistatina en *S. noursei* (Brautaset y col., 2000).

Muchos de los miembros de esta subfamilia están involucrados en la regulación positiva de la biosíntesis del antibiótico correspondiente, por ejemplo, se ha visto que PikD es esencial para la regulación específica de la biosíntesis de picromicina en *S. venezuelae* mediante su unión directa a varios promotores controlando de esta manera la expresión de los genes de biosíntesis. Además de ello, también se ha visto que los motivos Walker A y B de unión a ATP son esenciales para dicha activación, ya que su mutación produce una proteína no funcional incapaz de activar la transcripción de los genes de la agrupación (Wilson y col., 2001). Asimismo, el regulador transcripcional FscRII es esencial para la producción de candidicina en *Streptomyces* sp. FR-008 (Chen y col., 2003).

Sekurova y colaboradores (2004) han demostrado que la implicación de los genes reguladores *nysRI* y *nysRIII* es necesaria para una producción de nistatina eficiente en *S. noursei*. La regulación afecta tanto a la expresión de genes responsables de la iniciación de la biosíntesis de dicho antibiótico así como a su transporte en un mecanismo en cascada.

Proteína de la subfamilia LAL	Número de aa	Cepa	Sistema regulado	Referencia
AmphRI	948	<i>S. nodosus</i>	anfotericina	Carmody y col., 2004
AmphRIII	929			
AveR	949	<i>S. avermitilis</i>	avermectina	Kitani y col., 2009
FkbN	913	<i>S. hygroscopicus</i> var <i>ascomyceticus</i>	FK520 ascomicina	Wu y col., 2000
FscRII	942	<i>Streptomyces</i> sp. FR-008	candidina	Chen y col., 2003
FscRIV	1005			
GdmRI	968	<i>S. hygroscopicus</i> 17997	geldanamicina	He y col., 2008
GdmRII	921			
HbmRII	926	<i>S. hygroscopicus</i> AM 3672	herbimicina	Rascher y col., 2005
LipReg4	826	<i>S. aureofaciens</i> Tü117	lipomicina	Horbal y col., 2010
MonH	980	<i>S. cinnamomensis</i>	monensina	Oliynyk y col., 2003
NbmM	945	<i>S. narbonensis</i>	desosamina	Butler y col., 2002
NysRI	966	<i>S. noursei</i> ATCC 11455	nistatina	Sekurova y col., 2004
NysRIII	927			
PikD	928	<i>S. venezuelae</i>	picromicina	Wilson y col., 2001
RapH	948	<i>S. hygroscopicus</i>	rapamicina	Molnár y col., 1996
SalRI	962	<i>S. albus</i> CCM 4719	salinomicina	Knirschová y col., 2007
SalRII	941			
TmcN	1029	<i>Streptomyces</i> sp. CK4412	tautomycetina	Hur y col., 2008

**Tabla I.3:** Características de algunos reguladores LAL de *Streptomyces*.

La subfamilia de reguladores LAL, además de en *E. coli*, también se encuentra presente en otros organismos Gram-negativos como: *Klebsiella pneumoniae* (AcoK; Peng y col., 1997) o *Pseudomonas oleovorans* (AlKS; Yuste y col., 1998) implicados en la regulación de funciones catabólicas (degradación de acetoina y alcanos, respectivamente).

En *Pseudomonas alcaligenes* se ha identificado un regulador LAL (OrfV) que actúa como represor del operón *xcp* (genes que codifican el sistema de secreción de lipasa) (Gerritse y col., 1998) y a diferencia del MalT de *E. coli* se encuentra situado dentro de la agrupación de genes *xcp* sobre los que actúa.

## 1.5. *Streptomyces coelicolor*.

*Streptomyces coelicolor* recibe este nombre debido al color azulado de uno de los pigmentos que produce (*coelicolor* significa "color del cielo" o "color celestial" en Latín; Hopwood, 2007). *Streptomyces coelicolor* A3(2) es el organismo designado como modelo representativo de los actinomicetos y más concretamente del género *Streptomyces* (Hopwood, 1999). Estos microorganismos son responsables de la producción de muchos compuestos farmacéuticos útiles como antitumorales, inmunosupresores y alrededor de dos tercios de todos los antibióticos naturales conocidos.

*S. coelicolor* fue elegido como modelo de estudio de la biosíntesis de metabolitos secundarios porque esporula y conjuga bien, además existen una gran cantidad de mutantes y de herramientas genéticas desarrolladas para su manipulación.

Su genoma fue secuenciado por el Instituto Sanger en colaboración con David Hopwood del centro John Innes a partir de una genoteca de cósmidos y posteriormente usando una genoteca de BACs para rellenar los huecos y verificar la secuencia (Bentley y col., 2002). Su tamaño es de 8,67 Mb, de las cuales 4,9 Mb constituyen el núcleo de la secuencia, 1,5 Mb el brazo izquierdo, y 2,3 Mb el brazo derecho, siendo un total de 7825 las secuencias codificantes estimadas (Figura I.2 y Tabla I.4). El núcleo del cromosoma está constituido por genes esenciales como por ejemplo los necesarios para la división celular, replicación del ADN, transcripción, traducción y síntesis de aminoácidos; mientras que los brazos están formados por genes que codifican las denominadas funciones no esenciales entre las que se incluye el metabolismo secundario.

El metabolismo secundario, a pesar de no ser considerado como una función esencial, otorga muchas ventajas, un ejemplo de ello es la síntesis de hopanoides que podrían proteger al organismo frente a la pérdida de agua a través de la membrana plasmática del micelio aéreo y el ácido eicosapentanoico que podría ayudar a mantener la fluidez de la membrana a bajas temperaturas. También llama la atención la presencia de al menos tres agrupaciones que probablemente codifiquen para la formación de sideróforos para captar hierro en condiciones de baja disponibilidad (Bentley y col., 2002).

Componente del genoma	Propiedad
Tamaño	8,667507 Mb
Contenido G+C	72,12 %
Secuencias codificantes	7825
Proteínas con función reguladora	965 (12,3 %)
Factores sigma	65
Proteínas transportadoras	614 (7,8 %)
Proteínas secretadas	819 (10,5 %)

**Tabla I.4:** Características generales del cromosoma de *Streptomyces coelicolor* A3(2). Modificado de Bentley y col. (2002).

Curiosamente, en el genoma de *S. coelicolor* A3(2) se ve reforzada la regulación frente al resto de funciones; un elevado porcentaje de las proteínas estimadas poseen función reguladora, mostrando una gran abundancia de factores sigma (Tabla I.4) de los cuales 41 desarrollan su función fuera del citoplasma (ECF, del inglés *extra-cytoplasmic function*). Este tipo de proteínas responden a estímulos externos y activan genes implicados en el estrés por azufre, homeostasis de la pared celular y en el desarrollo del micelio aéreo (Bentley y col., 2002). Se ha propuesto que uno de ellos, el factor  $\sigma^B$ , actúa como regulador global controlando la expresión secuencial de otros factores sigma en un mecanismo en cascada regulando de esta forma la diferenciación y la respuesta tanto a estrés osmótico como oxidativo (Lee y col., 2005).

El genoma de *S. coelicolor* contiene numerosos sistemas reguladores de dos componentes, de los cuales 85 son sensoras quinasa y 79 reguladores de respuesta, incluyendo 53 parejas sensor-regulador. También presenta una gran variedad de reguladores pertenecientes a diferentes familias como LysR, LacI, ROK, GntR, TetR, IclR, AraC, AsnC y MerR.

Un reflejo de la interacción del microorganismo con el medio en el que habita es la existencia de proteínas relacionadas con el transporte y con proteínas secretadas: nucleasas, lipasas, xilanasas, celulasas y quitinasas, entre otras.

La disponibilidad de la secuencia del cromosoma de *S. coelicolor* y el desarrollo de métodos eficientes para su análisis ha permitido la investigación global de la expresión génica mediante el uso de micromatrices de ADN (DeRisi y col., 1997). El primer estudio en el que se usó chips de ADN de *S. coelicolor* combinado con el análisis de mutantes de genes individuales, fue publicado en 2001 (Huang y col., 2001). Gracias a esta técnica se observaron alteraciones en el patrón de expresión de genes durante el crecimiento de *S. coelicolor* y concretamente durante la fase de transición del metabolismo primario al secundario, desvelándose una parte muy importante de las rutas de biosíntesis de antibióticos. A este trabajo le siguieron otros (Huang y col., 2005; Lee y col., 2005; Kang y col., 2007; Bucca y col., 2009) que han contribuido a desvelar ciertos aspectos desconocidos o incompletos de *S. coelicolor* tales como cascadas de regulación y mecanismos de respuesta a estrés.

*S. coelicolor* A3(2) produce cuatro antibióticos estructuralmente distintos (Figura I.7): actinorrodina (policétido aromático codificado por la agrupación denominada *act*), undecilprodigiosina (antibiótico tripirrólico codificado por la agrupación denominada *red*), antibiótico dependiente de calcio (antibiótico peptídico no ribosomal o CDA *Calcium Dependent Antibiotic*, agrupación *cda*) y metilenomicina (antibiótico del tipo de las ciclopentanonas agrupación *mmr*). Los dos primeros, además de antibióticos, son compuestos pigmentados. Su fácil extracción y posterior estabilidad permiten su cuantificación mediante espectrofotometría. Esto hace de *S. coelicolor* un buen organismo modelo para el estudio de la producción de antibióticos. Estas agrupaciones no se encuentran distribuidas al azar en el genoma sino que se encuentran en los brazos especialmente en el izquierdo en la zona cercana a la unión entre el núcleo y el brazo (Figura I.2 en el círculo 4 en rojo). La cepa M145, utilizada normalmente en los laboratorios, no contiene los plásmidos SCP1 y SCP2, por lo que no produce metilenomicina (Kieser y col., 2000).

Curiosamente durante 40 años de experimentos de genética molecular clásica sólo se descubrieron las cuatro agrupaciones de biosíntesis anteriormente mencionadas mientras que desde que se ha publicado su genoma, mediante búsquedas de homología con policétido sintasas y péptido sintasas, se ha desvelado la existencia de otros 18 metabolitos secundarios (policétidos, péptidos, sideróforos, hopanoides, terpenos, butirolactonas, geosmina, etc) codificados por su genoma (Thompson y col., 2002). La existencia de tantos y tan variados metabolitos secundarios probablemente indica una adaptación específica a los diferentes hábitats en los que se encuentran presentes estos microorganismos.

La cepa *S. coelicolor* A3(2) porta tres plásmidos de diferentes características. Un plásmido lineal de 356 kb denominado SCP1 (Wright y Hopwood, 1976b; Kinashi y Shimaji-Murayama, 1991) que contiene los genes de biosíntesis del antibiótico metilenomicina (antibiótico del tipo de las ciclopentanonas; Kirby y Hopwood, 1977; Figura I.7), un plásmido circular transmisible de 30 kb y de pocas copias denominado SCP2, y un plásmido de 17 kb normalmente integrado en el cromosoma denominado SLP1 (Chater y Hopwood, 1993) pero que es capaz de escindir, conjugar y replicarse autónomamente en otros estreptomicetos (ver las revisiones de plásmidos de *Streptomyces* en Hopwood y col., 1987; Hopwood y Kieser, 1993). La **metilenomicina** presenta actividad antibacteriana en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, siendo especialmente efectiva en especies del género *Proteus*. Su cuantificación se determina por HPLC, o por bioensayo, generalmente frente a cepas de *S. coelicolor* SCP1<sup>-</sup>.

*S. coelicolor* A3(2) produce el antibiótico pigmentado actinorrodina "act" (Figura I.7). Se trata de un policétido aromático codificado por la agrupación denominada *act* (*SCO5071-5092*), que otorga a la colonia y sus alrededores un característico tono azulado a pH básico y rojo a pH ácido y neutro debido a la forma lactónica de dicho antibiótico,  $\gamma$ -actinorrodina (Christiansen, 1970). Este compuesto fue descrito la primera vez como un indicador de ácido-base (Brockmann y Hieronymus, 1955) y se ha propuesto como un buen colorante para la industria alimentaria gracias a su solubilidad, estabilidad y nula toxicidad (Zhang y col., 2006). Se han descrito seis análogos de la molécula ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\varepsilon$ -actinorrodina y ácido actinorrodínico), aunque el número podría ascender al menos hasta diez (Bystrykh y col., 1996). En la conversión de actinorrodina a  $\gamma$ -actinorrodina (forma principal de secreción del compuesto) así como en su transporte al exterior celular participan hasta tres genes (Bystrykh y col., 1996; Kieser y col., 2000) por lo que resulta conveniente el análisis espectrofotométrico combinado de ambas formas para realizar una correcta cuantificación. La actividad antibiótica de este compuesto es muy limitada en bacterias Gram-positivas y nula en bacterias Gram-negativas (Wright y Hopwood, 1976a). Se suele ensayar frente a bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. (Bystrykh y col., 1996).

El otro antibiótico pigmentado que produce *S. coelicolor* A3(2) es la undecilprodigiosina también conocido como el pigmento rojo o "red". Su localización es intracelular ya que es un compuesto muy insoluble en agua lo cual impide su difusión en el medio. Es un antibiótico tripirrólico (Figura I.7) codificado por la agrupación denominada *red*; en realidad es una mezcla de al menos cuatro prodigioninas con una undecilprodigiosina y butilcicloheptilprodigiosina predominantemente (*SCO5877-5898*; Tsao y col., 1985). Las prodigioninas se forman por la condensación de tres anillos pirrólicos y se diferencian por el hidrocarburo presente en el tercero de ellos. Fueron descubiertas por primera vez en especies del género *Serratia* (y más tarde también en especies del género *Streptomyces*) por su actividad antibacteriana, antifúngica y antiprotozoica (Williams y col., 1971; Williams y Qadri, 1980; Rudd y Hopwood, 1980). Recientemente se les ha asignado además un efecto inmunosupresor y anticancerígeno (Williamson y col., 2007) demostrando una toxicidad selectiva frente a todas las líneas celulares responsables del cáncer de mama (Ho y col., 2007).

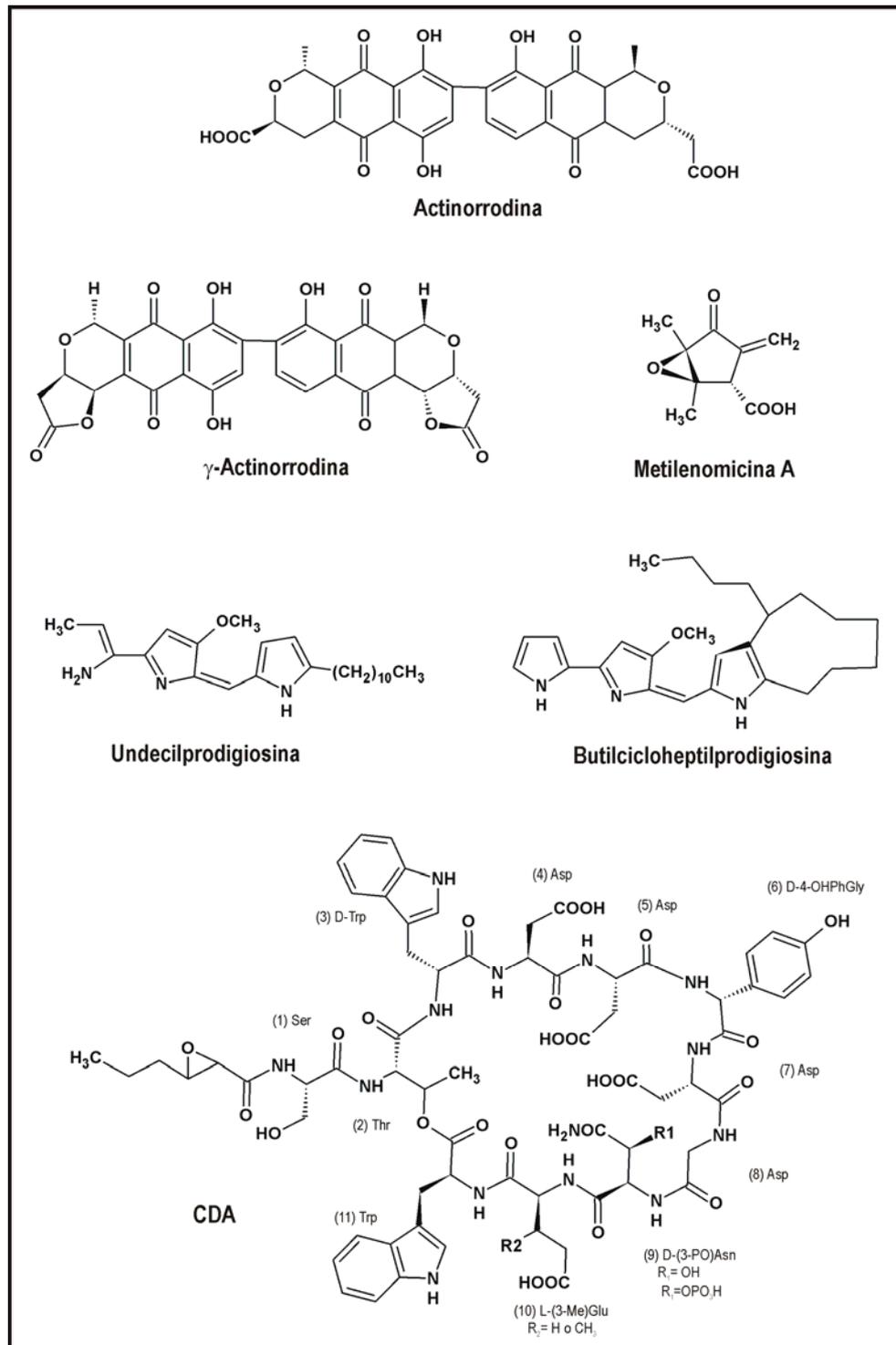
El CDA "Calcium Dependent Antibiotic" es un lipopéptido cíclico de 11 aminoácidos con un hidrocarburo de 6 carbonos en su extremo amino terminal (Kempter y col., 1997; Figura I.7). Fue descrito por primera vez en *S. coelicolor* por Lakey y col. (1983) y caracterizado químicamente por Kemper y col. (1997). Su actividad antibacteriana depende de la presencia de calcio en el medio. Su cuantificación se puede realizar mediante bioensayo utilizando organismos como *Bacillus mycoides* o *Staphylococcus aureus* y añadiendo nitrato cálcico al medio (Kieser y col., 2000). Está codificado por la agrupación de genes denominada *cda* (*SCO3210-3249*).

*Streptomyces* también produce la molécula responsable del característico olor a tierra mojada: la geosmina (*SCO6073*; Figura I.7), de hecho esta palabra es griega y significa "aroma de la tierra". Es una sustancia química de naturaleza sesquiterpenoide producida por *Streptomyces* y *Penicillium*. Es inestable frente a los ácidos, que la descomponen y destruyen su aroma, por lo que la lluvia ácida provoca que, cuando llueve, ya no huele a tierra mojada.

Esta sustancia es liberada cuando el organismo muere y permanece en la tierra hasta que caen las primeras gotas de lluvia, a continuación es arrastrada por la humedad haciendo que el aire adquiera este olor característico. El ser humano percibe la geosmina en concentraciones de hasta 1 parte por cada 1000 millones, lo que la convierte en una de las moléculas más olorosas que existen. La geosmina es útil en la industria farmacéutica para camuflar el olor desagradable de algunos medicamentos pero por otro lado su presencia es rechazada por los

fabricantes de vinos, ya que su aroma estropea las características organolépticas de la cosecha.

Los camellos, algunos insectos y las lombrices se ven atraídos por su aroma ya que es indicativo de la presencia de lluvia. Los cactus y algunas plantas del Amazonas se aprovechan de esto e incluyen esta fragancia en sus flores para que los insectos vayan hacia ellas creyendo que contienen agua, siendo de este modo, vectores de polinización.



**Figura I.7:** Estructura química de algunos antibióticos y metabolitos secundarios producidos por *Streptomyces coelicolor*.

## **I.6.Objetivos del presente trabajo.**

En la introducción se ha visto la importancia de los reguladores en la diferenciación morfológica, bioquímica y en la producción de metabolitos secundarios. Recientemente se ha identificado la nueva subfamilia de reguladores transcripcionales LAL y dado que en *S. coelicolor*, el microorganismo modelo del género *Streptomyces*, se desconocen este tipo de reguladores nos propusimos identificar y determinar la función de los reguladores LAL de *S. coelicolor*, en la producción de metabolitos secundarios y desvelar los mecanismos que controlan las cascadas regulatorias en las que participan este tipo de reguladores.

Por todo ello nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Identificación de los posibles genes LAL en el genoma de *S. coelicolor*.
2. Estudios de expresión diferencial de genes LAL bajo diferentes condiciones de cultivo.
3. Desarrollo de mutantes en distintos genes LAL con posible implicación en metabolismo secundario.
4. Análisis funcional de dichos genes LAL.

## ***Materiales y Métodos***

---



## II.1. Microorganismos utilizados.

***Escherichia coli* DH5 $\alpha$**  (Hanahan, 1983). Cepa utilizada habitualmente en experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico, debido a la alta eficiencia de transformación de sus células competentes (hasta  $5 \times 10^8$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico). Posee una deleción en el extremo 5' del gen *lacZ* del operón *lac*, susceptible de ser complementada por determinados vectores de clonación, como el pBluescript® (Stratagene) o el pBC (Stratagene), por ejemplo. Esta  $\alpha$ -complementación produce una coloración azul en la colonia, originada por la acción de la  $\beta$ -galactosidasa (codificada por *lacZ*) sobre el compuesto X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido).

Genotipo: F<sup>-</sup> ( $\phi$ 80d *lacZ* $\Delta$ M15)  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1* endA1 *hsdR17*(r<sup>-k</sup>, m<sup>+k</sup>).

***Escherichia coli* BW25113/pIJ790** (Datsenko y Wanner, 2000). Esta cepa crece en medio complejo con cloranfenicol (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a 30 °C.

Genotipo del plásmido: [*oriR101*], [*repA101(ts)*], *araBp-gam-be-exo*.

Genotipo cromosoma:  $\Delta$ (*araD-araB*)567,  $\Delta$ *lacZ*4787(::*rrnB-4*), *lacIp-400*(*lacI*<sup>Q</sup>),  $\lambda^-$ , *rpoS369*(Am), *rph-1*,  $\Delta$ (*rhaD-rhaB*)568, *hsdR514*.

***Escherichia coli* ET12567[pUZ8002]** (McNeil y col., 1992). Cepa donadora en el proceso de conjugación intergenérica, resistente a cloranfenicol. Contiene el plásmido conjugativo no movilizable pUZ8002 que posee el gen de resistencia a kanamicina.

Genotipo: dam-13:Tn9, *dcm-6*, *hsdM*.

***Streptomyces coelicolor* M145** (Kieser y col., 2000). Produce dos antibióticos pigmentados: actinorrodina y undecilprodigiosina, y uno no pigmentado CDA (antibiótico dependiente de calcio). Carece de los plásmidos SCP1 y SCP2, por lo que no produce metilenomicina.

***Bacillus subtilis*** (CECT 4522). Microorganismo utilizado en bioensayos para cuantificar la producción de CDA.

## II.2. Vectores plasmídicos.

**pBlueScript®(I/II) KS-SK (+/-)**. Plásmidos derivados del pUC19 y comercializados por Stratagene. Poseen un tamaño de 2,958 pb (I) y 2,961 pb (II) e incluyen un fragmento del gen *lacZ* (*lacZ*' subunidad  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa) capaz de complementar la mutación presente en la  $\beta$ -galactosidasa de algunas cepas de *E. coli* portadoras de la deleción *lacZ* $\Delta$ 15 (proceso denominado  $\alpha$ -complementación), permitiendo la aparición de color azul en presencia de IPTG (inductor del gen *lacZ*) y de X-gal (análogo estructural de la galactosa y responsable de la aparición del color azul).

La presencia de un sitio de clonación múltiple o policonector con cortes de restricción únicos para 21 enzimas en esta zona facilita la incorporación de insertos. La inserción de un fragmento de ADN foráneo dentro del policonector provoca la interrupción del gen *lacZ*'. Además tienen incorporado un gen de resistencia al antibiótico  $\beta$ -lactámico ampicilina ( $\beta$ -lactamasa codificada por el gen *bla*) que permite la selección de aquellos transformantes que se desarrollen

en presencia del antibiótico. También poseen el origen de replicación *colE1* para *E. coli* del plásmido pBR322.

La designación KS indica la orientación del sitio múltiple de clonación en dirección 5'-*KpnI*....*SacI*-3', respecto al extremo 5' del gen *lacZ*, mientras que SK denota la orientación contraria (5'-*SacI*....*KpnI*-3'). El símbolo (+) indica que la cadena rescatada al obtener ADN monocatenario es la codificante para el fragmento del gen *lacZ* y el (-) denota que la cadena de ADN monocatenario rescatada será la complementaria. Para conseguir la obtención de este ADN de cadena sencilla, estos vectores poseen el origen de replicación monocatenario del fago f1. Dicha cadena sencilla necesita la participación en su obtención de un fago ayudante como el fago M13K07 (Vieira y Messing, 1987).

**pGEM<sup>®</sup>-T Easy**. Vector de 3,02 kb comercializado por Promega, utilizado para clonar fragmentos amplificados por PCR. Se utiliza linealizado con *EcoRV* y con una timidina protuberante en los extremos 3' que impide su recircularización y favorece la ligación de los productos de PCR producidos por ciertas polimerasas termoestables que dejan adeninas en los extremos (Mezei y Storts, 1994; Robles y Doers, 1994). Contiene los promotores T7 y SP6 de la ARN polimerasa flaqueando una región múltiple de clonación dentro de la región codificante para el  $\alpha$ -péptido de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, lo que permite seleccionar los clones recombinantes por su color blanco. Además tiene incorporado un gen de resistencia a ampicilina. También posee el origen de replicación del fago filamentoso f1 para la preparación de ADN de cadena sencilla.

**pIJ773** (Gust y col., 2002). Vector de 3,36 kb. Presenta genes de resistencia a carbenicilina (100  $\mu$ g/mL) y apramicina (50  $\mu$ g/mL).

Genotipo: pBluescript KS (+), *aadA*, *oriT* (RK2), sitios FRT.

**pUZ8002** (Paget y col., 1999). Plásmido conjugativo no transmisible, ya que no posee origen de transferencia (*oriT*). Actúa de plásmido movilizador al aportar las funciones de transferencia (genes *tra*), que proceden del pRK2 y que se suplen en *trans*. Posee el gen de resistencia a kanamicina.

**pSET152** (Bierman y col., 1992). Plásmido integrativo de 5,5 kb que deriva del vector pUC18. Contiene el gen de resistencia a apramicina (*acc(3)IV*), que actúa de marcador de selección tanto en la cepa donadora como en la receptora. El sitio *attP* y los genes *int* proceden del fago  $\Phi$ C31.

**pSET152neo** (Vicente y col., 2009). Plásmido integrativo de 7,1 kb que deriva del vector pUC18. Construido a partir del plásmido pSET152 al que se le introdujo en el corte *Bam*HI el gen de resistencia a kanamicina. Continúa manteniendo el gen de resistencia a apramicina (*acc(3)IV*), que actúa de marcador de selección tanto en la cepa donadora como en la receptora. El sitio *attP* y los genes *int* proceden del fago  $\Phi$ C31.

**pSOK201** (Zotchev y col., 2000). Plásmido replicativo de 7,1 kb derivado del vector pGM11, donde fue reemplazado el fragmento *EcoRI-Hind*III por un fragmento de 3 kb procedente del plásmido pSOK101 (Zotchev y col., 2000). Presenta los genes de resistencia a apramicina y kanamicina.

**pAR933a** (Rodríguez-García y col., 2005). Plásmido integrativo de 9,6 kb derivado del vector pAR860 (Rodríguez-García y col., 2005). Contiene los genes *luxAB*, el gen de resistencia a apramicina y el promotor fuerte SF14 de expresión constitutiva procedente del fago I19 de *S. ghanaensis* (Labes y col., 1997).

## II.3. Productos y reactivos.

### II.3.1. Reactivos específicos para biología molecular.

#### II.3.1.1. Ácidos nucleicos.

El ADN del bacteriófago lambda (empleado como marcador de peso molecular en los geles de electroforesis de ADN tras su digestión con las endonucleasas de restricción *Hind*III o *Pst*I), fue adquirido a la casa comercial MBI Fermentas.

El ADN de espermatozoos de salmón tipo III se obtuvo de la compañía Sigma-Aldrich, Inc.

#### II.3.1.2. Soluciones de antibióticos y otros compuestos comúnmente utilizados.

La ampicilina (Amp), se preparó a una concentración de 200 mg/ml en solución acuosa, y para la selección de transformantes de *E. coli* se empleó a una concentración final de 100 µg/ml. Fue adquirida en forma del preparado farmacéutico Britapen (Beecham S.A.).

La Kanamicina (Km), se preparó a partir del compuesto comercial Kantrex (Apothecon) en solución acuosa concentrada a 50 mg/ml. En la selección de colonias resistentes se empleó una concentración final de 50 µg/ml.

El cloranfenicol (Cm) se preparó a una concentración de 100 mg/mL en etanol 100 %. A la hora de seleccionar transformantes se usó una concentración final de 50 µg/mL.

La apramicina (Apra) se preparó a una concentración de 50 mg/mL en solución acuosa. En la selección de transformantes/exconjugantes se usó una concentración final de 50 µg/mL. La apramicina se obtuvo en forma de sulfato de apramicina.

El ácido nalidíxico, usado en las conjugaciones para evitar el crecimiento de *E. coli*, se preparó a una concentración de 25 mg/mL en NaOH 0.15 M y agua Milli-Q.

El IPTG (1-isopropil-β-D-galactopiranosido), se preparó a una concentración de 100 mM en agua y para la selección de transformantes se usó una concentración final de 0.05 mM.

El X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) se preparó en solución concentrada a 40 mg/ml en N,N'-dimetilformamida. En los experimentos de transformación de *E. coli* se utilizó a una concentración final de 80 µg/ml. Conservar a -20 °C protegido de la luz.

Nota: Las soluciones concentradas (stocks) de antibióticos y otras sustancias disueltas en agua se esterilizaron por filtración a través de filtros estériles de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore). Los antibióticos disueltos en compuestos orgánicos no fueron esterilizados. Todos los antibióticos fueron alicuoteados y conservados a -20 °C.

#### II.3.1.3. Enzimas de restricción, modificadoras y otras.

Las enzimas de restricción fueron suministradas por las casas comerciales New England Biolabs Inc., Amersham Biosciences, MBI Fermentas y Takara Bio Inc.

Las enzimas desoxirribonucleasa I (DNasa I) de páncreas bovino y ribonucleasa A (RNasa A) de páncreas bovino y la proteinasa K, fueron adquiridas a la compañía Sigma-Aldrich, Inc.

La enzima ADN ligasa del fago T4 y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, fueron adquiridas a la compañía MBI Fermentas. La fosfatasa alcalina fue adquirida a la casa comercial New England Biolabs Inc.

La enzima Taq ADN Polimerasa fue adquirida a Sigma-Aldrich, Inc. y a Promega, y la enzima Platinum® Pfx ADN polimerasa a Invitrogen.

La lisozima de clara de huevo fue suministrada por Fluka Chemical & Biochemical Co.

#### **II.3.1.4. Oligonucleótidos.**

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en reacciones en cadena de la polimerasa fueron adquiridos a la casa comercial *Sigma-Aldrich* (USA). Con excepción de los cebadores alargados diseñados para inactivar los genes que se adquirieron en *Bonsai Technologies* y están purificados en gel HYPUR.

#### **II.3.1.5. Otros sistemas empleados.**

Varios de los procesos descritos en este capítulo, se realizaron mediante el uso de sistemas comerciales (kits), que incluyen los componentes necesarios para las reacciones.

Estos sistemas comerciales utilizados fueron los siguientes:

- *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* Kit. Para la purificación, aislamiento y concentración de productos de PCR y fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa o soluciones, suministrado por Amersham Biosciences.
- *RNAeasy™ Mini* Kit. Kit de QIAGEN usado para la obtención de ARN total de *Streptomyces* a pequeña escala.
- *SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq*. Adquirido a Invitrogen para utilizar en la retrotranscripción del ARN.
- *SuperScript™ II Reverse Transcriptase*. Adquirido a Invitrogen para utilizar en la retrotranscripción del ARN.
- *PRONTO! Microarray Hybridization* kit. Adquirido a Corning y usado en los experimentos de hibridación de micromatrices.
- *MinElute™ PCR Purification* kit. Adquirido a QIAGEN y usado para la purificación de los marcapos en los experimentos de hibridación de micromatrices.
- SYBR® Premix Ex Taq™. Adquirido a TAKARA y usado en la PCR a tiempo real.
- *SuperScript™ III Reverse Transcriptase*. Adquirido a Invitrogen y usado en los experimentos de PCR a tiempo real.

## II.4. Medios de cultivo.

### II.4.1. Medios de cultivo para *E. coli*.

#### Luria-Bertani (LB). (Miller, 1972)

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada	hasta 1 litro
pH 7,5	

Para conseguir medio sólido se añadió un 2 % de agar.

#### “Terrific Broth” (TB). (Sambrook y Russell, 2001)

Triptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	4 mL
Agua destilada	hasta 900 mL

Antes de su utilización, se añadieron 100 ml de una solución estéril de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  170 mM y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  720 mM.

#### SOB. (Hanahan, 1983)

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,2 g
Agua destilada	hasta 1 litro
pH 7,5	

Antes de su utilización se añadió 1 mL de una solución de  $\text{Mg}^{2+}$  2M ( $\text{MgCl}_2$  1M y  $\text{MgSO}_4$  1M).

#### 2xTY. (Sambrook y Russell, 2001)

Triptona	20 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g
Agua destilada	hasta 1 litro

### II.4.2. Medios de cultivo para *Streptomyces* spp.

#### TBO. (Higgins y col., 1974)

Concentrado de tomate (cidacos)	20
Copos de avena	20
Agar	25
Agua destilada	hasta 1 litro
pH 6,5	

**MS.** (Hobbs y col., 1989)

Manitol	20 g
Harina de soja	20 g
Agua destilada	hasta 1 litro
Agar	20 g

**YEME.** (Chater y col., 1982)

Extracto de levadura	3 g
Peptona	5 g
Extracto de malta	3 g
Glucosa	10 g
Agua destilada	hasta 1 litro

**NA.**

Nutrient broth	13 g
Agua destilada	hasta 1 litro
Agar	20 g

Se usan 20 g de agar para la base de la placa y 10 g para la cobertera.

**MG.** (Doull y Vining, 1989)○ **Base MG**

• MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
• CaCl <sub>2</sub>	1 g
• NaCl	0,0099 g
• MOPS ácido	21 g
• (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
• Extracto levadura (sólo en el medio complejo)	5 g
• Agua Milli-Q	hasta 1 litro
pH 6,5	

Fuente de carbono (una de las siguientes):

– Maltosa	50,45 g
– Glucosa	25,23 g
– Almidón	10 g

**Complementos**

- 32 μM FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O
- 4.5 mL Elementos traza (ver composición y concentraciones en la Tabla II.1)
- 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (sólo en el medio definido)
- 5 % PEG 6000

**Elementos Trazo MG**

	Concentración en el medio	para 10 mL de 100 X
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,7 μM	0,0390 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,4 μM	0,0057 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,013 μM	0,0037 g
MnSO <sub>4</sub> · 1 H <sub>2</sub> O	0,12 μM	0,0061 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	14 μM	0,8800 g

**Tabla II.1:** Componentes y concentraciones de elementos traza del medio MG.

## II.5. Crecimiento y conservación de los microorganismos.

### II.5.1. Crecimiento.

El crecimiento en medio líquido de las estirpes de *E. coli* se realizó en LB o TB a 37 °C y el de las cepas de *Streptomyces* en medio YEME o MG a 30 °C. Cuando se crecieron los microorganismos en medio líquido, se mantuvieron en un incubador de agitación orbital con temperatura y agitación regulables con valores de 250 rpm para *E. coli* y 250-300 rpm para *Streptomyces* spp. Las cepas de *Streptomyces* se cultivaron en matraces con indentaciones para facilitar la dispersión y oxigenación del micelio.

El crecimiento en medio sólido fue realizado en medio LB para *E. coli* y en medio TBO para *S. coelicolor*.

Cuando se cultivaron clones resistentes a antibióticos, las concentraciones finales de los mismos en el medio de cultivo fueron las siguientes:

Antibiótico	Concentración y solvente stock	Concentración final
Ampicilina (Amp)	200 mg/mL- Agua Milli-Q	100 µg/mL
Kanamicina (km)	100 mg/mL- Agua Milli-Q	50 µg/mL
Cloranfenicol (Cm)	100 mg/mL- Etanol 100 %	50 µg/mL
Apramicina (Apra)	50 mg/mL- Agua Milli-Q	50 µg/mL
Ácido nalidíxico	25 mg/mL- Agua Milli-Q+NaOH 0,15M	0,5 µg/mL

**Tabla II.2:** Concentraciones finales y del stock de los antibióticos usados.

#### II.5.1.1. Determinación del crecimiento de los microorganismos.

En el caso de *E. coli*, el crecimiento fue seguido midiendo la absorbancia del cultivo en medio líquido a 600 nm en un espectrofotómetro.

En *Streptomyces* el crecimiento se valoró mediante el cálculo de peso seco por volumen de medio. Para realizar estos cálculos, se recogieron muestras de fermentación (2 mL) y se lavaron una vez con NaCl 0,9 % y una vez con agua Milli-Q. El micelio fue recogido por centrifugación y secado a 80 °C en cestillos de papel de aluminio durante 2 ó 3 días. Posteriormente fueron pesados y se calculó el peso de la biomasa restándolo del peso de los cestillos vacíos.

### II.5.2. Conservación.

Los diferentes microorganismos utilizados fueron conservados mediante siembra periódica en placas con el medio de cultivo apropiado. Estas placas se mantuvieron selladas con Parafilm® a 4 °C. Para la conservación a largo plazo, las cepas de *E. coli* se mantuvieron en suspensiones de células en glicerol al 20 % (p/v) a -20 °C y las cepas de *S. coelicolor* se mantuvieron en suspensiones de esporas en glicerol al 30 % (p/v) y Triton X-100 al 0,025 % (v/v) a -20 °C ó -80 °C.

### II.5.2.1. Obtención de esporas de *Streptomyces*.

Para la obtención de esporas de *Streptomyces* se sembraron esporas o micelio hasta su esporulación a 28 °C (1-2 semanas) en placas de medio TBO (Higgins y col., 1974). A continuación, se añadió 1-2 mL de Triton X-100 al 0,025 % (v/v), se realizaron pases rozando la superficie con un bastoncillo de algodón y se recogió la suspensión. Se lavó con Triton X-100 al 0,025 % (v/v) y se conservaron a -20 °C ó -80 °C como suspensiones de esporas en glicerol al 30 % (p/v) y Triton X-100 al 0,025 % (v/v).

## II.6. Aislamiento de ácidos nucleicos.

### II.6.1. Extracción de ADN.

#### II.6.1.1. Limpieza y precipitación.

La eliminación de proteínas y otras impurezas de las soluciones de ADN, se realizó mediante un proceso de extracción con fenol (fenolización).

##### Procedimiento:

- Para la limpieza, añadir a la solución de ADN un volumen (1:1) de fenol-CIA (1) y mezclar bien mediante un vórtex.
- Centrifugar la mezcla durante 6 minutos a 10000-13000 rpm.
- Recuperar cuidadosamente la fase superior acuosa y repetir de nuevo el proceso hasta que la solución de ADN presente la interfase libre de impurezas.
- Añadir a la solución un volumen (1:1) de CIA (2), para eliminar los restos de fenol.
- Agitar una vez en vórtex y centrifugar la mezcla durante 5 minutos a 10000-13000 rpm.
- Recuperar la fase acuosa.
- Para la precipitación, añadir a la suspensión acuosa de ADN, 1/10 de volumen de acetato sódico 3M, pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto (mantenido a -20 °C) (3). Mezclar por medio de un vórtex.
- Mantener la mezcla al menos durante 2 horas a -20 °C ó 30 minutos a -80 °C. Centrifugar a 10000-13000 rpm durante 30 minutos y a 4 °C.
- Eliminar el sobrenadante. Lavar el precipitado con 0,5 volúmenes de etanol 70 % (4) y centrifugar nuevamente a 10000-13000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Retirar el sobrenadante y dejar secar el precipitado.
- Resuspender en agua o en tampón TE (5). Conservar a 4 °C o congelado (-20 °C) durante largos periodos de tiempo.

(1) Fenol-CIA: 1/2 volumen de fenol neutro pH 7,4; 1/2 volumen de CIA. Fenol neutro: Mezclar 50 g de fenol, 50 mg de hidroxiquinoleína y Tris-HCl 0,1M pH 8,5, dejar reposar hasta que se formen dos fases. Retirar la fase superior y añadir Tris-HCl 0,1M pH 8,5 hasta que se alcance pH 7,4-7,5. Conservar a 4 °C en un recipiente opaco.

(2) CIA (Cloroformo-Alcohol isoamílico): Mezclar 24 partes de cloroformo y 1 de alcohol isoamílico. En la precipitación de ADN, se pretende que éste pierda su solubilidad en agua por la adición de sales y de un alcohol.

(3) Se puede sustituir el etanol por 0,6 volúmenes de isopropanol (2-propanol) y realizar la precipitación a temperatura ambiente.

(4) Etanol al 70 %: Diluir etanol absoluto en agua al 70 % (v/v).

(5) TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; pH 8,0; en agua Milli-Q.

### II.6.1.2. Eliminación selectiva de ARN.

Los procesos de purificación de ADN conllevan habitualmente la contaminación de las muestras con ARN. Para eliminarlo selectivamente se empleó la enzima ribonucleasa A (RNasa A) <sup>(1)</sup> de páncreas bovino, libre de DNasas. Se utilizó a una concentración final de 10 µg/ml, incubando la reacción a 37 °C durante 90 minutos.

- (1) RNasa A: Stock preparado a 10 mg/ml en Tris-HCl 10mM pH 7,5; NaCl 15mM. Las DNasas presentes se eliminaron por ebullición de la solución durante 15 minutos. Se enfría lentamente y se guarda a -20 °C.

### II.6.1.3. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*.

#### a) Lisis Alcalina.

Este procedimiento se utilizó para la obtención de ADN plasmídico a gran escala. El método fue esencialmente el descrito por Birboim y Doly (1979).

#### Procedimiento:

- Inocular 100 ml de medio TB con células de *E. coli* portadoras del plásmido que se pretende aislar. Cultivar durante 12-16 horas a 37 °C en agitación a 250 rpm. El medio debe estar suplementado con el (los) marcador(es) de resistencia necesario(s) para el mantenimiento del plásmido.
- Recoger las células por centrifugación en tubos de centrifuga tipo GSA a 5000 rpm en una centrifuga Sorvall durante 5 minutos y retirar el sobrenadante.
- Añadir 2,5 ml de solución I de lisis (TEG) <sup>(1)</sup> y resuspender con ayuda de vórtex.
- Transferir a un tubo de centrifuga tipo SS34 o a un tubo Falcon en el cual se añaden otros 2,5 ml de una solución de lisozima preparada en TEG a una concentración de 20 mg/ml (concentración final 10 mg/ml). Mezclar bien y poner en hielo durante 10 minutos.
- Añadir 10 ml de solución II de lisis <sup>(2)</sup> y mantener en hielo 10 minutos, agitando suavemente cada 2 minutos. La mezcla debe ir adquiriendo un aspecto cada vez más viscoso.
- Añadir 7,5 ml de solución III de lisis <sup>(3)</sup>, agitar fuertemente 10 segundos y mantener en hielo 10 minutos.
- Centrifugar a 4 °C durante 30 minutos y 8000 rpm. Recuperar el sobrenadante en tubos Corex<sup>®</sup>, y precipitar el ADN plasmídico con 12 ml de isopropanol (0,6 volúmenes), a temperatura ambiente y durante 20 minutos.
- Centrifugar a temperatura ambiente durante 20 minutos a 8000 rpm. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado hasta que se evapore el isopropanol.
- Resuspender el precipitado en 400 µl de agua Milli-Q y transferir a un microtubo de 1,5 ml. Añadir 4 µl de RNasa A <sup>(4)</sup> (10 mg/ml) e incubar 1 hora a 37 °C.
- Realizar los procesos de limpieza y precipitación descritos en el apartado II.6.1.1.
- Resuspender finalmente en 100 µl de TE o agua Milli-Q.

(1) Solución I de lisis (TEG): 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 50 mM glucosa. La glucosa puede ser sustituida por sacarosa, denominándose a la solución TES. Esterilizar en autoclave a 120 °C durante 15 minutos. Conservar a 4 °C.

(2) Solución II de lisis: 0,2N NaOH; 1 % SDS en agua. Esta solución se prepara en el momento, adicionando primero el NaOH y luego el SDS.

(3) Solución III de lisis: 60 % acetato potásico 5M (estéril); 11,5 % ácido acético glacial y 28,5 % de agua. Conservar a 4 °C. pH 4,80.

(4) RNasa A: diluir en agua a una concentración final de 10 mg/ml. Hervir 15 minutos para eliminar DNasas.

**b) Minilisis Alcalina.**

Este es un procedimiento abreviado de la lisis alcalina, en el cual se obtiene menor cantidad de ADN.

Presenta como ventajas sobre la lisis alcalina que la extracción se realiza con menores volúmenes y en menor tiempo.

**Procedimiento:**

- Inocular 5 ml de medio TB con células de *E. coli* portadoras del plásmido que se pretende aislar. Cultivar durante 12-16 horas a 37 °C en agitación a 250 rpm. El medio debe estar suplementado con el(los) marcador(es) de resistencia necesario(s) para el mantenimiento del plásmido.
  - Recoger las células por centrifugación a 4800 rpm durante 5 minutos y retirar el sobrenadante.
  - Resuspender el precipitado en 200 µl de una solución de lisozima (5 mg/ml) preparada en TEG (1). Pasar a un microtubo de 2 ml e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
  - Añadir 400 µl de solución II de lisis (1), agitar y mantener en hielo 5 minutos.
  - Añadir 300 µl de solución III de lisis (1), agitar fuertemente y mantener en hielo 10 minutos. Al finalizar este paso la mezcla ha de tener un aspecto mucoso. Centrifugar 10 minutos a 10000 rpm.
  - Recoger con cuidado el sobrenadante para evitar retirar los restos celulares del fondo del microtubo y pasar el sobrenadante a un nuevo microtubo.
  - Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol, mezclar y dejar 10 minutos a temperatura ambiente.
  - Centrifugar a 4 °C durante 20 minutos a 10000 rpm.
  - Eliminar el sobrenadante, secar el precipitado y resuspender en 100 µl de agua Milli-Q.
  - Añadir 4 µl de RNasa A (1) (10 mg/ml) e incubar 30 minutos a 37 °C.
  - Realizar los procesos de limpieza y precipitación descritos en el apartado II.6.1.1.
  - Resuspender finalmente en 30-50 µl de TE o agua Milli-Q.
- (1) Las soluciones son las mismas que las empleadas para la lisis alcalina.

**c) Minipreparaciones de ADN plasmídico.****Método de Holmes-Quigley.**

Método empleado para el análisis de un alto número de muestras (Holmes y Quigley, 1981).

**Procedimiento:**

- Tomar una colonia con un palillo estéril e inocular un microtubo de 1,5 ml con 1 ml de medio LB suplementado con el (los) marcador(es) de resistencia necesario(s) para el mantenimiento del plásmido. Incubar durante 8-14 horas a 37 °C en agitación a 250 rpm.
- Precipitar las células mediante centrifugación a 8000 rpm, durante 2-5 minutos.
- Mientras tanto, mezclar 350 µl de STET (1) y 3 µl de lisozima (2) (50 mg/ml) por cada minipreparación y añadir 350 µl de la mezcla a cada microtubo.
- Resuspender el precipitado agitando vigorosamente durante 40 segundos y hervir durante 45 segundos.
- Centrifugar inmediatamente durante 15 minutos a 10000-13000 rpm y eliminar con un palillo estéril el precipitado de restos celulares y proteínas.
- Añadir 360 µl de isopropanol y 36 µl de acetato sódico 3M pH 5,2. Mezclar unos segundos.
- Dejar reposar 5 minutos y centrifugar a temperatura ambiente 15 minutos a 10000-13000 rpm.

- Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado. Resuspender en 30  $\mu$ l de TE o agua Milli-Q.
- (1) STET: 8 % (p/v) sacarosa; 0,5 % (v/v) Tritón X-100; 50 mM EDTA, pH 8,0; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; en solución acuosa.
- (2) Lisozima: preparar en solución acuosa a una concentración final de 50 mg/ml.

#### II.6.1.4. Aislamiento de ADN total de *Streptomyces*.

##### a) Método de Kirby.

El método utilizado para el aislamiento de ADN total de *Streptomyces* spp. para el experimento de micromatrices fué el método de Kirby con ligeras modificaciones (Hopwood y col., 1985).

- Crecer la cepa en 50 mL de medio YEME a 30 °C con agitación orbital durante 36-48 horas (cultivo en fase estacionaria) a 300 rpm.
- Recoger el micelio por centrifugación. Resuspender el micelio en 3 mL de solución de lisis (2). Incubar 15 minutos a 37 °C.
- Añadir 4 mL de solución de Kirby 2x (3), y agitar suavemente.
- Añadir 8 mL de fenol/cloroformo (1:1) y agitar suavemente por inversión.
- Centrifugar 10 minutos a 15000 rpm (rotor Sorvall SS-34).
- Transferir la fase acuosa (fase superior) a un tubo nuevo y añadir 1 volumen de fenol/cloroformo. Centrifugar como en el paso anterior y recuperar la fase acuosa. Repetir el proceso hasta que no se observe interfase.
- Precipitar el ADN (apartado II.6.1.1).
- (1) TES: Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 25 mM pH 8,0; Sacarosa 0,3 M
- (2) Solución de lisis: TES; lisozima 2 mg/mL; RNasa 10  $\mu$ g/mL.
- (3) Solución de Kirby 2x: 100 mL; Aminosalicilato de sodio 12 g; 5 mL de Tris-HCl 2 M pH 8,0; 6 mL de fenol neutro pH 8,0.

##### b) Método de "Salting out".

Método empleado para el aislamiento de ADN total de *Streptomyces* spp. (Pospiech y Neumann, 1995) en los experimento rutinarios: PCR, digestiones, hibridaciones...

##### Procedimiento:

- Inocular con esporas 30 mL de medio YEME, suplementado con el antibiótico adecuado.
- Incubar en agitación orbital (250-300 rpm), a 30 °C durante 36-48 horas.
- Recoger el micelio mediante centrifugación a 5000 rpm, durante 5 minutos.
- Resuspender el micelio en 5 mL de tampón SET (1) con 100  $\mu$ l de solución de lisozima (stock a 50 mg/mL).
- Incubar a 37 °C durante 30-60 minutos.
- Añadir 140  $\mu$ L de proteinasa K (2) y mezclar. Añadir 600  $\mu$ L de SDS 10 % y mezclar por inversión. Incubar a 55 °C durante 2 horas, mezclando por inversión ocasionalmente.
- Añadir 2 mL de NaCl 5M y mezclar vigorosamente por inversión, dejar enfriar hasta los 37 °C.
- Añadir 5 mL de cloroformo y mezclar por inversión. Mantener 30 minutos a 20 °C invirtiendo el tubo cada cierto tiempo.
- Centrifugar durante 15 minutos a 6000 rpm y 20 °C.
- Transferir el sobrenadante (6 mL) a un tubo y añadir 0,6 volúmenes de isopropanol. Mezclar por inversión durante 3 minutos. Normalmente se forma un ovillo que se rescata con una punta y la micropipeta, pero en otras ocasiones donde no se observa dicho ovillo se puede centrifugar la mezcla.

- Lavar el ADN con etanol 70 % y disolverlo en 200-400 mL de TE a 55 °C, en función de la cantidad de material obtenido.
- (1) Tampón SET: 75 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, 20 mM Tris-HCl pH 7,5.
- (2) Proteinasa K: preparar en solución acuosa a una concentración final de 20 mg/mL.

## II.6.2. Aislamiento de ARN total de *Streptomyces coelicolor*.

Para el aislamiento de ARN de *S. coelicolor* se utilizaron las columnas de purificación de ARN total *RNeasy<sup>TM</sup> mini* de Qiagen. Este sistema se basa en la retención selectiva del ARN en columnas cromatográficas y su elución posterior. El procedimiento utilizado es el siguiente:

### Procedimiento:

- Crecer *S. coelicolor* en 50 mL de medio líquido MG. Congelar el micelio obtenido por centrifugación en nitrógeno líquido y machacarlo en un mortero con el objetivo de romper las células.
- Recoger el micelio pulverizado y repartirlo en microtubos de 2 mL que se mantienen en hielo.
- Añadir a cada tubo 700 µL de tampón RLT (1) (al que se ha adicionado 10 µL de β-mercaptoetanol por cada mL de tampón).
- Mezclar por agitación en un vórtex hasta que el lisado adquiera un aspecto homogéneo. Centrifugar durante 5 minutos a 14000 rpm, para eliminar los restos celulares.
- Recoger el sobrenadante y mezclarlo con 500 µL de etanol al 100 %. Añadir el sobrenadante a la columna (*RNeasy Mini Spin Columns*, Qiagen) y centrifugar durante 30 segundos a 10000 rpm.
- Descartar el eluido y volver a pasar el resto de la mezcla. Centrifugar durante 30 segundos a 10000 rpm.
- La columna se lava con 700 µL de tampón RW1 (1). Centrifugar durante 30 segundos a 10000 rpm.
- Descartar el eluido y adicionar 500 µL de tampón RPE (2) para lavar la membrana. Centrifugar 30 segundos a 10000 rpm.
- Repetir el lavado con RPE. Centrifugar durante 3 minutos para eliminar completamente los restos de etanol.
- Transferir la minicolumna a un microtubo nuevo de 1,5 mL.
- Eluir el ARN dos veces, con 50 µL de agua Milli-Q directamente sobre la membrana. Centrifugar 2 minutos a 12000 rpm.
- El ARN obtenido se trató 2 veces con DNasa (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante y se pasó por las minicolumnas volviendo a realizar el tratamiento desde la adición del tampón RLT cada una de las veces.
- La elución final se realizó pasando dos veces 30-40 µL de agua Milli-Q directamente sobre la membrana. Centrifugar 2 minutos a 12000 rpm.
- La concentración de ARN se cuantificó espectrofotométricamente usando un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) y su integridad se comprobó en un gel de agarosa al 1 % o en un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), cargando 1-2 µL de muestra de ARN.
- Conservar el ARN a -20 ó -70 °C.

(1) Tampones RLT y RW1: son soluciones comerciales de composición desconocida incluidas en *RNeasy<sup>TM</sup> mini kit*, se sabe que contienen isotiocianato de guanidina.

(2) Tampón RPE: es una solución comercial de composición desconocida que se suministra como un concentrado al que deben añadirse 4 volúmenes de etanol.

## II.7. Cuantificación y análisis de pureza de ácidos nucleicos.

Las preparaciones de ADN se cuantificaron de manera visual, por comparación con la intensidad de cantidades conocidas del marcador de peso molecular. Observando la fotografía del gel, se compara la intensidad de fluorescencia que poseen las bandas de la muestra con la intensidad de las bandas del patrón, para lo cual se tuvo en cuenta que la fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN de las bandas.

Cuando se precisa una cuantificación más exacta de la cantidad de ácidos nucleicos presentes en la muestra, el método utilizado fue la medida espectrofotométrica de los ácidos nucleicos, mediante un equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). La relación absorbancia/cantidad de ácidos nucleicos viene establecida por las siguientes concentraciones equivalentes a una unidad de absorbancia medida a una longitud de onda de 260 nm:

50  $\mu\text{g/ml}$  ADN bicatenario  
40  $\mu\text{g/ml}$  ARN total  
33  $\mu\text{g/ml}$  ADN monocatenario

Además la relación  $A_{260}/A_{280}$  indica la pureza de la muestra. Una muestra pura de ADN presenta una relación  $A_{260}/A_{280} = 1,8$ . Este valor debe ser de 1,9-2,1 para muestras de ARN (Sambrook & Russell, 2001), una relación mayor a 2,1 generalmente indica una gran degradación. La presencia de proteínas contaminantes en las muestras reduce este coeficiente.

Otra relación indicada por el equipo es  $A_{260}/A_{230}$ . Su valor en el caso de ácidos nucleicos puros se encuentra entre 1,8-2,2. Valores inferiores indican la presencia de contaminantes no proteicos co-purificados con las muestras.

## II.8. Tratamiento enzimático del ADN.

### II.8.1. Hidrólisis con endonucleasas de restricción.

Las enzimas de restricción necesarias para este trabajo se utilizaron siguiendo las recomendaciones de los distintos proveedores. Toda enzima posee unas condiciones óptimas de actividad que varían según la enzima, estas condiciones son: la temperatura de reacción, pH, las condiciones salinas y los aditivos que son suministrados por los tampones de digestión.

Se tuvieron en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Añadir siempre menos de 1/10 de volumen de enzima con respecto al volumen final de la reacción, con objeto de diluir suficientemente el glicerol presente en las soluciones de conservación de las enzimas, evitando que pueda inhibir la actividad enzimática.
- Si el ADN se encuentra suspendido en TE, configurar la reacción en un volumen que supere 10 veces el volumen de ADN a digerir. De esta manera se evita que el TE modifique las características del tampón de reacción.

El esquema seguido en la preparación de una reacción de digestión fue el siguiente:

- Mezclar en un microtubo:

Tampón de digestión (10x) ..... 1/10 del volumen final  
ADN.....(n)  $\mu\text{g}$  de ADN a digerir  
RNasa A (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )..... 1/10 del volumen final  
Enzima de restricción ..... 1-2 U/ $\mu\text{g}$  de ADN  
Agua Milli-Q .....completar hasta volumen final

- Incubar la reacción a la temperatura adecuada para cada enzima, durante 1-4 horas.
- Analizar mediante electroforesis en geles de agarosa o purificar y precipitar, según su finalidad.

## II.8.2. Ligación de fragmentos de ADN.

La ADN ligasa del fago T4 es una enzima que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato del ADN de doble cadena, requiriendo iones  $Mg^{2+}$  y ATP como cofactores.

El esquema para preparar una reacción de ligación fue el siguiente:

- Mezclar en un microtubo:
  - ADN del vector ..... 50 ng
  - ADN del inserto ..... cantidad equimolecular o superior al vector
  - Tampón de ligación (10x) ..... 1/10 del volumen final
  - Ligasa del fago T4 ..... 2-7 U
  - Agua destilada..... completar hasta volumen final
- Al mezclar el agua con el vector y el inserto, la solución se llevó a 65 °C durante 30 segundos. Se dejó enfriar y posteriormente se añadieron el tampón y la enzima.
- Incubar la reacción a 14-16 °C durante 6-16 horas si los extremos a ligar son cohesivos y a temperatura ambiente durante 1-4 horas si los extremos son romos.
- Inactivar la ligasa por calentamiento a 65 °C durante 10 minutos.
- Transformar en una cepa apropiada de *E.coli*.

Para la realización del anterior esquema, se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

La relación vector/inserto varió según: i) si ambos extremos eran romos o cohesivos, ii) si las ligaciones direccionales tenían un extremo romo y el otro cohesivo, iii) o ambos extremos cohesivos. Las relaciones equimoleculares variaron entre 1:3 y 1:15.

La reacción se efectúa en el mínimo volumen posible (preferiblemente 10  $\mu$ l), excepto cuando se trata de una auto-ligación. En este caso se recomienda emplear 50  $\mu$ l como volumen final.

En una ligación de extremos cohesivos se utilizaron entre 2-4 unidades de enzima y la incubación duró entre 1 y 6 horas.

Cuando se trató de una ligación con extremos romos se llegaron a usar hasta 7 unidades de enzima y se empleó polietilenglicol (PEG 4000) al 5 % de concentración final, para favorecer la concentración "efectiva" de moléculas de ADN. Así mismo, el tiempo de incubación se extendió a 12 horas.

## II.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación se basa en la repetición de un ciclo que consta de tres etapas:

**Desnaturalización:** Consiste en la separación de las dos cadenas del ADN molde mediante la incubación a elevada temperatura (92-96 °C). Las hebras disociadas permanecerán de esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente como para permitir la unión de los cebadores.

**Anillamiento de los cebadores:** Básicamente consiste en la unión de dos oligonucleótidos al ADN diana. Cada uno de los cuales es complementario a una de las dos cadenas del ADN y su diseño es tal, que quedan enfrentados por sus extremos 3' tras el

anillamiento flanqueando la región a amplificar. La distancia entre ellos determinará la longitud de la secuencia de ADN que se pretende obtener.

**Extensión:** Consiste en la elongación de los cebadores del conjunto ADN-cebador por la acción de una ADN polimerasa termoestable, a una temperatura próxima a los 72 °C, durante un tiempo que depende de la longitud del fragmento a amplificar.

En el mercado existen diversas ADN polimerasas que se pueden usar para PCR y cada una de ellas con unas características y condiciones específicas para llevar a cabo la reacción. Para este trabajo, han sido dos las enzimas utilizadas: i) Taq DNA polymerase (Promega), cuando la introducción de un pequeño número de errores no resultaba crucial para el experimento (p. ej.: sondas), o bien cuando se pretendía determinar la temperatura óptima de anillamiento de unos nuevos oligonucleótidos. Esta enzima deja una desoxiadenosina en cada extremo 3', lo que permite clonar directamente los fragmentos amplificados por PCR en vectores del tipo pGEM-T Easy (Promega); ii) Platinum® Pfx DNA polymerase (Invitrogen), se utilizó cuando la fidelidad en la copia es imprescindible (inactivación de genes).

En la Tabla II.3 se especifican, de acuerdo al catálogo PCR *applications manual* (Roche), los valores normales de los distintos componentes para la realización de un típica reacción de amplificación por PCR. Estos valores son orientativos y han de ser ajustados en función de la ADN polimerasa, el tipo de región a amplificar, etc. De igual forma, en algunas reacciones se hace necesario el uso de aditivos que potencian la eficiencia o especificidad de la reacción (DMSO, betaina, seroalbúmina bovina, detergentes, etc).

<b>ADN Molde</b>	1-10 ng ADN bacteriano
<b>Cebadores (18-24 pb)</b>	0,1-1 ng ADN plasmídico
<b>ADN polimerasa</b>	0,1-0,6 µM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0,5-2,5 unidades
<b>dNTPs</b>	1-5 mM (normalmente 1,5 mM)
<b>Tampón 10x</b>	50-500 µM (normalmente 200 µM)
<b>Agua</b>	1x
	completar volumen de reacción

**Tabla II.3:** Componentes necesarios para realizar una reacción de PCR y concentraciones finales para 50 µl de reacción.

Los tiempos y temperaturas para una reacción de PCR son básicamente empíricos y dependen de diversos factores como: contenido en G+C del ADN, contenido en G+C de los oligonucleótidos, longitud del fragmento a amplificar, velocidad de procesamiento de la ADN polimerasa, abundancia de ADN molde, etc. De modo genérico estos tiempos y temperaturas aparecen reflejados en la tabla II.4.

Segmento	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94-96 °C	4-6 minutos	1
Amplificación	Desnaturalización	94-96 °C	30-60 segundos
	Anillamiento	Según el cebador	30-45 segundos
	Extensión	72 °C	30-240 segundos
Extensión final	72 °C	7-10 minutos	1

**Tabla II.4:** Tiempos y temperaturas de reacción típicos para una reacción de PCR.

Al finalizar cualquier reacción de PCR, se debe analizar el resultado de la misma en un gel de agarosa, comprobando la cantidad del fragmento amplificado, no existencia de bandas inespecíficas, etc.

## II.10. Electroforesis de ácidos nucleicos.

### II.10.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

La electroforesis en geles de agarosa se realizó básicamente según las descripciones realizadas por Sambrook y Russell (2001). Se utilizó agarosa (Pronadisa) disuelta por calentamiento en tampón TAE <sup>(1)</sup> con concentraciones entre 0,3 % y 3 % (p/v) dependiendo del rango de tamaños de los fragmentos de ADN a separar (Tabla II.5). Se mezclaron las muestras de ADN con 1/10 del volumen final de tampón de carga <sup>(2)</sup> concentrado.

El tamaño de los fragmentos de ADN separados por electroforesis se determinó por comparación con marcadores de peso molecular de ADN.

Concentración agarosa (%)	Tamaño fragmentos ADN separados (kb)
0,3	5-60
0,5	1-20
0,7	0,8-12
1	0,5-10
1,5	0,2-3
2	0,05-2
3	0,02-2

**Tabla II.5:** Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de fragmentos de ADN de diferentes tamaños.

(1) TAE 50x: 242 g de Tris base (2 M); 57,1 ml de ácido acético glacial [5,7 % (v/v)]; 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0 (50 mM) y agua destilada hasta completar un litro.

(2) Tampón de carga concentrado (6x): 0,25 % (p/v) azul de bromofenol; 0,25 % (p/v) xilene-cianol; 50 % (v/v) glicerol; EDTA 0,1M; SDS 0,1 %; Tris-HCl 10 mM; en solución acuosa. Se conserva a 4 °C o a temperatura ambiente.

#### II.10.1.1. Recuperación de fragmentos de ADN separados por electroforesis.

Para realizar la extracción de ADN de geles de agarosa se utilizaron dos métodos. El primero de ellos es una técnica tradicional basada en la congelación rápida de la banda de agarosa y su posterior centrifugación a través de lana de vidrio o algodón hidrófobo. El segundo es un método comercial que fue utilizado siguiendo las recomendaciones del fabricante.

##### a) Método de congelación rápida (*Freeze-squeeze*).

Esta técnica es conocida como *freeze-squeeze* (Tautz y Renz, 1983). Es un método rápido y sencillo, con un porcentaje de recuperación de ADN del 80 %. En este procedimiento ha sido sustituido el uso de lana de vidrio (nociva por inhalación) por algodón hidrófobo.

##### Procedimiento:

- Una vez separado el ADN mediante electroforesis, cortar la banda del gel procurando escindir la menor cantidad de agarosa posible. Introducir el fragmento de agarosa en un microtubo de 1,5 ml y congelar la banda a -20 °C durante 10-15 minutos.
- Colocar un microtubo, al que se ha practicado un orificio en el fondo y se ha obturado con algodón hidrófobo, sobre un microtubo intacto. Situar la banda en el microtubo agujereado y centrifugar a 11000 rpm durante 5-8 minutos.

- Recoger la fase acuosa recolectada en el tubo inferior. Limpiar y precipitar tal como se describe en el apartado II.6.1.1.
- Resuspender el precipitado en un volumen de agua Milli-Q de 10-20  $\mu$ l.

### **b) Método de purificación por columnas GFX.**

La extracción de los fragmentos de ADN se realizó mediante el *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham-Biosciences). Este kit emplea un agente caotrópico que desnatura las proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión del ADN de doble cadena (0,1-48 Kb) a la matriz de la columna. Una vez que el ADN es "retenido", las proteínas y sales contaminantes son eliminadas mediante un lavado. El ADN es posteriormente eluído en un buffer de baja fuerza iónica. Se obtiene un porcentaje de recuperación mayor al 60 %.

#### Procedimiento:

Una vez separado el ADN mediante electroforesis, cortar la banda del gel procurando escindir la menor cantidad de agarosa posible.

- Introducir el fragmento de agarosa en un microtubo de 1,5 ml de peso conocido, pesándose posteriormente el conjunto tubo-agarosa. Deducir el peso de agarosa.
  - Adicionar 10 ml de tampón de captura (1) por cada 10 mg de agarosa. Mezclar vigorosamente en vórtex e incubar a 60 °C durante 5-15 minutos (hasta completa disolución de la agarosa).
  - Transferir la muestra a una columna GFX e incubar un minuto a temperatura ambiente.
  - Centrifugar durante 30 segundos a 10000 rpm.
  - Descartar el eluído y adicionar a la columna 500  $\mu$ l de tampón de lavado (1). Centrifugar durante 30 segundos a 10000 rpm.
  - Transferir la columna a un nuevo microtubo de 1,5 ml y añadir 15-50  $\mu$ l de tampón de elución (2) e incubar por un minuto a temperatura ambiente.
  - Centrifugar durante un minuto a 10000 rpm, para recuperar el ADN purificado.
- (1) Tampones de captura y de lavado: soluciones incluidas en el kit.  
(2) Tampón de elución: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. También puede usarse agua Milli-Q.

## **II.10.2. Electroforesis de ARN.**

En un primer momento, la integridad del ARN se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % (Kieser y col., 2000). En las muestras con una integridad elevada se observan las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 23S y 16S, siendo la intensidad de la primera el doble que la segunda (Kieser y col., 2000). En ocasiones, se observa una tercera banda por encima de la de 23S, debida a la formación de un agregado entre los dos tipos de ARN ribosómico. Si las bandas ribosomales aparecen poco definidas, y si entre éstas y por debajo de la correspondiente al 16S aparecen otras bandas adicionales o un rastro difuso, la muestra de ARN se encuentra parcialmente degradada.

### **II.10.2.1. Electroforesis de ARN en gel desnaturizante.**

En los geles para electroforesis de ARN se añade formaldehído como agente desnaturizante, con la finalidad de evitar la formación de estructuras secundarias en el ARN que pudieran afectar el proceso de separación.

Procedimiento:

- Lavar todo el material de electroforesis de forma secuencial con 0,1 % de SDS (dodecilsulfato sódico) en agua, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % durante 10 minutos y enjuagar con agua Milli-Q y etanol absoluto. Dejar secar.
- Por cada 30 ml de volumen de gel mezclar: 0,3 g de agarosa, 3 ml de MOPS 10x <sup>(1)</sup> y 21,6 ml de agua destilada. Calentar la mezcla hasta que la agarosa esté completamente disuelta.
- Dejar enfriar hasta 60 °C y añadir 5,4 ml de formaldehído al 37 %. Mezclar sin formar burbujas y dispensar la mezcla sobre una bandeja de electroforesis nivelada, donde se deja solidificar durante 15-20 minutos. Para evitar los vapores del formaldehído realizar éste y los siguientes pasos en campana de extracción.
- Colocar el gel dentro de la cubeta de electroforesis con tampón MOPS 1x hasta cubrir el gel unos pocos milímetros.
- Precorrer el gel durante 5-30 minutos a un voltaje de hasta 5 V/cm.
- Mientras tanto preparar las muestras
- Cargar las muestras en los pocillos. Correr el gel a un voltaje de hasta 5 V/cm.
- Una vez que las muestras han migrado lo suficiente, se puede observar el gel directamente en un transiluminador con luz UV.

**(1)** MOPS 10x: 0,4 M ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS); 0,1 M acetato sódico; 0,01 M EDTA; ajustar pH a 7 con NaOH 1 N; completar con agua Milli-Q autoclavada 2 veces hasta 1 litro, agitar vigorosamente varias veces y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

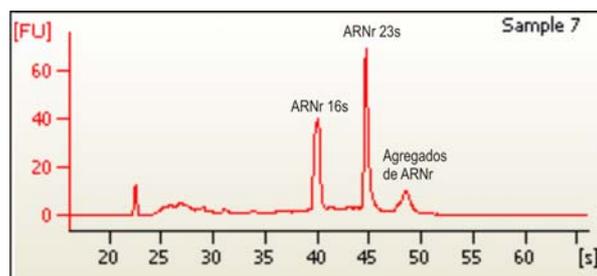
Las muestras antes de ser cargadas se calientan a 65 °C durante 15 minutos para desnaturalizarlas e inmediatamente se enfrían en hielo durante 5 minutos. Por cada 2 µL de muestra (1-3 µg de ARN) se añaden 8 µL de tampón de carga que se prepara como se describe a continuación:

500 µl de formamida  
 200 µl de formaldehído al 37 %  
 150 µl de MOPS 10x  
 150 µl de solución de colorantes <sup>(1)</sup>  
 10 µl de bromuro de etidio 1 mg/mL [10 µg/ml]<sub>F</sub>

**(1)** Solución de colorantes: 50 % Glicerol; 0,25 % (p/v) azul de bromofenol; 0,25 % (p/v) xilen-cianol; 1 mM EDTA; en agua Milli-Q.

**II.10.2.2. Electroforesis de ARN en bioanalizador.**

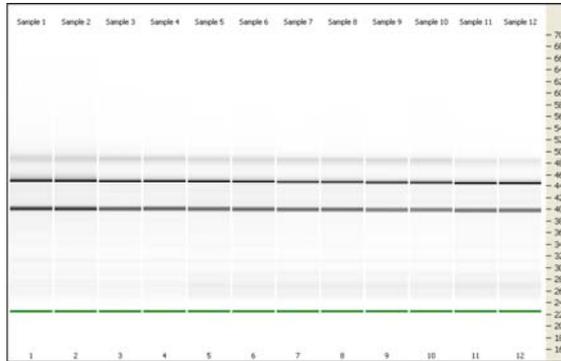
Cuando se dispuso del equipo, se midió la integridad del ARN en un equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) utilizando los chips incluidos en *RNA 6000 Nano LabChip® kits* (Agilent). Este sistema permite la separación del ARN según su peso molecular mediante una electroforesis que tiene lugar en microcanales, detectando los fragmentos a través de fluorescencia inducida por láser (Mueller y col., 2000).



**Figura II.1:** Electroferograma de muestras de ARN de *S. coelicolor* obtenido mediante el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Se observan dos picos correspondientes a ARNr 16s y 23s y un pico correspondiente a agregados de ARNr.

El resultado se expresa en forma de un electroferograma (Figura II.1), donde cada pico se corresponde con un fragmento de ARN, siendo la cantidad de fluorescencia de cada pico

proporcional a la cantidad de ARN de ese tamaño. El aparato es capaz de traducir este electroferograma en una imagen similar a la que se obtendría en un gel (Figura II.2), pudiendo observarse bandas que se corresponderían con cada pico del electroferograma y, por tanto, con cada fragmento de ARN presente en la muestra.



**Figura II.2:** Gel de muestras de ARN de *S. coelicolor* obtenido mediante el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Se observan dos bandas intensas correspondientes a ARNr 16s y 23s y una banda superior más leve correspondiente a agregados de ARNr.

El bioanalizador expresa la integridad del ARN a través del número RIN (*RNA Integrity Number*), calculado mediante la aplicación informática suministrada con el equipo a través de un algoritmo, que no sólo tiene en cuenta la relación entre las bandas ribosomales 23 y 16S, sino que también considera otros parámetros, como la intensidad y cantidad de otros picos presentes en la muestra (Schroeder y col., 2006). El número RIN varía entre un valor de 10 (muestras sin degradación) y 1 (muestras totalmente degradadas).

Para medir la integridad de las muestras en el bioanalizador se siguieron las indicaciones del fabricante, analizando entre 50-500 ng de ARN, previamente cuantificado mediante NanoDrop.

## II.11. Transferencia de ADN a membranas.

La transferencia a un soporte sólido de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción y sometidos a migración electroforética en geles de agarosa se denomina *Southern blotting* (Southern, 1975). Esta técnica se basa en la fragmentación *in situ* del ADN, desnaturalización del mismo y transferencia de los fragmentos en forma monocatenaria a la membrana, para su posterior fijación a la misma mediante luz UV. Actualmente se usa la transferencia mediante sistema de vacío (*VacuGene XL*, Amersham Pharmacia Biotech).

### Procedimiento:

- Separar el ADN mediante electroforesis (apartado II.10.1.), teñirlo y fotografiarlo.
- Cortar un filtro de nailon 1 cm por cada lado mayor que el tamaño del gel y humedecerlo con agua destilada durante 1 minuto y después con SSC 20x <sup>(1)</sup> durante 5 minutos. Depositarlo en la unidad de transferencia, ensamblada de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- Encender la bomba de vacío (transferir a 50 mbares).
- Cubrir toda la superficie del gel con solución despurinizante <sup>(2)</sup> y dejar 15-20 minutos (en este tiempo el frente de migración del azul de bromofenol debe cambiar su color de azul a amarillo). Transcurrido este tiempo se retira la solución.
- Cubrir la superficie del gel con solución desnaturizante <sup>(3)</sup> durante 15-20 minutos (el azul de bromofenol recupera su color azul original).

- Retirar la solución y cubrir la superficie del gel con la solución neutralizante (4) durante 20-25 minutos.
- Por último, retirar la solución neutralizante y cubrir la superficie del gel con SSC 20x durante 60-120 minutos.
- Retirar todo el líquido y marcar la posición de los pocillos del gel sobre el filtro (con bolígrafo), antes de retirarlo. Apagar la bomba de vacío.
- Retirar el gel transferido y verificar la eficiencia del proceso por medio de una tinción con bromuro de etidio.
- Colocar el filtro sobre papel Whatman 3MM y fijar el ADN mediante la aplicación de luz ultravioleta al filtro (UV-Stratalinker 2400, Stratagene). Lavarlo con SSC 6x para eliminar el exceso de sales y dejarlo secar.
- Estos filtros se pueden conservar a 4 °C protegidos con papel Whatman 3MM y papel de aluminio durante varios meses.

(1) SSC 20x: 3 M NaCl; 0,3 M citrato sódico, pH 7,0.

(2) Solución despurinizante: 0,25 M HCl.

(3) Solución desnaturalizante: 1,5 M NaCl; 0,5 N NaOH.

(4) Solución neutralizante: 1,5 M NaCl; 0,05 M Tris-HCl, pH 7,2; 1 mM EDTA.

## II.12. Procedimiento para la hibridación de ADN.

### II.12.1. Marcaje de sondas de ADN.

El fragmento de ácido nucleico utilizado como sonda en procesos de hibridación debe ser marcado de tal forma que sea posible su posterior detección. El sistema de marcaje no radiactivo comercializado por la compañía Roche (*DIG-High Prime*) emplea un hapteno esteroide (digoxigenina) para marcar fragmentos de ADN. La digoxigenina está unida al nucleótido trifosfato dUTP por un enlace éster susceptible de ser eliminado en condiciones alcalinas, lo que facilita la posterior reutilización de los filtros ya utilizados. Las sondas marcadas con digoxigenina son generadas enzimáticamente por el método de cebado al azar (*random priming*) descrito por Feinberg y Vogelstein (1983).

El método se basa en la incorporación al azar en el ADN de un análogo de nucleótidos (digoxigenina-1-dUTP), gracias a la extensión de hexanucleótidos iniciadores por el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. El procedimiento está ajustado (proporción de DIG-11-dUTP frente a dTTP) para que cada 20-25 nucleótidos incorporados se introduzca una molécula de digoxigenina. Esta densidad de haptenos en el ADN proporciona una gran sensibilidad en la inmunodetección posterior por anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con la enzima fosfatasa alcalina.

Para el marcaje de las sondas se siguieron las instrucciones del sistema *DIG-High Prime* de Roche.

### II.12.2. Hibridación de ADN.

El proceso de hibridación se lleva a cabo una vez que se ha realizado la transferencia del ADN y se ha marcado la sonda. En el proceso completo de hibridación se pueden distinguir cuatro fases: prehibridación, hibridación, lavados y detección.

La prehibridación, tiene como finalidad bloquear los sitios activos de la membrana donde no se han unido ácidos nucleicos durante la transferencia y equilibrar ésta con el tampón de prehibridación.

La hibridación, en sentido estricto permite la unión de la sonda marcada al ADN fijado en la membrana. La especificidad de esta unión depende tanto de las condiciones utilizadas durante la incubación (temperatura a la que se desarrolla la hibridación y la concentración de sales y detergentes en el tampón de hibridación) como de las utilizadas en los lavados posteriores.

Los lavados, permiten la eliminación selectiva de las uniones inespecíficas que hayan podido producirse entre la sonda y el ADN. La disminución de la unión inespecífica durante los lavados se consigue: **i)** disminuyendo la concentración de sales del tampón de lavado, **ii)** aumentando la concentración de detergentes en el tampón de lavado y **iii)** aumentando la temperatura y la duración del lavado. La detección, permite visualizar la unión de la sonda con los fragmentos de ácidos nucleicos.

Procedimiento:

- Colocar la membrana en una bolsa de plástico (que quedará sellada) o en un tubo de hibridación y añadir 30 ml de solución de hibridación (1), incubar a la temperatura adecuada (generalmente 80 °C debido al elevado contenido en G+C de *Streptomyces*) durante 1 hora.
- Hervir la sonda previamente marcada durante 10 minutos para desnaturalizar el ADN y enfriar rápidamente en hielo.
- Añadir la sonda así desnaturalizada a la solución de hibridación. Esta solución de hibridación puede ser reutilizada varias veces, en caso de ser así, desnaturalizar antes de usar durante 15 minutos.
- Eliminar la solución utilizada en la prehibridación y añadir la solución de hibridación, dejando el conjunto a la temperatura de hibridación un mínimo de 8 horas. Tras el tiempo de hibridación, recoger la solución de hibridación en un tubo para su reutilización y conservarla a -20 °C.
- Lavar la membrana con la solución de lavado I (2) a 80 °C manteniéndola en agitación durante 5-10 minutos.
- Retirar la solución y adicionar nueva solución de lavado I para tratar la membrana en agitación durante 10 minutos a temperatura de hibridación.
- Lavar la membrana con solución de lavado II (3) durante 15 minutos a temperatura de hibridación y en agitación.
- Repetir el lavado con la misma solución fresca durante 15 minutos a 80 °C.
- Tratar la membrana con buffer de lavado (4) durante 1-2 minutos en agitación.
- Bloquear la membrana con tampón II (5) durante 30 minutos en agitación.
- Sustituir el tampón II por la solución de anticuerpos (6) y dejar al menos 30 minutos en agitación.
- Eliminar la solución de anticuerpos y lavar la membrana 2 veces con tampón de lavado durante 15 minutos (cada vez) en agitación.
- Eliminar el tampón de lavado y sustituirlo por tampón III (7) durante 5 minutos en agitación.
- Tratar la membrana con la solución CDP-Star (8) durante 5 minutos en oscuridad y con el lado de la membrana por el que fue transferido el ADN, hacia abajo. Guardar la solución de CDP-Star<sup>TM</sup> (varios usos).
- Secar y envolver la membrana en plástico de hibridación.
- Exponer la membrana bajo una película de autorradiografía (Hyper film, Amersham Pharmacia Biotech) en un estuche con pantallas intensificadoras de calcio-tungsteno-fósforo, durante un tiempo que varía entre 5 y 30 minutos.
- Revelar la película sometiéndola al siguiente tratamiento: 1-5 minutos en líquido revelador de rayos X Kodak (9), 1 minuto en solución de paro (10), y 5 minutos en líquido fijador Kodak (11). Lavar con agua y dejar secar la película de autorradiografía.

**(1)** Solución de Hibridación: 5x SSC; 2 % agente Bloqueante (*Blocking Reagent* de Roche); 0,1 % lauroilsarcosina; 0,02 % SDS.

**(2)** Solución de lavado I: 2x SSC y 0,1 % SDS

**(3)** Solución de lavado II: 0,5x SSC y 0,1 % SDS.

**(4)** Buffer de lavado: Tampón I (100 mM ácido maléico; 150 mM NaCl, pH 7,50) más Tween-20 al 0,3 % (v/v).

- (5) Tampón II: Tampón I más 1 % de agente bloqueante (*Blocking Reagent* de Roche).
- (6) Solución de anticuerpos: diluir en una proporción 1:10000 los anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) en tampón II.
- (7) Tampón III: Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5; NaCl 0,1 M. Se preparan dos soluciones: una con 1 M Tris-HCl, pH 9,5 y otra 1 M NaCl; 500 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. De esta forma las soluciones están 10x, mezclándose con agua destilada antes de usar como 1x.
- (8) Solución CDP-Star<sup>TM</sup> (de Roche): Se prepara diluyendo 100 veces en el tampón III, la solución del compuesto disodio 2-cloro-5-(4-metoxiespiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-il)-1-fenilfosfato, quedando a una concentración final de 0,25 mM. Se almacena a 4 °C en oscuridad.
- (9) Líquido revelador de rayos X: Diluir el preparado comercial de Kodak en proporción 1:31 en agua Milli-Q.
- (10) Solución de paro: 2,5 % (v/v) ácido acético.
- (11) Líquido fijador: Diluir el preparado comercial de Kodak en proporción 1:9 en agua Milli-Q.

### **Reutilización de la membrana de nailon.**

#### Procedimiento:

- Enjuagar brevemente la membrana en agua destilada durante un minuto.
- Lavar dos veces durante 15 minutos (cada vez) a 37 °C, con 0,2 M NaOH; 0,1 % SDS. Este tratamiento elimina el enlace éster que une la digoxigenina al nucleótido trifosfato.
- Lavar con agitación, sumergiendo la membrana en SSC 2x.
- Almacenar a 4 °C para su posterior utilización.

## **II.13. Secuenciación de ADN.**

El proceso de secuenciación se realizó por el método de los didesoxinucleótidos descrito por Sanger y col. (1977), utilizando metodología de secuenciación cíclica con el ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). La secuenciación de los productos amplificados se llevó a cabo por electroforesis capilar en el secuenciador ABI PRISM<sup>®</sup> 3130 (Applied Biosystems).

## **II.14. Introducción de ADN en *E. coli*.**

### **II.14.1. Transformación de *E. coli*.**

#### **II.14.1.1. Inducción del estado de competencia.**

Para inducir el estado de competencia en *E. coli* se siguió el método del cloruro de rubidio, descrito inicialmente por Hanahan (1983; 1985). Con este método las células alcanzan eficiencias de hasta 5·10<sup>8</sup> transformantes/μg ADN. En este procedimiento es de suma importancia trabajar durante todo el proceso de lavados e inducción de la competencia a 4 °C.

#### Procedimiento:

- Se inocula con una colonia aislada de medio SOB sólido 10 mL de medio SOB líquido incubándolo durante 6 horas a 37 °C y a una agitación constante de 250 rpm.
- Con 1 mL del cultivo anterior, se inoculan 100 mL de medio SOB líquido, incubándolo en las mismas condiciones de temperatura y agitación que en el apartado anterior.
- Cuando el cultivo alcanza una DO<sub>600 nm</sub> de 0,4-0,5 unidades se enfría rápidamente en hielo manteniéndose desde este momento a una temperatura constante de 4 °C.
- Las células se recogen por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El precipitado celular se resuspende suavemente en 30 mL de solución RF1 (1) y se mantiene durante 30 minutos en hielo.

- Nuevamente, se recogen las células por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se resuspenden en 8 mL de solución RF2 (2). Una vez resuspendidas dichas células, se mantienen 30 minutos en hielo.
  - Por último, las células se reparten en alícuotas de 100-125 µL y pueden utilizarse en el momento o pueden almacenarse a -80 °C previa congelación en nitrógeno líquido.
- (1) RF1: RbCl 100 mM; MnCl<sub>2</sub> 50 mM; Acetato potásico 30 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM; Glicerol 15 %, pH 5,8; ajustado con ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtración.
- (2) RF2: MOPS 10 mM; RbCl 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 75 mM; Glicerol 15 %, pH 6,8; ajustado con NaOH. Esterilizar mediante filtración.

#### II.14.1.2. Procedimiento de transformación.

El método de transformación empleado fue descrito por Hanahan (1983) y es prácticamente universal para las diversas cepas de *E. coli*.

##### Procedimiento:

- Descongelar las células competentes manteniendo el tubo en hielo.
- A 100 µl de células, añadir el ADN (hasta un volumen máximo de 10 µl) y mantener la mezcla en hielo durante 20 minutos.
- Aplicar al conjunto un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos.
- Enfriar en hielo 2 minutos.
- Añadir 600 µl de LB e incubar las células durante 1 hora en agitación (250 rpm) a 37 °C.
- Finalmente, sembrar alícuotas de las células en placas de Petri con el medio adecuado.

#### II.14.2. Electroporación de *E. coli*.

##### II.14.2.1. Inducción del estado de electro-competencia.

El procedimiento utilizado en la preparación de células electro-competentes se desarrolló a partir de las especificaciones de Gust y colaboradores (2002).

##### Procedimiento:

- Se inocula una colonia aislada de medio LB sólido a 10 mL de medio LB líquido incubándolo durante 14-18 horas a 37 °C o 30 °C (dependiendo de la cepa) y a una agitación constante de 250 rpm.
- Inocular 2-3 mL del preinóculo a 100 mL de medio SOB líquido conteniendo 200 mM de MgSO<sub>4</sub> y el antibiótico de selección.
- Dejar crecer a las condiciones anteriormente indicadas hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,4.
- Recuperar las células por centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender las células en 10 mL de glicerol 10 % a 4 °C. Repetir la centrifugación y lavar de nuevo las células con 5 mL de glicerol 10 % a 4 °C.
- Resuspender las células en 1 mL de glicerol 10 % a 4 °C y repartirlo en alícuotas de 50 µL. Pueden utilizarse en el momento o pueden almacenarse a -80 °C previa congelación en nitrógeno líquido.

##### II.14.2.2. Procedimiento de electroporación.

La electroporación consiste en generar pulsos eléctricos de alto voltaje y alta intensidad de corriente sobre las células. Estos pulsos se transmiten mediante dos electrodos a una cubeta que contiene la preparación celular mezclada con el ADN y de este modo se incrementa la permeabilidad de la pared celular.

Procedimiento:

- Descongelar un vial de células electro-competentes en hielo y añadir el ADN.
- Poner la mezcla en una cubeta de electroporación de 0,2 cm fría (4 °C).
- Aplicar un pulso en el electroporador en las siguientes condiciones: 2,5kV, 200Ω y 25μF, o 2,5kV, 500Ω y 10μF (dependiendo de la cantidad de ADN y de la concentración de células). Debiendo transcurrir un tiempo de paso de corriente de entre 4,5-5 milisegundos.
- Añadir 1 mL de medio LB a 4 °C a la cubeta y transferir todo el contenido a un microtubo de 1,5 mL.
- Incubar de 1-2 horas a 37 °C o 30 °C (dependiendo de la cepa) y a una agitación constante de 250 rpm.
- Sembrar en placas de LB sólido con el antibiótico de selección.

**II.15. Introducción de ADN en *S. coelicolor* mediante conjugación.**

Para la conjugación de *S. coelicolor* la cepa donadora fue *E. coli* ET12567/pUZ8002. Esta cepa es deficiente en los sistemas de metilación *dam*, *dcm* y *hsd*, y porta el plásmido pUZ8002, no movilizable que contiene los genes necesarios para la movilización de vectores que contengan en su secuencia un *oriT* (Paget y col., 1999).

El procedimiento de conjugación que se ha seguido es el descrito por Kieser y col. (2000). Como células receptoras se usan esporas de *S. coelicolor*.

Procedimiento:

- Transformar el plásmido a conjugar en *E. coli* ET12567/pUZ8002. Sembrar en medio LB con los antibióticos de selección adecuados (Km y Cm para la cepa, y los antibióticos a los que confiera resistencia el plásmido que hemos transformado).
- Inocular una colonia en 5-7 mL de LB con los antibióticos adecuados. Incubar toda la noche a 37 °C y 250 rpm.
- Inocular con 2 mL del cultivo anterior 50 mL de medio LB con los antibióticos. Incubar a 37 °C y 250 rpm hasta que el cultivo alcance una DO<sub>600</sub> entre 0,4-0,6.
- Recuperar las células por centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender las células en 50 mL de LB, centrifugar durante 5 minutos a 4 °C.
- Lavar de nuevo las células con 50 mL de LB a 4 °C y repetir la centrifugación durante 15 minutos. Resuspender las células en un 10 % del volumen inicial.
- Mientras se lavan las células de *E. coli*, añadir aproximadamente 10<sup>8</sup> esporas de *S. coelicolor* a 500 μL de 2xTY.
- Dar un choque térmico a la suspensión de esporas a 50 °C durante 10 minutos.
- Mezclar 500 μL de la suspensión de células de *E. coli* con 500 μL de la suspensión de esporas de *S. coelicolor*. Centrifugar la mezcla a 4000 rpm durante 2 minutos.
- Desechar el sobrenadante y resuspender la mezcla en los 50 μL residuales.
- Hacer diluciones seriadas desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup> en un volumen total de 100 μL de agua Milli-Q.
- Sembrar 100 μL de las diluciones en placas de medio MS al que se ha añadido 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. Incubar a 30 °C de 16-20 horas.
- Añadir como cobertera ácido nalidíxico (0,5 mg/mL) junto con los antibióticos de selección. Incubar a 30 °C durante 3-6 días hasta observar colonias exconjugantes.

**II.16. Interrupción de genes mediante el sistema ReDirect.**

Este método consiste en un primer paso donde se sustituye el gen de interés presente en un cósmido dentro de *E. coli*, por un casete constituido por un gen de resistencia a un

antibiótico y un origen de transferencia (*oriT*) de RP4. En un segundo paso se introduce esta construcción en *Streptomyces* mediante conjugación para finalmente, seleccionar aquellas colonias en las que se ha producido el doble sobrecruzamiento y el gen ha sido sustituido por el marcador de resistencia deseado.

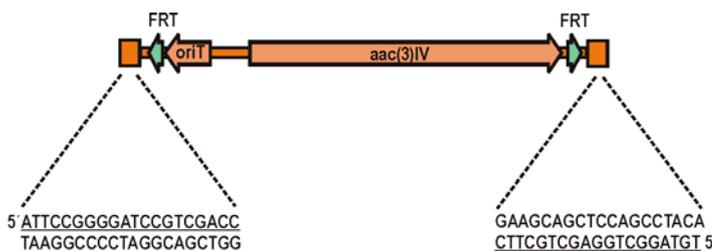
Para llevar a cabo las inactivaciones se siguió el procedimiento desarrollado en el *John Innes Center* por Gust y col. (2002) (disponible en <http://streptomyces.org.uk/redirect/>), con ciertas modificaciones introducidas para mejorar las probabilidades de que se lleve a cabo el doble sobrecruzamiento entre el cósmido y el casete generado por PCR.

### II.16.1. Purificación del casete de resistencia.

El gen que deseamos inactivar debe ser sustituido por un casete. A la hora de diseñar el experimento es necesario elegir un marcador de resistencia adecuado para poder diferenciar en cada paso aquellas células que porten la construcción deseada. En este caso se eligió la resistencia a apramicina como marcador de selección, dicho gen (*aac(3)IV*) se encuentra presente en el plásmido pIJ773.

El ADN del plásmido pIJ773 se trató según el procedimiento descrito en el apartado II.8.1 con las enzimas de restricción *EcoRI-HindIII*. Mediante este tratamiento se produce la liberación de un fragmento de 1,4 kb que contiene: un fragmento que poseen todos los casetes de inactivación, una zona que reconoce la enzima FLP recombinasa (FRT) y que permite la obtención de mutantes limpios, el origen de transferencia y el marcador de resistencia a apramicina (Figura II.3).

El fragmento se separó mediante electroforesis (II.10.1), se extrajo la banda y se purificó mediante el método de purificación por columnas GFX (II.10.1.1). Este proceso se repitió dos veces para asegurar que con la banda de 1,4 kb no se arrastraba parte del resto del plásmido (Gust y col., 2003).



**Figura II.3:** Esquema del fragmento pIJ773 *EcoRI-HindIII*. Se indica la secuencia de los 20 y 19 nucleótidos comunes en todos los casetes. En subrayado se indica la secuencia que se debe introducir en cada cebador.

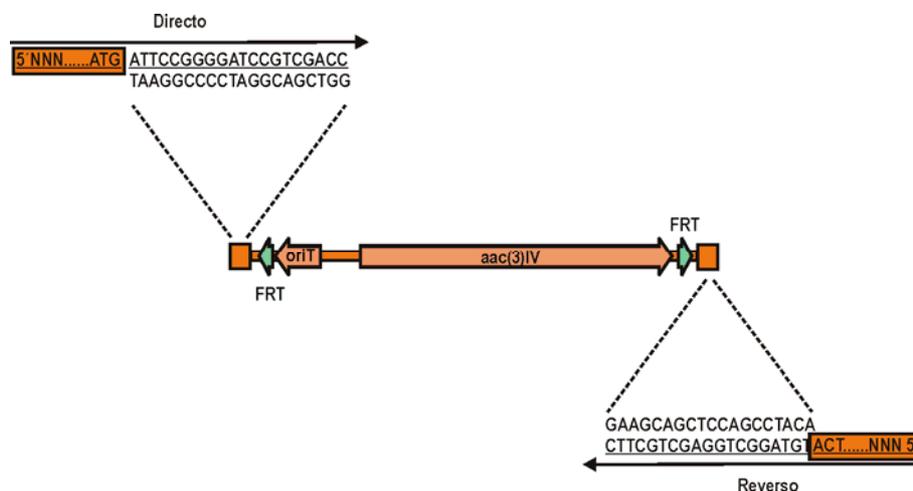
### II.16.2. Diseño de cebadores para ReDirect.

Para la disrupción de cada gen es necesario diseñar unos cebadores de 58 y 59 nucleótidos. Cada uno de ellos posee en el extremo 5' 39 nucleótidos que coinciden exactamente con la región situada corriente abajo o arriba del gen que se desea inactivar. Estos 39 nucleótidos incluyen el codón de inicio o de paro (dependiendo del cebador) del gen a inactivar. Mientras que el extremo 3' de cada cebador presenta una secuencia de 20 ó 19 nucleótidos (dependiendo si es el cebador directo o el reverso) común en todos los casetes de inactivación.

La posición, en la cadena codificante, de la secuencia de 39 nucleótidos idénticos al gen situado corriente arriba del gen que se desea inactivar junto con los 20 nucleótidos especificados, es fundamental a la hora de eliminar el casete de los mutantes mediante el sistema de la FLP recombinasa. Al igual que la posición, en la cadena complementaria, de la secuencia de los 39

nucleótidos idénticos al gen situado corriente abajo del gen que se desea inactivar junto con los 19 nucleótidos comunes en todos los casetes (Figura II.4).

Es conveniente hacer una búsqueda mediante BlastN para asegurarnos de que los 39 nucleótidos que se añaden a cada cebador se corresponden exactamente con la secuencia anterior y posterior del gen a inactivar.



**Figura II.4:** Esquema del diseño de los cebadores usados para la construcción del casete de inactivación. Se indican como N los 39 nucleótidos a añadir coincidentes con la secuencia del gen situado corriente arriba o abajo del que se desea inactivar. También se indican los codones de inicio y fin del gen diana.

### II.16.3. Amplificación por PCR del casete de inactivación alargado.

Una vez diseñados los cebadores y purificado el fragmento *HindIII-EcoRI* se llevó a cabo una PCR teniendo en cuenta las condiciones especificadas en el procedimiento desarrollado en el *John Innes Center* por Gust y col. (2002) (disponible en <http://streptomyces.org.uk/redirect/>).

El producto de la PCR, un fragmento de unas 1,5 kb, fue purificado en gel dos veces para no arrastrar posibles bandas inespecíficas y obtener un producto con el menor contenido en sales para que no interfieran en el proceso de electroporación posterior.

### II.16.4. Introducción del cósmido de *S. coelicolor* en la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790.

Para la obtención de células electro-competentes de la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790 se siguió el procedimiento descrito en el apartado II.14.2.1.

A continuación, para introducir en dichas células el cósmido, que porta el gen a inactivar, se utilizó el método de electroporación descrito en el apartado II.14.2.2. Una vez dado el choque eléctrico a las células es necesario incubarlo a 30 °C y 250 rpm ya que el plásmido pIJ790 es termosensible y se pierde al aumentar la temperatura.

A la hora de sembrar las placas en el medio LB sólido hay que tener en cuenta la suplementación de dicho medio con los antibióticos de selección (ampicilina, kanamicina y cloranfenicol), así como la temperatura de incubación de las placas (30 °C) para no perder el plásmido que porta los genes que facilitarán la recombinación.

### II.16.5. Inactivación del gen de *Streptomyces* en el cósmido.

El cassette de inactivación se introduce en la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790/cósmido para que se produzca la doble recombinación y se sustituya el gen deseado por el fragmento generado mediante PCR. Para este proceso es necesario disponer de células electro-competentes de la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790/cósmido.

#### Procedimiento:

- Se inocula una colonia aislada de la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790/cósmido de medio LB sólido a 10 mL de medio LB líquido incubándolo durante 12 horas a 30 °C y a una agitación constante de 250 rpm.
- Inocular 2-3 mL del preinóculo a 100 mL de medio SOB líquido conteniendo 200 mM de MgSO<sub>4</sub> y los antibióticos de selección (ampicilina, kanamicina y cloranfenicol).
- Añadir al medio 1 mL de L-arabinosa 1M (concentración final 10 mM) para inducir los genes que favorecen la recombinación.
- Dejar crecer a las condiciones anteriormente indicadas hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,4-0,5.
- Recuperar las células por centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
- Desechar el sobrenadante y resuspender las células en 10 mL de glicerol 10 % a 4 °C. Repetir la centrifugación y lavar de nuevo las células con 5 mL de glicerol 10 % a 4 °C.
- Resuspender las células en 500 µL-1 mL de glicerol 10 % a 4 °C y repartirlo en alícuotas de 50 µL. Pueden utilizarse en el momento o pueden almacenarse a -80 °C previa congelación en nitrógeno líquido.

A continuación, se lleva a cabo la electroporación. La eficiencia es más alta si se realiza el proceso con células frescas.

#### Procedimiento:

- Añadir ADN del casete generado por PCR, en concentraciones crecientes (100ng-1µg) a varios viales de células electro-competentes en hielo.
- Poner la mezcla en una cubeta de electroporación de 0,2 cm fría (4 °C).
- \*Aplicar un pulso en el electroporador en las siguientes condiciones: 2,5kV, 500Ω y 10µF. Debiendo transcurrir un tiempo de paso de corriente de entre 4,5-5 milisegundos.
- Añadir 1 mL de medio LB a 4 °C a la cubeta y transferir todo el contenido a un microtubo de 1,5 mL.
- \*Incubar de 2-4 horas a 30 °C (para dejar transcurrir más tiempo y que se produzca la doble recombinación) y a una agitación constante de 250 rpm.
- Sembrar en placas de LB sólido con los antibióticos de selección: del cósmido (ampicilina y kanamicina) y del casete que debe sustituir al gen (apramicina). Incubar durante 12-16 horas a 37 °C.

Nota: Los pasos indicados con un asterístico son modificaciones introducidas del procedimiento original disponible en <http://streptomyces.org.uk/>.

Es necesario comprobar todas las colonias obtenidas de la electroporación. Para ello se obtiene su ADN (apartado II.6.1.3) y se pueden realizar las comprobaciones mediante PCR (apartado II.9) o usando un tratamiento con endonucleasas de restricción (apartado II.8.1). Bien sea por uno u otro método siempre es conveniente introducir controles negativos.

### II.16.6. Trasferencia del cósmido con el gen inactivado a *Streptomyces*.

La introducción en *Streptomyces* del cósmido con el gen de interés sustituido por el casete generado por PCR, se lleva a cabo mediante conjugación (apartado II.15).

Para ello se necesita introducir primero el cósmido con el gen inactivado en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 mediante transformación (apartado II.14.1)

## II.17. Ensayos de producción de antibióticos.

### II.17.1. Ensayos de producción de actinorrodina y undecilprodigiosina.

En un matraz indentado de 500 mL con 50 mL de medio MG se inocularon esporas de *S. coelicolor* manteniendo una concentración final de  $4 \cdot 10^6$  esporas/mL. Se incubaron a 30 °C y 300 rpm, tomando muestras del caldo a determinados tiempos.

Se tomaron 700  $\mu$ L de muestra para la cuantificación de antibióticos y 2 mL para realizar la curva de crecimiento.

#### DETERMINACIÓN DE ACTINORRODINA (Kieser y col., 2000)

##### Procedimiento:

- Añadir 700  $\mu$ L de KOH 2 N a 700  $\mu$ L de caldo de cultivo. Incubar la mezcla a 4 °C durante 12 horas.
- Centrifugar la mezcla durante 20 minutos a 4 °C y 14000 rpm.
- Recoger el sobrenadante y medir su densidad óptica a 640 nm, usando como blanco el medio de cultivo tratado de la misma forma ( $\epsilon=25320$ ).

$$\text{Abs} = \epsilon \cdot [\text{actinorrodina}]$$

#### DETERMINACIÓN DE UNDECILPRODIGIOSINA (Kieser y col., 2000)

##### Procedimiento:

- Lavar el precipitado que ha quedado al centrifugar la mezcla de caldo de cultivo y KOH, dos veces, la primera con 1 mL de KOH 2 N para eliminar los restos de actinorrodina que pudieran quedar y la segunda con 1 mL de HCl 0,5 M.
- Extraer el antibiótico mediante la adición de 1 mL metanol acidificado con HCl 0,5 M. Mezclar con el vórtex e incubar 2 horas a temperatura ambiente.
- Centrifugar la mezcla y medir la absorbancia del sobrenadante a 530 nm ( $\epsilon=100500$ ), usando como blanco metanol acidificado con HCl 0,5 M.

$$\text{Abs} = \epsilon \cdot [\text{undecilprodigiosina}]$$

### II.17.2. Ensayos de producción de CDA.

El ensayo se realiza sobre medio sólido NA (agar nutritivo) con 2 % de agar para la base y 1 % de agar para la cobertera (Uguru y col., 2005).

##### Procedimiento:

- Añadir 25 mL de medio NA 2 % a cada placa de 9 cm de diámetro.
- Se coloca una gota de 5  $\mu$ L con  $2,5 \times 10^2$  esporas de aquellas cepas a comparar, teniendo en cuenta una separación entre ellas para que no se fusionen los halos de inhibición del crecimiento.
- Se incuban a 30 °C durante 48 horas.
- Se añaden a cada placa 5 mL de medio NA 1 % suplementado con  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  60mM que contenga *Bacillus subtilis* (0,25 de DO final en los 5 mL). Como control negativo, se hace lo mismo de forma paralela pero sin añadir  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  a la cobertera.
- Incubar a 30 °C unas 12-20 horas.

## II.18. Técnicas aplicadas en el análisis de la expresión génica.

El análisis de la expresión de algunos genes se realizó mediante RT-PCR (*Reverse Transcription PCR*) a tiempo final y a tiempo real.

La expresión de un gen, en una determinada cepa y condición, se analizó mediante RT-PCR a tiempo final. Esta técnica también permitió comparar la expresión de un gen en distintos medios y condiciones pudiendo establecer, en algunos casos, diferencias de expresión.

La técnica de RT-PCR a tiempo real permitió la cuantificación relativa de las diferencias de expresión de un determinado gen en distintas cepas o condiciones.

### II.18.1. RT-PCR a tiempo final.

El sistema utilizado para el análisis fue el *Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq System (Invitrogen)* que se basa en la síntesis de la hebra complementaria al ARN por la enzima retrotranscriptasa. Dicha enzima utiliza oligonucleótidos específicos como cebadores que se unen al ARN mensajero y lo elongan sintetizando ADN complementario (ADNc) al ARN.

La reacción se basa en tres ciclos:

**Síntesis de ADNc y pre-desnaturalización:** consiste básicamente en la transcripción inversa del ARN molde gracias a una enzima transcriptasa reversa. La síntesis de ADNc se consigue en unos 15-30 minutos a 40-55 °C. Inmediatamente después, la transcriptasa reversa es inactivada y la ADN polimerasa es reactivada. El híbrido ARN/ADNc se desnaturaliza durante dos minutos de incubación a 94 °C.

**Amplificación por PCR:** Se realizan 28-40 ciclos típicos de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el ADNc obtenido en función del nivel de expresión. Hay que tener en cuenta que la temperatura de anillamiento debe estar entre 5-7 °C por debajo de la temperatura de fusión menor de los dos oligonucleótidos.

**Extensión final:** Paso opcional. Se usó 10 minutos a 72 °C.

Para llevar a cabo estos ensayos se utilizó el kit *Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen)*, las cantidades de los componentes utilizados se han indicado en la tabla II.6. El sistema consta de dos componentes principales:

1. *Superscript™ II RT/Platinum® Taq mix:* Contiene una mezcla de transcriptasa reversa (*SuperScript™ II RT*) y de ADN polimerasa (*Platinum® Taq polimerase*) para la síntesis de ADNc y su posterior amplificación por PCR.

2. *The 2x Mix:* Es un tampón optimizado para transcripciones reversas y amplificaciones por PCR. Contiene Mg<sup>2+</sup>, desoxiribonucleótidos trifosfato y estabilizadores.

<b>Mezcla de reacción 2x</b>	25 µL
<b>ARN molde</b>	100-500 ng
<b>Enzima RT/Taq Mix</b>	1 µL
<b>Oligonucleótido A (10 µM)</b>	1 µL
<b>Oligonucleótido B (10 µM)</b>	1 µL
<b>Agua Milli-Q</b>	completar hasta 50 µL

**Tabla II.6:** Componentes necesarios para una reacción de RT-PCR para un volumen de reacción de 50 µL.

Al igual que para una reacción de PCR, los tiempos y temperaturas para una RT-PCR también son bastante empíricos y dependen de diversos factores como: calidad del ARN molde

(que no existan RNAsas y que no haya contaminación con ADN), longitud del fragmento a amplificar, velocidad de procesamiento de la ADN polimerasa, etc. Siguiendo las instrucciones del fabricante, los tiempos y temperaturas genéricos usados aparecen reflejados en la tabla II.7.

Del mismo modo que en el apartado II.9 se recomendaba analizar el resultado de la reacción en un gel de agarosa, aquí también es aconsejable para comprobar la cantidad de amplificación, existencia de bandas inespecíficas, contaminaciones con ADN, etc.

Segmento	Temperatura	Tiempo	Ciclos	
Síntesis de ADNc	45 °C	40 minutos	1	
Pre-desnaturalización	94 °C	2 minutos	1	
Amplificación	Desnaturalización	98 °C	15 segundos	28-40
	Anillamiento	Según el cebador	30 segundos	
	Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	10 minutos	1	

**Tabla II.7:** Tiempo y temperaturas de reacción generales para una reacción de RT-PCR.

## II.18.2. RT-PCR a tiempo real.

En este tipo de técnica, la retrotranscripción del ARN a ADNc se combina con la amplificación posterior del ADNc mediante una PCR a tiempo real. Esta variante de la PCR se basa en la detección y cuantificación simultánea de la fluorescencia emitida por los productos de PCR a lo largo de todo el proceso de amplificación (Higuchi y col., 1993).

En este trabajo, la RT-PCR a tiempo real se ha realizado en dos pasos, de manera que la retrotranscripción y la posterior reacción de amplificación del ADNc se llevaron a cabo en dos fases y tubos diferentes. Como marcador del producto amplificado se utilizó SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (TaKaRa), fluoróforo que sólo emite fluorescencia al unirse a ADN de doble cadena, siendo la cantidad de fluorescencia emitida durante una reacción de PCR proporcional a la cantidad de producto amplificado. Debido a que el SYBR<sup>®</sup> se une a cualquier molécula de ADN de doble cadena, es muy importante que en la reacción de PCR no se amplifiquen productos inespecíficos ni se formen dímeros de oligonucleótidos.

El diseño de los cebadores se llevó a cabo de manera que amplificasen fragmentos de entre 100 y 200 pb de bases, cercanos al extremo 5' del ARNm que se deseaba amplificar. Se intentó que la complementariedad de los cebadores fuera lo menor posible para evitar la formación de dímeros de oligonucleótidos, los cuales disminuyen la eficiencia de la amplificación y alteran los resultados al producir un aumento de la fluorescencia inespecífica.

En cada uno de los pasos se usaron premezclas para así reducir en la medida de lo posible errores de pipeteo que pueden alterar los resultados aumentando el error.

### II.18.2.1. Retrotranscripción.

La síntesis de ADNc se llevó a cabo empleando la retrotranscriptasa SuperScript<sup>™</sup> III (Invitrogen), utilizando como molde una cantidad de ARN de 1 µg-2 µg.

La retrotranscripción se llevó a cabo con hexanucleótidos al azar (Random Primers, Invitrogen) a una concentración final de 12,5 ng/µL.

Procedimiento:

- Mezclar el cebador, el ARN molde y los desoxinucleótidos (concentración final de 0,5 mM) y añadir agua hasta completar un volumen final de 14  $\mu$ L.
  - Incubar a 70 °C durante 5 minutos y enfriar a 4 °C durante un tiempo mínimo de un minuto.
  - Añadir 4  $\mu$ L de Tampón 5x (1), 1  $\mu$ L de DTT 0,1 M (1) y 1  $\mu$ L de retrotranscriptasa (200 unidades). Mezclar con la micropipeta evitando la formación de burbujas.
  - Incubar a 25 °C durante 5 minutos.
  - Incubar durante una hora a 55 °C.
  - Inactivar la retrotranscriptasa mediante una incubación a 70 °C durante 15 minutos.
  - Guardar el ADNc a 4 °C si va a usarse en las siguientes 48 horas. Si no es así, almacenar a -20 °C hasta el momento de su uso.
- (1) Tampón 5x y DTT 0,1 M: Suministrados junto con la retrotranscriptasa *SuperScript™ III*.

**II.18.2.2. PCR a tiempo real.**

La amplificación y cuantificación del ADNc mediante PCR a tiempo real se realizó usando SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa), en un termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems).

Las reacciones se prepararon de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, en un volumen final de 20  $\mu$ l por triplicado y con dos réplicas biológicas. Como molde se utilizaron 2  $\mu$ l de ADNc sintetizado como se indicó en el apartado anterior y que, según el experimento, se utilizó sin diluir o diluido de 2 a 4 veces. La concentración de oligonucleótidos se optimizó para cada pareja, de manera que se obtuviera la mayor amplificación de producto específico, en el menor Ct, y sin formación de dímeros de oligonucleótidos. En cada placa de optimización de la concentración también se introdujeron controles negativos sustituyendo el ADNc por agua Milli-Q para comprobar la presencia o ausencia de señal en función de la existencia o no de dímeros. Para la mayoría de los cebadores la concentración óptima fue de 300 nM.

Para comprobar que en las muestras de ARN no existía contaminación con ADN, se llevaron a cabo controles negativos donde se sustituyó el ADNc molde por ARN (33ng). Si en estas reacciones de PCR se observaba amplificación de producto específico era debido a la presencia de ADN contaminante en las muestras de ARN.

El programa de amplificación que se aplicó se muestra a continuación:

Segmento		Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial		95 °C	10 minutos	1
Amplificación	Desnaturalización	95 °C	15 segundos	40
	Anillamiento	Según el cebador	1 minuto	
Disociación	Desnaturalización	95 °C	15 segundos	1
	Anillamiento	60 °C	1 minuto	1
	Extensión	95 °C	15 segundos	1

**Tabla II.8:** Tiempo y temperaturas de reacción generales para una reacción de PCR a tiempo real.

En todos los casos, finalizado el programa de amplificación, se llevó a cabo una curva de disociación para detectar la amplificación de posibles productos inespecíficos o la formación de dímeros de oligonucleótidos. Con este fin, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 3 %

para separar y visualizar los productos amplificados utilizando como referencia de tamaños un marcador de peso molecular de 25 pb (Invitrogen).

La determinación de la línea base así como del ciclo umbral se llevó a cabo mediante la aplicación informática suministrada junto al termociclador ("Sequence Detection Software StepOnePlus", versión 1.2.3).

### II.18.2.3. Cuantificación de la expresión génica.

La cuantificación del producto durante una PCR a tiempo real debe producirse en la fase exponencial de amplificación, ya que sólo entonces la cantidad de producto amplificado es proporcional a la cantidad de molde inicial (Bustin, 2000). Debido a esto, la mayoría de los métodos de cuantificación se basan en la determinación del ciclo umbral o Ct (*threshold cycle*), definido como el ciclo en el cual la fluorescencia debida al producto sobrepasa el umbral de la fluorescencia basal.

En este trabajo, el método de cuantificación empleado ha sido una cuantificación relativa, ya que nos interesaba conocer la cantidad relativa de un ácido nucleico diana en cantidades equivalentes de muestras (cepa silvestre y mutante).

Se realizaron curvas estándar para calcular la eficiencia de la reacción con cada pareja de oligonucleótidos, para ello se hicieron diluciones seriadas de ADN<sub>g</sub> por triplicado de hasta 6 órdenes de magnitud. Cada reacción de la curva estándar contenía la misma concentración de ADN<sub>g</sub> que las reacciones ensayadas con ADN<sub>c</sub>. Para que una curva estándar sea buena debe cumplir una serie de requisitos:

- Debe contener al menos 4 puntos y duplicados de cada concentración.
- Las muestras deben estar dentro del rango de concentración.
- Debe ser lineal en todo el rango de concentración.
- El valor de  $R^2$  debe ser lo más cercano posible a 1 (mayor o igual a 0,985).
- La eficiencia de la amplificación debe situarse entre 90-110 % en cada concentración.
- La diferencia entre las muestras y los estándares no debe ser mayor del 5 %.
- El valor de la pendiente óptima se sitúa en -3.32.

Siempre que se reúnan estas condiciones se puede aplicar el método de Livak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001) para obtener la expresión relativa. Los datos obtenidos se normalizaron respecto a un gen de referencia *hrdB*, el cual codifica un factor sigma de expresión constitutiva en *Streptomyces* (Buttner y col., 1990). Finalmente, se compararon los Ct de los genes seleccionados en los mutantes con los obtenidos en la cepa de referencia (*S. coelicolor* M145).

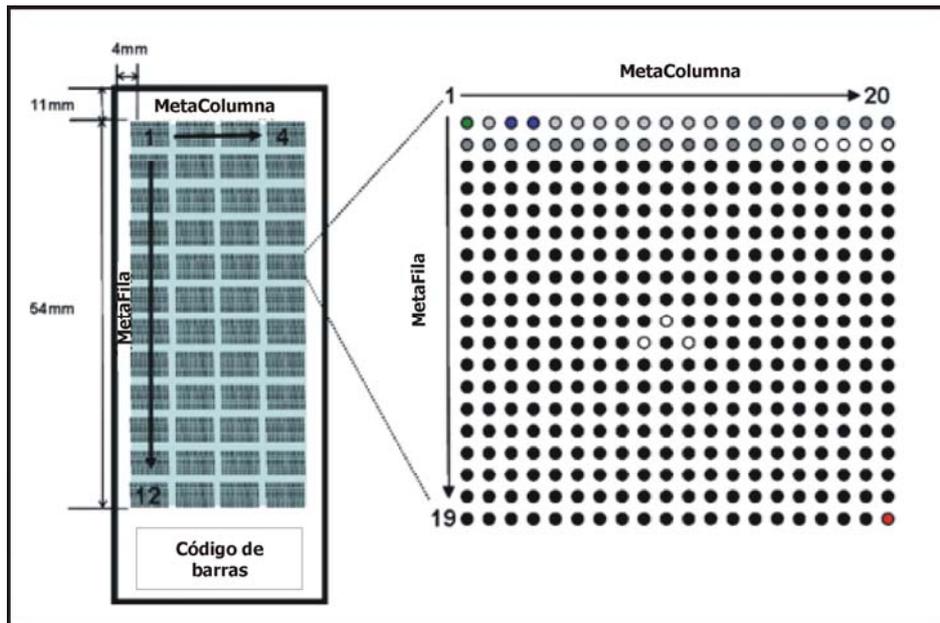
### II.18.3. Micromatrices.

Las micromatrices de *S. coelicolor* se adquirieron en el *Functional Genomics Laboratory* de la Universidad de Surrey, Inglaterra (lote SCo29). Son micromatrices impresas sobre soporte de vidrio del tamaño de un portaobjetos (Figura II.5). Comprenden 7728 sondas de genes cromosómicos y, dado que 7825 es el total de genes identificados por Bentley y col. (2002) en la secuenciación del cromosoma, la cobertura es del 98,76 %. Las sondas están compuestas por

oligos de 45 nucleótidos de longitud y están impresas por duplicado, lo que incrementa la capacidad de detección de genes diferencialmente regulados entre las distintas cepas ensayadas.

Se realizaron cinco réplicas biológicas para las cepas M145, M145: $\Delta$ 0877 y M145: $\Delta$ 7173 y cuatro réplicas biológicas para las cepas M145: $\Delta$ 7093, M145: $\Delta$ 6334 y M145: $\Delta$ 7143. Por réplica biológica se entiende, además de la extracción de ARN y el marcaje, un cultivo independiente.

Los procedimientos de marcaje, hibridación y detección son los empleados en el trabajo previo de Rodríguez-García y col. (2007). Se ha procurado especial cuidado en cada paso para así introducir la menor variabilidad técnica posible.



**Figura II.5:** Esquema de las micromatrices de ADN para *S. coelicolor*. En total existen 18240 posiciones en el cristal.

### II.18.3.1. Pretratamiento y prehibridación de micromatrices con *PRONTO!*

La aplicación del sistema comercial *Pronto!* (Corning, num. 40026) se utilizó por recomendación del laboratorio fabricante para el pretratamiento (el cual minimiza la fluorescencia de fondo) y la prehibridación de las micromatrices. Generalmente se tratan a la vez del orden de 24-25 portaobjetos en un cestillo para minimizar el gasto de las soluciones. Es imprescindible el uso de guantes sin talco para evitar el depósito de partículas en las micromatrices.

#### Procedimiento:

- Introducir cada portaobjeto en cada ranura del cestillo usando pinzas y guantes sin talco. Es muy importante no forzar los portaobjetos al introducirlos o al sacarlos de las ranuras del cestillo, pues se pueden romper con cierta facilidad.
- Preparar las soluciones y calentar las de pretratamiento (1) y prehibridación (2) a 42 °C en las cubetas de tinción, junto con dos tubos de 50 mL llenos de bolas de vidrio.
- Completar la solución de 297 mL de pretratamiento añadiendo 3 mL de borohidruro sódico. Mezclar. Realizar el siguiente paso antes de que transcurran 30 minutos.
- Introducir el cestillo con los portaobjetos en la cubeta con la solución de pretratamiento y añadir las bolas de vidrio en el hueco entre el cestillo y la pared de la cubeta hasta conseguir elevar el nivel de la solución hasta que cubra las micromatrices. La función de las bolas de vidrio es la de ahorrar solución. Tapar y colocar a 42 °C y 250 rpm durante 20 minutos.

- Transferir el cestillo a una cubeta nueva con 350 mL de la solución 2 (3) siguiendo las indicaciones de la Nota.
  - Repetir el paso anterior transfiriendo el cestillo a una cubeta con 350 mL de la solución 2 fresca.
  - Introducir el cestillo con los portaobjetos en la cubeta con 300 mL de solución de prehibridación y añadir las bolas de vidrio en el hueco entre el cestillo y la pared de la cubeta hasta conseguir elevar el nivel de la solución hasta que cubra las micromatrices. Tapar y colocar a 42 °C y 250 rpm durante 15 minutos.
  - Mientras tanto, lavar las cubetas usadas primero con agua Milli-Q, después con etanol y finalmente de nuevo con agua Milli-Q.
  - Transferir el cestillo a una cubeta nueva con 350 mL de solución 2 fresca, mantener a temperatura ambiente durante 1 minuto.
  - Transferir el cestillo a una cubeta nueva con 350 mL de solución 3 (4), mantener a temperatura ambiente durante 30 segundos.
  - Transferir el cestillo a una cubeta nueva con 350 mL de solución 3 fresca, mantener a temperatura ambiente durante 30 segundos.
  - Aclarar brevemente cada portaobjeto, uno por uno, con agua Milli-Q libre de DNAsas. Secarlos por centrifugación en tubos de 50 mL de punta cónica, colocando cada portaobjeto en un tubo con la cara impresa hacia arriba. Centrifugar a 1600 g durante 2 minutos. Los portaobjetos que no estén siendo secados se conservan en la solución 3 hasta que sean aclarados y secados.
- (1) Solución de pretratamiento ("PreSoak"): solución comercial incluida en el kit de Corning.  
 (2) Solución de prehibridación: solución comercial incluida en el kit de Corning.  
 (3) Solución 2: Para 1300 mL: 1235 mL agua Milli-Q y 65 mL de *Universal Wash Reagent A* (solución incluida en el kit de Corning).  
 (4) Solución 3: Para 750 mL: 600 mL agua Milli-Q y 150 mL de solución 2.
- Nota: Al introducir el cestillo con los portaobjetos en una solución nueva primero sumergir y sacar el cestillo rápidamente un par de veces y después mantener dentro de la solución el tiempo indicado.

### II.18.3.2. Marcaje y purificación de ácidos nucleicos para micromatrices.

Se detallan el procedimiento para el marcaje y síntesis de ADNc con Cy3-dCTP (usando ARN total como molde) y el marcaje de ADN genómico con Cy5-dCTP para el diseño experimental ADNc vs ADNg.

#### a) Síntesis y marcaje de ADNc con Cy3-dCTP.

Para el desarrollo de todo el procedimiento es necesario usar puntas, microtubos y agua Milli-Q libre de RNAsas. También es conveniente evitar la exposición de los Cy3-dCTP a la luz directa o intensa, por lo tanto, mantener en oscuridad el reactivo y las mezclas.

#### Procedimiento:

- Mezclar la muestra de ARN (4,2 µg disueltos en agua Milli-Q) con los cebadores (1,8 µg; hexámeros aleatorios), y añadir agua Milli-Q hasta un volumen final de 5,9 µL. En caso de necesidad se puede lograr la concentración suficiente de la muestra de ARN por medio de la centrifuga con vacío (*SpeedVac*), a temperatura ambiente, y preferentemente sin llegar a desecar totalmente el ARN.
- Colocar los microtubos que contienen la mezcla ARN-cebadores en un termociclador a 70 °C durante 10 minutos para la desnaturalización.
- Pasar inmediatamente los microtubos a hielo y centrifugar brevemente. Mantener en hielo.
- Mientras se lleva a cabo el paso de desnaturalización preparar la premezcla con la enzima y Cy3-dCTP. Para ello, multiplicar los volúmenes requeridos por reacción por el número de marcajes que se van a hacer más un 15-20 % de margen de seguridad (Tabla II.9).

- Añadir 4,6  $\mu\text{L}$  de la premezcla a la solución ARN-cebadores. Mezclar bien pipeteando pero evitando la formación de burbujas. Incubar la mezcla en el termociclador y en oscuridad durante 10 minutos a 25 °C seguidos de 5 horas a 42 °C.
- Lisar el ARN añadiendo 3,5  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 N y mezclar. Incubar en el termociclador y en oscuridad durante 10 minutos a 70 °C.
- Añadir 3,5  $\mu\text{L}$  de HCl 1 N para neutralizar la sosa y mezclar. Mantener en oscuridad o guardar hasta su uso durante un plazo de 2-3 días a -20 °C.

	<b>0,35 X</b>
tampón <i>First Strand</i> 5x	2,100 $\mu\text{l}$
DTT 100 mM	1,050 $\mu\text{l}$
"dNTP-R" (dA/G/TTP: 25 mM; dCTP: 10 mM)	0,210 $\mu\text{l}$
<b>Cy3</b> -dCTP 1 mM	0,525 $\mu\text{l}$
Superscript II (ó III)	0,700 $\mu\text{l}$
<b>Volumen final</b>	<b>4,585 <math>\mu\text{l}</math></b>

**Tabla II.9:** Componentes y volúmenes necesarios para la síntesis y el marcaje de ADNc con Cy3-dCTP de una reacción. El epígrafe 0,35 X hace referencia a que se ha escalado la formulación original, siguiendo la modificación recomendada por el laboratorio fabricante (*Functional Genomics Laboratory*).

#### b) Síntesis y marcaje de ADN genómico con Cy5-dCTP.

Durante todo el procedimiento es necesario usar puntas, microtubos y agua Milli-Q libre de DNAsas. Evitar la exposición de los Cy5-dCTP a la luz directa o intensa, por tanto, mantener en oscuridad el reactivo y las mezclas. El Cy5 es especialmente sensible al ozono (20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) y a la humedad (50 %).

##### Procedimiento:

- Preparar la mezcla del ADN (3  $\mu\text{g}$ ) junto con los hexámeros aleatorios (3  $\mu\text{g}$ ), ya añadir agua Milli-Q hasta un volumen final de 40  $\mu\text{L}$ . Desnaturalizar durante 5 minutos a 95 °C en un bloque térmico, enfriar en hielo y centrifugar brevemente.
- Mientras se lleva a cabo el paso de desnaturalización preparar la premezcla con la enzima y Cy5-dCTP añadiendo éste en último lugar (Tabla II.10). Mezclar muy bien.

	<b>por reacción</b> PolK 2 $\mu\text{L}$
ADN	3 $\mu\text{g}$
Hexámeros aleatorios	1,0 $\mu\text{L}$
tampón nº 2 de NEB (o similar)	5,0 $\mu\text{l}$
"dNTP-G" (dA/G/TTP 5 mM, dCTP 2 mM)	1,0 $\mu\text{l}$
<b>Cy5</b> -dCTP	1,5 $\mu\text{l}$
fragmento Klenow DNA polimerasa (PolK) (5 u/reacción)	2,5 $\mu\text{l}$
Volumen final	50,0 $\mu\text{l}$

**Tabla II.10:** Componentes y volúmenes necesarios para la síntesis y el marcaje de ADN genómico con Cy5-dCTP.

Nota: Estas reacciones se pueden escalar para tener suficiente ADN genómico marcado como para hacer todos los experimentos necesarios.

- Mantener en un incubador a 37 °C y en oscuridad durante 20-24 horas. A continuación, se puede guardar a -20 °C durante unos días hasta su uso.

### c) Purificación de los marcajes.

Para la purificación de los marcajes se usó el kit *MinElute™ PCR purification* (QIAGEN). Evitar en todo momento la luz directa sobre los marcajes. El marcaje escalado de ADN genómico se reparte en alícuotas de 100  $\mu$ l, para tratarlas en columnas independientes.

#### Procedimiento:

- Añadir a cada reacción de marcaje 5 volúmenes de solución PB <sup>(1)</sup>: 100  $\mu$ L a los procedentes de ARN y 500  $\mu$ L para los marcajes de ADN genómico.
- Cargar en la columna acoplada a un tubo de colección. Se puede hacer en dos pasos cuando el volumen excede la capacidad de la columna.
- Centrifugar un minuto a 13000 rpm. Descartar el eluido.
- Añadir 500  $\mu$ L de solución PE <sup>(2)</sup> a la columna. Centrifugar un minuto a 13000 rpm.
- Añadir otros 250  $\mu$ L de solución PE. Centrifugar un minuto a 13000 rpm.
- Tirar el eluido del tubo de colección. Centrifugar un minuto a 13000 rpm para eliminar los restos de etanol de la solución PE de la columna.
- Transferir la columna a un microtubo de 1,5 mL.
- Añadir 10  $\mu$ l (el ADNg con 20  $\mu$ l) de tampón EB <sup>(3)</sup> diluido 1:2 sobre el centro de la membrana de la columna.
- Mantener un minuto a temperatura ambiente. Centrifugar un minuto a 13000 rpm.
- Repetir la elución con otros 10  $\mu$ l (el ADNg con 20  $\mu$ l) de tampón EB 1:2.
- Repetir la elución con otros 20  $\mu$ l (el ADNg con 20  $\mu$ l) de tampón EB 1:2.
- Repetir la elución solamente del ADNg con otros 20  $\mu$ l de tampón EB 1:2 precalentado a 50 °C.
- Medir el volumen recuperado ajustando la pipeta. Debería haber unos 36  $\mu$ l en los marcajes de RNA y unos 75  $\mu$ l en el marcaje del ADNg (de dos reacciones).
- Guardar a  $-20$  °C y en oscuridad hasta su uso.

**(1)** Solución PB: solución comercial incluida en el kit *MinElute™ PCR purification*.

**(2)** Solución PE: solución comercial incluida en el kit *MinElute™ PCR purification*.

**(3)** Solución EB: solución comercial incluida en el kit *MinElute™ PCR purification*. Se usa diluida 1:2 con Tris-HCl 5 mM pH 8,5.

### II.18.3.3. Hibridación de micromatrices.

Se detallan el procedimiento para la cuantificación y la hibridación de micromatrices SCo29 de *Streptomyces coelicolor*. Para la realización de este procedimiento se usó *Pronto! Microarray Hybridization*. Es necesario el uso, en todo momento, de guantes sin talco para evitar el depósito de cualquier partícula en las micromatrices que pudiera interferir en la hibridación. Así como trabajar en condiciones de luz tenue cuando se maneje el ADN marcado con los fluoróforos.

#### Procedimiento:

- Cuantificar los marcajes purificados mediante el *NanoDrop* por medio del menú *microarray*. En el caso del marcaje Cy3 del ADNc sintetizado a partir del ARN total, se utilizó la opción *ssDNA*; sin embargo, para cuantificar el ADNg marcado se utilizó la opción *dsDNA-50*, ya que en su mayoría se trata de ADN de doble cadena. En este proceso se usa como blanco tampón EB 1:2 y 2  $\mu$ L de cada muestra.
- Hacer la mezcla de marcajes: 80 pmoles de marcaje Cy3-ADNc y 10 pmoles de marcaje Cy5 procedente de ADNg.
- Desecar los marcajes en *SpeedVac* (sin calor) en un microtubo de 1,5 mL, tapado con una tapa perforada procedente de otro tubo. De control se puede poner otro tubo con el mismo

volumen de agua coloreada. Cuando se completa la desecación, se descarta la tapa perforada y se tapa el tubo con su tapa original.

- Lavar los cubreobjetos. Se deben de manejar siempre por los bordes, uno a uno, se frotran con un guante de plástico y agua Milli-Q, se pulverizan con etanol y, por último, un nuevo enjuague con agua Milli-Q aplicada con un vaso lavador. Se eliminan las gotas más grandes de agua hacia los bordes con gas comprimido quitapolvos y se dejan secar en la campana de flujo laminar sin el mechero encendido. Para el soporte, una caja de puntas amarillas con puntas en las dos filas longitudinales externas. En estas puntas se apoyan los cubreobjetos (tamaño de 24x60 mm) por los extremos más cortos, minimizando el contacto de los cubreobjetos con las puntas. El tamaño es de 24x60 mm. Lavar los cubreobjetos en exceso para tener de reserva en el caso de que queden manchas en alguno.
- Redisolver los marcajes desecados en 40  $\mu$ L de solución de hibridación (1). Usar *vórtex* durante unos segundos para redisolver los marcajes, a continuación centrifugar durante 5 segundos para bajar la solución al fondo del tubo.
- Desnaturalizar a 95 °C durante 5 minutos y en oscuridad.
- Preparar la cámara de hibridación limpiando las posibles motas de polvo con gas comprimido (que no contenga ozono). Añadir 30  $\mu$ L de SSC 3x (2) en los pocillos de la cámara para evitar la desecación.
- Centrifugar la solución de hibridación a 13500 g durante 2 minutos, para recoger la condensación y precipitar posibles partículas. No poner en hielo.
- Montaje de la hibridación. Es muy importante seguir todos los pasos siguientes por orden:
  - 1) Anotar el número de serie de la micromatriz y la muestra aplicada.
  - 2) Inspeccionar el cubreobjetos al contraluz antes de usar y si es necesario darle un golpe de gas para eliminar posibles partículas presentes.
  - 3) Poner la solución de hibridación sobre el cubreobjetos en el eje longitudinal evitando la formación de burbujas y evitando recoger las partículas que hubiesen quedado al fondo descartando 1  $\mu$ L.
  - 4) Inspeccionar el portaobjetos a contraluz y eliminar posibles partículas de polvo con el gas comprimido, evitar el contacto de la cara impresa con cualquier objeto.
  - 5) Ir bajando el portaobjetos con la cara impresa de la micromatriz hacia abajo procurando que el cubreobjetos quede centrado y que abarque completamente la superficie impresa.
  - 6) Una vez adherido el cubreobjetos se levanta el conjunto, se le da la vuelta y se observa la colocación y la ausencia de burbujas, si la posición del cubreobjetos no es la correcta se puede recolocar con delicadeza tocando muy levemente su superficie. Evitar en todo momento tocar los bordes del portaobjetos o del cubreobjetos porque conlleva la pérdida de líquido por capilaridad. Vigilar que no haya líquido de hibridación en los cantos de la micromatriz, si así fuera, una vez centrado el cubreobjetos se secan los bordes pasando un papel.
  - 7) Depositar el conjunto micromatriz-cubreobjetos en la cámara de hibridación, manteniéndolo en horizontal en todo momento.
  - 8) Cerrar la cámara con la cara de la micromatriz impresa hacia arriba.
- Incubar a 42 °C durante 70-74 horas en un baño o en un horno en condiciones de oscuridad.

(1) Solución de hibridación (*Pronto! Long Oligo/ADNc Hybridization Solution*): solución comercial incluida en el *Pronto! Microarray Hybridization* para micromatrices de ADNc/PCR o de oligos de más de 50 mer.

(2) SSC 3x: solución comercial incluida en el kit de Corning.

#### II.18.3.4. Lavados de las micromatrices hibridadas.

A continuación, se detallan el procedimiento para el lavado y secado de las micromatrices hibridadas. Para la realización de este procedimiento son necesarias condiciones de luz tenue y el uso en todo momento de guantes sin talco para evitar el depósito de cualquier partícula en los portaobjetos que pudiera interferir en la lectura.

También es muy importante evitar que la matriz se deseque, por lo tanto las transferencias entre soluciones de lavado han de ser rápidas y la micromatriz debe quedar totalmente sumergida en las soluciones.

Procedimiento:

- Preparación de las soluciones de lavado: I <sup>(1)</sup>, II <sup>(2)</sup> y III <sup>(3)</sup>.
  - En un baño a 42 °C poner a calentar (más de 30 minutos) una cubeta de Fisher con el volumen suficiente de solución I para cubrir las micromatrices y colocar tantos tubos de 50 mL como micromatrices con solución de lavado I (45 mL) a 42 °C.
  - Recuperar la micromatriz de la cámara de hibridación, para ello se seca el exterior de ésta evitando así que el agua moje el portaobjetos al abrirla.
  - Coger el conjunto micromatriz-cubreobjetos con pinzas y meterlo en un tubo de 50 mL con la solución de lavado I a 42 °C. Si no ha habido desecación durante la hibridación el cubreobjetos se despegará en un minuto.
  - Coger con pinzas la micromatriz ya despegada del cubreobjetos y transferirla al cestillo sumergido colocado en una cubeta con un agitador magnético en su interior y con solución de lavado I precalentada.
  - Mantener en agitación intensa durante 5 minutos. Es importante que el tamaño del agitador magnético sea el adecuado para una correcta agitación porque si es muy grande puede chocar contra las paredes del cestillo, saltar y golpear las micromatrices pudiendo provocar su ruptura.
  - Transferir el agitador y el cestillo a una cubeta con solución de lavado II a temperatura ambiente. Mantener en agitación durante 2 minutos.
  - Transferir el agitador y el cestillo a una cubeta con solución de lavado II nueva a temperatura ambiente. Mantener en agitación durante 2 minutos.
  - Transferir el agitador y el cestillo a una cubeta con solución de lavado III a temperatura ambiente. Mantener en agitación durante 5 minutos.
  - Transferir el agitador y el cestillo a una cubeta con solución de lavado III nueva a temperatura ambiente. Mantener en agitación durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se dejan las micromatrices en reposo hasta que llegue su turno para el secado.
  - Se introduce cada micromatriz en un tubo de 50 mL vacío (el resto de los portaobjetos permanecen en la solución de lavado III a temperatura ambiente). Centrifugar durante 2 minutos a 1600 g en una centrífuga con rotor vasculante. La cara impresa de los portaobjetos debe quedar hacia arriba.
  - Pasar cada micromatriz a su estuche y proceder a la lectura. Si no es posible la lectura inmediata, se pueden guardar en oscuridad y en atmósfera protectora (N<sub>2</sub>, argón), o con desecante.
- (1) Solución I: Para 800 mL: 80 mL de SSC 20X, 40 mL de SDS 10 % y 680 mL de agua Milli-Q.  
 (2) Solución II: Para 800 mL: 20 mL de SSC 20X, 40 mL de SDS 10 % y 740 mL de agua Milli-Q.  
 (3) Solución III: Para 800 mL: 20 mL de SSC 20X, 0,4 mL de DTT 0,2 M y 780 mL de agua Milli-Q.  
 (4) Solución 3: Para 750 mL: 600 mL agua Milli-Q y 150 mL de solución II.

### II.18.3.5. Lectura de las micromatrices hibridadas, cuantificación de las señales de fluorescencia y procesamiento de los datos.

Para la lectura de las señales de fluorescencia de las micromatrices hibridadas se utilizó un escáner Agilent G2565BA. Antes de realizar las lecturas se encendió con el tiempo suficiente para que las fuentes de luz láser alcanzasen la intensidad de trabajo.

Procedimiento para la lectura de las micromatrices hibridadas:

- Es necesario crear una carpeta informática donde se guarden todos los datos del experimento. Para la organización de los datos generados se ha seguido una nomenclatura sistemática de los archivos y de las carpetas [D:\Array data (*carpeta donde se guardan todos los datos generados*)\exp05LAL01 (*denominación del experimento y el n°*)\Lecturas (*donde se guardan las lecturas del escaneado*)].

- En la ventana del lector es necesario cambiar algunas características que vienen por defecto: el tamaño de la región escaneada (54x21 mm), la carpeta donde se van a almacenar las lecturas, la designación de las lecturas por código de barras o por su posición en el carrusel, la resolución de los píxeles obtenidos (10  $\mu$ M) y el nivel de sensibilidad de los tubos fotomultiplicadores (en nuestro caso se usó 100 % para el rojo y el verde).
- Seleccionar las posiciones ocupadas por las micromatrices en el carrusel.
- Realizar la lectura.
- Una vez realizadas las lecturas, se usa el programa *FeatureExtraction* V8.1 para la cuantificación de las fluorescencias de cada *punto* o región de la micromatriz donde se localiza una determinada sonda o control.
- Abrir cada archivo de imagen de las lecturas, colocar la imagen en vertical e invertir. Guardar la nueva imagen.
- Pasar al modo *Grid* para cargar la plantilla (que lleva extensión gal: Sco29.gal).
- Modificar una serie de factores: el diámetro del punto que va a tener en cuenta (15 de horizontal y de vertical), no poner límites para el ajuste de cada celdilla y permitir que ajuste cada celda independientemente. Pulsar "*autofit*". A veces no es posible un ajuste perfecto, por lo que hay que encajar cada celdilla una por una a los puntos permitiendo que las líneas que determinan cada punto pasen lo más cercanas al centro de éste.
- Guardar el conjunto plantilla-imagen al que llamaremos rejilla y que tendrá extensión csv.

*Procedimiento para la cuantificación de las señales de fluorescencia:*

- Cargar la rejilla y en la ventana que aparece seleccionamos los archivos que queremos crear: imagen, jpeg, txt y visual. Seleccionar la carpeta de destino (Cuantificación).
- Modificar una serie de parámetros presentes en la siguientes pestañas:
  1. *FindSpots*: introducir 1,5 veces el valor que pone por defecto en Deviation Limit. Es el área donde buscará un punto alrededor de donde teóricamente debería estar.
  2. *SpotAnalyzer*: Activar la casilla para que calcule el tamaño del punto, ya que por defecto está activado *Cookie culter* y hay que cambiarlo a *Whole Spot*.
  3. *PolyOutlierFlagger*: Desactivar la casilla de *population outlier flagger*, ya que viene por defecto diseñado para portaobjetos con 15 réplicas de una misma sonda.
  4. *BGSub*: Activar la casilla de fondo local (*Local Background*) para que lo tenga en cuenta alrededor de cada punto; Activar *Spatial Detrend* y desactivar la casilla de ajuste de fondo global (Adjust Background globally).
- El programa invierte unos minutos en realizar la cuantificación.

*Procedimiento para el preprocesamiento de los datos:*

En este paso se da el formato adecuado a los datos de cuantificación para su introducción en el procedimiento de análisis estadístico en el entorno R. Para ello se utilizan dos libros Microsoft Excel creados por el Dr. Antonio Rodríguez García, uno contiene los macros que agilizan el proceso, el otro es la plantilla donde se organizan los datos y a partir del cual se exportan a un archivo del tipo "texto delimitado por tabuladores".

- Abrir el libro de macros, la funcionalidad de macros debe estar habilitada en *Excel*.
- Abrir el libro plantilla de preprocesamiento (.....S0....A01....D...PMT...inraportaV...).
- Abrir un archivo de cuantificación con el programa *Excel* (la extensión del archivo es "txt", extensión no asociada a *Excel*, por ello debe usarse el menú de funciones de este programa o, alternativamente, por medio del desplegable iniciado con el botón derecho del ratón cuando el archivo está seleccionado en *Windows Explorer*).
- En el archivo de cuantificación, colocar el cursor en la casilla A1 y pulsar simultáneamente las teclas "Ctrl" y "R". Esta combinación abreviada ejecuta una macro que ordena alfabéticamente los datos en función del nombre de la sonda, selecciona todos los datos y los copia al portapapeles.
- En la pestaña "Entrada de datos", colocar el cursor en la casilla A1 y pulsar "Ctrl" y "V": la función de *Excel* invocada es "pegar valores".

- En la pestaña de Instrucciones, pulsar F9 para calcular los parámetros estadísticos de control. (Se debe evitar tocar cualquier tecla hasta que no se complete la operación, en caso contrario se detiene el cálculo).
- Guardar el nuevo libro *Excel* con los datos organizados.
- Cuando la hoja "X\_rN" está activa, ejecutar la función "guardar como archivo de texto delimitado por tabuladores", dando el nombre apropiado al archivo resultante.

## II.19. Análisis informáticos.

### II.19.1. Análisis informático de las secuencias.

El análisis y comparación de secuencias nucleotídicas y proteicas, se ha realizado con los siguientes programas:

DNASTAR (Comprehensive Microcomputer Systems for Molecular Biology; DNASTar Inc., Madison, WI EE.UU.).

Vector NTI Advance™ 9.0 (Invitrogen).

Chromas. Versión 2.3 (Technelysium).

ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Versión 1.81 ([www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/](http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/)).

#### ***A través de INTERNET se han utilizado diferentes programas y bases de datos:***

EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Alemania): [www.ebi.ac.uk/](http://www.ebi.ac.uk/).

GenBank (GenBank Genetic Sequence Data Bank; Los Álamos National Laboratory, EEUU): [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Blast: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Simulador *in silico* de experimentos de biología molecular: <http://insilico.ehu.es>.

ClustalW: [www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/).

Fasta Search Form: [www.ebi.ac.uk/fasta33/](http://www.ebi.ac.uk/fasta33/).

Primer3 (v.0.4.0): <http://frodo.wi.mit.edu/>.

PubMed: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

Base de datos del genoma de *Streptomyces*: <http://streptomyces.org.uk/>

### II.19.2. Tratamiento estadístico de los datos.

Los datos obtenidos del experimento con micromatrices fueron normalizados y analizados estadísticamente por medio del paquete limma incluido en el proyecto Bioconductor que utiliza el entorno R (Smyth y Speed, 2003; Smyth, 2004). Los comandos introducidos en R se listan en el material suplementario. Estas herramientas de análisis se eligieron porque incorporan los métodos más fiables de normalización y de análisis estadístico. Asimismo, permiten la posibilidad de incluir en los resultados estadísticos la información de las sondas duplicadas (Smyth, 2005). Finalmente, limma proporciona una gran facilidad para el análisis de distintos diseños experimentales y contrastes entre las condiciones (Smyth, 2004).

Los datos de cuantificación, preprocesados según se ha detallado en el apartado anterior, se incorporaron directamente al espacio de trabajo abierto en R. Como paso inicial se obtuvieron las señales netas de fluorescencia, para cada punto y para cada fluoróforo. Este paso

consiste simplemente en restar de la señal total del punto, la señal de fluorescencia del fondo. Ambos valores los proporciona *FeatureExtraction*.

En las operaciones de normalización y de ajuste del modelo lineal se utilizaron pesos, con valores entre 0 y 1, como estimadores de la calidad de las señales correspondientes a cada punto. El valor final de peso de cada punto es la multiplicación del peso por hibridación y el peso estimado por punto. Para la estimación del peso por hibridación se utilizó el método de Ritchie y col. (2006) que se encuentra implementado en la versión de limma utilizada (2.8.1).

Para obtener el peso estimado por punto se utilizaron como indicadores de calidad los parámetros Booleanos que proporciona *FeatureExtraction*. Se realizó un proceso preliminar de normalización y ajuste del modelo lineal (véase el siguiente párrafo), en el que se asignó un peso igual a 1 a los valores de los puntos correspondientes a sondas cromosómicas (es decir, todos cuentan por igual). En este proceso de normalización y ajuste —y también en el final— se excluyeron los valores de los puntos correspondientes a controles o a sondas de genes plasmídicos (bien asignándoles un peso igual a 0, o bien eliminando los valores correspondientes). Una vez calculados los valores Mg iniciales (véase el siguiente párrafo), se calculó la varianza entre las réplicas biológicas y de cada punto para estimar los pesos por punto. Los detalles del procedimiento se encuentran en el material suplementario.

Se aplicaron un procedimiento de normalización local y otro total, como recomienda Wu y colaboradores (2005). Como valores de partida, se obtuvieron los logaritmos de base 2 del cociente de la señal Cy3 por la señal Cy5 de cada punto (correspondientes respectivamente a la fluorescencia generada por ADNc y ADNg). Para la normalización local (*print-tip normalization*), se calcularon las medianas ponderadas para cada bloque de impresión (48 en cada micromatriz; las sondas de un mismo bloque están impresas por una misma punta de la impresora; de esta forma se descuenta la variabilidad técnica debida a las diferencias entre puntas y la variabilidad espacial). Posteriormente, para la normalización total, se utilizó el procedimiento Loess (Smyth y Speed, 2003).

Los resultados finales de estas operaciones están constituidos por los valores numéricos Mg, Mc (ambos logarítmicos) y  $p$  (valores de probabilidad entre 0 y 1). La denominación Mg hace referencia a la media de los valores normalizados  $\log_2$  (señal neta Cy3 / señal neta Cy5) correspondientes a un gen en una determinada condición experimental. Hay, por tanto, un total de 23184 valores Mg en los resultados obtenidos (7728 genes x 3 condiciones experimentales). Estos valores son especialmente significativos en cuanto que son aproximadamente proporcionales a la cantidad de transcrito (Mehra y col., 2006). Para saber la cuantía de una transcripción diferencial entre dos condiciones experimentales, limma proporciona valores M de contraste o Mc. Se calculan simplemente con la resta "Mg de la condición problema (un mutante)" menos "Mg de la condición de referencia (cepa silvestre)". Dado que en este estudio hay 3 condiciones experimentales, las comparaciones posibles son 3. Finalmente, los valores  $p$  proporcionados por limma dan la significación estadística a los resultados de los contrastes.

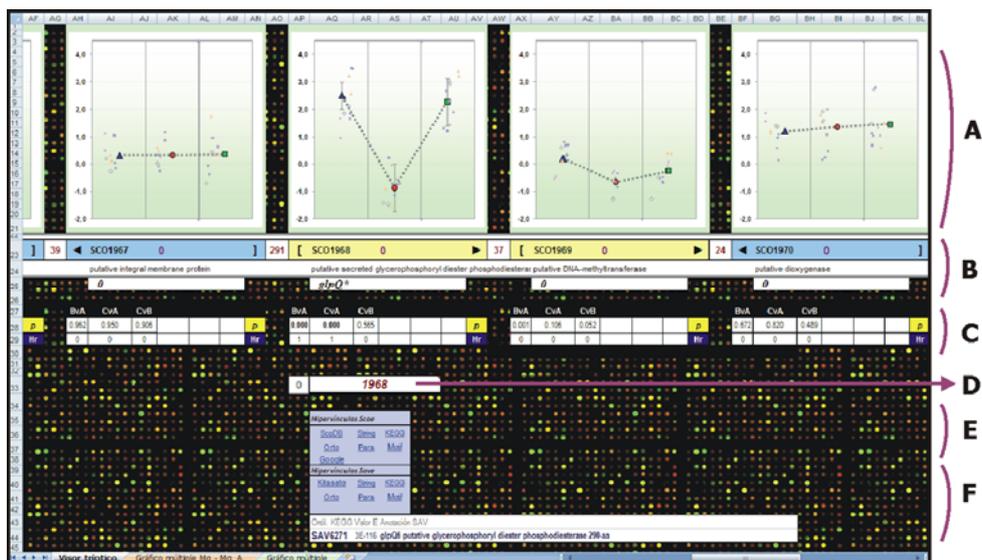
Para obtener el conjunto de genes que se consideran como diferencialmente expresados, se corrigieron los valores  $p$  para pruebas múltiples por el método FDR ("false-discovery rate method"). Como complemento a estos resultados estadísticos por el procedimiento limma, se utilizó el método no paramétrico *Rank Products* (Breitling y col., 2004) que proporciona un valor de probabilidad  $pfp$  ("proportion of false positives"), ya corregido para pruebas múltiples. Para cada contraste, se consideró un resultado como estadísticamente significativo si a) el valor  $p$  corregido por FDR  $<0,05$ ; o si b) el valor  $pfp <0,05$  y el valor  $p$  no corregido  $<0,05$ .

### II.19.3. Procesado de los datos de micromatrices.

Los datos obtenidos en los experimentos con micromatrices fueron procesados con ayuda de un libro Excel creado por el Dr. Antonio Rodríguez García (Material suplementario). El libro presenta tres etiquetas: visor tríptico, gráfico múltiple Mg - Mg A, y gráfico múltiple.

El visor tríptico consiste en una hoja donde se pueden visualizar los resultados transcriptómicos obtenidos (Figura II.6), de tal manera que al introducir en la casilla situada debajo de los gráficos el nombre de un gen o su SCO, se obtiene una imagen donde se puede observar (de la parte superior a inferior):

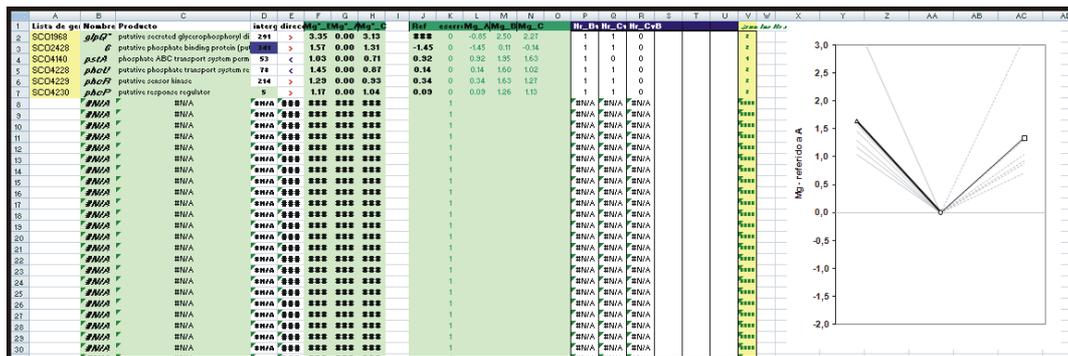
- A. El perfil de transcripción de ese gen y de sus adyacentes en los mutantes *S. coelicolor* M145:Δ0877 (izquierda) y *S. coelicolor* M145:Δ07173 (derecha) en relación con la cepa parental (central). En esta imagen también se observan las desviaciones obtenidas y los puntos dispersos son los valores individuales de las réplicas para cada punto (réplicas técnicas y biológicas). El eje Y es el valor Mc.
- B. La denominación SCO del gen, la dirección en la que se transcribe, la distancia intergénica, el producto del gen y si posee un nombre en concreto. También se muestran en diferentes colores (azul o amarillo) aquellos genes que forman parte del mismo operón.
- C. El resultado de cada gen para cada contraste BvA, CvA y CvB (A: *S. coelicolor* M145, B: *S. coelicolor* M145:Δ0877 y C: *S. coelicolor* M145:Δ7173), el valor *p* obtenido y si es gen es GES sobreexpresado (1), GES subexpresado (-1) o si no es GES (0).
- D. La casilla donde se introduce el nombre del gen o su SCO.
- E. Una serie de hipervínculos que conducen a diferentes bases de datos gran parte de ellas de *S. coelicolor*.
- F. Un serie de hipervínculos que conducen a diferentes bases de datos de *S. avermitilis*. El gen ortólogo de *S. avermitilis* junto con su anotación correspondiente y el "valor e" obtenido.



**Figura II.6:** Imagen del visor tríptico del libro de procesado de datos transcriptómicos.

El gráfico múltiple Mg – Mg A permite la creación del perfil de transcripción de aquellos genes que se deseen obtenidos en el experimento pero referidos al Mg obtenido por la cepa parental (Figura II.7). De tal modo que la transcripción de la cepa parental equivale a cero y la de los mutantes se sitúa por encima o debajo. Además también se incorpora en el perfil el valor medio obtenido para el grupo de genes seleccionados (líneas negras).

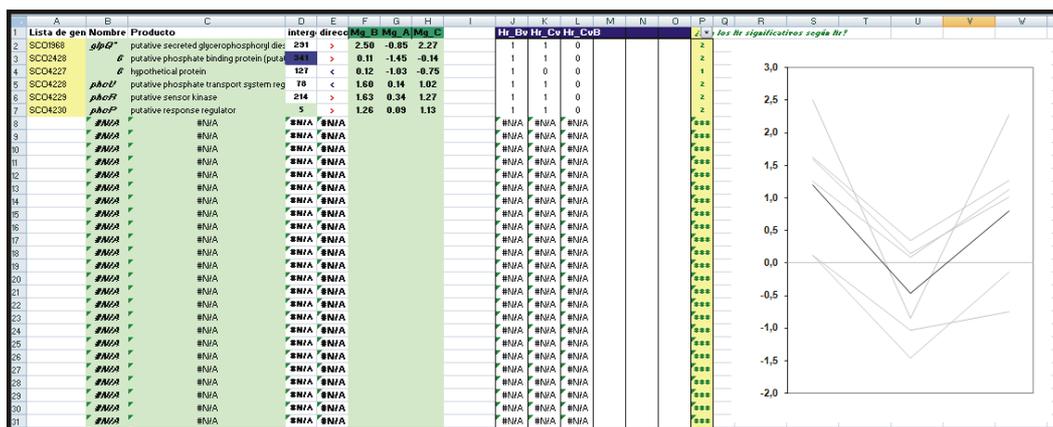
En esta imagen se pueden observar también el nombre de los genes, su producto, la separación intergénica, la dirección de transcripción, el valor Mg, si son GES y si están sobreexpresados o subexpresados.



**Figura II.7:** Imagen del gráfico múltiple Mg – Mg A del libro de procesamiento de datos transcriptómicos.

El gráfico múltiple permite la creación del perfil de transcripción de aquellos genes que se deseen obtenidos en el experimento (Figura II.8). Al igual que el anterior también incorpora en el perfil el valor medio obtenido para el grupo de genes seleccionados (líneas negras), así como la restante información.

Esta forma de visualizar los datos aporta mucha información ya que se conoce en todo momento la transcripción de la cepa parental, aunque el gráfico múltiple Mg – Mg A permite visualizar los resultados de una forma más clara.



**Figura II.8:** Imagen del gráfico múltiple del libro de procesamiento de datos transcriptómicos.

Una vez obtenidos los resultados transcriptómicos con la lista de GES, se agruparon los distintos genes en base a las diferentes funciones o categorías funcionales en las que estuvieran implicados. Algunos genes se introdujeron en más de una categoría, por ejemplo *whiA* está incluido en diferenciación morfológica y en regulación, y otros genes no se incluyeron en ninguna porque o bien su función es desconocida o fue imposible establecer una correlación o comentario.



## ***Resultados y Discusión***

---



### III.1. Identificación de genes LAL en el genoma de *Streptomyces coelicolor*.

El análisis del genoma completo de *S. coelicolor* permitió identificar 23 marcos abiertos de lectura (ORFs) que se podrían asignar a la familia LuxR de reguladores transcripcionales. Entre ellos se pueden seleccionar 14 que parecen pertenecer a la subfamilia LAL, dado que comparten las siguientes características: motivo HTH (hélice-giro-hélice) de unión a ADN en la región carboxilo terminal, sitio de unión a ATP/GTP en la región amino terminal y un tamaño no inferior a 800 aminoácidos (Tabla III.1).

Reguladores de la familia LuxR identificados en el genoma de <i>S. coelicolor</i>			
Proteína	Número de aminoácidos	Motivo unión ATP/GTP	Posible regulador LAL
SCO0132	919	SI	SI
SCO0712	941		
SCO0877	888	SI	SI
SCO1331	780	SI	SI
SCO1351	912	SI	SI
SCO2686	338		
SCO3665	327		
SCO3666	394		
SCO4263	1251		
SCO4276	223		
SCO4768	203		
SCO5065	943	SI	SI
SCO5506	1091	SI	SI
SCO6029	220		
SCO6193	943	SI	SI
SCO6334	892	SI	SI
SCO6993	606	SI	
SCO7093	932	SI	SI
SCO7134	923	SI	SI
SCO7137	924	SI	SI
SCO7143	937	SI	SI
SCO7173	908	SI	SI
SCO7295	988	SI	SI

**Tabla III.1:** Reguladores de la familia LuxR identificados en el genoma de *S. coelicolor*. Se indica el número de aminoácidos de la proteína y la presencia/ausencia de motivos de unión ATP/GTP.

## III.2. Estudios de expresión diferencial de genes LAL bajo diferentes condiciones de cultivo.

Se ensayaron medios de cultivo definidos y medios complejos. Era de esperar que en medios complejos se produjese la expresión diferencial de genes LAL implicados en metabolismo secundario puesto que la producción de metabolitos secundarios se dispara en estos medios. Por el contrario la misma debe verse afectada negativamente en medios definidos (mínimos), donde la producción de metabolitos secundarios es generalmente pobre.

### III.2.1. Selección de medio y condiciones de cultivo.

Haciendo una revisión de la bibliografía publicada en *Streptomyces* aparecen tres medios que son frecuentemente utilizados en estudios de genómica funcional: SMM (Kieser y col., 2000; Hesketh y col., 2002), R2YE y MG. El medio por el que nos decantamos fue el medio MG (Doull y Vining, 1989) debido a que era el que más se ajustaba a nuestras necesidades y nos permitía realizar comparaciones de nuestros resultados con los otros miembros del consorcio pertenecientes al proyecto de investigación.

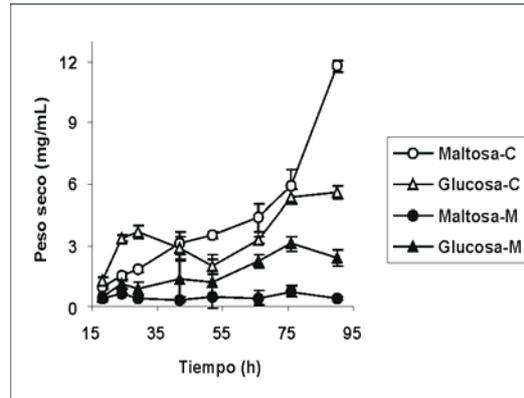
Se ensayaron diferentes condiciones de cultivo:

- Maltosa como fuente de carbono.
- Glucosa como fuente de carbono.
- Almidón como fuente de carbono.
- Cultivos en agitación a 250 rpm.
- Cultivos en agitación a 300 rpm.
- Presencia o ausencia de extracto de levadura, ya que el medio MG descrito era un medio definido y nosotros necesitábamos un medio complejo.

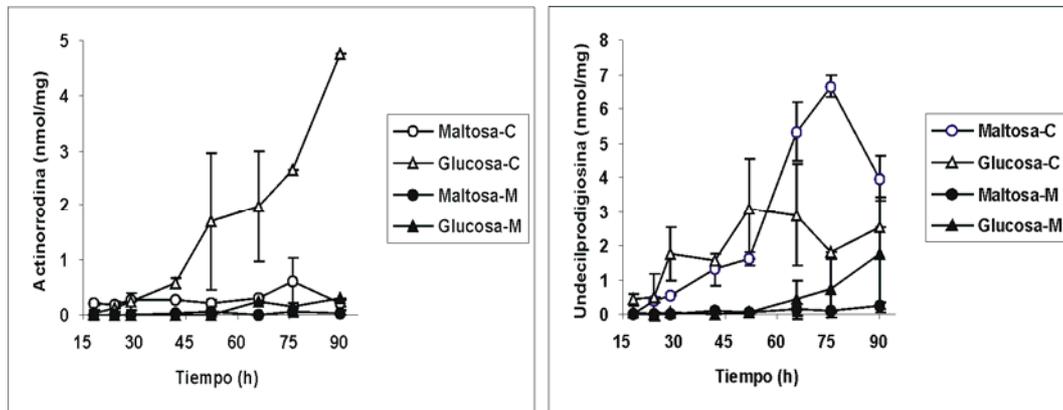
El almidón podría constituir una buena fuente de carbono; sin embargo, se desestimó su uso puesto que se observaba un retraso en la producción de antibióticos respecto a las otras fuentes de carbono ensayadas (datos no mostrados), esto no resulta conveniente puesto que cuanto más se retrase la producción de antibiótico más se retrasa la expresión de genes relacionados y la calidad del ARN disminuye con el transcurso del tiempo de cultivo. Lo mismo ocurría cuando se usaba 250 rpm en lugar de 300 rpm (datos no mostrados).

Mediante el uso de glucosa como fuente de carbono (Figura III.1) se obtuvo una producción de antibióticos pigmentados en torno a 3-5 nmol/mg en medio complejo, ambos claramente apreciables (Figura III.2). Sin embargo, cuando se utilizó maltosa como fuente de carbono (Figura III.1) se detectaron bajos niveles de producción de actinorrodina, así que aunque la producción de undecilprodigiosina era muy buena se optó por usar en los sucesivos experimentos glucosa como fuente de carbono y una agitación orbital de 300 rpm (Figura III.2).

Evidentemente como era de esperar, los niveles de producción de los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina fueron mucho menores (más del 90 %) en el medio definido que en el complejo (Figura III.2). Es necesario destacar que los niveles de producción pueden variar entre fermentaciones debido a varios factores: el uso de diferentes agitadores orbitales a pesar de tener la misma excentricidad, la antigüedad del medio de cultivo usado, la temperatura exterior, el volumen de esporas añadidas, etc. Debido a estas razones en cada fermentación siempre se han introducido los controles oportunos y se ha procurado minimizar las variables en aquellos experimentos que requieren una mayor precisión.



**Figura III.1:** Curva de crecimiento de la cepa *S. coelicolor* M145 a 30 °C y 300 rpm, en medio MG complejo (C) y definido (M) con maltosa o glucosa como fuente de carbono.



**Figura III.2:** Producción de actinorrodina y undecilprodigiosina (nmol/mg) de la cepa *S. coelicolor* en medio MG complejo (C) y definido (M) con maltosa o glucosa como fuente de carbono.

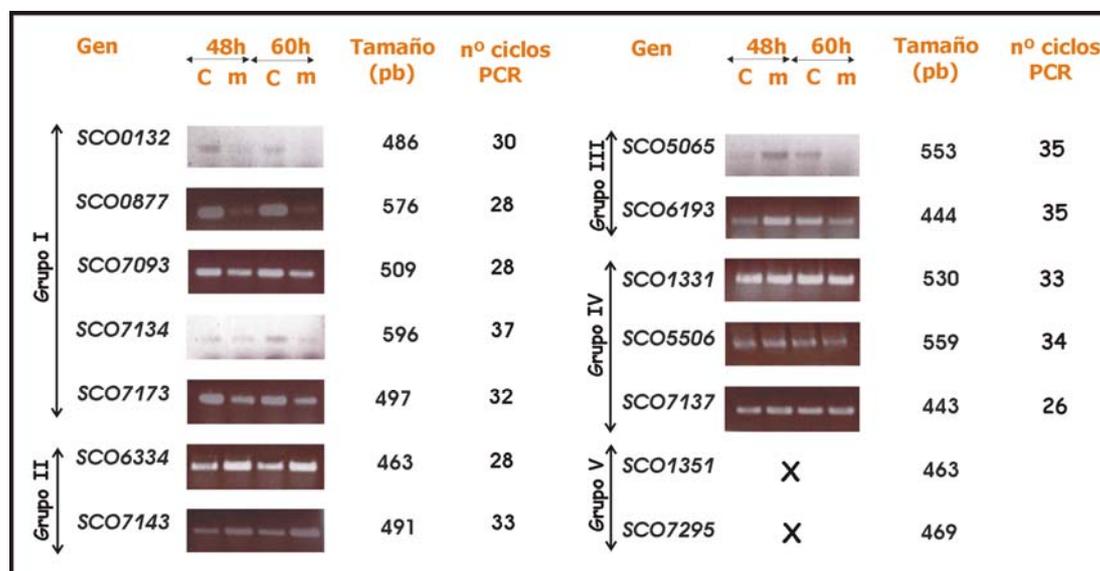
### III.2.2. Expresión diferencial de genes LAL en las condiciones de cultivo seleccionadas.

Para la extracción de ARN (apartado II.6.2) se eligieron dos tiempos, uno a las 48 horas cuando el cultivo se encuentra al principio de la fase estacionaria y otro a las 60 horas cuando el cultivo se encuentra en plena fase estacionaria. Una vez extraído el ARN total de cada condición de cultivo (medio complejo y definido) a los tiempos indicados, se usó para determinar el patrón de expresión mediante experimentos de RT-PCR. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos, entre 18 y 25 pb de longitud (Material Suplementario), que permitían la obtención de un producto de amplificación entre 400-600 pb situado en la zona 5' de la secuencia nucleotídica del gen de interés. De este modo se pretendía evitar falsos negativos derivados de la posible degradación del ARN.

En todo momento se usó como control endógeno el gen codificante del factor  $\sigma$  principal de *S. coelicolor* (*SCO5820*; *hrdB*) de expresión constitutiva, que codifica para la subunidad mayor del factor sigma. Para verificar que el ARN no estaba contaminado con restos de ADN se introdujo en cada serie de reacciones un control negativo, donde se sustituyeron las enzimas con

actividades transcriptasa reversa y polimerasa por la enzima Platinum Taq con tan sólo actividad polimerasa.

El resultado esperado de la amplificación fue predicho mediante la introducción de las secuencias de los oligonucleótidos diseñados en el simulador *in silico* de experimentos de biología molecular (<http://insilico.ehu.es>).

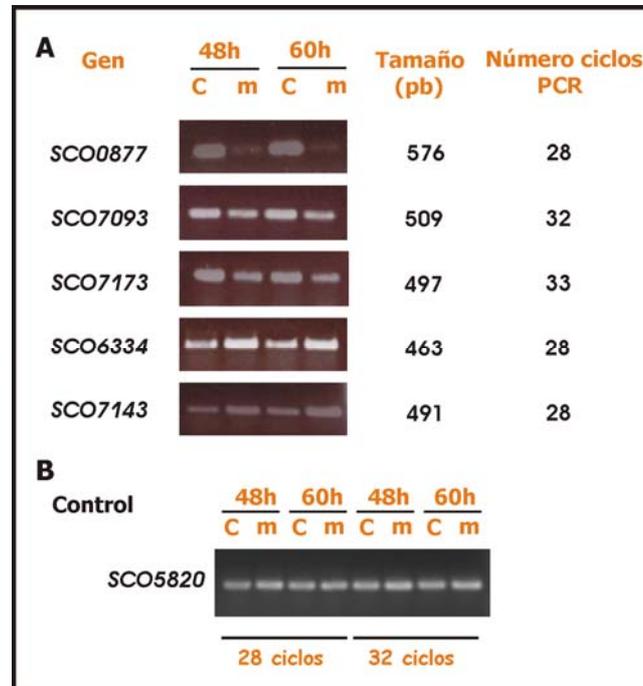


**Figura III.3:** Análisis de la expresión de los hipotéticos genes LAL mediante RT-PCR a tiempo final. El análisis se llevó a cabo en medio complejo (C) y definido (m) a las 48 horas y 60 horas de cultivo. Se indica el tamaño de banda amplificada y el número de ciclos empleado en cada reacción. No se obtuvo expresión en el caso de los genes *SCO1351* y *SCO7295* (X, ver párrafo siguiente).

El patrón de expresión de los genes fue muy variado, algunos presentaron una mayor expresión en medio complejo (Figura III.3, grupo I) y otros en medio mínimo (Figura III.3, grupo II). También se encontraron dos genes: *SCO5065* y *SCO6193* que presentaban una mayor expresión en el medio MG mínimo a tiempos cortos, mientras que a tiempos largos (60 horas) existía una mayor expresión en el medio complejo (Figura III.3, grupo III). Por otro lado, había genes cuyo patrón de expresión no sufría cambios en función de la composición del medio (Figura III.3, grupo IV). Finalmente, no se detectó expresión de los genes *SCO1351* y *SCO7295* bajo ninguna de las condiciones ensayadas incluso tras 40 ciclos de amplificación y una concentración de ARN de hasta un microgramo, lo cual indicaba que estos genes o no se expresaban, o poseían unos niveles de expresión muy bajos en comparación con el resto de genes ensayados (Figura III.3, grupo V).

En base a lo indicado anteriormente, se seleccionaron aquellos genes cuyo patrón de expresión difería claramente en medio complejo y definido (Figura III.4A), ya que es de esperar que en medios complejos se produzca la expresión de los genes LAL puesto que la producción de metabolitos secundarios se dispara en estos medios y la misma se verá afectada negativamente en medios definidos. Teniendo en cuenta esto, se seleccionaron los genes *SCO0877*, *SCO7093* y *SCO7173* ya que presentaban un patrón de expresión mayor en el medio complejo cuando se usó un número de ciclos relativamente bajo. El gen *SCO7134* presenta un patrón de expresión superior en medio complejo pero dicho patrón tan sólo se observó cuando se usaron un elevado número de ciclos, lo que indica que su nivel de expresión es bajo, por lo que no se seleccionó para un estudio posterior. El gen *SCO0132* tampoco fue seleccionado debido a su patrón de expresión poco definido.

Los genes *SCO6334* y *SCO7143* también fueron seleccionados ya que presentaban un patrón de expresión superior en el medio definido cuando se usaron 28 y 33 ciclos respectivamente; éste patrón también fue observado a menos ciclos pero la diferencia no era tan clara.



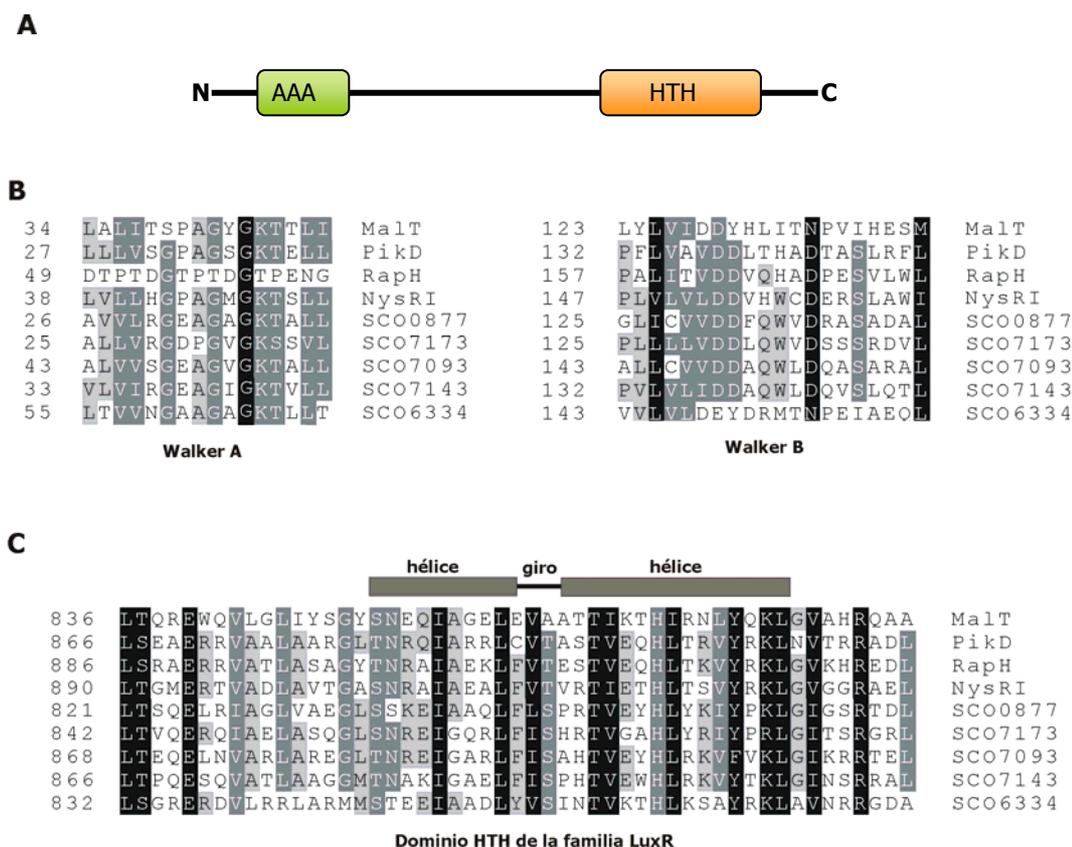
**Figura III.4:** Análisis de la expresión de los genes LAL seleccionados (A) y del gen usado como control endógeno (B), mediante RT-PCR a tiempo final. El análisis se llevó a cabo en medio complejo (C) y definido (m) a las 48 horas y 60 horas de cultivo. Se indica el tamaño de banda amplificada y el número de ciclos empleado en cada reacción.

### III.3. Análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas seleccionadas.

Un análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de estos genes con las secuencias de proteínas de las bases de datos mostró analogías con proteínas pertenecientes a la familia de reguladores LuxR.

En la Figura III.5 se muestran fragmentos del alineamiento realizado con las proteínas MalT (*E. coli*) que es el regulador positivo del regulón de la maltosa (Boos y col., 1998), PikD de la ruta de biosíntesis de la picromicina en *Streptomyces venezuelae* (Wilson y col., 2001), RapH de la ruta de biosíntesis de la rapamicina en *S. hygroscopicus* (Aparicio y col., 1996; Molnár y col., 1996) y NysRI de la ruta de biosíntesis de la nistatina en *S. noursei* (Brautaset y col., 2000).

Todas estas proteínas se caracterizan por tener dominios de unión a ATP/GTP en su zona amino terminal con la presencia de los motivos conservados Walker A (GxxxxGK[ST]) y B (hhh[DE]) (Walker y col., 1982), estos motivos son característicos de una gran familia de ATPasas que ha sido asociada con diversas actividades celulares incluyendo la regulación del ciclo celular y la degradación y el transporte de proteínas, por lo que su presencia sugiere que la actividad que desempeña es dependiente de la hidrólisis de ATP. Además estas proteínas presentan un dominio de unión al ADN en su zona carboxilo terminal con un motivo conservado hélice-giro-hélice (HTH "helix turn helix") (SMART 00421).



**Figura III.5:** Dominios estructurales y alineamiento de parte de las secuencias aminoacídicas de los genes LAL seleccionados. (A) Dominios estructurales de los genes LAL. AAA, dominio característico de ATPasas asociadas con diversas actividades celulares (InterPro no. IPR003593); HTH, dominio de unión a ADN de tipo LuxR (SMART 00421).

(B) Comparación de los motivos Walker A y Walker B de la parte N-terminal de los genes LAL seleccionados con los de otros reguladores de la subfamilia LAL. Malt es el regulador del regulón de la maltosa en *E. coli* y PikD, RapH y NysRI son reguladores de la subfamilia LAL identificados en algunas agrupaciones génicas responsables de la biosíntesis de picromicina, rapamicina y nistatina, respectivamente.

(C) Alineamiento comparativo de la zona correspondiente al dominio de unión a ADN localizado en la zona C-terminal, con las de otros reguladores homólogos a los genes LAL seleccionados. Las barras horizontales en la parte superior representan la localización del motivo HTH de tipo LuxR en la región de unión al ADN. Los números indican los residuos de aminoácidos desde el extremo N-terminal de la proteína. Los residuos que son idénticos se indican en cajas en negra.

### III.4. SCO0877.

#### III.4.1. Análisis estructural del gen SCO0877.

El gen *SCO0877* está constituido por 2667 pb (922247-924913) y codifica una proteína de 888 aminoácidos y 91,93 kDa, con un punto isoeléctrico de 6,06.

Contiene en la zona amino terminal un motivo A de unión a ATP/GTP mientras que en la zona carboxilo terminal presenta un dominio de unión al ADN característico de proteínas LuxR. Este dominio presenta un motivo hélice-giro-hélice de unión al ADN entre los residuos 836 y 857.

### III.4.2. Análisis funcional del gen *SCO0877*.

Los resultados obtenidos de la comparación de la secuencia aminoacídica del producto del gen *SCO0877* junto con los resultados de RT-PCR sugerían que esta proteína podría estar implicada en la regulación de la producción de metabolitos secundarios. Con el fin de corroborar la funcionalidad de *SCO0877* en dicha producción se procedió a su inactivación mediante la técnica del Redirect® (sección II.16 y Figura III.6).

#### III.4.2.1. Inactivación del gen *SCO0877*.

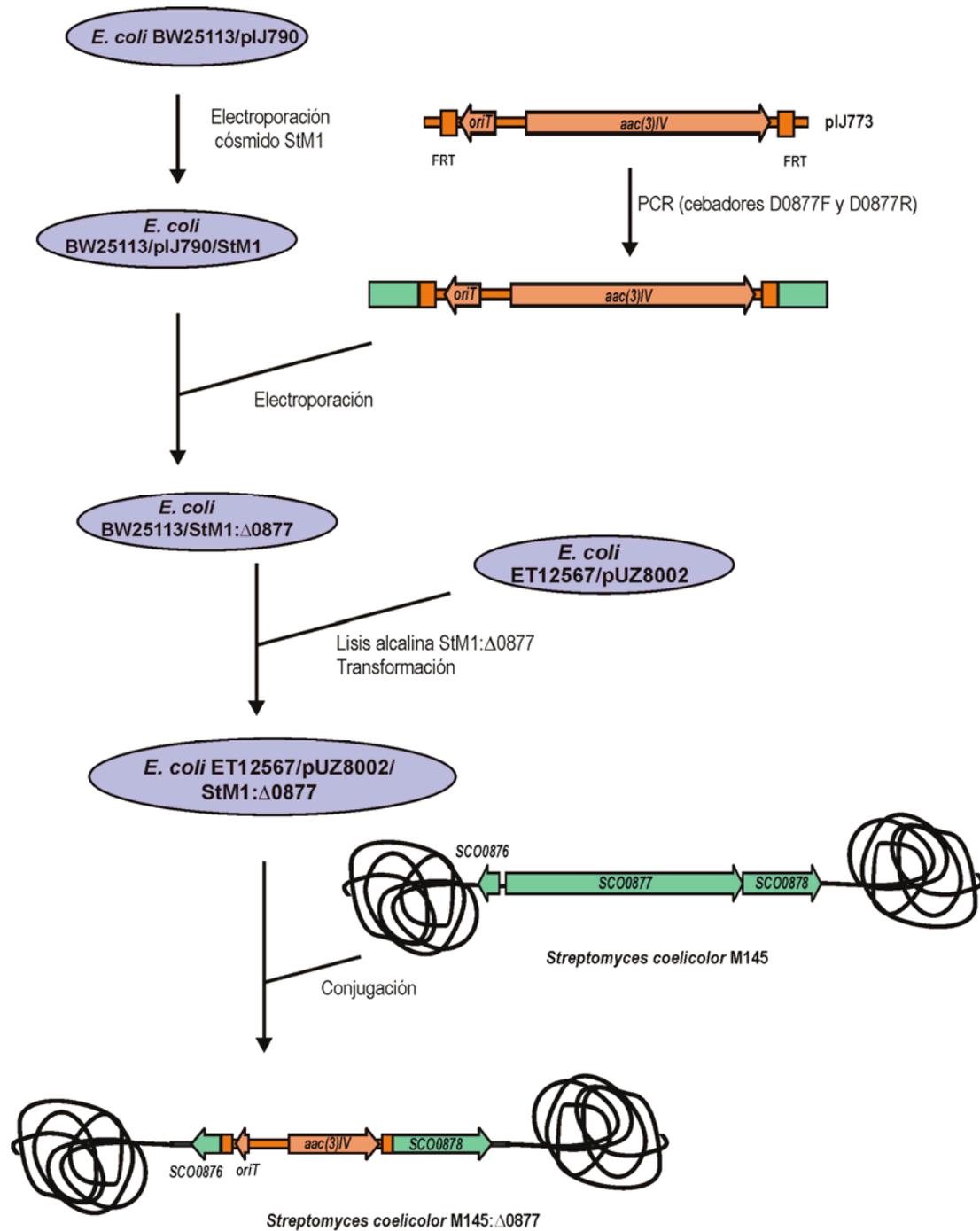
La inactivación génica se llevó a cabo reemplazando el gen por un fragmento de 1,5 kb amplificado mediante PCR a partir del plásmido pIJ773. Para ello se diseñaron un par de cebadores D0877F (5'-ccggacgcccggccgtcccccttagagtgggcttct**GTG**ATTCCGGGGATCCGTCGACC-3') y D0877R (5'-gaactcttactccagatggttacgtttcgcgatgcb**TCA**TGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'), de manera que el producto de amplificación abarcara 39 nucleótidos corriente arriba del gen a inactivar, el codón de inicio del gen, 20 nucleótidos idénticos al pIJ773, el gen de resistencia a apramicina *aac(3)IV* con el *oriT*, 19 nucleótidos idénticos al pIJ773, el codón de paro del gen a inactivar y 39 nucleótidos corriente abajo del gen (Figura III.6).

A continuación, se introdujo el cósmido StM1 que contiene el gen *SCO0877* en la cepa BW25113/pIJ790 mediante electroporación (II.16.4). Para verificar el resultado se extrajo ADN de varias colonias y se realizaron reacciones de PCR usando los oligonucleótidos diseñados para las reacciones de RT-PCR, de tal modo que se observó una banda de amplificación del tamaño esperado en todos los casos (datos no mostrados).

Una vez que se hubo incorporado el cósmido en la cepa que poseía el plásmido pIJ790 con los genes que facilitan la recombinación, era necesario introducir en dicha cepa el fragmento lineal de ADN que se había amplificado por PCR.

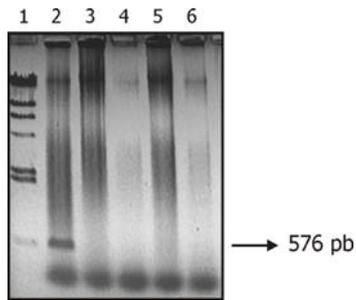
Este fragmento lineal, porta 39 ó 38 nt idénticos a los genes adyacentes al gen que se desea inactivar, el codón de inicio y fin de dicho gen, el gen de resistencia a apramicina y los sitios FRT, además también posee un origen de transferencia necesario para permitir la posterior movilización del cósmido a *Streptomyces*.

Por lo tanto, el casete de resistencia amplificado fue introducido mediante electroporación en la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790/StM1. La electroporación se llevó a cabo según el protocolo descrito en la sección II.16.5 de materiales y métodos.



**Figura III.6:** Estrategia seguida para la inactivación del gen *SCO0877* de *S. coelicolor*. Las zonas correspondientes al plásmido pIJ773 están indicadas en naranja y las zonas de *S. coelicolor* en verde.

De este modo y tras varios intentos y modificaciones del protocolo original (ver materiales y métodos apartado II.16.5), se consiguió el reemplazamiento del gen *SCO0877* presente en el cósmido StM1 en *E. coli* (StM1:Δ0877). Para verificar que el gen había sido sustituido por el casete, se llevaron a cabo reacciones de PCR usando los oligonucleótidos 0877-S y 0877-AS (Material Suplementario) como cebadores, éstos amplificaron un fragmento interno del gen, de tal modo que la reacción que contenía ADN del cósmido con el gen *SCO0877* intacto presentaba una banda de amplificación de 576 pb; sin embargo, cuando el gen había sido reemplazado no se observaba dicha banda de amplificación (Figura III.7).



**Figura III.7:** Análisis por PCR para comprobar la existencia del gen *SCO0877* en el cósmido StM1 (carril 2) y su inexistencia en las colonias de *E. coli* Apra<sup>R</sup> Km<sup>S</sup> 2, 9, 70 y 164 (carriles del 3 al 6). Carril 1: ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción *HindIII*.

*S. coelicolor* posee un potente sistema de restricción que puede ser superado mediante el pase del ADN a través de una cepa de *E. coli* dam<sup>-</sup> dcm<sup>-</sup> (MacNeil y col, 1992). Esta cepa porta un vector conjugativo no movilizable, pUZ8002, que contiene las funciones de transferencia necesarias para que se produzca el paso de material genético de una célula a otra.

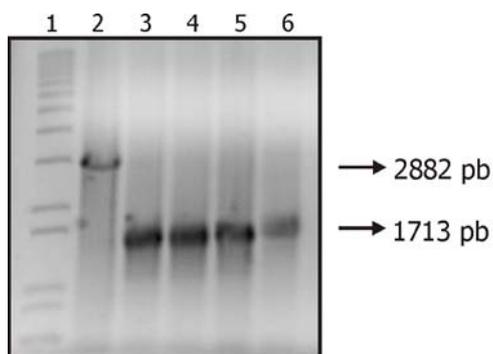
Por ello, el cósmido StM1: $\Delta$ 0877 se introdujo en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 mediante transformación (sección II.14.1). El ADN de las colonias obtenidas se analizó mediante PCR para comprobar que el cósmido con la construcción no se había perdido.

A continuación, se introdujo en *Streptomyces* la construcción que previamente había sido hecha en *E. coli* mediante conjugación intergenérica (sección II.15). Como resultado se obtuvieron 180 colonias exconjugantes que fueron seleccionadas en un primer paso por su resistencia a apramicina, lo cual indicaba que se había incorporado el casete generado por PCR.

En una segunda selección, con cada colonia obtenida se hicieron réplicas en placas de MS-agar con apramicina y en placas de MS-agar con kanamicina. Y finalmente, tras dos pases por estas placas se obtuvieron 4 parches Apra<sup>R</sup> (apramicina resistentes) y Km<sup>S</sup> (kanamicina sensibles) los cuales se sembraron en medio de esporulación TBO (Higgins y col., 1974). Esto sugería que se había producido el doble sobre cruzamiento incorporándose el casete generado por PCR y perdiéndose el resto del cósmido con el marcador de resistencia a kanamicina.

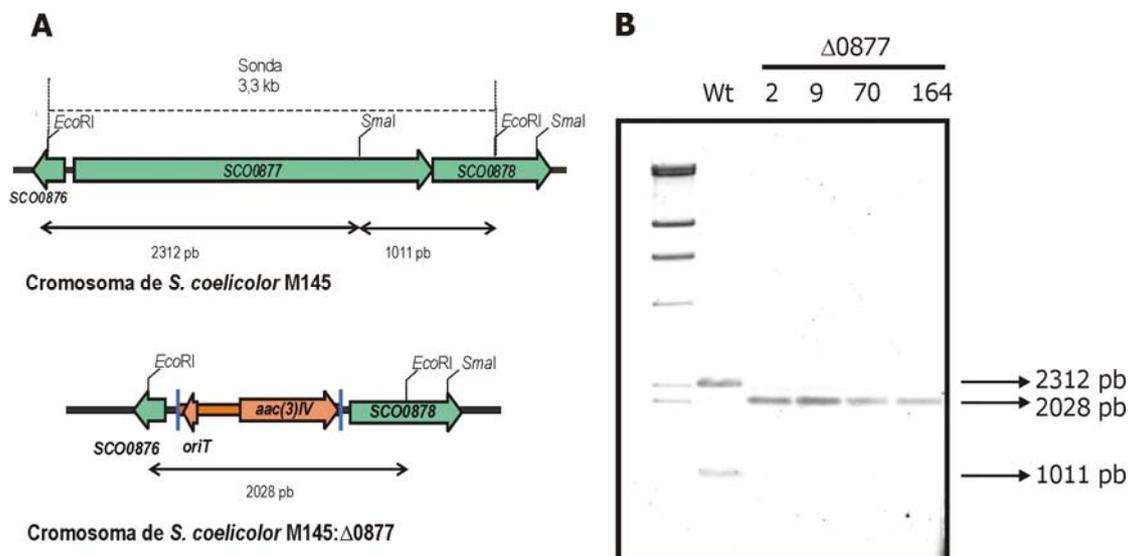
Tras una semana de crecimiento y esporulación, se obtuvieron esporas de los cuatro clones Apra<sup>R</sup> y Km<sup>S</sup>, para crecerlos en cultivo líquido (medio YEME) y extraer el ADN (sección II.6.1.4) necesario para realizar un estudio de hibridación de Southern (sección II.11 y II.12).

Como estudio previo al Southern se realizó una PCR con los oligonucleótidos C0877D1/C0877R que amplifican fuera de la zona de recombinación del fragmento lineal obtenido por PCR (Figura III.8). Si el gen había sido sustituido por el casete de apramicina, en el carril correspondiente a los exconjugantes se observaría una banda de amplificación de 1713 pb, mientras que en el carril correspondiente a la cepa parental se observaría una banda de 2882 pb. El resultado fue el esperado.



**Figura III.8:** Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen *SCO0877*. Carril 1, marcador comercial de 1 kb; carril 2, ADN de la cepa parental *S. coelicolor* M145; carriles 3 a 6, ADN correspondiente a las colonias de *Streptomyces* Apra<sup>R</sup> Km<sup>S</sup> 2, 9, 70 y 164.

Para confirmar el resultado obtenido mediante PCR se realizó una hibridación de Southern (Figura III.9). Para ello el ADN de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y el de los clones Apra<sup>R</sup> y Km<sup>S</sup> se digirió con las enzimas *Sma*I-*Eco*RI (Figura III.9A), y después de separar los fragmentos del ADN digerido mediante electroforesis, éstos se transfirieron a un filtro de nilón (sección II.11). El filtro se hibridó con una sonda *Eco*RI de 3,3 kb, marcada con digoxigenina (sección II.12). Dicha sonda se obtuvo mediante la digestión del cósmido StM1 con *Eco*RI y la extracción y purificación de la banda de 3,3 kb (sección II.10.1.1).



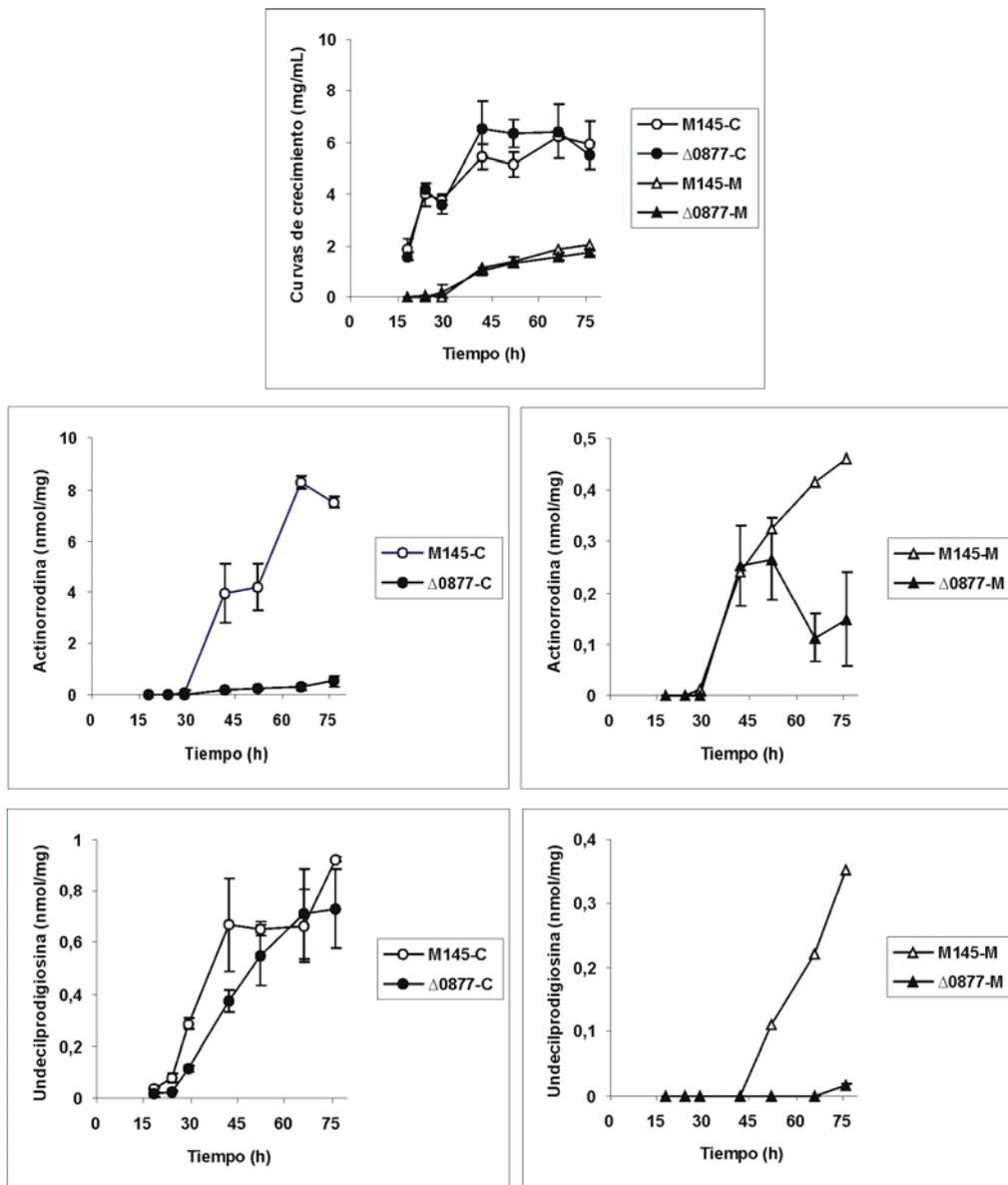
**Figura III.9:** Comprobación mediante Southern de los posibles exconjugantes  $\Delta 0877$ . (A) Mapa del cromosoma de *S. coelicolor* M145 y del mutante *S. coelicolor* M145: $\Delta 0877$ . Se indica la sonda usada en la hibridación. (B) Hibridación Southern del ADN de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 (Wt) y de las cepas *S. coelicolor* M145: $\Delta 0877$  (exconjugantes 2, 9, 70 y 164) digerido *Sma*I-*Eco*RI, utilizando como sonda un fragmento *Eco*RI. Las señales obtenidas corresponden al patrón de restricción indicado en (A).

Al hibridar con la sonda, el diseño del experimento permitió diferenciar dos bandas de 2312 pb y 1011 pb, cuando no se había producido el doble sobrecruzamiento, y tan sólo una banda de 2028 pb cuando se había producido la recombinación y el gen *SCO0877* había sido inactivado (Figura III.9B).

#### III.4.2.2. Análisis de la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en el mutante *Streptomyces coelicolor* M145: $\Delta 0877$ .

Con el fin de estudiar el efecto que la inactivación del gen *SCO0877* tiene en la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina, se seleccionó al azar uno de los exconjugantes (*S. coelicolor* M145: $\Delta 0877$ -70) para realizar, junto con la cepa parental *S. coelicolor* M145, una fermentación en medios MG complejo y definido. Se realizaron tres réplicas de cada cultivo y se tomaron muestras de 700  $\mu$ L para valorar la producción de antibióticos y 2 mL para determinar el peso seco.

Para cuantificar la producción específica, se determinó el peso seco de cada cultivo y se relacionó con la producción volumétrica (Figura III.10).



**Figura III.10:** Curvas de crecimiento y producción específica de actinorrodina y undecilprodigiosina de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y del mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 en medio MG complejo (C) y mínimo (M).

La inactivación del gen *SCO0877* no cambió significativamente la cinética de crecimiento de la cepa (Figura III.10). No obstante, los resultados mostraron una disminución drástica de la producción de actinorrodina en el mutante tanto en el medio MG mínimo (15,6-73,2 % dependiendo del tiempo de cultivo) como complejo (93,2-96,3 %); sin embargo la producción de undecilprodigiosina del mutante tan sólo fue menor que la producción de la cepa parental en el medio MG mínimo (94 %). Por lo que la delección del gen *SCO0877* tiene un efecto claro en el metabolismo secundario. Los resultados obtenidos sugieren que *SCO0877* se comportaría como un activador transcripcional.

#### **III.4.2.3. Análisis de la producción de CDA en el mutante *Streptomyces coelicolor* M145:Δ0877.**

Para valorar la producción de antibiótico dependiente de calcio se realizaron bioensayos en medio sólido NA utilizando siempre como control negativo una placa de dicho medio en el que la cobertera añadida no contenía  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .

Los resultados obtenidos mostraron una producción de CDA del mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 similar a la de la cepa parental (no mostrado).

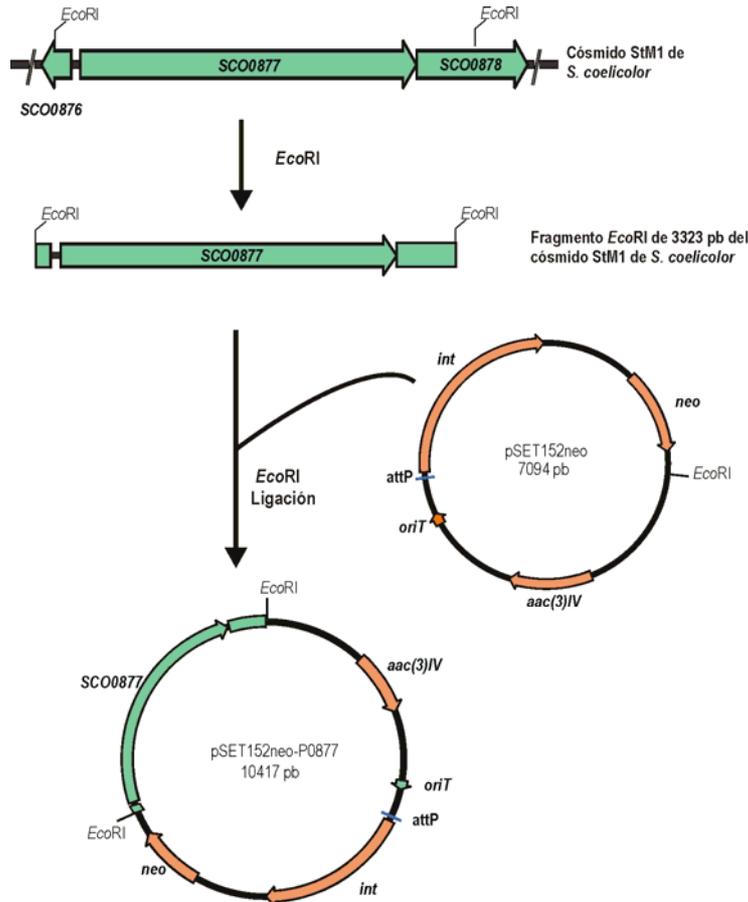
#### **III.4.2.4. La introducción del vector pSET152neo en las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* M145:Δ0877 disminuye drásticamente la producción de antibióticos pigmentados.**

Una vez comprobado el efecto que causa la inactivación del gen *SCO0877* sobre la producción de antibióticos pigmentados en *Streptomyces coelicolor* M145 se procedió a la complementación del mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 y a la introducción de una copia extra del gen *SCO0877* en la cepa parental.

Para ello se clonó el gen *SCO0877* junto a su propio promotor en el vector pSET152neo (Vicente y col., 2009), que es un vector integrativo que posee genes de resistencia a apramicina (*aac(3)IV*) y kanamicina (*neo*). La presencia en el vector de estos marcadores de resistencia nos permitió diferenciar fácilmente aquellas colonias que poseían la construcción deseada integrada en su genoma.

Para clonar el gen *SCO0877* con su correspondiente promotor se trató el ADN del cósmido StM1 con la enzima de restricción *EcoRI*, lo cual permitió liberar un fragmento de 3323 pb que cubría 193 pb corriente arriba del gen *SCO0877* para asegurarnos de que ese fragmento incluía el promotor del gen. Por otra parte se trató el ADN del vector pSET152neo con la enzima de restricción *EcoRI* (Figura III.11). Una vez purificados el vector y el fragmento, se ligaron (sección II.8.2) ambos obteniéndose el vector pSET152neo-P0877 de 10,4 kb que fue utilizado para la conjugación en las cepas *Streptomyces coelicolor* M145 y *Streptomyces coelicolor* M145:Δ0877 desde *E. coli* ET12567/pUZ8002.

En este experimento era necesario disponer de un control interno para asegurarnos de que la producción de antibióticos pigmentados no se viese afectada por la presencia en su genoma del vector pSET152neo, por lo que se introdujo mediante conjugación dicho vector tanto en la cepa *Streptomyces coelicolor* M145 como en el mutante.



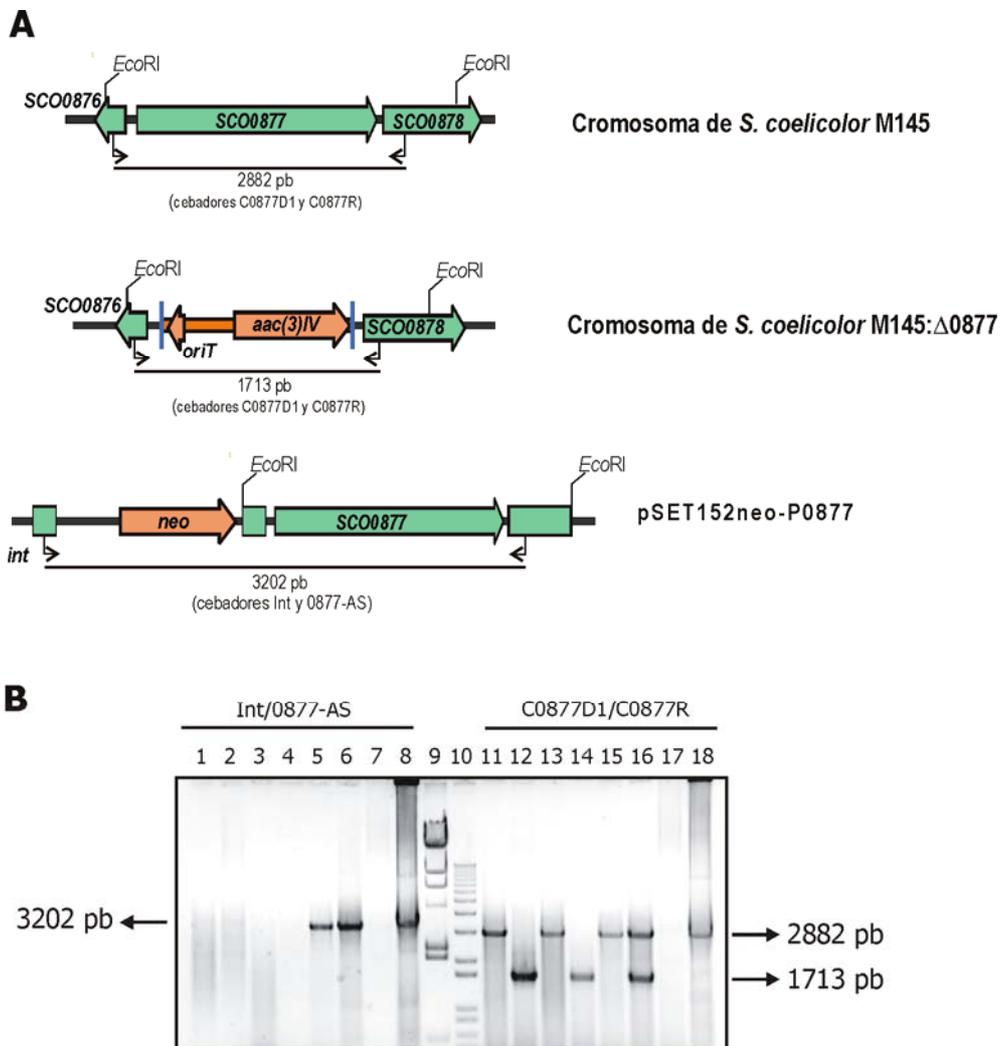
**Figura III.11:** Esquema de la construcción del plásmido pSET152neo-P0877.

Para seleccionar las colonias exconjugantes en la cepa *Streptomyces coelicolor* M145 se usaron los dos marcadores de resistencia: apramicina y kanamicina, aunque en realidad con uno de los dos ya era suficiente. Sin embargo, como la cepa *Streptomyces coelicolor* M145:Δ0877 ya contiene en su genoma el gen de resistencia a apramicina era necesario el uso de un vector con otra resistencia distinta. De este modo mediante el uso del vector pSET152neo, añadiendo al medio apramicina y kanamicina, se seleccionaron las colonias exconjugantes en el mutante.

Se obtuvieron varias colonias con el patrón de resistencia deseado para cada una de las conjugaciones, de tal modo que se seleccionó una colonia de cada una y se obtuvieron las esporas necesarias para la extracción del ADN. Para verificar que cada cepa poseía la construcción deseada integrada en su genoma se realizaron comprobaciones mediante reacciones de PCR.

Se realizaron dos reacciones de PCR (Figura III.12B), en la primera de ellas se usaron los cebadores "int" (anilla en el extremo 3' del gen que codifica para la integrasa que posee el vector pSET152neo) y 0877-AS (anilla en la zona 5' del gen *SCO0877*) (Figura III.12A). Mediante su uso nos aseguramos de que el vector pSET152neo-P0877 se haya integrado en el genoma ya que se espera una banda de amplificación de 3202 pb. En la segunda PCR se usaron los oligonucleótidos C0877D1 y C0877R (usados previamente para la comprobación de la inactivación del gen *SCO0877*). Mediante su uso diferenciamos una banda de 2882 pb cuando la copia del gen es la endógena y una banda de 1713 cuando la copia endógena del gen está reemplazada por el casete de resistencia.

En dichas reacciones se incluyeron como controles positivos y negativos el ADN genómico de las cepas *Streptomyces coelicolor* M145 (carriles 1 y 11) y *Streptomyces coelicolor* M145:Δ0877 (carriles 2 y 12) y el ADN plasmídico de los vectores pSET152neo (carriles 7 y 17) y pSET152neo-P0877 (carriles 8 y 18).



**Figura III.12:** Análisis mediante PCR para la comprobación de la incorporación de las construcciones en diferentes cepas. (A) Esquema de la localización de los cebadores usados en la PCR. (B) PCR para verificar las construcciones: carriles 1 y 11: *S. coelicolor* M145, carriles 2 y 12: *S. coelicolor* M145:Δ0877, carriles 3 y 13: *S. coelicolor* M145/pSET152neo, carriles 4 y 14: *S. coelicolor* M145:Δ0877/pSET152neo, carriles 5 y 15: *S. coelicolor* M145/pSET152neo-P0877, carriles 6 y 16: *S. coelicolor* M145:Δ0877/pSET152neo-P0877; carriles 7 y 17: pSET152neo, carriles 8 y 18: pSET152neo-P0877, carril 9: marcador de peso molecular  $\lambda$ /HindII y carril 10: marcador comercial de 1 kb. En la parte superior se indican las parejas de cebadores utilizados.

En la figura III.12 las reacciones de PCR de los carriles 1 y 11 contienen ADN de la cepa parental *S. coelicolor* M145 por lo que se obtiene la banda de 2882 pb correspondiente al gen *SCO0877* y como en su genoma no se ha introducido el vector, al usar los cebadores en los que uno de ellos anilla con el gen que codifica para la integrasa no se observa banda.

Los carriles 3 y 13 contienen ADN de la cepa *S. coelicolor* M145/pSET152neo por lo que tan sólo presentan la banda (2882 pb) correspondiente al gen *SCO0877* del genoma ya que aunque llevan el vector pSET152neo integrado en su genoma este no porta el gen por lo que no se obtiene ninguna amplificación.

Se usó ADN de la cepa *S. coelicolor* M145/pSET152neo-P0877 para llevar a cabo las reacciones de PCR de los carriles 5 y 15. Se observan la banda de 2882 pb indicando la copia endógena del gen *SCO0877* y la banda de 3202 pb indicando la integración en el genoma del vector pSET152neo-P0877 que porta una copia extra del gen.

Los carriles 2 y 12 contienen en su reacción ADN del mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 por lo que se obtiene la banda de 1713 pb indicando el reemplazamiento del gen *SCO0877* por el fragmento diseñado. Como en esta cepa no se ha introducido el vector no presenta ninguna banda de amplificación en la zona correspondiente a los cebadores Int/0877-AS.

En los carriles 4 y 14 se añadió a la reacción ADN de la cepa *S. coelicolor* M145:Δ0877/pSET152neo. En el primero de ellos no se observó ninguna banda ya que el genoma no contiene el gen *SCO0877* y en el segundo de ellos se observó la banda correspondiente al reemplazamiento del gen por la casete.

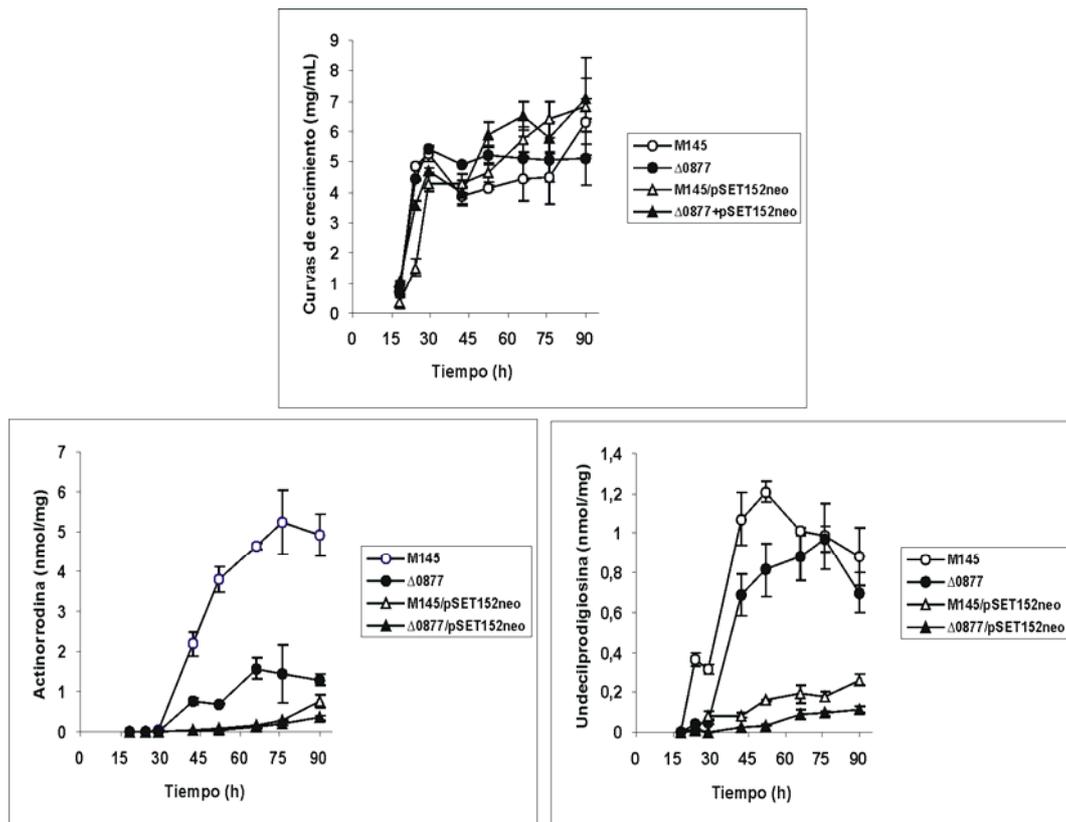
Los carriles 6 y 16 contienen ADN de la cepa *S. coelicolor* M145:Δ0877/pSET152neo-P0877 en la reacción de PCR. En el carril 16 se observan dos bandas de amplificación; la menor de ellas se corresponde con el reemplazamiento del gen *SCO0877* y la mayor con la copia exógena del gen introducido en el genoma mediante el uso del vector pSET152neo-P0877. En el carril 6 se observa la banda de amplificación de 3202 pb que indica la presencia en el genoma del vector que porta el gen y su promotor.

Los carriles 7 y 17 contienen ADN del plásmido pSET152neo. Son controles negativos por lo que no se obtiene ninguna banda de amplificación ya que no porta el gen *SCO0877*.

Los carriles 8 y 18 contienen ADN del plásmido pSET152neo-P0877. Son controles positivos observándose las bandas de 3202 pb (cuando se usa los cebadores Int/0877-AS) y de 2882 pb (cuando se usa los cebadores C0877D1/C0877R).

Para observar si la introducción del vector integrativo pSET152neo afectaba a la producción de antibióticos pigmentados se analizó la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en medio MG complejo en las cepas parental y mutante que contienen dicho vector. Dicha producción se comparó con la obtenida por las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* M145:Δ0877.

Como se observa en la figura III.13 la mera introducción del vector pSET152neo en las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* M145:Δ0877 provoca una disminución de la producción de actinorrodina del 93 %. La producción de undecilprodigiosina también se ve afectada causando una reducción de los niveles del orden del 84 % en el caso de la cepa parental y del 92 % en el caso del mutante.



**Figura III.13:** Curvas de crecimiento y producción específica de actinorrodina y undecilprodigiosina en medio MG complejo de la cepa parental *S. coelicolor* M145, del mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 y de la cepas *S. coelicolor* M145/pSET152neo y *S. coelicolor* M145:Δ0877/pSET152neo.

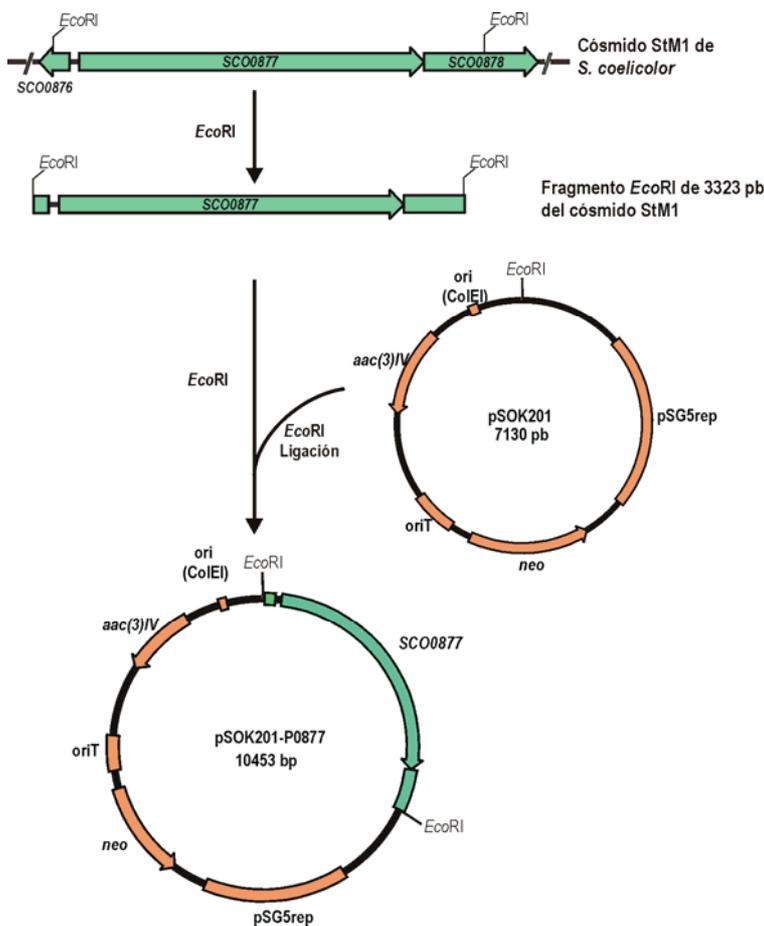
Este hecho ya había sido documentado en algunas especies de *Streptomyces* (Baltz, 1998; Combes y col., 2002; Gregory y col., 2003); también se ha descrito un fenómeno similar en *S. natalensis* en referencia a la producción del macrólido polieno pimarcina (Vicente y col., 2009). También se ha descrito una reducción de la producción de bialafos en la cepa *S. hygroscopicus* ATCC 21705 mediante el uso de vectores pTO1, un plásmido integrativo que usa la función integrativa del fago ΦC31 (Voeykova y col., 1998). Por lo que parece que este fenómeno no es específico de *S. coelicolor* o *S. natalensis* y por lo tanto, parece concebible que el uso de vectores con un lugar de integración diferente puede superar estos problemas. Teniendo en cuenta estos resultados, es probable que el incremento de la producción de pimarcina observado en la cepa silvestre que se producía al aumentar en una copia el regulador *pimM*, mediante el uso de un vector derivado del pSET152, esté infravalorado (Antón y col., 2007) y que el efecto sea mayor que el publicado.

Estos efectos posiblemente sean debidos a la integración de los plásmidos en el sitio *attB* del fago ΦC31. Además, los vectores pSET152 pueden integrarse en lugares pseudo-*attB* tanto en *S. coelicolor* como en *S. lividans* (Combes y col., 2002), por lo que esto es lo que podría estar ocurriendo en este caso.

### III.4.2.5. Efectos de la introducción del gen *SCO0877* en multicopia en la cepa *S. coelicolor* M145:Δ0877.

Debido al efecto negativo que tiene la introducción del plásmido integrativo pSET152neo sobre la producción de antibióticos pigmentados se recurrió al vector replicativo pSOK201 ( $apra^R$  y  $km^R$ ) para observar el posible efecto de la introducción de dicho gen en varias copias extra en el mutante.

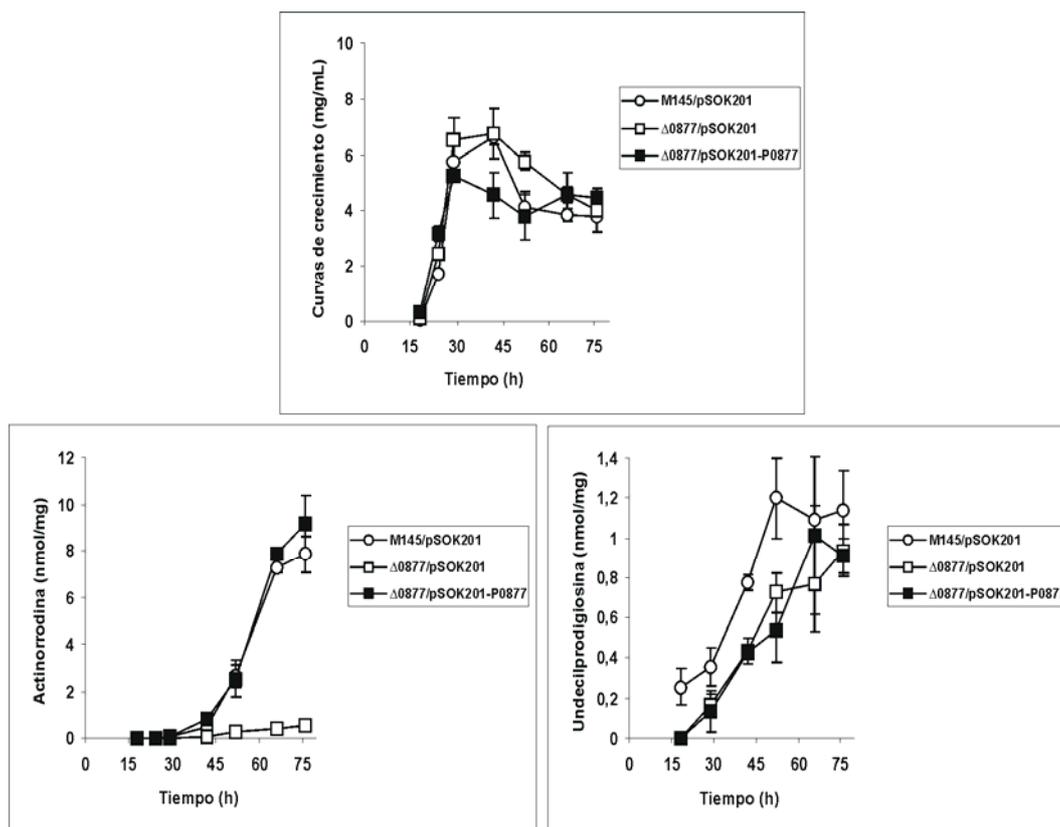
Para llevar a cabo dicho experimento fue necesario introducir el gen *SCO0877* junto con su promotor en el vector pSOK201. En primer lugar se trató el ADN del cósmido StM1 con la enzima de restricción *EcoRI*, lo cual permitió liberar un fragmento de 3323 pb que contiene el gen con su promotor. Por otra parte se trató el ADN del vector con la enzima de restricción *EcoRI* (Figura III.14).



**Figura III.14:** Esquema de la construcción del plásmido pSOK201-P0877.

Como resultado de la ligación de ambos (sección II.8.2), se obtuvo el plásmido pSOK201-P0877 de 10,5 kb. Dicho vector fue utilizado para la conjugación en las cepas *Streptomyces coelicolor* M145 y *S. coelicolor* M145:Δ0877-70, previo paso a través de la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002.

Teniendo en cuenta lo comentado en el apartado anterior, en este experimento era necesario disponer de controles internos para asegurarnos de que la producción de antibióticos pigmentados no se viese afectada por la presencia de cada uno de los vectores, por lo que se introdujo mediante conjugación el vector pSOK201 tanto en la cepa parental como en la mutante. Se verificó la presencia de las construcciones en las cepas mediante digestiones con enzimas de restricción (datos no mostrados).



**Figura III.15:** Curvas de crecimiento y producción específica de actinorrodina y undecilprodigiosina en medio MG complejo de las cepas *S. coelicolor* M145/pSOK201, Δ0877/pSOK201 y Δ0877/pSOK201-P0877.

Al comparar la producción de actinorrodina de la cepa *S. coelicolor* M145:Δ0877/pSOK201-P0877 con su cepa control *S. coelicolor* M145:Δ0877/pSOK201 se observa un aumento en la producción de unos 8 nmol/mg a las 75 horas de cultivo. Si comparamos estos valores con los obtenidos por la cepa silvestre con el plásmido pSOK201, se observa una restauración de los niveles de producción de actinorrodina que se habían visto afectados por la inactivación del gen *SCO0877*.

Por lo tanto teniendo en cuenta estos resultados, la introducción del gen *SCO0877* mediante un plásmido replicativo provoca un restablecimiento de la producción de actinorrodina y no afecta a los niveles de producción de undecilprodigiosina. Esta complementación génica valida los resultados obtenidos tras la delección del gen, y corrobora la implicación del mismo en la producción del antibiótico pigmentado actinorrodina.

### III.5. SCO7173.

#### III.5.1. Análisis estructural del gen SCO7173.

El gen *SCO7173* está constituido por 2727 pb (7969712-7972438) y codifica una proteína de 908 aminoácidos y 98,46 kDa, con un punto isoelectrico de 6,45.

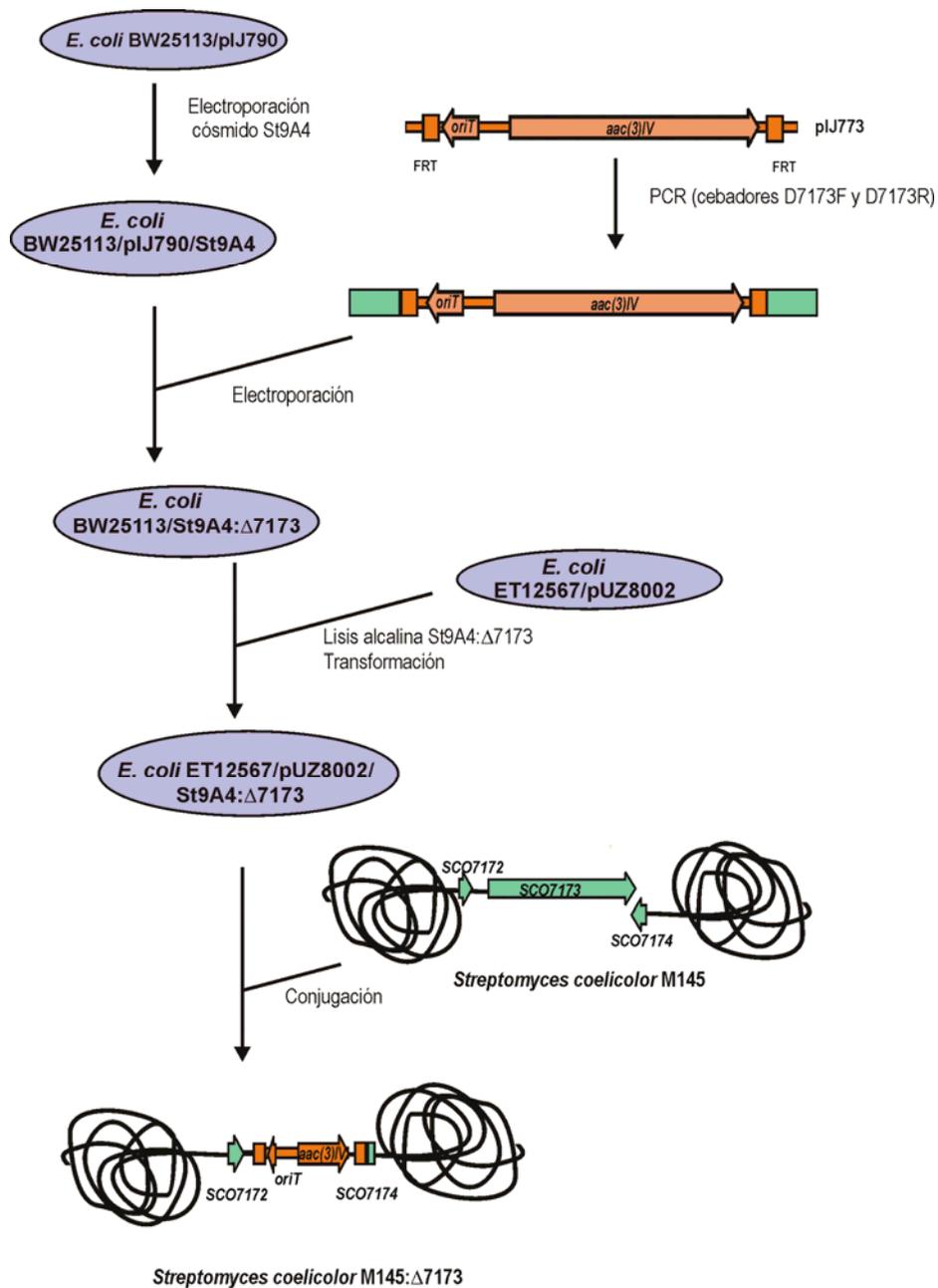
En la zona amino terminal presenta un motivo A de unión a ATP/GTP. En la zona carboxilo terminal presenta un dominio de unión al ADN característico de proteínas LuxR. Este dominio presenta un motivo hélice-giro-hélice de unión al ADN entre los residuos 699 y 720 (Figura III.15).

### III.5.2. Análisis funcional del gen *SCO7173*.

La comparación de la secuencia aminoacídica del gen *SCO7173* y los resultados de RT-PCR sugerían que esta proteína podría estar implicada en la regulación de la producción de metabolitos secundarios. Para dilucidar la funcionalidad de *SCO7173* en dicha producción se procedió a su inactivación mediante la técnica del ReDirect® (sección II.16 y Figura III.16).

#### III.5.2.1. Inactivación del gen *SCO7173*.

Usando el método ReDirect (sección II.16) se logró la inactivación del gen *SCO7173* presente en el cósmido St9A4 en *E. coli* (Figura III.16).



**Figura III.16:** Estrategia seguida para la inactivación del gen *SCO7173* de *S. coelicolor*.

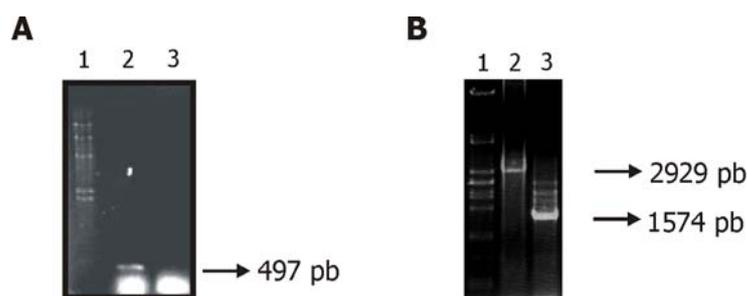
La inactivación génica se llevó a cabo reemplazando el gen por un fragmento de 1,5 kb amplificado mediante PCR a partir del plásmido pIJ773. Para ello se diseñaron un par de cebadores D7173F (5'-GGGCGCTTCGTCGGACCGGCATCGGTGCCACGGC**ATG**attccgggatccgtcgacc-3') y D7173R (5'-AGGTGGCGCAGCTGATGGGCGCTACGGAGGAGGAGT**TCA**tgtaggctggagctgcttc-3'), de manera que el producto de amplificación abarcara 39 nucleótidos corriente arriba del gen a inactivar, el codón de inicio del gen, 20 nucleótidos idénticos al pIJ773, el gen de resistencia a apramicina *aac(3)IV* con el *OriT*, 19 nucleótidos idénticos al pIJ773, el codón de fin del gen a inactivar y 39 nucleótidos corriente abajo del gen.

A continuación, se introdujo el cósmido St9A4 que contiene el gen *SCO7173* en la cepa BW25113/pIJ790 mediante electroporación (II.16.4). Para verificar el resultado se extrajo ADN de varias colonias y se realizaron reacciones de PCR usando los oligonucleótidos diseñados para las reacciones de RT-PCR, de tal modo que se observó una banda de amplificación del tamaño esperado en todos los casos (datos no mostrados).

Una vez que se hubo incorporado el cósmido en la cepa que poseía el plásmido pIJ790 con los genes que facilitan la recombinación, era necesario introducir en dicha cepa el fragmento lineal de ADN que se había amplificado por PCR.

Por lo tanto, el casete de resistencia amplificado fue introducido mediante electroporación en la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790/St9A4. La electroporación se llevó a cabo según el protocolo descrito en la sección II.16.5 de materiales y métodos.

De este modo y tras varios intentos y modificaciones del protocolo original (ver materiales y métodos apartado II.16.5), se consiguió el reemplazamiento del gen *SCO7173* presente en el cósmido St9A4 en *E. coli* (St9A4:Δ7173). Se llevaron a cabo reacciones de PCR para verificar dicha sustitución. En la primera PCR se usaron los oligonucleótidos 7173-S y 7173-AS (Material Suplementario) para comprobar la existencia ó inexistencia de una banda de amplificación de 497 pb en el cósmido St9A4-Δ7173, puesto que dichos cebadores amplifican un fragmento interno al gen *SCO7173* (Figura III.17A).



**Figura III.17:** Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen *SCO7173* en el cósmido St9A4. (A) Reacción de PCR con los cebadores 7173-S y 7173-AS. (B) Reacción de PCR con los cebadores C7173-F y C7173-R. En los carriles 2 la reacción de PCR contiene ADN de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y en los carriles 3 se muestra la reacción de PCR que contiene ADN del cósmido St9A4 con el gen *SCO7173* inactivado.

En la segunda PCR se usaron los cebadores C7173-F y C7173-R (Material Suplementario), éstos amplificaron un fragmento que abarca el gen más 83 nucleótidos corriente arriba y 119 nucleótidos corriente abajo, de tal modo que la reacción que contenía ADN del cósmido con el gen *SCO7173* intacto presentaba una banda de amplificación de 2929 pb; sin embargo, cuando el gen fue reemplazado se obtuvo una banda de amplificación de 1574 pb, lo cual permitió comprobar que la sustitución se había producido en el lugar deseado (Figura III.17B).

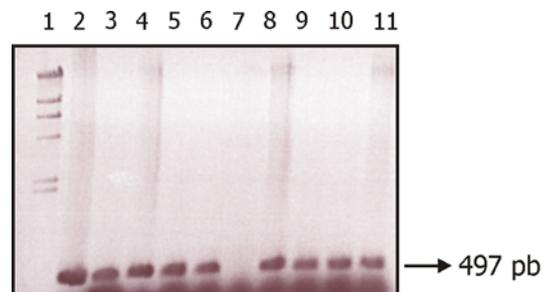
Para evitar los sistemas de restricción de *S. coelicolor* se introdujo el cósmido St9A4:Δ7173 en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 mediante transformación. El ADN de las colonias obtenidas se analizó mediante PCR para comprobar que el cósmido con la construcción no se había perdido.

A continuación, la construcción que previamente había sido realizada en *E. coli* se introdujo en *Streptomyces* mediante conjugación (sección II.15).

Como resultado de la conjugación se obtuvieron 336 colonias que fueron seleccionadas en un primer paso por su resistencia a apramicina. En una segunda selección, con cada colonia obtenida se hicieron réplicas en placas de agar MS con apramicina y en placas de agar MS con kanamicina. Y finalmente, tras dos pases por estas placas se obtuvieron 12 parches Apra<sup>R</sup> y Km<sup>S</sup> los cuales se sembraron en medio de esporulación TBO (Higgins y col., 1974).

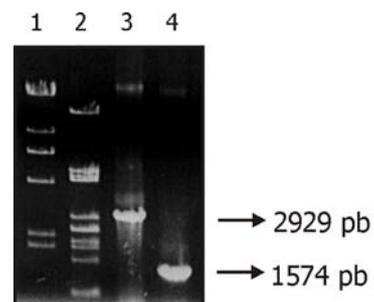
Tras una semana de crecimiento y esporulación, se obtuvieron esporas de los 12 clones Apra<sup>R</sup> y Km<sup>S</sup>, para crecerlos en cultivo líquido (medio YEME) y extraer el ADN necesario para realizar estudios posteriores.

En primer lugar para hacer una selección rápida se realizó una PCR con los oligonucleótidos que amplificaban un fragmento interno al gen *SCO7173* (Figura III.18). Si el gen había sido sustituido por el casete de apramicina, en el carril correspondiente a los exconjugantes no se observaría banda de amplificación y sin embargo, en el carril correspondiente a la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 se observaría una banda de 497 pb. El resultado mostró que tan sólo el exconjugante 232 (carril 7) presentaba el gen *SCO7173* inactivado; en el resto de los exconjugantes tuvo lugar una recombinación simple en la cual el ADN de la cepa incorporó una parte del cósmido y por eso estos exconjugantes presentaban resistencia a apramicina y sensibilidad a kanamicina.



**Figura III.18:** Análisis por PCR para comprobar la existencia del gen *SCO7173* en la cepa parental *S. coelicolor* M145 (carril 2) y su inexistencia en alguno de los exconjugantes de *Streptomyces* Apra<sup>R</sup> Km<sup>S</sup> (carriles 3-11). EL carril 1 contiene ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción *Hind*III

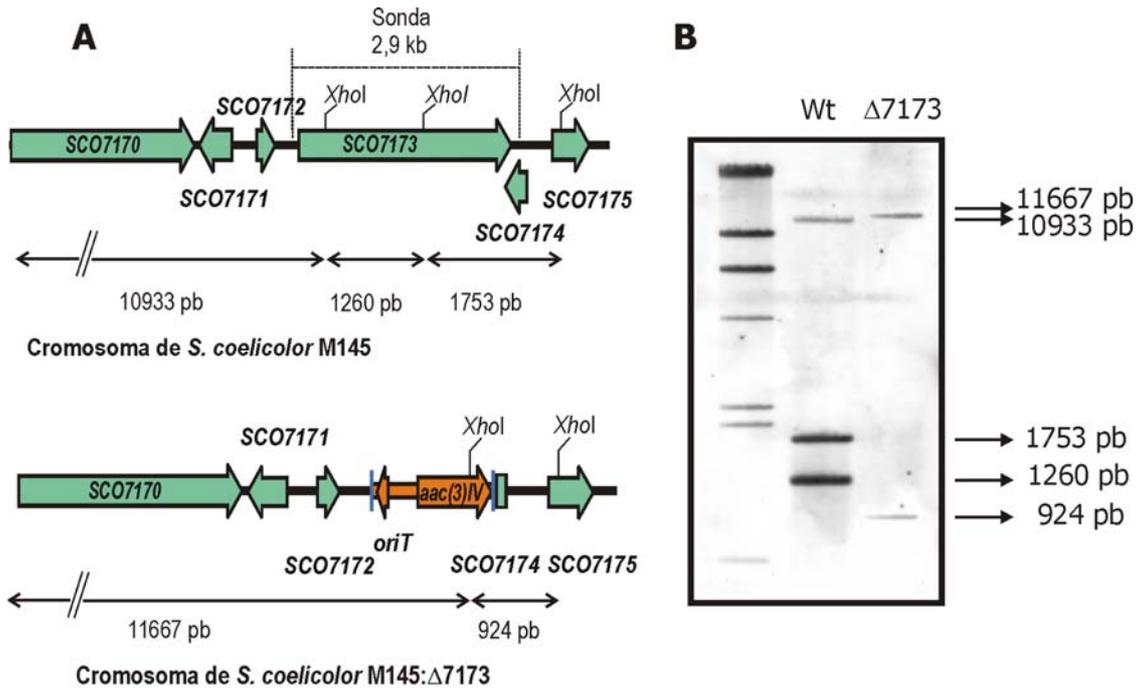
A continuación, se usó el ADN del exconjugante 232 para realizar otra PCR con los cebadores C7173-F y C7173-R (Material Suplementario) que anillaban en una región fuera de la zona de recombinación, lo cual nos permitió diferenciar una banda de amplificación de diferente tamaño en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173 y en la cepa parental *S. coelicolor* M145 (Figura III.19).



**Figura III.19:** Análisis por PCR para comprobar la delección del gen *SCO7173* (carril 4) y comparar el tamaño de amplificación obtenido con el de la cepa *S. coelicolor* M145 que porta el gen intacto (carril 3). Los carriles 1 y 2 contienen ADN del fago  $\lambda$  digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Pst*I, respectivamente.

Para confirmar el resultado obtenido mediante PCR se realizó una hibridación Southern, usando el ADN de la cepa *S. coelicolor* M145 y el del exconjugante 232 digerido con la enzima *Xho*I (Figura III.20). El filtro se hibridó con una sonda de 2,9 kb, marcada con digoxigenina, obtenida mediante PCR usando los cebadores C7173-F y C7173-R (Figura III.20A).

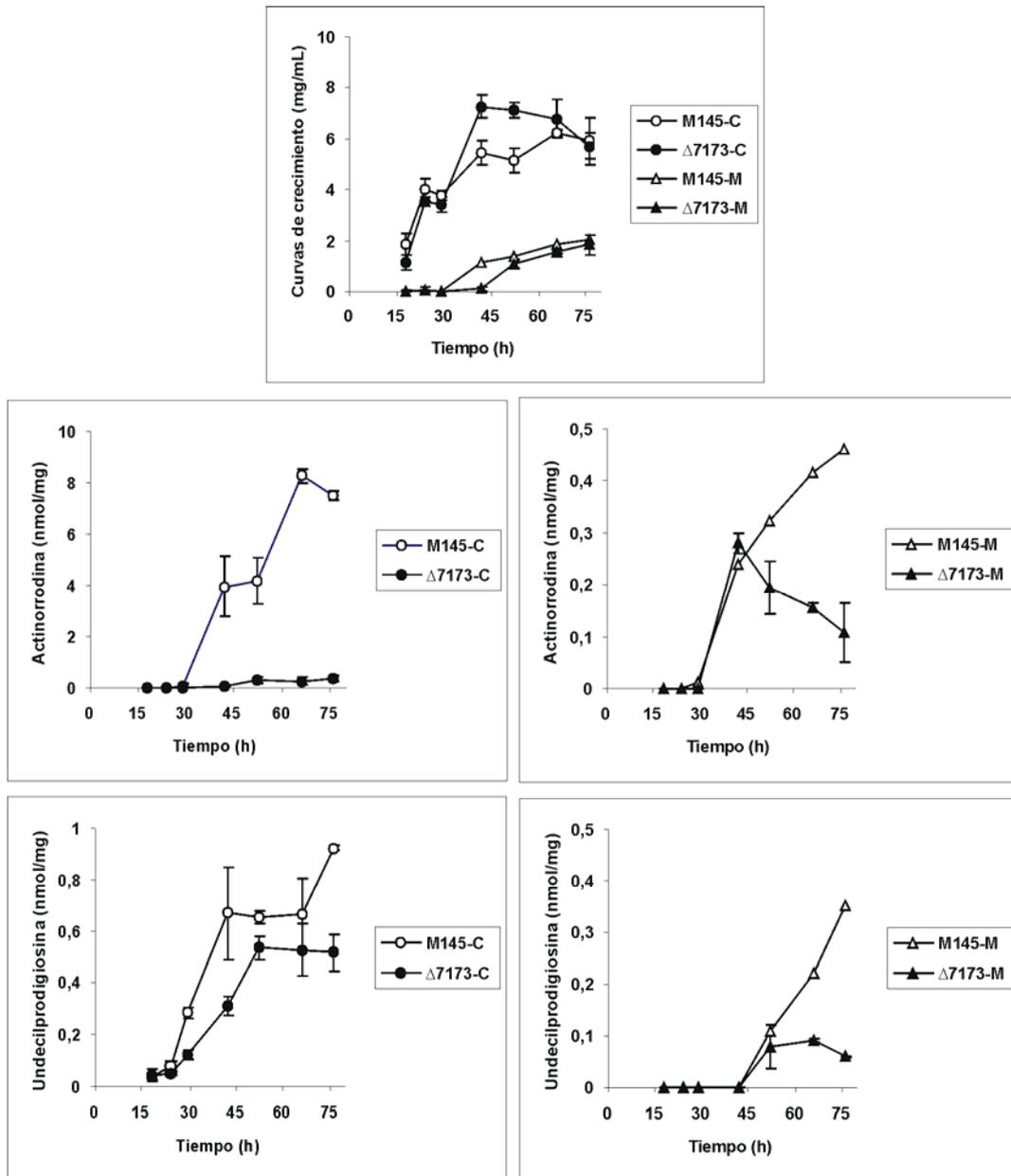
Al hibridar con la sonda, el diseño del experimento permitió diferenciar tres bandas de 10933 pb, 1753 pb y 1260 pb, cuando no se había producido el doble sobrecruzamiento, y dos bandas de 11667 pb y 924 pb cuando se había producido la recombinación y el gen *SCO7173* había sido deletado (Figura III.20B).



**Figura III.20:** Comprobación mediante Southern del posible exconjugante  $\Delta 7173$ . (A) Mapa del cromosoma de *S. coelicolor* M145 y del mutante *S. coelicolor* M145: $\Delta 7173$ . Se indica la sonda usada en la hibridación. (B) Hibridación Southern del ADN de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 (Wt) y de la cepa *S. coelicolor* M145: $\Delta 7173$  (exconjugante 232) digerido *Xho*I, utilizando como sonda un fragmento de 2,9 kb. Las señales obtenidas corresponden al patrón de restricción indicado en (A).

### III.5.2.2. Análisis de la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en el mutante *Streptomyces coelicolor* M145: $\Delta 7173$ .

Para estudiar el efecto que la inactivación del gen *SCO7173* tiene en la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina, se utilizaron el mutante *S. coelicolor* M145: $\Delta 7173$  y la cepa parental *S. coelicolor* M145 para realizar una fermentación en medio MG complejo y definido. Se realizaron tres réplicas de cada cultivo y se tomaron muestras de 700  $\mu$ L para valorar producción de antibióticos y 2 mL para determinar el peso seco. Para cuantificar la producción específica, se determinó el peso seco de cada cultivo y se relacionó con la producción volumétrica.



**Figura III.21:** Curvas de crecimiento y producción específica de actinorrodina y undecilprodigiosina de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y del mutante *S. coelicolor* M145: $\Delta$ 7173 en medio MG complejo (C) y mínimo (M).

Los resultados mostraron una cinética de crecimiento en el mutante similar al mostrado por la cepa parental aunque ligeramente retrasada en el medio MG mínimo (Figura III.21). Se observó una disminución drástica de la producción de actinorrodina en el mutante *S. coelicolor* M145: $\Delta$ 7173 tanto en el medio MG mínimo (un 76 % menos a las 75 horas de cultivo) como complejo (un 98 % a las 75 horas de cultivo). En cuanto a la producción de undecilprodigiosina del mutante, en el medio MG mínimo fue significativamente menor que la producción de la cepa parental (de hasta un 82,8 % a las 75 horas de cultivo), mientras que la producción en el medio MG complejo fue sólo ligeramente inferior, teniendo en cuenta los errores.

Por lo que la inactivación del gen *SCO7173* tiene un efecto claro en el metabolismo secundario, similar al que se observa tras la delección del gen *SCO0877*.

### III.5.2.3. Análisis de la producción de CDA en el mutante *Streptomyces coelicolor* M145:Δ7173.

Para valorar la producción de antibiótico dependiente de calcio se realizaron bioensayos en medio sólido NA utilizando siempre como control negativo una placa de dicho medio en el que la cobertera añadida no contenía  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .

Los resultados obtenidos mostraron una producción de CDA del mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173 similar a la de la cepa parental (datos no mostrados).

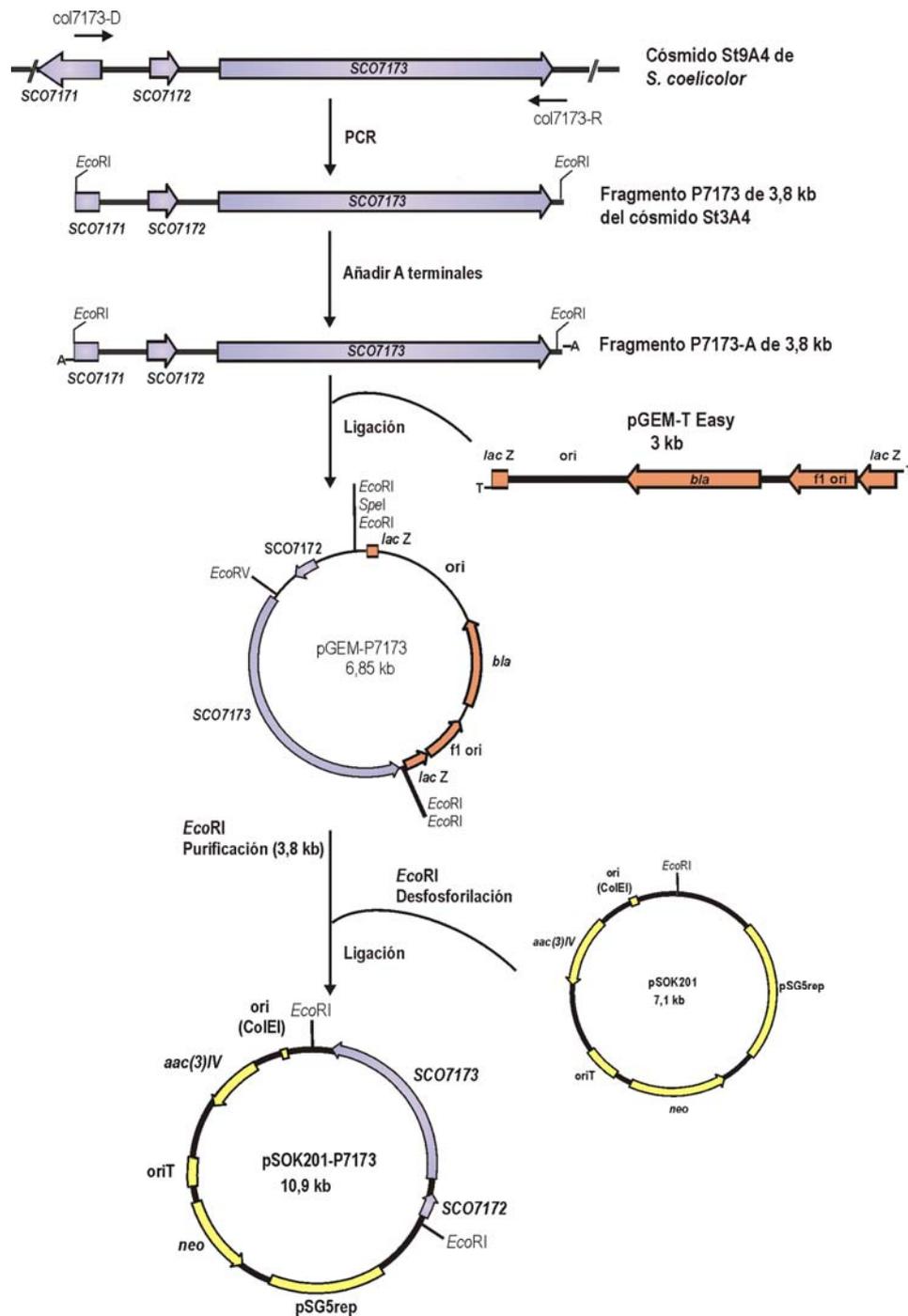
### III.5.2.4. Efectos de la introducción del gen *SCO7173* en multicopia en la cepa *S. coelicolor* M145:Δ7173.

Para comprobar la posible complementación génica del mutante delecionado en el gen *SCO7173*, se usó el plásmido de replicación autónoma pSOK201 ( $\text{apra}^R$  y  $\text{km}^R$ ). Se tomó esta decisión debido a varios factores: no era posible una complementación estricta debido a que la introducción del vector pSET152neo produce una drástica bajada de la producción de los antibióticos analizados; no se disponía de ningún vector integrativo que no afectase a la producción de antibióticos y que a la vez portase una resistencia diferente a la de apramicina para la selección de exconjugantes.

Para llevar a cabo dicho experimento era necesario introducir el gen *SCO7173* junto con su promotor en el vector pSOK201. Esto nos planteó un problema ya que se desconoce la situación del promotor por lo que se decidió clonar el gen situado corriente arriba (*SCO7172*) y parte de la secuencia que precede a este gen (724 pb).

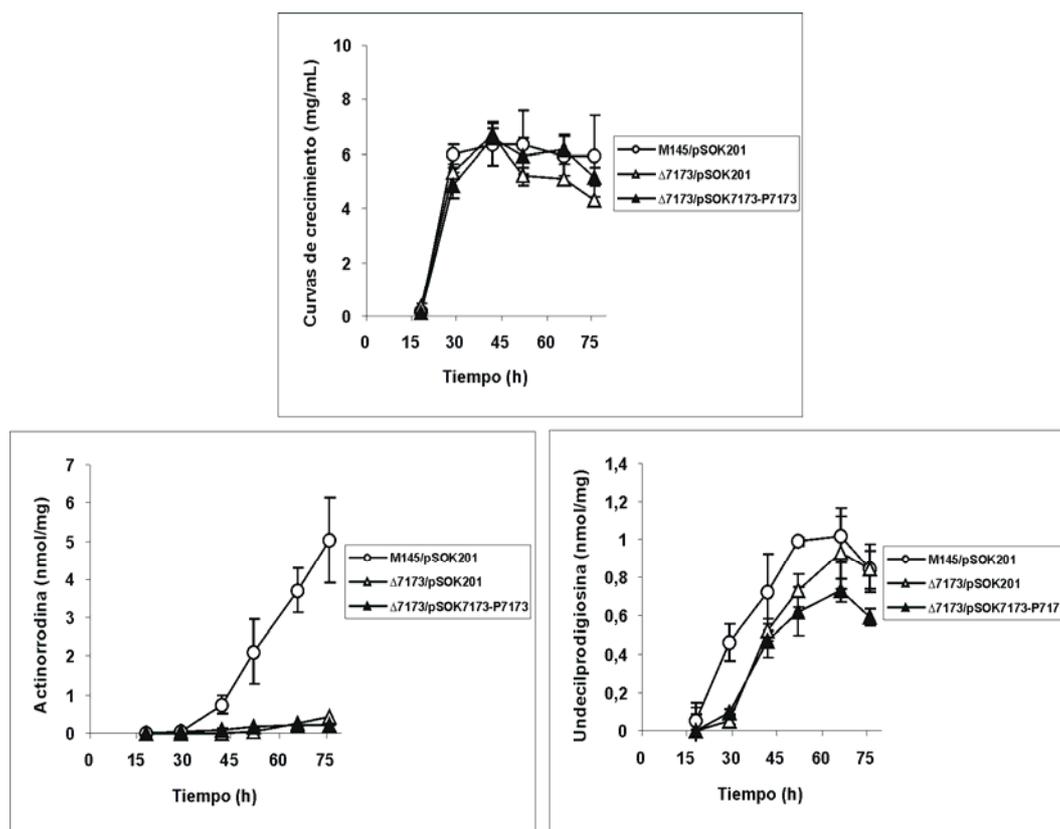
La estrategia para subclonar el fragmento (P7173) deseado no permitía el uso de enzimas de restricción, puesto que al tener tan elevado contenido en GC las enzimas de corte menos frecuente cortaban en lugares muy alejados, por lo que se decidió amplificar el fragmento con unos cebadores que poseen en su secuencia un corte para la enzima *EcoRI* a partir del cósmido St9A4 (Figura III.22). Se utilizó para la amplificación por PCR una polimerasa de alta fidelidad que deja extremos romos (Phusion, de BioLabs). Tras la extracción y purificación de la banda se añadió al fragmento una adenina en ambos extremos para mejorar las condiciones de ligación en un pGem-T Easy. A continuación se digirió la construcción pGEM-P7173 con *EcoRI* para liberar el fragmento y ligarlo con el vector pSOK201 previamente digerido con la misma enzima y desfosforilado. De este modo se construyó el plásmido pSOK201-P7173 (Figura III.22) que fue utilizado para la conjugación en la cepa *Streptomyces coelicolor* M145 y *Streptomyces coelicolor* M145:Δ7173.

Se secuenció el inserto clonado en el vector pGEM-P7173 para comprobar que la enzima no hubiera introducido ningún cambio en la secuencia. Se detectó una mutación silenciosa en el nucleótido 564 y no fue posible secuenciar 24 pb situadas 253-277 pb anteriores al codón de inicio del gen *SCO7173* (ggcccaccgaccggctggtgggc).



**Figura III.22:** Esquema de la construcción del plásmido pSOK201-P7173.

En este experimento, al igual que en el llevado a cabo con el gen *SCO0877*, era necesario disponer de controles internos para asegurarnos de que la producción de antibióticos pigmentados no se viese afectada por la presencia del vector. Por esta razón, se introdujo mediante conjugación el vector pSOK201 en la cepa mutante  $\Delta 7173$  y se utilizó junto con la cepa M145/pSOK201 en fermentaciones. Se verificó la presencia de las construcciones en las cepas mediante digestiones con enzimas de restricción (datos no mostrados).

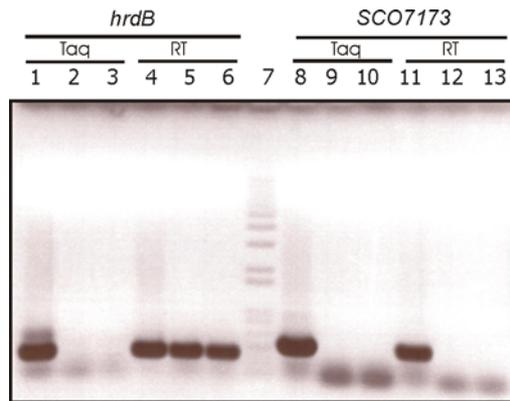


**Figura III.23:** Curvas de crecimiento y producción específica de actinorrodina y undecilprodigiosina en medio MG complejo de las cepas *S. coelicolor* M145/pSOK201, *S. coelicolor* M145:Δ7173/pSOK201 y *S. coelicolor* M145:Δ7173/pSOK201-P7173.

Como se observa en las gráficas de producción de antibióticos, la introducción del gen *SCO7173* mediante un plásmido replicativo en la cepa *S. coelicolor* M145:Δ7173 no restaura los niveles de producción de actinorrodina alcanzados por la cepa *S. coelicolor* M145/pSOK201, sino que se siguen obteniendo valores similares a los producidos por el mutante Δ7173 (Figura III.23).

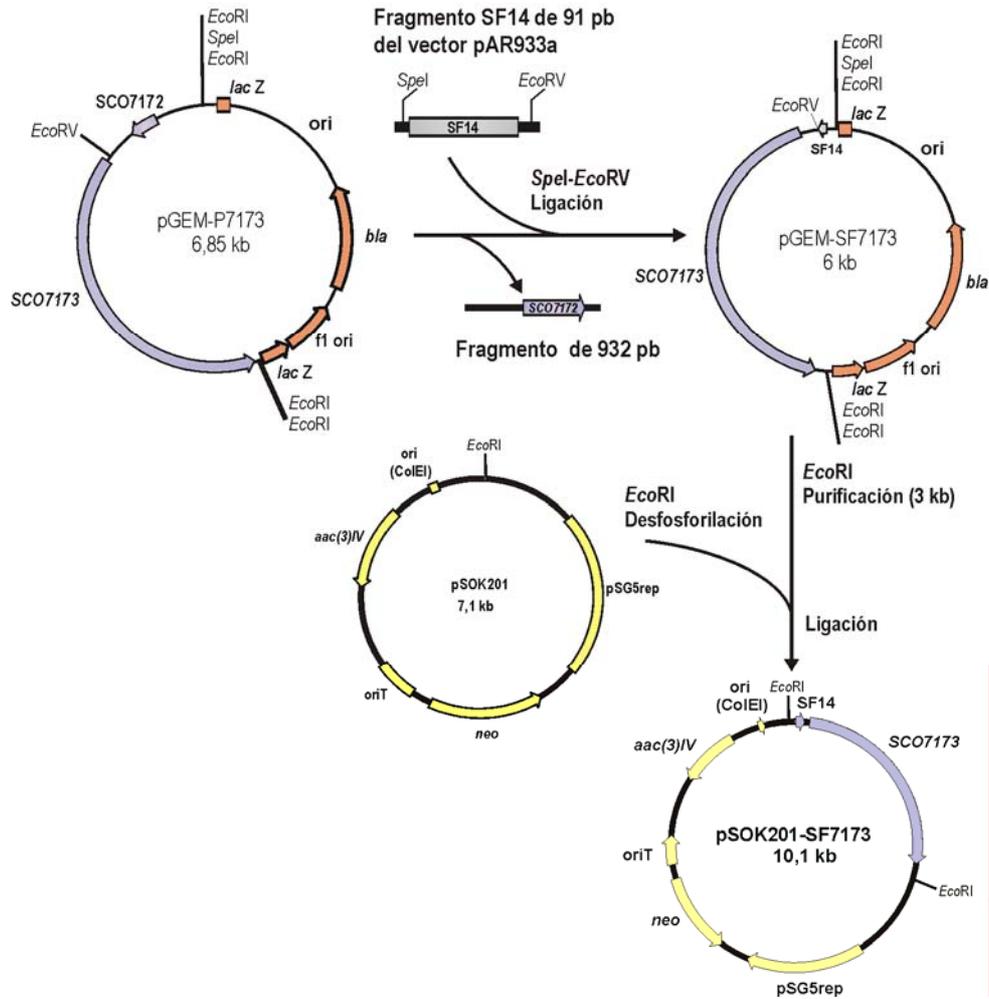
Para descartar cualquier problema relacionado con la transcripción del gen *SCO7173* introducido mediante el vector, se extrajo ARN de las cepas *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor* M145:Δ7173 y *S. coelicolor* M145:Δ7173/pSOK201-P7173. Se realizaron reacciones de RT-PCR con los cebadores 7173-S y 7173-AS para comprobar la existencia o inexistencia de transcripción del gen en las diferentes cepas. Al mismo tiempo, se introdujeron reacciones de control positivo con el gen *hrdB* (*SCO5820*) y controles con polimerasa (Taq) para verificar la inexistencia de ADN en las muestras.

Como se puede observar en la Figura III.24 tan sólo existe transcripción del gen *SCO7173* en la cepa parental, por lo que la copia del gen que se ha introducido mediante el vector no se está expresando. Esto puede ser debido a algún problema con su promotor o que simplemente el promotor no se encuentre en la región que se ha incluido en la clonación, a pesar de que se han introducido 1030 pb corriente arriba del gen.



**Figura III.24:** Análisis por RT-PCR para comprobar la transcripción del gen *SCO7173* en diferentes cepas. En la parte superior se indican los genes amplificados. En los carriles 1-3 y 8-10 se añadió Taq polimerasa a las reacciones, mientras que las reacciones de los carriles 4-6 y 11-13 contienen retrotranscriptasa y polimerasa. Los carriles 1 y 8 contienen ADN de *S. coelicolor* M145, los carriles 4 y 11 contienen ARN *S. coelicolor* M145, los carriles 2, 5, 9 y 12 contienen ARN de *S. coelicolor* M145:Δ7173/pSOK201-P7173 y el carril 7 contiene marcador comercial de 1 kb.

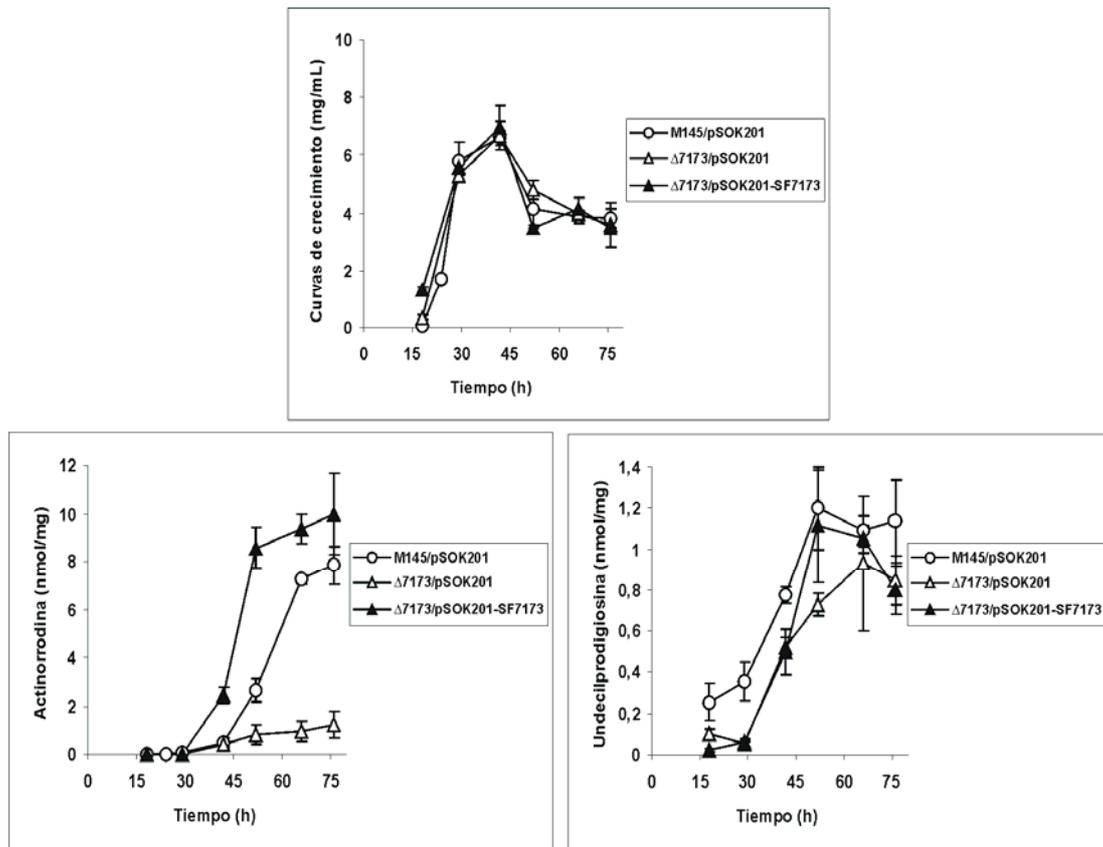
Teniendo en cuenta este resultado se recurrió a la expresión del gen *SCO7173* bajo un promotor fuerte, el SF14 (Labes y col., 1997). La construcción del vector se realizó amplificando el promotor a partir del plásmido pAR933a (Rodríguez-García y col., 2005), para ello se usaron unos cebadores que presentaban en sus extremos una secuencia de reconocimiento para las enzimas *SpeI* (SPEI-SF14-D) y *EcoRV* (ERV-SF14-R) que permitía su introducción en la construcción pGEM-P7173 mediante el tratamiento con las enzimas anteriormente mencionadas. A continuación, se digirió el vector pGEM-SF7173 con *EcoRI* para liberar el fragmento SF14-7173 e introducirlo en el plásmido pSOK201, obteniéndose así la construcción pSOK201-SF7173 (Figura III.25).



**Figura III.25:** Esquema de la construcción del plásmido pSOK201-SF7173.

El plásmido pSOK201-SF7173 fue introducido en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173 mediante conjugación, previo paso por la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002. A continuación, se realizaron fermentaciones para determinar el efecto de la introducción del gen *SCO7173* en un plásmido replicativo bajo un promotor fuerte de expresión constitutiva sobre la producción de antibióticos pigmentados.

La producción de actinorrodina mostrada por la cepa *S. coelicolor* M145:Δ7173/pSOK201-SF7173 recupera los niveles de producción de la cepa parental control llegando incluso a superarlos (Figura III.26). Este resultado es coherente con los datos aportados en el caso de la inactivación del gen *SCO7173* sugiriendo un papel de la proteína como regulador positivo de la biosíntesis de actinorrodina.



**Figura III.26:** Curvas de crecimiento y producción específica de actinorrodina y undecilprodigiosina en medio MG complejo de las cepas *S. coelicolor* M145/pSOK201, *S. coelicolor* M145: $\Delta 7173$ /pSOK201 y *S. coelicolor* M145: $\Delta 7173$ /pSOK201-SF7173.

### III.6. SCO7093.

#### III.6.1. Análisis estructural del gen SCO7093.

El gen *SCO7093* está constituido por 2799 pb (7881841-7884639) y codifica una proteína de 932 aminoácidos y 99,54 kDa, con un punto isoeléctrico de 6,94.

Presenta un dominio de unión a ATP/GTP con un motivo Walker A en la zona amino terminal. Mientras que en la zona carboxilo terminal presenta un motivo hélice-giro-hélice situado entre los residuos 883 y 904.

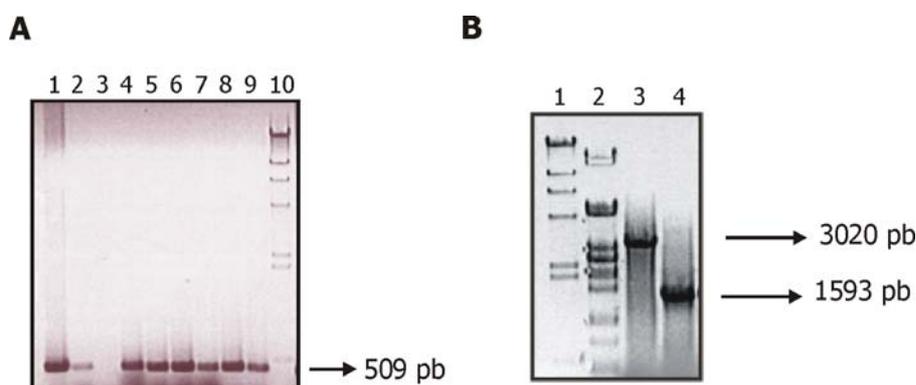
#### III.6.2. Análisis funcional del gen SCO7093.

##### III.6.2.1. Inactivación del gen SCO7093.

La inactivación génica se llevó a cabo utilizando la técnica ReDirect, reemplazando el gen por un fragmento de 1,5 kb amplificado mediante PCR a partir del plásmido pIJ773. Para ello se utilizaron los cebadores D7093F (5'-AGGTCGACGCTCCGATAGAATGCGTGGACGAATGACATGattccggggatccgtcgacc-3') y D7093R (5'-AAGCGGGAGCGGAGTCCGGCGCCCGCCCTCGGGGGTTCAtgtaggctggagctgcttc-3') (sección II.16.2).

Se introdujo el cósmido St3A4 que contiene el gen *SCO7173* en la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790 mediante electroporación (II.16.4) y a continuación el fragmento lineal de ADN que se había amplificado por PCR. De este modo se consiguió el reemplazamiento del gen *SCO7173* presente en el cósmido St3A4 en *E. coli* (*E. coli* BW25113/pIJ790/St3A4:Δ7093) por el casete diseñado. Se verificó el reemplazamiento mediante reacciones de PCR. En la primera de ellas, se usaron los oligonucleótidos 7093-S y 7093-AS (Material Suplementario) para comprobar la inexistencia de una banda de amplificación de 509 pb en el cósmido St3A4:Δ7093, ya que dichos cebadores amplifican un fragmento interno al gen *SCO7093* (Figura III.27A). El único clon que no presentaba dicha banda de amplificación y por tanto, que posiblemente tuviese el gen *SCO7093* deletado fue el situado en el carril 3.

En la segunda PCR se usaron como cebadores C7093-F y C7093-R (Material Suplementario), éstos amplificaron un fragmento que abarca el gen más 90 nucleótidos corriente arriba y 131 nucleótidos corriente abajo, de tal modo que la reacción que contenía ADN del cósmido con el gen *SCO7093* intacto presentaba una banda de amplificación de 3020 pb; sin embargo, cuando el gen había sido reemplazado se obtuvo una banda de amplificación de 1593 pb, lo cual nos permitía comprobar que el reemplazamiento se había producido en el lugar deseado (Figura III.27B).



**Figura III.27:** Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen *SCO7093* en el cósmido St3A4. (A) Reacción de PCR con los cebadores 7093-S y 7093-AS. En el carril 1 la reacción de PCR contiene ADN del cósmido St3A4 y en el resto los posibles clones con el gen inactivado. El carril 10 contiene el marcador de peso molecular fago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción *HindIII*. (B) PCR con los cebadores que anillan fuera de la zona de recombinación. En el carril 3 la reacción contiene ADN del cósmido St3A4 y el carril 4 contiene ADN del clon 3. Los carriles 1 y 2 contienen los marcadores de peso molecular  $\lambda$ /*HindIII* y *PstI*.

La reacción de PCR con los cebadores que anillan dentro del gen *SCO7093* (Figura III.27A) mostró que tan sólo uno de los clones no presentaba banda de amplificación (carril 3); por esta razón se usó ADN de éste clon para la reacción de PCR con los cebadores externos al gen y a la zona de recombinación (Figura III.27B). El resultado de esta reacción mostró la banda de amplificación de 1593 pb, mientras que en la reacción que contenía ADN del cósmido St3A4 se observó una banda de 3020pb, correspondiente al gen *SCO7093* intacto.

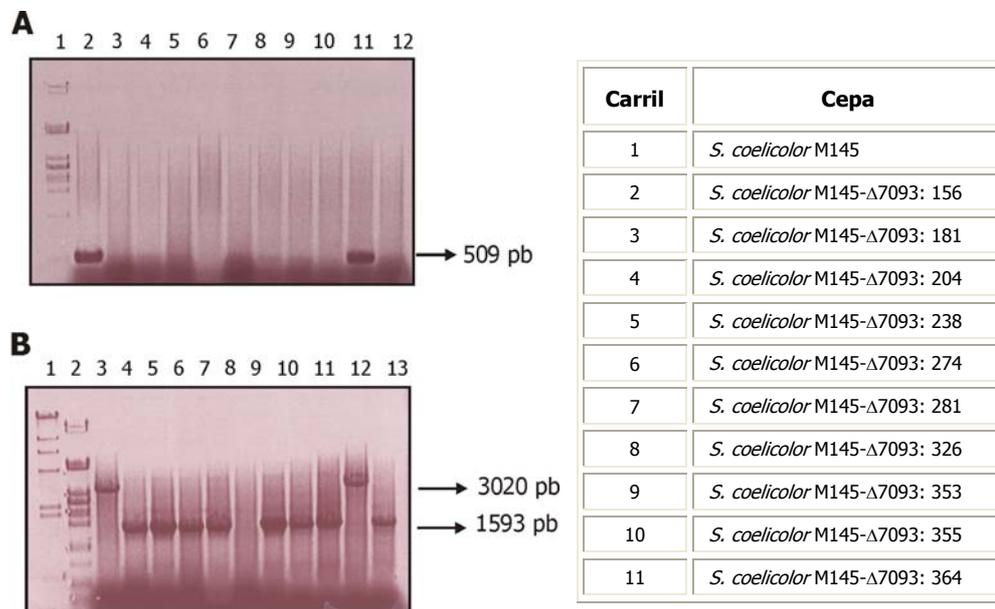
Posteriormente, el cósmido St9A4:Δ7093 se introdujo en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 mediante transformación. El ADN de las colonias obtenidas se analizó mediante PCR para comprobar que el cósmido con la construcción no se había perdido.

A continuación, la construcción se introdujo en *Streptomyces* mediante conjugación (sección II.15). Como resultado de la conjugación se obtuvieron 365 colonias que fueron seleccionadas en un primer paso por su resistencia a apramicina. Lo cual indicaba que se habían incorporado el casete generado por PCR. En una segunda selección, con cada colonia obtenida se

hicieron réplicas en placas de agar MS con apramicina y en placas de agar MS con kanamicina. Y finalmente, tras dos pases por estas placas se obtuvieron 19 parches Apra<sup>R</sup> y Km<sup>S</sup> los cuales se sembraron en medio de esporulación TBO (Higgins y col., 1974).

Como estudio previo al *Southern* se realizaron dos reacciones de PCR. La primera de ellas con los cebadores 7093-S y 7093-AS (Material Suplementario); en ella se observó una banda de amplificación de 509 pb en el carril correspondiente a las reacciones que contenían ADN de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y del exconjugante *S. coelicolor* M145:Δ7093-355. Por lo que de acuerdo con éste resultado el resto de los exconjugantes debería presentar el gen *SCO7093* reemplazado por el fragmento diseñado (Figura III.28A).

En la segunda PCR se usaron los oligonucleótidos C7093-F y C7093-R (Material Suplementario) que amplifican un fragmento que incluye la zona de recombinación. El resultado mostró que todos los exconjugantes analizados salvo el número 355 presentaban la banda de amplificación de 1593 pb correspondiente a la inactivación del gen *SCO7093*, a diferencia de la banda de 3020 pb obtenida en el carril de la cepa *S. coelicolor* M145 (Figura III.28B).

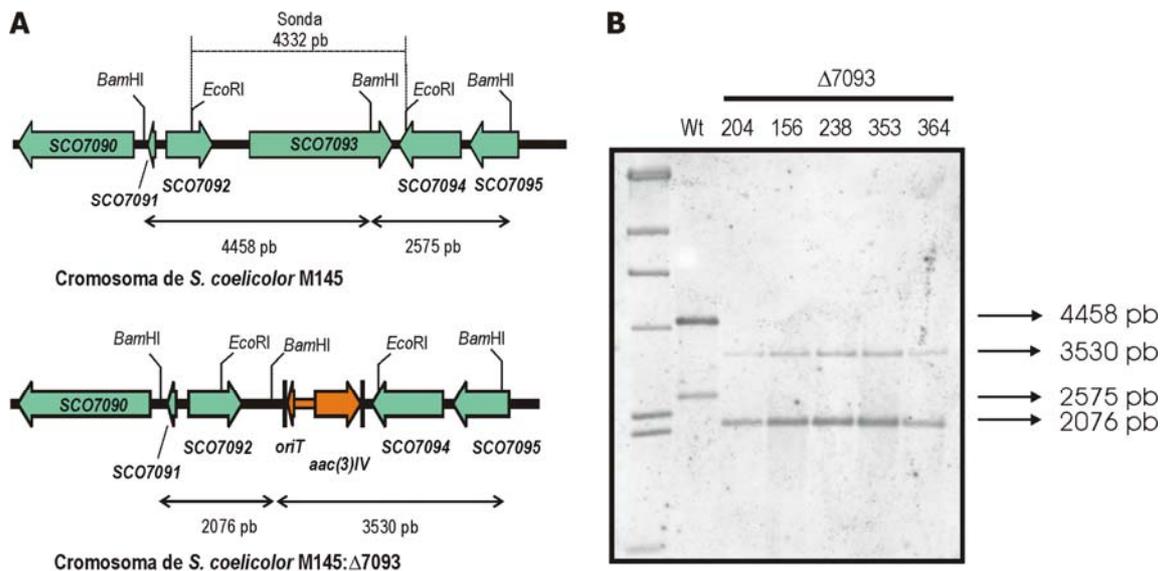


**Figura III.28:** Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen *SCO7093* en *S. coelicolor*. (A) Reacción de PCR usando los cebadores 7093-S y 7093-AS. En el carril 2 la reacción de PCR contiene ADN de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y en los carriles 3-12 se muestra las reacciones de PCR que contienen ADN de los posibles clones del cósmido St10H5/Δ6334. El carril 1 contiene ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción *HindIII*. (B) Reacción de PCR usando los cebadores 7093-F y 7093-R. En el carril 3 la reacción de PCR contiene ADN de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y en los carriles 4-13 se muestran las reacciones de PCR que contienen ADN de los posibles clones del cósmido St10H5/Δ6334. Los carriles 1 y 2 contienen ADN del fago λ digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *PstI*, respectivamente.

Para confirmar el resultado obtenido mediante PCR se realizó una hibridación en la que se digirió el ADN de la cepa *S. coelicolor* M145 y de los exconjugantes *S. coelicolor* M145:Δ7093-156, 204, 238, 353 y 364 elegidos al azar con la enzima *BamHI* y, después de separar los fragmentos del ADN digerido mediante electroforesis, éstos se transfirieron a un filtro de nilón. El filtro se hibridó con una sonda de 4332 pb obtenida mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI* y marcada con digoxigenina (Figura III.29A).

Este experimento de hibridación Southern permitió diferenciar dos bandas de 4458 pb y 2575 pb, cuando no se había producido el doble sobrecruzamiento, y dos bandas de 3530 pb y

2076 pb cuando se había producido la doble recombinación y el gen *SCO7093* había sido reemplazado por el fragmento amplificado por PCR (Figura III.29B).

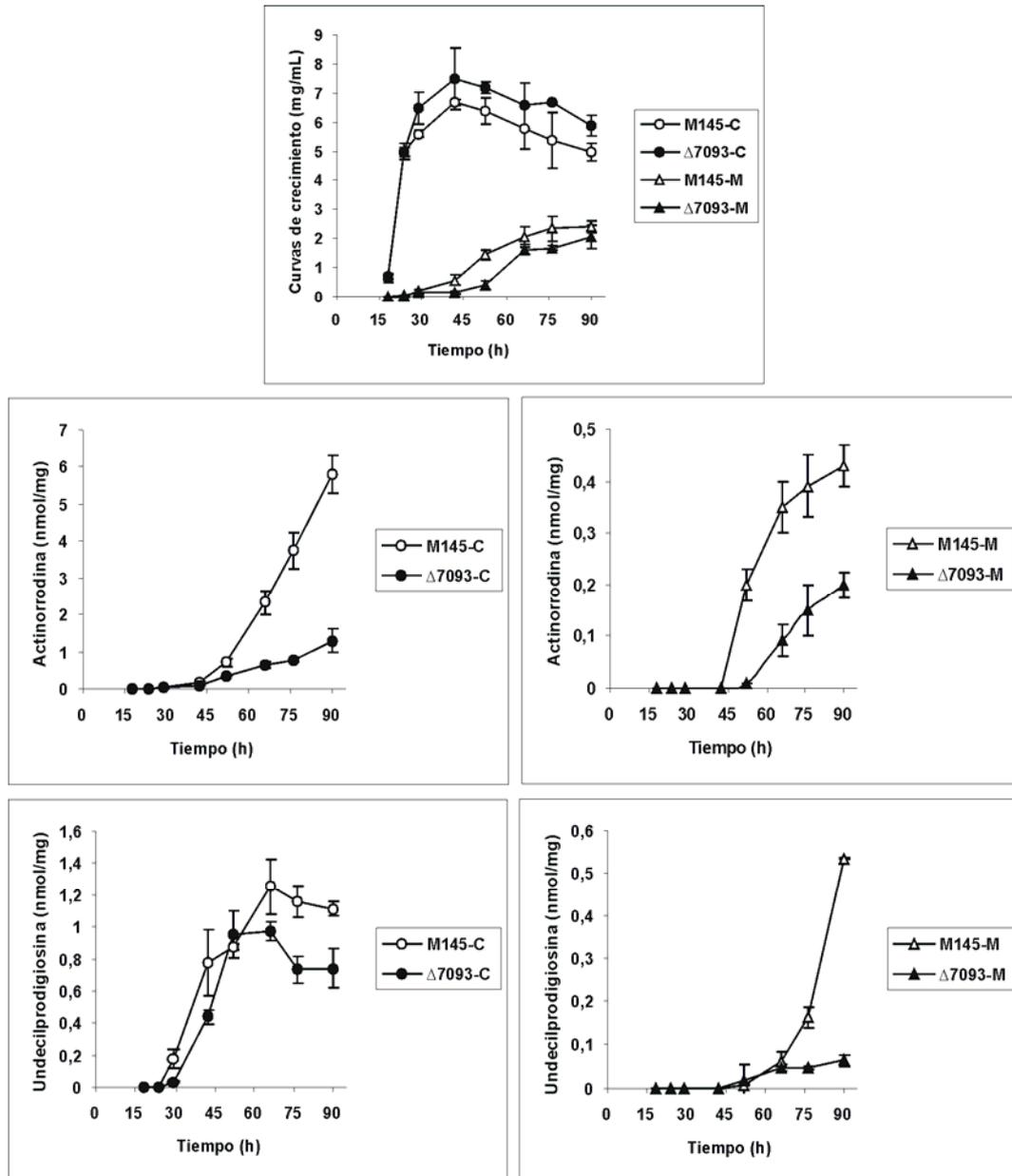


**Figura III.29:** Comprobación mediante Southern de los posibles exconjugantes  $\Delta 7093$ . (A) Mapa del cromosoma de *S. coelicolor* M145 y del mutante *S. coelicolor* M145: $\Delta 7093$ . Se indica la sonda usada en la hibridación. (B) Hibridación Southern del ADN de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 (Wt) y de los exconjugantes *S. coelicolor* M145: $\Delta 7093$  digerido *Bam*HI, utilizando como sonda un fragmento de 4,3 kb. Las señales obtenidas corresponden al patrón de restricción indicado en (A).

### III.6.2.2. Análisis de la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en el mutante *Streptomyces coelicolor* M145: $\Delta 7093$ .

Con el fin de estudiar el efecto que la inactivación del gen *SCO7093* tiene en la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina, se escogió uno de los exconjugantes al azar: *S. coelicolor* M145: $\Delta 7093$ -204 para realizar una fermentación en medios MG definido y complejo junto con la cepa parental. Se realizaron tres réplicas de cada cultivo y se tomaron muestras de 700  $\mu$ L para valorar la producción de antibióticos y 2 mL para determinar peso seco.

La cinética de crecimiento mostrada por el mutante fue similar a la de la cepa parental (Figura III.30). En cuanto a la producción de metabolitos secundarios pigmentados, se observa una disminución de la producción de actinorrodina en el mutante *S. coelicolor* M145: $\Delta 7093$  tanto en el medio MG mínimo (un 73,6 % a las 66 horas de cultivo) como complejo (un 76,6 % menos que la producción de la cepa parental a partir de las 60 horas). La producción de undecilprodigiosina del mutante en el medio MG complejo disminuyó entre un 22-37 % (a partir de las 60 horas de cultivo) respecto a la producción de la cepa parental, mientras que la producción en el medio MG mínimo fue claramente menor que la producción de la cepa parental en las últimas horas de cultivo (70-89 %). Por lo que la delección del gen *SCO7093* tiene un efecto claro en el metabolismo secundario, lo que sugiere que este gen actúa como un regulador de la biosíntesis de metabolitos secundarios directa o indirectamente.



**Figura III.30:** Curvas de crecimiento y producción específica de actinorrodina y undecilprodigiosina de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y del mutante *S. coelicolor* M145:Δ7093 en medio MG complejo (C) y mínimo (M).

### III.6.2.3. Análisis de la producción de CDA en el mutante *Streptomyces coelicolor* M145:Δ7093.

La valoración de la producción de CDA indicó que la producción de CDA del mutante *S. coelicolor* M145:Δ7093 era similar a la de la cepa parental (datos no mostrados).

### III.7. SCO6334.

#### III.7.1. Análisis estructural del gen SCO6334.

El gen *SCO6334* está constituido por 2679 pb (6991755-6994433) y codifica una proteína de 892 aminoácidos y 91,93 kDa, con un punto isoeléctrico de 7,04.

En la región amino terminal presenta una región multidominio conservada presente en reguladores transcripcionales dependientes de ATP del tipo del que presenta la proteína MalT de *Escherichia coli* (COG2909).

En la región carboxilo terminal presenta una zona muy conservada de unión a ADN de tipo hélice-giro-hélice desde los residuos 848-869, típica de reguladores transcripcionales de la familia LuxR.

#### III.7.2. Análisis funcional del gen SCO6334.

##### III.7.2.1. Inactivación del gen SCO6334.

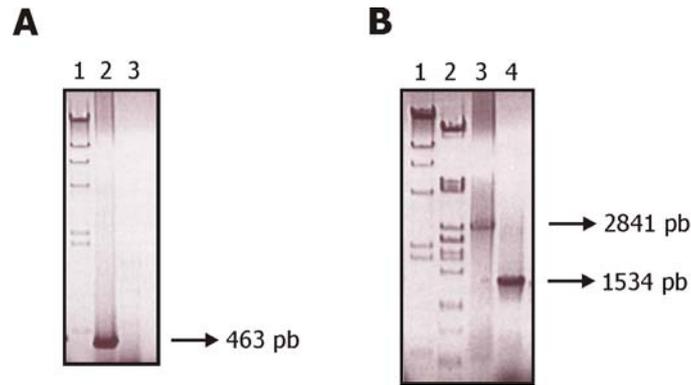
Para conseguir la inactivación del gen *SCO6334* presente en el cósmido St10H5 en *E. coli* se usó la técnica ReDirect (sección II.16).

La inactivación génica se llevó a cabo reemplazando el gen por un fragmento de 1,5 kb amplificado mediante PCR a partir del plásmido pIJ773. Para ello se utilizaron los cebadores D6334F (5'-GTACGCCGACGGCCCCGGGTCGTGGGCGTGAGGGGCGTGattccggggatccgctgacc-3') y D6334R (5'-CGGTGGCCCCGCGTGCCTCACCCCTCGCGGGGAGGTCAgttaggctggagctgcttc-3'), de manera que el producto de amplificación abarcara 39 nucleótidos corriente arriba del gen a inactivar, el codón de inicio del gen, 20 nucleótidos idénticos al pIJ773, el gen de resistencia a apramicina *aac(3)IV* con el *oriT*, 19 nucleótidos idénticos al pIJ773, el codón de fin del gen a inactivar y 39 nucleótidos corriente abajo del gen.

A continuación, se introdujo el cósmido St10H5 que contiene el gen *SCO6334* en la cepa BW25113/pIJ790 mediante electroporación (II.16.4), obteniéndose la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790/ St10H5. En dicha cepa se introdujo mediante electroporación (sección II.16.5 de Materiales y Métodos) el fragmento lineal de ADN que se había amplificado por PCR. De este modo se consiguió la sustitución del gen *SCO6334* presente en el cósmido St10H5 en *E. coli* (St10H5:Δ6334).

Se verificó mediante reacciones de PCR que el gen había sido reemplazado por el fragmento diseñado. En la primera de ellas, se usaron los oligonucleótidos 6334-S y 6334-AS (Material Suplementario) para comprobar la inexistencia de una banda de amplificación de 463 pb en el cósmido St10H5:Δ6334, ya que dichos cebadores amplifican un fragmento interno al gen *SCO6334* (Figura III.31A).

En la segunda PCR se usaron los cebadores C6334-F y C6334-R (Material Suplementario), éstos amplificaron un fragmento que abarca el gen más 100 nucleótidos corriente arriba y 62 nucleótidos corriente abajo, de tal modo que la reacción que contenía ADN del cósmido con el gen *SCO6334* intacto presentaba una banda de amplificación de 2841 pb, sin embargo, cuando el gen había sido reemplazado se obtuvo una banda de amplificación de 1534 pb, lo cual nos permitía comprobar que la inactivación se había producido en el lugar deseado (Figura III.31B).



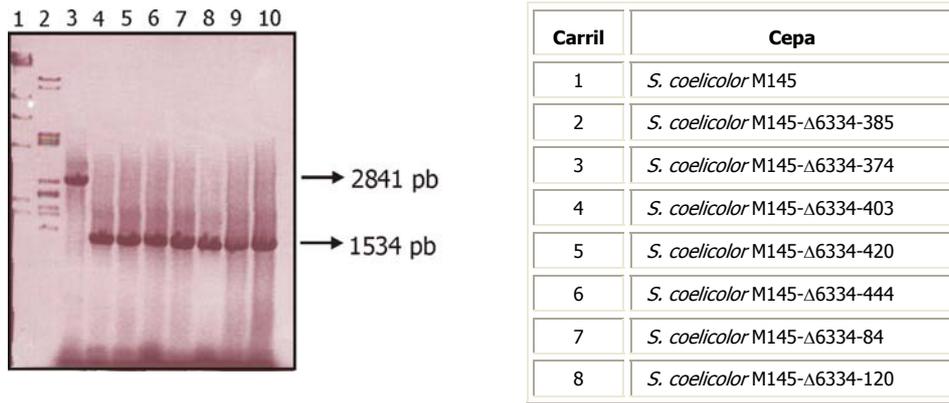
**Figura III.31:** Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen *SCO6334* en el cósmido St10H5. (A) Reacción de PCR con los cebadores 6334-S y 6334-AS. En el carril 2 la reacción de PCR contiene ADN del cósmido St10H5 y en el carril 3 ADN del cósmido St10H5/ $\Delta$ 6334. El carril 1 contiene el marcador de peso molecular fago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción *Hind*III. (B) PCR con los cebadores que anillan fuera de la zona de recombinación. En el carril 3 la reacción contiene ADN del cósmido St10H5 y el carril 4 contiene ADN del cósmido St10H5/ $\Delta$ 6334. Los carriles 1 y 2 contienen los marcadores de peso molecular  $\lambda$  *Hind*III y *Pst*I.

Posteriormente, el cósmido St10H5: $\Delta$ 6334 se introdujo en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 mediante transformación. El ADN de las colonias obtenidas se analizó mediante PCR para comprobar que el cósmido con la construcción no se había perdido. A continuación, se introdujo el cósmido en *Streptomyces* mediante conjugación desde *E. coli* (sección II.15).

Como resultado de la conjugación se obtuvieron 444 colonias que fueron seleccionadas en un primer paso por su resistencia a apramicina. Lo cual indicaba que se había incorporado el fragmento generado por PCR.

En una segunda selección, con cada colonia obtenida se hicieron réplicas en placas de agar MS con apramicina y en placas de agar MS con kanamicina. Y finalmente, tras dos pases por estas placas se obtuvieron 24 parches Apra<sup>R</sup> y Km<sup>S</sup> los cuales se sembraron en medio de esporulación TBO (Higgins y col., 1974).

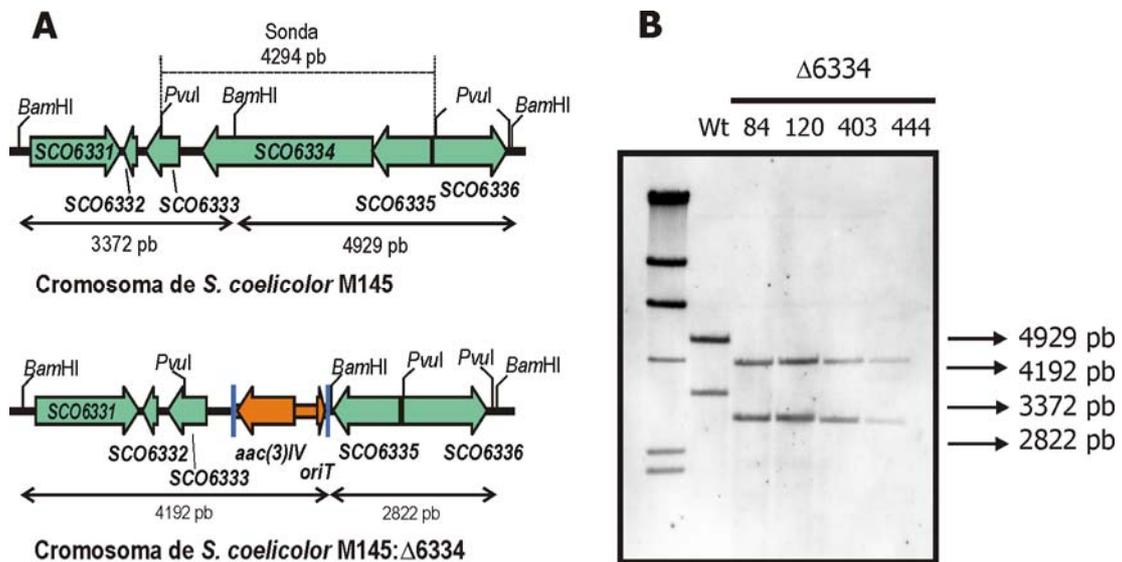
Como estudio previo se realizó una PCR con los oligonucleótidos C6334-F y C6334-R (Material Suplementario) que amplifican un fragmento que incluye la zona de recombinación. El resultado mostró que los exconjugantes analizados presentaban la banda de amplificación de 1534 pb correspondiente a la inactivación del gen *SCO6334*, a diferencia de la banda de 2841 pb obtenida en el carril de la cepa *S. coelicolor* M145 (Figura III.32).



**Figura III.32:** Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen *SCO6334* en *S. coelicolor*. Reacción de PCR usando los cebadores C6334-F y C6334-R. En el carril 3 la reacción de PCR contiene ADN de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y en los carriles 4-10 se muestran las reacciones de PCR que contienen ADN de los posibles clones del cósmido St10H5/Δ6334. Los carriles 1 y 2 contienen ADN del fago λ digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Pst*I, respectivamente.

Para confirmar el resultado obtenido mediante PCR se realizó una hibridación Southern. Para ello el ADN de la cepa *S. coelicolor* M145 y de los exconjugantes Δ6334: 84, 120, 403 y 444 elegidos al azar se digirió con la enzima *Bam*HI, y después de separar los fragmentos del ADN digerido mediante electroforesis, éstos se transfirieron a un filtro de nilón. El filtro se hibridó con una sonda de 4294 pb obtenida mediante digestión del cósmido St10H5 con la enzima de restricción *Pvu*I, marcada con digoxigenina (Figura III.30A).

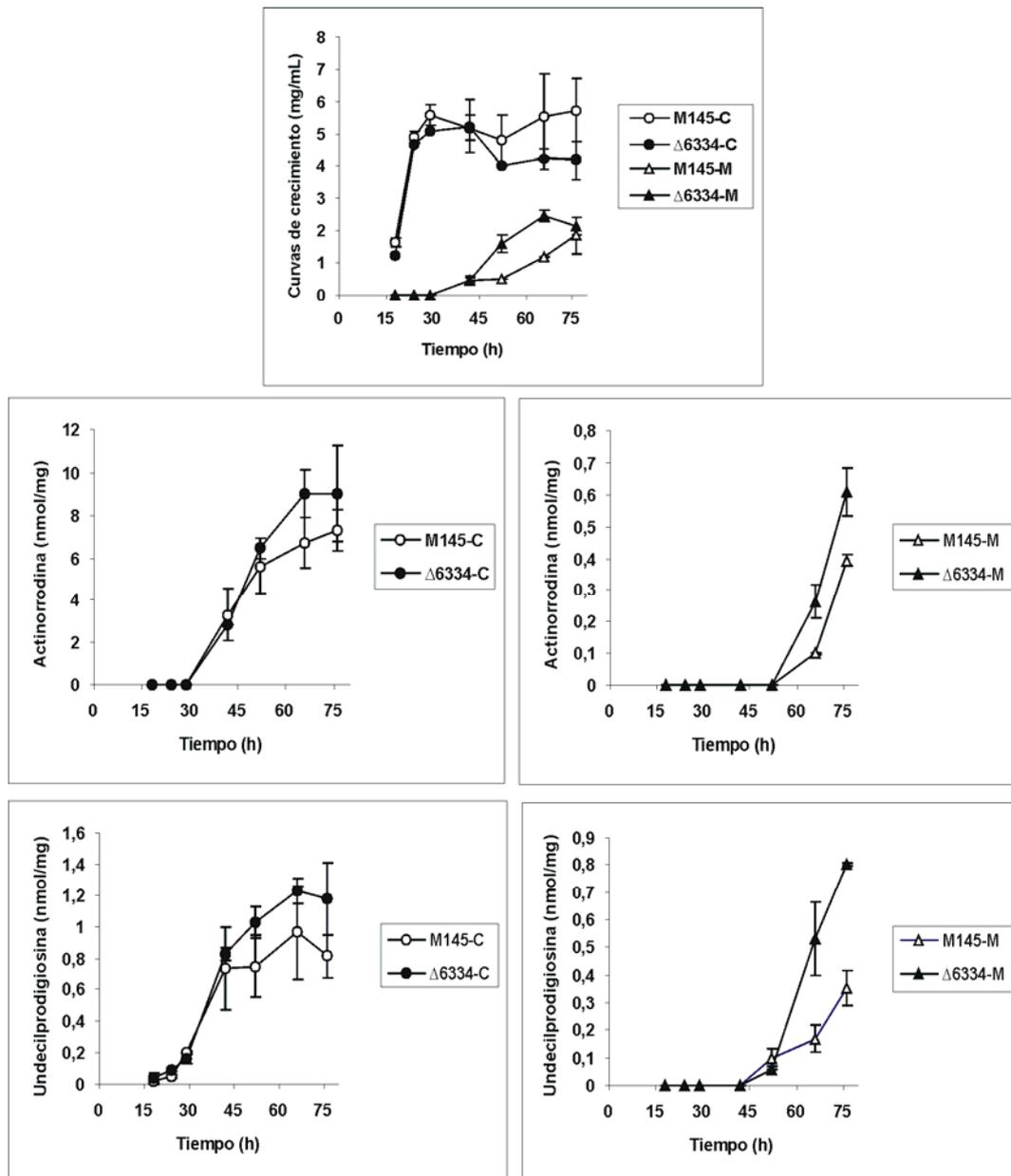
Este experimento de hibridación permitió diferenciar dos bandas de 4929 pb y 3372 pb, cuando no se había producido el doble sobrecruzamiento, y dos bandas de 4192 pb y 2822 pb cuando se había producido la doble recombinación y el gen *SCO6334* había sido inactivado (Figura III.33B).



**Figura III.33:** Comprobación mediante Southern de los posibles exconjugantes Δ6334. (A) Mapa del cromosoma de *S. coelicolor* M145 y del mutante *S. coelicolor* M145:Δ6334. Se indica la sonda usada en la hibridación. (B) Hibridación Southern del ADN de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 (Wt) y de los exconjugantes *S. coelicolor* M145:Δ6334 digerido *Bam*HI, utilizando como sonda un fragmento de 4,3 kb. Las señales obtenidas corresponden al patrón de restricción indicado en (A).

### III.7.2.2. Análisis de la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en el mutante *Streptomyces coelicolor* M145:Δ6334.

Para estudiar el efecto que la delección del gen *SCO6334* tenía en la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina, se escogió uno de los exconjugantes al azar: *S. coelicolor* M145:Δ6334-444 y la cepa parental *S. coelicolor* M145 para realizar una fermentación en medio MG complejo y definido. Se realizaron tres réplicas de cada cultivo y se tomaron muestras de 700 μL para valorar la producción de antibióticos y 2 mL para determinar el peso seco del cultivo.



**Figura III.34:** Curvas de crecimiento y producción específica de actinorrodina y undecilprodigiosina de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y del mutante *S. coelicolor* M145:Δ6334 en medio MG complejo (C) y mínimo (M).

La cinética de crecimiento mostrada por el mutante fue similar a la de la cepa parental (Figura III.34). En cuanto a la producción de metabolitos secundarios pigmentados, no se observó ningún cambio significativo en el medio complejo; sin embargo, en el medio MG mínimo se observó en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ6334 un aumento de la producción de los antibióticos undecilprodigiosina y actinorrodina, aunque de éste último en menor medida (Figura

III.34). Por lo que la inactivación del gen *SCO6334* tiene un efecto en el metabolismo secundario actuando de forma muy diferente a la presentada por los genes *SCO0877*, *SCO7173* y *SCO7093* y comportándose como un regulador negativo de la biosíntesis en el medio mínimo.

### III.7.2.3. Análisis de la producción de CDA en el mutante *Streptomyces coelicolor* M145:Δ6334.

La producción de CDA del mutante *S. coelicolor* M145:Δ6334 fue en todo momento similar a la de la cepa parental (datos no mostrados).

## III.8. SCO7143.

### III.8.1. Análisis estructural del gen *SCO7143*.

El gen *SCO7143* está constituido por 2814 pb (7936673-7939486) y codifica una proteína de 937 aminoácidos y 99,83 kDa, con un punto isoeléctrico de 6,38.

Presenta en la región amino terminal un dominio de unión a ATP/GTP con un motivo Walker A (P-loop). En la región carboxilo terminal presenta un motivo hélice-giro-hélice situado entre los residuos 881 y 902 (Figura III.35).



**Figura III.35:** Dominios estructurales de *SCO7143*. AAA, dominio característico de ATPasas asociadas con diversas actividades celulares (InterPro no. IPR003593) están indicados los dominios Walker A (WA) y Walker B (WB); HTH, dominio de unión a ADN de tipo LuxR (SMART 00421).

### III.8.2. Análisis funcional del gen *SCO7143*.

#### III.8.2.1. Inactivación del gen *SCO7143*.

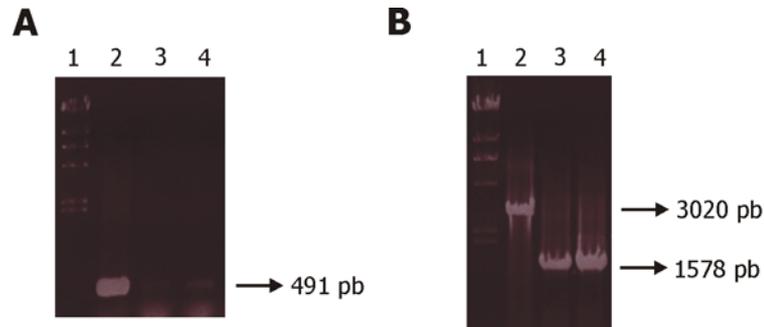
Usando el método ReDirect (sección II.16 y Figura III.32) se logró la inactivación del gen *SCO7143* presente en el cósmido St9A4 en *E. coli*.

La inactivación génica se llevó a cabo reemplazando el gen por un fragmento de 1,5 kb amplificado mediante PCR a partir del plásmido pIJ773. Para ello se utilizaron los cebadores D7143F (5'-GTTTCGCTGTCCCCGAGCACCTGAGGAGCCACGCGC**ATG**attccgggatccgctcgacc-3') y D7143R (5'-AGTCCGTGGGGCCCCGGGGCCCCGGGCCTACGGACT**TCA**tgtaggctggagctgcttc-3').

A continuación, se introdujo mediante electroporación (sección II.16.5) el fragmento lineal de ADN que se había amplificado por PCR en la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790/St9A4 creada para la inactivación del gen *SCO7173*.

Para verificar que el gen había sido reemplazado, se llevaron a cabo dos reacciones de PCR. En la primera de ellas se usaron los cebadores 7143-S y 7143-AS (Material Suplementario) para comprobar la existencia de una banda de amplificación de 491 pb en el ADN del cósmido St9A4 y su desaparición en el ADN del cósmido St9A4:Δ7143, puesto que dichos cebadores amplifican un fragmento interno al gen *SCO7143* (Figura III.36A).

En la segunda PCR se usaron como cebadores C7143-F y C7143-R (Material Suplementario); éstos amplificaron un fragmento que abarca el gen más 74 nucleótidos corriente arriba y 132 nucleótidos corriente abajo, de tal modo que la reacción que contenía ADN del cósmido con el gen *SCO7143* intacto presentaba una banda de amplificación de 3020 pb, sin embargo, cuando el gen fue reemplazado se obtuvo una banda de amplificación de 1578 pb, lo cual nos permitía comprobar que la delección se había producido en el lugar deseado (Figura III.36B).



**Figura III.36:** Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen *SCO7143* en el cósmido St9A4. (A) Reacción de PCR con los cebadores 7143-S y 7143-AS. En el carril 2 la reacción de PCR contiene ADN del cósmido St9A4 y en los carriles 3 y 4 ADN del cósmido St9A4:Δ7143. El carril 1 contiene el marcador de peso molecular fago λ digerido con la enzima de restricción *Hind*III. (B) PCR con los cebadores que anillan fuera de la zona de recombinación. En el carril 2 la reacción contiene ADN del cósmido St9A4 y los carriles 3 y 4 contienen ADN de diferentes clones del cósmido St9A4:Δ7143. El carril 1 contiene el marcador de peso molecular λ/*Hind*III.

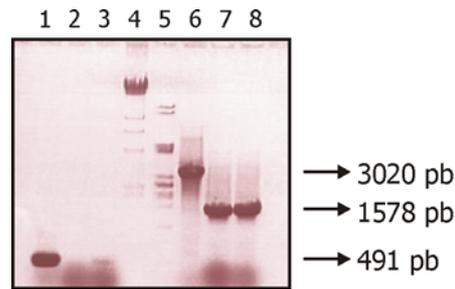
El cósmido St9A4:Δ7143 se introdujo en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 mediante transformación, y el ADN de las colonias obtenidas se analizó mediante PCR para comprobar que el cósmido con la construcción no se había perdido. A continuación, se introdujo la construcción en *Streptomyces*, mediante conjugación (sección II.15).

Como resultado de la conjugación se obtuvieron 360 colonias que fueron seleccionadas por su resistencia a apramicina. Lo cual indicaba que se había incorporado el fragmento generado por PCR.

En una segunda selección, con cada colonia obtenida se hicieron réplicas en placas de agar MS con apramicina y en placas de agar MS con kanamicina. Y finalmente, tras dos pases por estas placas se obtuvieron 115 parches Apra<sup>R</sup> y Km<sup>S</sup> de los cuales se seleccionaron 2 al azar (exconjugantes 43 y 55) y se sembraron en medio de esporulación TBO (Higgins y col., 1974).

Como estudio previo al Southern se realizaron dos reacciones de PCR. En la primera de ellas se usaron los cebadores 7143-S y 7143-AS que amplificaban un fragmento interno al gen *SCO7143* (carriles 1-3). Si el gen había sido reemplazado por el casete de apramicina, no se observaría banda de amplificación en los carriles correspondientes a los exconjugantes y sin embargo, en el carril correspondiente a la cepa silvestre M145 se observaría una banda de 491 pb (Figura III.37).

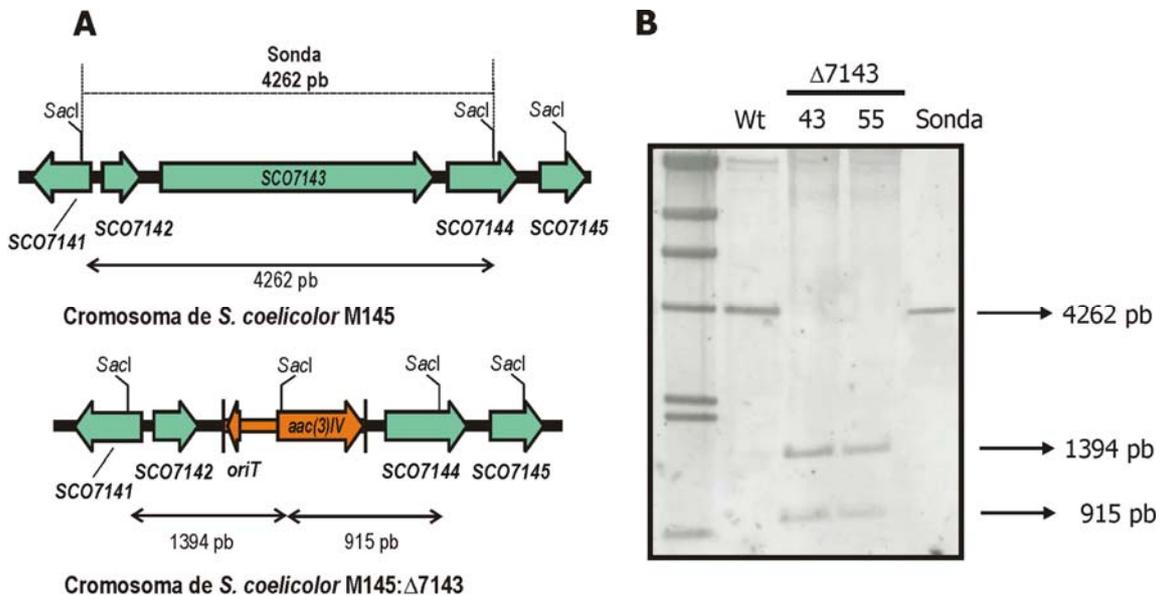
En la segunda PCR, se usaron los cebadores C7143-F y C7143-R que anillaban en una región fuera de la zona de recombinación (carriles 6-8), lo cual nos permitió diferenciar una banda de amplificación de diferente tamaño en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7143 (1548 pb) y en la cepa parental *S. coelicolor* M145 (3020pb). El resultado mostró que los dos exconjugantes presentaban el gen *SCO7143* inactivado por reemplazamiento génico (Figura III.37).



**Figura III.37:** Análisis por PCR para comprobar la inactivación del gen *SCO7143* en *S. coelicolor*. Reacciones de PCR usando los cebadores 7143-S y 7143-AS (carriles 1-3) y C7143-F y C7143-R (carriles 6-8). En los carriles 1 y 6 las reacciones de PCR contienen ADN de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y en los carriles 2, 3, 7 y 8 se muestran las reacciones de PCR que contienen ADN de los posibles clones del cósmido St9A4/ $\Delta$ 7143. Los carriles 4 y 5 contienen ADN del fago  $\lambda$  digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Pst*I, respectivamente.

Para confirmar el resultado obtenido mediante PCR se realizó una hibridación (Figura III.38). Para ello el ADN de la cepa *S. coelicolor* M145 y el de los exconjugantes 43 y 55 Apra<sup>R</sup> y Km<sup>S</sup> se digirió con la enzima *Sac*I, y después de separar los fragmentos del ADN digerido mediante electroforesis, éstos se transfirieron a un filtro de nilón. Dicho filtro se hibridó con una sonda, marcada con digoxigenina, de 4262 pb obtenida mediante el corte del ADN con la enzima de restricción *Sac*I (Figura III.38A).

Al hibridar con la sonda, el diseño del experimento permitió diferenciar una banda de 4262 pb, cuando no se había producido el doble sobrecruzamiento, y dos bandas de 1394 pb y 915 pb cuando se había producido la recombinación y el gen *SCO7143* había sido inactivado (Figura III.38B).

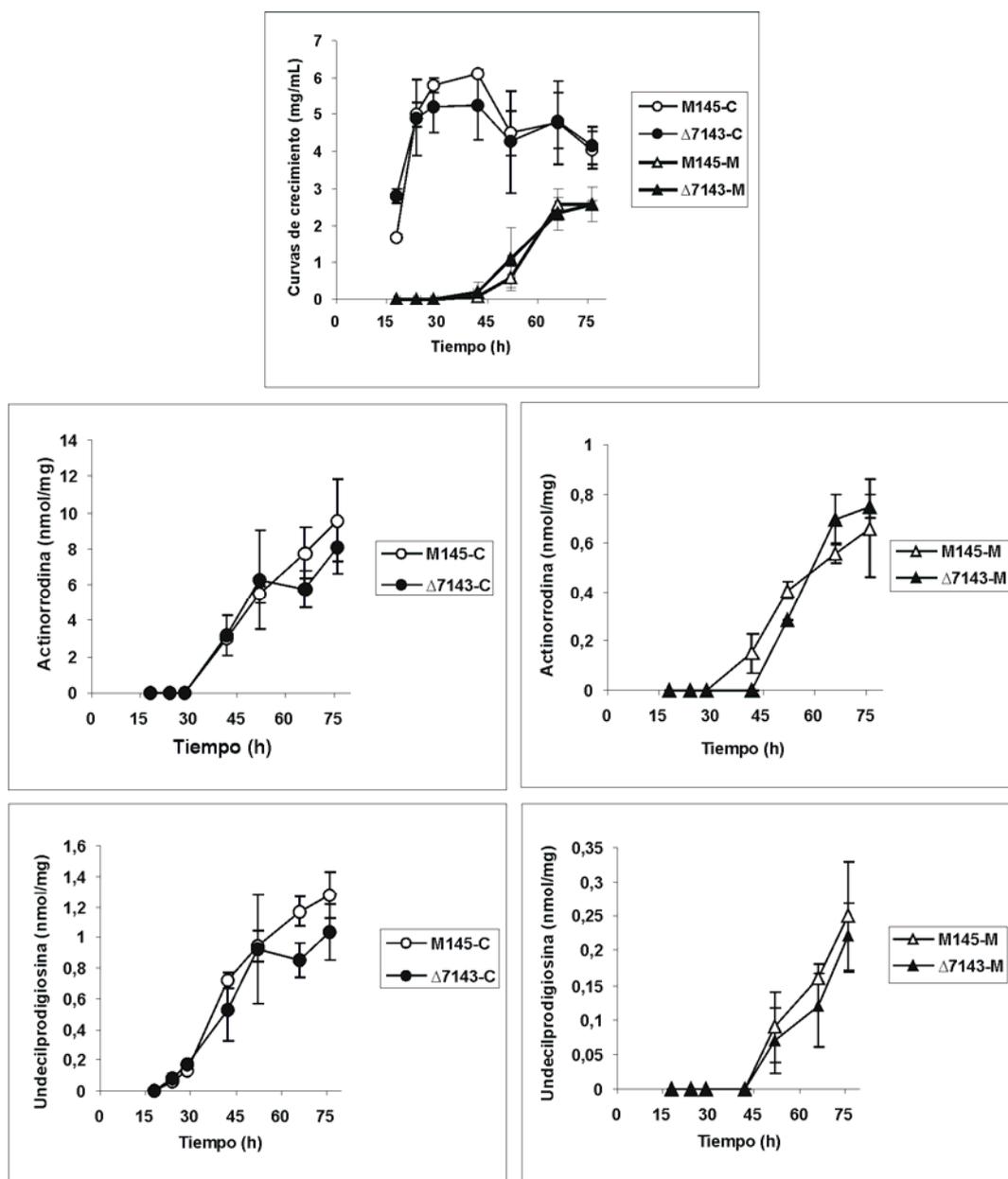


**Figura III.38:** Comprobación mediante Southern de los posibles exconjugantes  $\Delta$ 7143. (A) Mapa del cromosoma de *S. coelicolor* M145 y del mutante *S. coelicolor* M145: $\Delta$ 7143. Se indica la sonda usada en la hibridación. (B) Hibridación Southern del ADN de la cepa silvestre *S. coelicolor* M145 (Wt) y de los exconjugantes *S. coelicolor* M145: $\Delta$ 7143 digerido *Sac*I, utilizando como sonda un fragmento de 4,3 kb. Las señales obtenidas corresponden al patrón de restricción indicado en (A).

### III.8.2.2. Análisis de la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina en el mutante *Streptomyces coelicolor* M145:Δ7143.

Para estudiar el efecto que la inactivación del gen *SCO7143* tiene en la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina, se seleccionó al azar el exconjugante *S. coelicolor* M145:Δ7143-43 para realizar una fermentación en los medios MG complejo y definido junto con la cepa parental *S. coelicolor* M145. Se realizaron tres réplicas de cada cultivo y se tomaron muestras de 700  $\mu$ L para valorar producción de antibióticos y 2 mL para determinar el peso seco.

Los resultados mostraron una cinética de crecimiento en el mutante similar a la presentada por la cepa parental. Respecto a la producción de metabolitos secundarios pigmentados, no se observa ningún cambio significativo en el medio complejo ni en el mínimo. Por lo que la inactivación del gen *SCO7143* no tiene un efecto claro en el metabolismo secundario (Figura III.39).



**Figura III.39:** Curvas de crecimiento y producción específica de actinorrodina y undecilprodigiosina de la cepa parental *S. coelicolor* M145 y del mutante *S. coelicolor* M145:Δ7143 en medio MG complejo (C) y mínimo (M).

### III.8.2.3. Análisis de la producción de CDA en el mutante *Streptomyces coelicolor* M145:Δ7143.

Para valorar la producción de antibiótico dependiente de calcio se realizaron bioensayos en medio sólido NA utilizando siempre como control negativo una placa de dicho medio en el que la cobertera añadida no contenía  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .

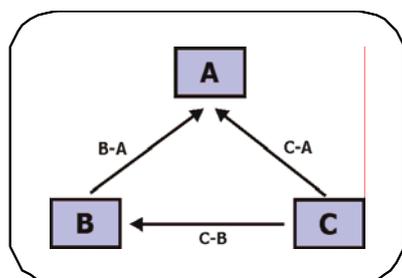
Los resultados obtenidos mostraron una producción de CDA del mutante *S. coelicolor* M145:Δ7143 similar a la de la cepa parental.

## III.9. Estudio comparativo de expresión génica de las cepas *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor* M145:Δ0877 y *S. coelicolor* M145:Δ7173 mediante el uso de micromatrices.

### III.9.1. Diseño experimental.

La utilización de micromatrices permite evaluar diferencias de expresión de los genes entre distintas cepas; además mediante el uso de ADN genómico logramos tener una referencia común a todas ellas. El modelo lineal utilizado fue la comparación de cada uno de los mutantes con la cepa parental *S. coelicolor* M145 y de los mutantes entre sí. Estas comparaciones reciben la denominación de contrastes (Figura III.40).

Para este experimento se extrajo ARN de las cepas *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor* M145:Δ0877 y *S. coelicolor* M145:Δ7173, a las 48 horas cuando los cultivos se hallaban en los comienzos de la fase estacionaria. Los patrones de crecimiento de las cepas fueron similares. El ADN genómico, usado como referencia, fue aislado mediante el método Kirby (Kieser y col., 2000) cuando el cultivo se encontraba en fase estacionaria.

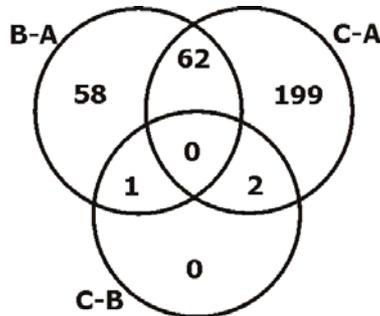


**Figura III.40:** Modelo lineal seguido en el diseño experimental para el análisis con micromatrices. Las condiciones experimentales están encuadradas: A es la cepa silvestre, B es el mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 y C es el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173. La orientación en las flechas se refiere a la comparación entre condiciones.

### III.9.2. Identificación de genes con el patrón de expresión alterado en los mutantes LAL.

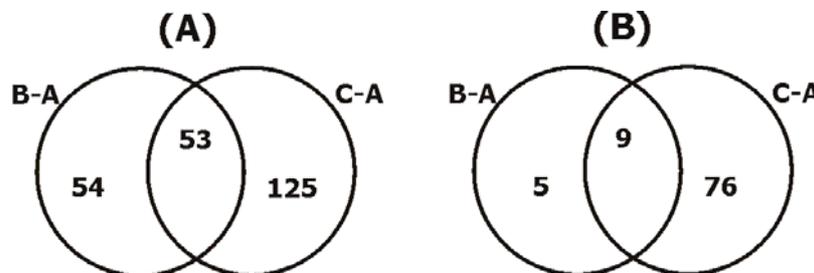
Como resultado del análisis estadístico de los datos (sección II.19.2), se obtuvieron un total de 322 genes estadísticamente significativos (GES) en al menos uno de los contrastes (Material Suplementario). Una forma de expresar este resultado es mediante un diagrama de Venn, donde se representan los GES cuyo contraste cambia, exclusivos de cada condición y los que comparten con otras (Figura III.41). El mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 presentó 121 genes con el patrón de expresión alterado, de los cuales 58 fueron exclusivos, 62 GES fueron comunes con el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173 y uno fue común con el contraste entre el otro mutante y la parental. El mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173 presentó 263 genes estadísticamente

significativos de los cuales 199 exclusivos, 62 comunes al mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 y 2 comunes con el contraste entre el otro mutante y la parental. Es de destacar que los 62 genes en común de los mutantes presentaron el mismo patrón de transcripción (transcripción incrementada o disminuida).



**Figura III.41:** Diagrama de Venn de los diferentes contrastes. Las condiciones experimentales son: A es la cepa parental *S. coelicolor* M145, B es el mutante *S. coelicolor*:Δ0877 y C es el mutante *S. coelicolor*:Δ7173.

Al realizar una comparación entre los genes que presentaron un patrón de transcripción superior (genes sobreexpresados) o inferior (genes subexpresados) al que presentaban los mismos genes en la cepa parental, observamos que existen 107 genes con una transcripción incrementada en la cepa *S. coelicolor* M145:Δ0877 y 178 en la cepa *S. coelicolor* M145:Δ7173, presentando en común 53 genes. Por otro lado, el mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 presentó 14 genes con una transcripción disminuida y 85 el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173, teniendo en común 9 de ellos. Es decir, que existen 232 genes con una transcripción incrementada y 90 genes con una transcripción disminuida en alguno de los mutantes o en los dos. Con todo ello podemos afirmar que prevalece la función de represión por parte de los dos genes LAL estudiados (Figura III.42).



**Figura III.42:** Diagrama de Venn de los contrastes de los mutantes respecto a la cepa parental. Las condiciones experimentales son: A es la cepa parental *S. coelicolor* M145, B es el mutante *S. coelicolor*:Δ0877 y C es el mutante *S. coelicolor*:Δ7173. (A) Genes sobreexpresados y (B) genes subexpresados.

Los genes se clasificaron en diferentes grupos atendiendo a su categoría funcional (Tabla III.2). Los resultados se presentan mediante dos expresiones. El valor  $M_c$  es un valor relativo que equivale al  $M_g$  de la cepa silvestre menos el  $M_g$  de una de las cepas mutantes. El valor  $M_g$  es un valor absoluto obtenido mediante el logaritmo en base dos del cociente del marcaje con Cy3 entre el marcaje con Cy5. Es decir, un valor de  $M_c$  igual a +1 significa que un determinado gen se está expresando dos veces más que el mismo gen de la cepa silvestre. Un valor de  $M_c$  negativo equivale a una disminución de la expresión del gen respecto a la cepa M145.

**Tabla III.2:** Genes diferencialmente expresados en los mutantes LAL *S. coelicolor* M145:Δ0877 y Δ7173.

SCO	Nombre del gen	Producto	Mc BvA	Mc CvA	valor p BvA	valor p CvA
<b>(1) Metabolismo de aminoácidos, transcripción y traducción</b>						
Cepa parental vs. mutante activación						
SCO1492		peptidasa	<b>-0,18</b>	<b>-0,92</b>	0,4819	<b>0,0009</b>
SCO1505	<i>rpsD</i>	S4 proteína ribosomal 30S	<b>-0,31</b>	<b>-1,20</b>	0,2140	<b>0,0000</b>
SCO2954	<i>sigU</i>	factor sigma ARN polimerasa	<b>-0,85</b>	<b>-1,27</b>	0,0370	<b>0,0029</b>
SCO3892	<i>sigT</i>	factor sigma ARN polimerasa	<b>-0,61</b>	<b>-0,92</b>	0,0038	<b>0,0001</b>
SCO4649	<i>rplA</i>	L1 proteína ribosomal 50S	<b>-0,06</b>	<b>-0,65</b>	0,7334	<b>0,0008</b>
SCO4659	<i>rpsL</i>	S12 proteína ribosomal 30S	<b>-0,10</b>	<b>-1,17</b>	0,7476	<b>0,0007</b>
SCO4720	<i>rpmD</i>	L30 proteína ribosomal 50S	<b>-0,02</b>	<b>-1,50</b>	0,9529	<b>0,0006</b>
SCO4769	<i>ECF</i>	factor sigma ECF	<b>-0,44</b>	<b>-1,03</b>	0,0817	<b>0,0002</b>
SCO4908	<i>sigQ</i>	factor sigma ARN polimerasa	<b>-0,10</b>	<b>-1,25</b>	0,7094	<b>0,0000</b>
SCO4958	<i>metB</i>	cistationina gamma-sintasa	<b>-0,64</b>	<b>-1,04</b>	0,0022	<b>0,0000</b>
SCO6743		proteína transcripcional accesoria	<b>-0,27</b>	<b>-0,62</b>	0,1372	<b>0,0014</b>
Cepa parental vs. mutante represión						
SCO0613	<i>arcA</i>	arginina deiminasa	<b>0,42</b>	<b>0,76</b>	0,0359	<b>0,0004</b>
SCO0992		cisteina sintasa	<b>0,79</b>	<b>0,61</b>	<b>0,0004</b>	0,0048
SCO1054		aminotransferasa	<b>0,78</b>	<b>0,67</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0012</b>
SCO1222		amidinotransferasa	<b>1,31</b>	<b>0,63</b>	<b>0,0000</b>	0,0030
SCO1276	<i>sigJ</i>	ECF factor sigma ARN polimerasa	<b>1,16</b>	<b>0,78</b>	<b>0,0003</b>	0,0115
SCO1657		metionina sintasa	<b>0,84</b>	<b>0,73</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0003</b>
SCO1916	<i>dapD</i>	transferasa	<b>1,07</b>	<b>1,25</b>	0,0018	<b>0,0005</b>
SCO2018	<i>pepN</i>	aminopeptidasa N	<b>0,75</b>	<b>1,07</b>	0,0056	<b>0,0002</b>
SCO3397		lisil-ARNt sintetasa integral de membrana	<b>0,98</b>	<b>1,29</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0000</b>
SCO3801		aspartil aminopeptidasa	<b>0,66</b>	<b>1,08</b>	0,0047	<b>0,0000</b>
SCO4366		fosfoserina aminotransferasa	<b>0,64</b>	<b>0,43</b>	<b>0,0005</b>	0,0157
SCO4384		enoi CoA hidratasa	<b>0,32</b>	<b>1,44</b>	0,2886	<b>0,0000</b>
<b>(2) Metabolismo de nucleótidos y coenzimas, replicación, recombinación y reparación de ADN</b>						
Cepa parental vs. mutante activación						
SCO1522	<i>pdxT</i>	glutamina amidotransferasa subunidad pdxT	<b>-0,06</b>	<b>-0,88</b>	0,7860	<b>0,0003</b>
SCO1958	<i>uvrA</i>	ABC nucleasa de excisión subunidad A	<b>-0,64</b>	<b>-1,10</b>	0,0416	<b>0,0011</b>
SCO3319	<i>hemA</i>	glutamil-ARNt reductasa	<b>-0,55</b>	<b>-0,81</b>	0,0065	<b>0,0002</b>
SCO3347		AP endonucleasa	<b>-0,32</b>	<b>-0,73</b>	0,0978	<b>0,0005</b>
SCO3873	<i>gyrA</i>	ADN girasa subunidad A	<b>-0,83</b>	<b>-1,62</b>	0,0189	<b>0,0000</b>
SCO5166		helicasa	<b>-0,31</b>	<b>-0,95</b>	0,2297	<b>0,0007</b>
SCO5439		helicasa	<b>-0,63</b>	<b>-1,01</b>	0,0215	<b>0,0006</b>
SCO5770	<i>recX</i>	proteína de recombinación reguladora	<b>-0,88</b>	<b>-1,08</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0000</b>
Cepa parental vs. mutante represión						
SCO1167		helicasa	<b>1,39</b>	<b>1,01</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
SCO1202		ADN ligasa	<b>1,01</b>	<b>0,70</b>	<b>0,0003</b>	0,0100
SCO2162		quinolinato sintetasa (fragmento)	<b>1,13</b>	<b>0,67</b>	<b>0,0000</b>	0,0061
SCO3383	<i>panC</i>	pantoato-aminoácido ligasa	<b>0,91</b>	<b>0,67</b>	<b>0,0004</b>	0,0068
SCO3401	<i>folK</i>	hidroximetildihidropteridina pirofosfoquinasa	<b>0,48</b>	<b>0,90</b>	0,0209	<b>0,0001</b>
SCO4079	<i>purL</i>	fosforibosil formilglicinamide sintasa II	<b>0,63</b>	<b>0,56</b>	<b>0,0008</b>	0,0028
SCO4971		xantina deshidrogenasa	<b>0,86</b>	<b>1,32</b>	0,0073	<b>0,0001</b>
SCO5465		NADPH oxidoreductasa dependiente de coenzima F420	<b>0,67</b>	<b>-0,01</b>	<b>0,0007</b>	0,9370

Tabla 2. Continuación.

SCO	Nombre del gen	Producto	Mc BvA	Mc CvA	valor p BvA	valor p CvA
<b>(3) Respiración y producción de energía</b>						
Cepa parental vs. mutante activación						
SCO1934	<i>cyoE</i>	citocromo oxidasa factor de ensamblaje	<b>-1,15</b>	<b>-0,12</b>	<b>0,0007</b>	0,7079
SCO5368	<i>atpE</i>	ATP sintasa cadena C	<b>-0,36</b>	<b>-1,01</b>	0,1929	<b>0,0010</b>
SCO5372	<i>atpG</i>	ATP sintasa cadena gamma	<b>-0,19</b>	<b>-1,08</b>	0,4572	<b>0,0002</b>
Cepa parental vs. mutante represión						
SCO1419	<i>ugpQ2</i>	glicerofosforil diester fosfodiesterasa	<b>1,70</b>	<b>0,97</b>	<b>0,0000</b>	0,0031
SCO1955		proteína Rieske de unión a sulfuro de hierro	<b>0,70</b>	<b>1,18</b>	0,0385	<b>0,0011</b>
SCO1968	<i>glpQ2</i>	glicerofosforil diester fosfodiesterasa secretada	<b>3,35</b>	<b>3,13</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
SCO4948	<i>narH3</i>	NarH3 nitrato reductasa cadena beta	<b>0,67</b>	<b>0,99</b>	0,0017	<b>0,0000</b>
SCO5424	<i>ackA</i>	acetato quinasa	<b>0,82</b>	<b>0,52</b>	<b>0,0003</b>	0,0156
SCO5842		acil-CoA sintetasa	<b>0,72</b>	<b>1,07</b>	0,0089	<b>0,0003</b>
<b>(4) Biosíntesis de la envuelta celular y diferenciación morfológica</b>						
Cepa parental vs. mutante activación						
SCO0399		piruvil transferasa biosíntesis de peptidoglicano	<b>-0,37</b>	<b>-1,06</b>	0,2179	<b>0,0011</b>
SCO2953	<i>rsuA</i>	factor anti-sigma	<b>-0,79</b>	<b>-1,19</b>	0,0261	<b>0,0015</b>
SCO2954	<i>sigU</i>	factor sigma ARN polimerasa	<b>-0,85</b>	<b>-1,27</b>	0,0370	<b>0,0029</b>
SCO6753		nucleótido azúcar-1-fosfato transferasa	<b>-0,72</b>	<b>-0,83</b>	0,0009	<b>0,0002</b>
Cepa parental vs. mutante represión						
SCO1950	<i>whiA</i>	proteína reguladora de la esporulación	<b>1,78</b>	<b>1,02</b>	<b>0,0030</b>	0,0865
SCO2187		acetilmuramoil-L-alanina amidasa	<b>0,96</b>	<b>0,86</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0002</b>
SCO2328		D-ala-D-ala dipeptidasa	<b>0,83</b>	<b>1,40</b>	0,0867	<b>0,0066</b>
SCO2924	<i>ssgG</i>	regulador de la esporulación	<b>1,23</b>	<b>0,37</b>	<b>0,0000</b>	0,1680
SCO3846	<i>ftsW</i>	familia FtsW/RodA/SpoVE proteína del ciclo celular	<b>1,31</b>	<b>1,58</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
SCO4880	<i>neuA</i>	ácido CMP-N-acetilneuramínico sintetasa	<b>0,78</b>	<b>0,34</b>	<b>0,0005</b>	0,1048
SCO4881	<i>neuB<sup>2</sup></i>	ácido N-acetilneuramínico sintasa	<b>0,93</b>	<b>0,33</b>	0,0020	0,2512
SCO5039		proteína de unión a penicilina pbp2	<b>0,40</b>	<b>0,75</b>	0,0349	<b>0,0003</b>
SCO5582	<i>nsdA</i>	regulador negativo de la diferenciación	<b>0,93</b>	<b>0,32</b>	<b>0,0003</b>	0,1732
SCO6060	<i>murC</i>	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanina ligasa	<b>0,61</b>	<b>0,93</b>	0,0015	<b>0,0000</b>
SCO6682	<i>ramS</i>	proteína del desarrollo SC5A7.32	<b>0,60</b>	<b>1,01</b>	0,0292	<b>0,0007</b>
SCO6691		fosfolipasa C	<b>0,91</b>	<b>0,29</b>	<b>0,0003</b>	0,2043
SCO7306	<i>wblK</i>	regulador transcripcional de la familia WhiB	<b>0,48</b>	<b>1,23</b>	0,0611	<b>0,0000</b>
<b>(5) Metabolismo de carbohidratos</b>						
Cepa parental vs. mutante activación						
SCO0766		beta-galactosidasa secretada	<b>-0,44</b>	<b>-0,93</b>	0,0347	<b>0,0001</b>
SCO1935	<i>tktA1</i>	transcetolasa A	<b>0,00</b>	<b>-0,90</b>	0,9945	<b>0,0003</b>
SCO6374		transferasa de azúcares de membrana	<b>-0,58</b>	<b>-0,92</b>	0,0115	<b>0,0002</b>
Cepa parental vs. mutante represión						
SCO4209	<i>pgm1</i>	fosfoglicerato mutasa	<b>0,82</b>	<b>1,03</b>	0,0019	<b>0,0002</b>
SCO6232		beta-manosidasa	<b>0,11</b>	<b>0,79</b>	0,5461	<b>0,0002</b>
SCO6234	<i>manA</i>	beta-manosidasa secretada	<b>0,33</b>	<b>0,66</b>	0,0528	<b>0,0003</b>
SCO6548		celulasa secretada	<b>0,20</b>	<b>0,79</b>	0,2939	<b>0,0003</b>

Tabla 2. Continuación.

SCO	Nombre del gen	Producto	Mc BvA	Mc CvA	valor p BvA	valor p CvA
<b>(6) Metabolismo de lípidos</b>						
Cepa parental vs. mutante represión						
SCO0330		3-cetoacil-ACP/CoA reductasa	<b>0,91</b>	<b>0,70</b>	<b>0,0001</b>	0,0021
SCO0920		acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa	<b>1,77</b>	<b>1,00</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
SCO1048		fosfolipasa A2	<b>1,47</b>	<b>1,32</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>
SCO1209		acil-CoA deshidrogenasa de la cadena corta	<b>1,18</b>	<b>1,04</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0001</b>
SCO2194	<i>lipA</i>	ácido lipoico sintetasa	<b>0,82</b>	<b>0,72</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0005</b>
SCO4234		2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfate sintasa	<b>0,55</b>	<b>1,24</b>	0,1071	<b>0,0013</b>
SCO4384		enoil CoA hidratasa	<b>0,32</b>	<b>1,44</b>	0,2886	<b>0,0000</b>
SCO6470		proteína similar a MaoC (Acil deshidratasa)	<b>0,69</b>	<b>1,15</b>	0,0016	<b>0,0000</b>
<b>(7) Respuesta a la escasez de fosfato</b>						
Cepa parental vs. mutante represión						
SCO0920		acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa	<b>1,77</b>	<b>1,00</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
SCO1048		fosfolipasa A2	<b>1,47</b>	<b>1,32</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,0003</b>
SCO1196 <sup>b)</sup>		proteína secretada dependiente de Tat	<b>1,94</b>	<b>1,62</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
SCO1419	<i>ugpQ2</i>	glicerofosforil diéster fosfodiesterasa	<b>1,70</b>	<b>0,97</b>	<b>0,0000</b>	0,0031
SCO1633	<i>tatA</i>	proteína secretada dependiente de Tat	<b>1,00</b>	<b>1,22</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0000</b>
SCO1845	<i>pitHZ<sup>a,c)</sup></i>	proteína transportadora de fosfato de baja afinidad	<b>0,91</b>	<b>0,86</b>	0,0252	0,0401
SCO1968	<i>glpQ2<sup>d)</sup></i>	glicerofosforil diéster fosfodiesterasa secretada	<b>3,35</b>	<b>3,13</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
SCO2198	<i>glnA<sup>a,e)</sup></i>	glutamina sintetasa I	<b>0,61</b>	<b>0,25</b>	0,0045	0,2266
SCO2286	<i>phoA<sup>a,f)</sup></i>	fosfatasa alcalina	<b>0,86</b>	<b>0,32</b>	0,0056	0,2752
SCO2428		proteína de unión a fosfato (proteína secretada)	<b>1,57</b>	<b>1,31</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0001</b>
SCO4140	<i>pstA</i>	permeasa del sistema ABC de transporte de fosfato	<b>1,03</b>	<b>0,71</b>	<b>0,0001</b>	0,0032
SCO4141	<i>pstC<sup>a)</sup></i>	permeasa del sistema ABC de transporte de fosfato	<b>0,64</b>	<b>-0,07</b>	0,0143	0,7711
SCO4142	<i>pstS<sup>a,d)</sup></i>	precursor de la proteína de unión a fosfato	<b>0,97</b>	<b>0,79</b>	0,0012	0,0069
SCO4209	<i>pgm1</i>	fosfoglicerato mutasa	<b>0,82</b>	<b>1,03</b>	0,0019	<b>0,0002</b>
SCO4226		proteína hipotética	<b>0,91</b>	<b>0,54</b>	<b>0,0002</b>	0,0180
SCO4227	<i>mtpA</i>	metalotioneina	<b>1,15</b>	<b>0,28</b>	<b>0,0000</b>	0,2728
SCO4228	<i>phoU<sup>f)</sup></i>	proteína reguladora del sistema de transporte del fosfato	<b>1,45</b>	<b>0,87</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0013</b>
SCO4229	<i>phoR<sup>d)</sup></i>	PhoR sensor quinasa	<b>1,29</b>	<b>0,93</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0007</b>
SCO4230	<i>phoP<sup>d)</sup></i>	PhoP regulador de respuesta	<b>1,17</b>	<b>1,04</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0001</b>
SCO4880	<i>neuA<sup>b)</sup></i>	ácido CMP-N-acetilneuramínico sintetasa	<b>0,78</b>	<b>0,34</b>	<b>0,0005</b>	0,1048
SCO4881	<i>neuB<sup>a,b)</sup></i>	ácido N-acetilneuramínico sintasa	<b>0,93</b>	<b>0,33</b>	0,0020	0,2512
SCO5746		proteína hipotética SC7C7.01	<b>1,49</b>	<b>1,55</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
SCO6691		proteína secretada dependiente de Tat	<b>0,91</b>	<b>0,29</b>	<b>0,0003</b>	0,2043
SCO7344		proteína secretada	<b>1,57</b>	<b>0,98</b>	<b>0,0000</b>	0,0025
SCO7631		proteína secretada dependiente de Tat	<b>0,73</b>	<b>0,99</b>	0,0047	<b>0,0003</b>
SCO7697	<i>phy<sup>b)</sup></i>	fitasa secretada	<b>1,09</b>	<b>0,71</b>	<b>0,0001</b>	0,0072

Tabla 2. Continuación.

SCO	Nombre del gen	Producto	Mc BvA	Mc CvA	valor p BvA	valor p CvA
<b>(8) Metabolitos secundarios</b>						
Cepa parental vs. mutante activación						
SCO5073	<i>actVI-ORF2</i>	oxidoreductasa	<b>-1,01</b>	<b>-1,14</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0001</b>
SCO5075	<i>actVI-ORF4</i>	oxidoreductasa	<b>-0,80</b>	<b>-1,19</b>	0,0012	<b>0,0000</b>
SCO5080	<i>actVA5</i>	hidrolasa	<b>-0,79</b>	<b>-1,06</b>	0,0107	<b>0,0011</b>
SCO5083	<i>actII-2</i>	transportador de actinorrodina	<b>-0,68</b>	<b>-1,39</b>	0,0456	<b>0,0002</b>
SCO5088	<i>actI-ORF2</i>	$\beta$ -cetoacil sintasa subunidad $\beta$ del poliuretido actinorrodina	<b>-0,86</b>	<b>-1,16</b>	0,0123	<b>0,0014</b>
SCO6277	<i>cpkE</i>	epoxidasa hidrolasa	<b>-0,29</b>	<b>-0,77</b>	0,1689	<b>0,0007</b>
<b>(9) Regulación</b>						
Cepa parental vs. mutante activación						
SCO2753		regulador transcripcional de la familia LacI	<b>-0,34</b>	<b>-0,77</b>	0,0920	<b>0,0005</b>
SCO2953	<i>rsuA</i>	factor anti-sigma	<b>-0,79</b>	<b>-1,19</b>	0,0261	<b>0,0015</b>
SCO2954	<i>sigU</i>	factor sigma ARN polimerasa	<b>-0,85</b>	<b>-1,27</b>	0,0370	<b>0,0029</b>
SCO3857		proteína reguladora	<b>-0,74</b>	<b>-1,02</b>	0,0081	<b>0,0006</b>
SCO4425	<i>afsS<sup>g</sup></i>	proteína similar a sigma	<b>-0,55</b>	<b>-1,17</b>	0,2337	0,0161
SCO4908	<i>sigQ</i>	ARN polimerasa factor sigma	<b>-0,10</b>	<b>-1,25</b>	0,7094	<b>0,0000</b>
SCO4920		regulador transcripcional de la familia DeoR	<b>-0,22</b>	<b>-1,48</b>	0,5297	<b>0,0002</b>
SCO5770	<i>recX</i>	proteína reguladora de la recombinación	<b>-0,88</b>	<b>-1,08</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0000</b>
SCO7089		sensor quinasa de un sistema de dos componentes	<b>-0,82</b>	<b>-0,28</b>	<b>0,0008</b>	0,2299
Cepa parental vs. mutante represión						
SCO0148		proteína reguladora de la transcripción	<b>1,17</b>	<b>0,79</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0007</b>
SCO0275		proteína represora de la transcripción	<b>0,85</b>	<b>0,38</b>	<b>0,0001</b>	0,0636
SCO0471		regulador transcripcional de la familia AraC	<b>0,86</b>	<b>1,10</b>	0,0019	<b>0,0002</b>
SCO0605		regulador transcripcional de la familia AraC	<b>0,75</b>	<b>0,88</b>	0,0043	<b>0,0012</b>
SCO0702	<i>abaA-orfA</i>	regulador pleiotrópico	<b>0,87</b>	<b>0,16</b>	<b>0,0413</b>	0,6953
SCO1066		regulador transcripcional de la familia LacI	<b>1,07</b>	<b>1,69</b>	<b>0,0003</b>	<b>0,0000</b>
SCO1119		proteína reguladora de la transcripción de la familia AsnC	<b>0,45</b>	<b>1,01</b>	0,0746	<b>0,0002</b>
SCO1370		regulador de respuesta de unión a ADN de un sistema de dos componentes	<b>0,93</b>	<b>1,02</b>	0,0020	<b>0,0009</b>
SCO1950	<i>whiA</i>	proteína reguladora de la esporulación	<b>1,78</b>	<b>1,02</b>	<b>0,0030</b>	0,0865
SCO2374		regulador transcripcional de la familia TetR	<b>0,87</b>	<b>0,56</b>	<b>0,0005</b>	0,0195
SCO2775		proteína reguladora de la familia TetR	<b>1,26</b>	<b>0,88</b>	<b>0,0002</b>	0,0076
SCO2924	<i>ssgG</i>	regulador de la esporulación	<b>1,23</b>	<b>0,37</b>	<b>0,0000</b>	0,1680
SCO3653		regulador de respuesta de un sistema de dos componentes	<b>0,53</b>	<b>0,67</b>	0,0034	<b>0,0004</b>
SCO3750		sensor histidina quinasa de un sistema de dos componentes	<b>0,69</b>	<b>1,13</b>	0,0261	<b>0,0007</b>
SCO3975		regulador	<b>1,52</b>	<b>1,56</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,0004</b>
SCO3979		regulador transcripcional de la familia TetR	<b>0,59</b>	<b>0,76</b>	0,0067	<b>0,0009</b>
SCO4122		regulador transcripcional de la familia MarR	<b>0,74</b>	<b>0,36</b>	<b>0,0007</b>	0,0793
SCO4198		proteína de unión al ADN	<b>0,77</b>	<b>0,67</b>	<b>0,0008</b>	0,0032
SCO4228	<i>phoU<sup>f</sup></i>	regulador del sistema de transporte de fosfato	<b>1,45</b>	<b>0,87</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0013</b>
SCO4229	<i>phoR<sup>f</sup></i>	PhoR sensor quinasa	<b>1,29</b>	<b>0,93</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0007</b>
SCO4230	<i>phoP<sup>f</sup></i>	PhoP regulador de respuesta	<b>1,17</b>	<b>1,04</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0001</b>
SCO4263 <sup>h)</sup>		regulador transcripcional de la familia LuxR	<b>0,81</b>	<b>0,82</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0005</b>

Tabla 2. Continuación.

SCO	Nombre del gen	Producto	Mc BvA	Mc CvA	valor p BvA	valor p CvA
<b>(9) Regulación (continuación)</b>						
Cepa parental vs. mutante represión (continuación)						
SCO4276	<i>senR</i>	proteína reguladora de respuesta	<b>0,81</b>	<b>1,11</b>	0,0068	<b>0,0004</b>
SCO4434		regulador transcripcional de la familia LysR	<b>0,45</b>	<b>0,81</b>	0,0439	<b>0,0008</b>
SCO4906	<i>afsQ2</i>	proteína sensora quinasa	<b>0,62</b>	<b>0,83</b>	0,0046	<b>0,0003</b>
SCO4907	<i>afsQ1<sup>a)</sup></i>	proteína reguladora transcripcional	<b>0,70</b>	<b>0,24</b>	0,0087	0,3597
SCO5532		regulador transcripcional de la familia TetR	<b>0,41</b>	<b>1,27</b>	0,1847	<b>0,0003</b>
SCO5582	<i>nsdA</i>	regulador de la esporulación	<b>0,93</b>	<b>0,32</b>	<b>0,0003</b>	0,1732
SCO5917		regulador transcripcional de la familia MerR	<b>0,71</b>	<b>1,20</b>	0,0411	<b>0,0012</b>
SCO7054		regulador transcripcional similar a la familia PadR	<b>1,05</b>	<b>1,02</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>
SCO7306	<i>wbK</i>	regulador transcripcional de la familia WhiB	<b>0,48</b>	<b>1,23</b>	0,0611	<b>0,0000</b>

**Tabla III.2:** Genes diferencialmente expresados en los mutantes LAL *S. coelicolor* M145:Δ0877 y Δ7173. Mc y valor *p* de los contrastes entre las condiciones indicadas (A: cepa *S. coelicolor* A3(2) M145, B: cepa *S. coelicolor*:Δ0877 y C: cepa *S. coelicolor*:Δ7173). Entre los 322 genes estadísticamente significativos (GES), en la tabla se incluyen aquellos genes con una función definida que coincide con las categorías seleccionadas. Algunos genes están incluidos en varias categorías funcionales debido a su implicación en varios procesos. Algunos genes que no coinciden con este criterio de selección han sido incluidos (ver pie de figura <sup>a)</sup>). Los genes están ordenados primero por su clase funcional, segundo por el tipo de regulación y entonces por la posición que ocupan en el cromosoma con el objetivo de destacar la coincidencia de perfiles entre genes de la misma agrupación. La fuente para las anotaciones es la base de datos de *Streptomyces* (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>). Para simplificar, se han eliminado las designaciones "putativo". Los valores *p* BvA and CvA estadísticamente significativos (GES) están indicados en negrita (ver sección II.19.2).

- a) Gen incluido porque su perfil de transcripción coincide con genes funcionalmente relacionados.  
b) PhoP activa la transcripción de este gen de forma directa (Sola-Landa y col., 2008).  
c) PhoP activa la transcripción de este gen de forma directa (Santos-Beneit y col., 2008).  
d) PhoP activa la transcripción de este gen de forma directa (Rodríguez-García y col., 2007).  
e) PhoP regula negativamente la transcripción del gen *glnA* de forma directa mediante la unión a su región promotora y también indirectamente por represión del gen *glnR* (Rodríguez-García y col., 2009).  
f) PhoP activa la transcripción de este gen de forma directa (Apel y col., 2007).  
g) PhoP controla negativamente la transcripción de este gen por unión directa (Santos-Beneit y col., 2009b).  
h) En la región promotora de este gen se encuentra una zona de unión de PhoP (Sola-Landa y col., 2008).

### III.9.2.1. Genes implicados en el metabolismo de aminoácidos, transcripción y traducción.

Este grupo incluye 23 genes que muestran una expresión alterada en alguno de los mutantes. Estos genes codifican enzimas implicadas en el metabolismo de aminoácidos (12 genes), proteínas ribosomales (4 genes), proteínas relacionadas con la transcripción (6 genes, incluyendo 5 factores sigma), y una hipotética lisil-ARNt sintetasa (*SCO3397*) (Tabla III.2).

Es de destacar que los cuatro genes que codifican proteínas ribosomales (*rplA*, *rpsD*, *rpsL* y *rpmD*) y los cinco genes implicados en la transcripción (los factores sigma *sigU*, *sigT*, *sigQ*, *SCO4769* y la proteína de transcripción *SCO6743*) muestran niveles de transcripción por debajo de la cepa parental en los dos mutantes, sin embargo, tan sólo son GES en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173. Por otro lado, el factor sigma *sigJ* muestra un nivel de transcrito elevado en ambos mutantes, siendo tan sólo GES en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877.

Sólo hay tres GES en común entre los dos mutantes: la aminotransferasa *SCO1054*, la metionina sintasa *SCO1657* y la lisil-ARNt sintetasa (*SCO3397*) y todos ellos muestran niveles de expresión por encima del mostrado por la cepa parental, lo que indica una represión directa o indirecta de estos genes mediada por ambos reguladores LAL.

### III.9.2.2. Genes implicados en el metabolismo de nucleótidos y coenzimas, y en la replicación, recombinación y reparación del ADN.

Este grupo engloba 16 genes que muestran un patrón de transcripción diferente en los mutantes (Tabla III.2). Ocho de ellos están implicados en la replicación, recombinación y reparación del ADN. De ellos, las helicasas *SCO5166* y *SCO5439*, las nucleadas *SCO3347* y *uvrA*, la ADN girasa (*gyrA*) y el regulador de la recombinación *recX* muestran un nivel de transcrito reducido en los mutantes (aunque sólo son GES en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173), mientras que la helicasa *SCO1167* y la ADN ligasa *SCO1202* presentan un comportamiento opuesto (ambos son GES en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877).

Seis genes están implicados en el metabolismo de coenzimas y los dos restantes en el metabolismo de las purinas. Todos ellos son GES, aunque sólo dos en ambos mutantes, la helicasa *SCO1167* que muestra una transcripción elevada y el regulador *recX* que muestra una transcripción reducida.

### III.9.2.3. Genes relacionados con la respiración y la producción de energía.

Han sido asignados a este grupo 9 genes que muestran un patrón de transcripción diferente en los mutantes (Tabla III.2). Tres genes están implicados en la fosforilación oxidativa (*atpE*, *atpG* y *cyoE*) mostrando un patrón reducido en ambos mutantes, los dos primeros son GES en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173 y el gen *cyoE* en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877.

Los seis genes restantes afectados están implicados en la producción de energía mostrando unos niveles de transcripción en los mutantes elevados. Éstos incluyen dos glicerofosforil diéster fosfodiesterasas (*SCO1419* y *SCO1968*), una de las nitrato reductasas (*narH3*), una acil-CoA sintetasa (*SCO5842*) y una acetato quinasa (*ackA*). Aunque todos estos genes comparten el mismo patrón de transcripción en ambos mutantes, sólo uno (*SCO1968*) es GES en ambos.

### III.9.2.4. Genes relacionados con la biosíntesis de la envuelta celular y la diferenciación morfológica.

Este grupo incluye 17 genes que muestran una transcripción diferente en al menos uno de los mutantes (Tabla III.2). Estos genes codifican enzimas relacionadas con la biosíntesis de la envuelta celular (9 genes), la diferenciación morfológica (7 genes), y también una proteína similar a FtsW hipotéticamente implicada en la división celular durante la esporulación (*SCO3846*).

Entre ellos, aquellos relacionados con la diferenciación morfológica son particularmente interesantes porque en *Streptomyces* la diferenciación morfológica está normalmente acompañada por la diferenciación fisiológica (Bibb, 2005). Nuestros resultados indican que el factor sigma extracitoplasmático *sigU*, que causa un retraso en la formación del micelio aéreo cuando se sobreexpresa (Gehring y col., 2001), posee un nivel de transcripción por encima del parental en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173, mientras que el regulador *nsdA* que reprime indirectamente la biosíntesis de actinorrodina (Li y col., 2006) posee un nivel de transcrito por debajo del presentado por la cepa parental en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877.

El gen *ramS*, que codifica para un polipéptido que es usado como material de partida para el péptido SapB similar a los lantibióticos (Kodani y col., 2004), muestra un nivel de

transcrito situado por encima del parental en ambos mutantes LAL, mientras que el gen *whiA* esencial para la esporulación (Aínsa y col., 2000) posee un nivel de transcripción en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 por encima del mostrado por la cepa parental. Por lo que los reguladores LAL actuarían disminuyendo la transcripción de ambos genes.

### III.9.2.5. Genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos.

El mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 no tiene genes con un patrón de expresión estadísticamente significativo que puedan ser incluidos en este grupo, sin embargo en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173 existen 7 GES (Tabla III.2).

En este grupo se incluyen una hidrolasa de azúcares, una transcetolasa A1 y un parálogo de una fosfoglicerato mutasa (*pgm1*). Estudios proteómicos han mostrado que esta enzima es activada por PhoP bajo condiciones de escasez de fosfato, y este mecanismo ha sido propuesto como una compensación celular a la limitación de sustrato (Rodríguez-García y col., 2007). Nuestros resultados indican que el patrón de expresión de *pgm1* se ve afectado negativamente en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173, lo que podría indicar una conexión con la respuesta a la escasez de fosfato en esta bacteria.

### III.9.2.6. Genes relacionados con el metabolismo de lípidos.

Este grupo incluye 8 genes relacionados con el metabolismo de lípidos con un patrón de expresión afectado en al menos uno de los mutantes (Tabla III.2). Se incluye una hipotética 3-cetoacil-ACP/CoA reductasa (*SCO0330*), una sintetasa de ácido lipoico (*SCO2194*) y una enoil CoA hidratasa (*SCO4384*) que están implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos, o genes relacionados con la biosíntesis de esteroides similares a 2C-metil-D-eritriol 2,4-ciclodifosfato sintasa (*SCO4234*), entre otros. Curiosamente, todos estos genes muestran un patrón de expresión afectado positivamente en ambos mutantes.

### III.9.2.7. Genes relacionados con la respuesta a la escasez de fosfato.

Este grupo incluye 26 genes diferencialmente expresados relacionados con el metabolismo del fosfato o la respuesta a la escasez de fosfato (Rodríguez-García y col., 2007; Lian y col., 2008), todos ellos muestran una transcripción superior a la mostrada por la cepa parental (Tabla III.2).

Se incluyen en este grupo el sistema de dos componentes *phoR-phoP* y el modulador de la señal de transducción del fosfato *phoU*, homólogos de glicerofosforil diéster fosfodiesterasas *glpQ1* (*SCO1419*) y *glpQ2* (*SCO1968*) (Santos-Beneit y col., 2009a), o los transportadores específicos de fosfato *pstSA*.

Curiosamente el gen cuya expresión se ve más aumentada es el *glpQ2* (Tabla III.2). Recientemente se ha correlacionado el aumento en la actividad promotora de este gen con la adición de glucosa al medio (Santos-Beneit y col., 2009a), por lo que un aumento tan elevado podría deberse a la utilización de glucosa como fuente de carbono en el medio de cultivo MG unido al efecto de los LAL sobre el regulón PHO.

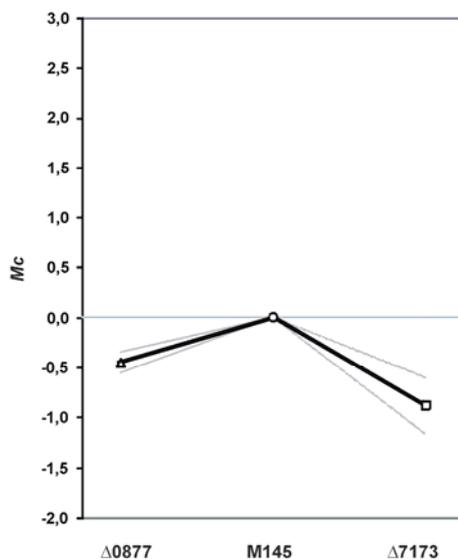
Otros genes afectados son *neuAB* (*SCO4880* y *SCO4881*), que están involucrados en la biosíntesis del ácido teicurónico como un sustituto para los ácidos teicoicos ricos en fosfato, los

sistemas de translocación Tat (twin-arginine translocation) *SCO1196*, *SCO1633*, *SCO6691* y *SCO7631* (Widdick y col., 2006), o la fitasa *SCO7697*.

La mayoría de estos genes son miembros del regulón PHO (Rodríguez-García y col., 2007) que está directamente controlado por el sistema de dos componentes PhoR-PhoP, que desencadena la respuesta celular a la escasez de fosfato (Sola-Landa y col., 2005). Cuando se produce el agotamiento de fosfato en el medio de cultivo, tiene lugar la unión del regulador de respuesta fosforilado PhoP a sus operadores en el ADN (cajas PHO) y esta unión controla la expresión de los genes regulados por el fosfato (Rodríguez-García y col., 2007; Sola-Landa y col., 2005). De este modo, la transcripción diferencial de todos estos genes en los dos mutantes LAL sugiere que ambos reguladores controlan la respuesta a la escasez de fosfato, quizás a través del sistema PhoR-PhoP que está, a su vez, autoregulado (Sola-Landa y col., 2005; Mendes y col., 2007).

Curiosamente, entre los genes afectados por la mutación del gen *SCO0877* está la metalotioneina codificada por el gen *mtpA* cuya expresión ha sido descrita que está regulada positivamente cuando el fosfato inorgánico es limitante pero independientemente de PhoP (Rodríguez-García y col., 2007; Ghorbel y col., 2006). En el mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 la expresión de este gen es superior a la mostrada por la cepa parental, lo que es una evidencia de regulación negativa, mientras que el LAL 7173 no parece controlar este gen.

Estudios recientes han descubierto que todos estos genes están también controlados por *afsS* (Lian y col., 2008) y que existe un control directo de *afsS* por PhoP (Santos-Beneit y col., 2009b). Curiosamente, aunque el gen *afsS* no es un GES su transcripción está regulada negativamente en ambos mutantes LAL lo que evidencia una regulación positiva por parte de los LAL 0877 y 7173 (Figura III.43). Este resultado es especialmente claro en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173 que muestra un valor  $p$  de 0,0083 (Tabla III.2).

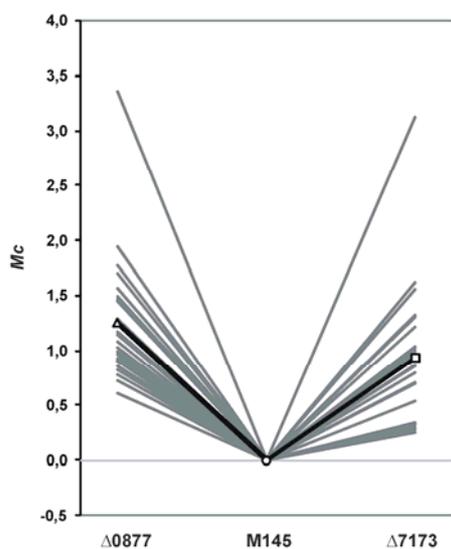


**Figura III.43:** Perfil de transcripción de los genes *afsS* y *afsR*. El valor Mc de transcripción diferencial fue obtenido restando del valor Mg de la cepa parental el valor Mg de cada mutante. Las líneas grises son los valores de transcripción de cada gen en cada mutante, las líneas negras se corresponden con el valor medio de los perfiles. Para visualizar mejor los resultados se han unido los puntos correspondientes a los valores Mc de cada uno de estos genes con el valor normalizado de la cepa parental M145.

Recientemente se ha realizado un estudio detallado de los cambios que se producen en el transcriptoma, metaboloma y proteoma de *S. coelicolor* en el paso del metabolismo primario al secundario en fermentadores en condiciones controladas (Nieselt y col., 2010). Entre los múltiples genes afectados (ribosomales, relacionados con el metabolismo del nitrógeno, genes implicados en el desarrollo, respuesta a la escasez de fosfato, producción de antibióticos, etc)

llama la atención una pequeña agrupación génica (*SCO4873-4882*) implicada en la biosíntesis de un polímero de la pared celular, el ácido teicurónico, cuya expresión aumenta (excepto la expresión del *SCO4877*) de manera sincrónica con los genes del regulón PHO. Curiosamente, en el mutante LAL 0877 de los cinco genes de la agrupación cinco de ellos muestran su perfil de transcripción aumentado (*SCO4874*, *SCO4875*, *SCO4879*, *SCO4880* y *SCO4881*; ver Material suplementario VII.4).

Por encima de todo, estos resultados indican que los genes de respuesta a la escasez de fosfato están regulados negativamente por los reguladores LAL 0877 y 7173. La figura III.44 muestra la transcripción de 25 genes de respuesta a la escasez de fosfato, incluyendo 15 cuya transcripción ha sido demostrada que está directamente controlada por PhoP (Tabla III.2). Para visualizar mejor los resultados se han unido los puntos correspondientes a los valores Mc de cada uno de estos genes con el valor normalizado de la cepa parental M145. Este perfil indica que el sistema de respuesta a la escasez de fosfato está fuertemente controlado por los reguladores LAL 0877 y 7173. Así, ambos producen el efecto opuesto que PhoP en la expresión de estos genes. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para dilucidar si el control es llevado a cabo a través de una regulación transcripcional directa o indirecta del sistema *phoRP*.



**Figura III.44:** Comparación del perfil de transcripción de algunos genes de respuesta a la escasez de fosfato. El valor Mc de transcripción diferencial fue obtenido restando del valor Mg de la cepa parental el valor Mg de cada mutante. En el gráfico se incluyen los perfiles de 25 genes: SCOs 0920, 1048, 1196, 1419, 1633, 1845, 1968, 2198, 2286, 2428, 4140, 4142, 4209, 4226-4230, 4880, 4881, 5746, 6691, 7344, 7631 y 7697. Las líneas grises son los valores de transcripción de cada uno de los genes de cada mutante, las líneas negras se corresponden con el valor medio de los perfiles.

### III.9.2.8. Genes relacionados con la biosíntesis de antibióticos.

En el medio MG, *S. coelicolor* M145 comienza la síntesis de prodigiosinas al final de la fase exponencial y la producción de actinorrodina comienza 15 horas después (Figura III.2). Los análisis de micromatrices revelan que mientras que la expresión de los genes que pertenecen al agrupamiento *red* de las prodigiosinas y al de síntesis de CDA no están afectados significativamente por las mutaciones, la enoil reductasa *actVI-ORF2* muestra un patrón de transcripción por debajo del parental, siendo GES en ambos mutantes (Tabla III.3). Se ha demostrado que este gen está involucrado en la producción de actinorrodina, ya que su interrupción impide la biosíntesis de dicho antibiótico (Fernández-Moreno y col., 1994).

SCO	Nombre del gen	Producto	Mc BvA	Mc CvA	valor p BvA	valor p CvA
SCO5070	<i>ORFB</i>	hidroxilacil-CoA deshidrogenasa	-0,33	0,02	0,1113	0,9302
SCO5071	<i>ORFA</i>	hidroxilacil-CoA deshidrogenasa	-0,70	-0,94	0,1298	0,0495
SCO5072	<i>ORF1</i>	hidroxilacil-CoA deshidrogenasa	-0,22	-0,29	0,5288	0,4090
SCO5073	<i>actVI-ORF2</i>	hipotética oxidoreductasa	-1,01	-1,14	0,0002	0,0001
SCO5074	<i>actVI-ORF3</i>	proteína hipotética	0,14	-0,44	0,6009	0,1192
SCO5075	<i>actVI-or4</i>	hipotética oxidoreductasa (fragmento)	-0,80	-1,19	0,0012	0,0000
SCO5076	<i>actVA1</i>	proteína integral de membrana	-0,25	-0,73	0,4147	0,0261
SCO5077	<i>actVA2</i>	proteína hipotética	0,43	-0,58	0,1188	0,0393
SCO5078	<i>actVA3</i>	proteína hipotética	-0,33	-0,65	0,3267	0,0603
SCO5079	<i>actVA4</i>	proteína hipotética	-0,33	-0,65	0,3267	0,0603
SCO5080	<i>actVA5</i>	hipotética hidrolasa	-0,79	-1,06	0,0107	0,0011
SCO5082	<i>actII-1</i>	hipotética proteína reguladora de la transcripción	0,33	-0,17	0,0937	0,3848
SCO5083	<i>actII-2</i>	hipotético transportador de actinorrodina	-0,68	-1,39	0,0456	0,0002
SCO5084	<i>actII-3</i>	hipotética proteína de membrana	-0,31	-0,25	0,3072	0,4151
SCO5085	<i>actII-4</i>	activador de la agrupación de actinorrodina	-0,57	-0,42	0,0048	0,0361
SCO5086	<i>actIII</i>	cetoacil reductasa	0,16	-0,24	0,5604	0,3813
SCO5087	<i>actIORF1</i>	$\beta$ -cetoacil sintasa subunidad $\alpha$ del poliquétido actinorrodina	-0,45	-0,64	0,1391	0,0402
SCO5088	<i>actIORF2</i>	$\beta$ -cetoacil sintasa subunidad $\beta$ del poliquétido actinorrodina	-0,86	-1,16	0,0123	0,0014
SCO5089	<i>actIORF3</i>	proteína actinorrodina poliquétido sintasa portadora de acilo	-0,61	-0,65	0,0080	0,0059
SCO5090	<i>actVII</i>	actinorrodina poliquétido sintasa bifuncional ciclasa/deshidratasa	-0,25	-0,45	0,2290	0,0381
SCO5091	<i>actIV</i>	ciclasa	0,11	-0,31	0,8540	0,6234

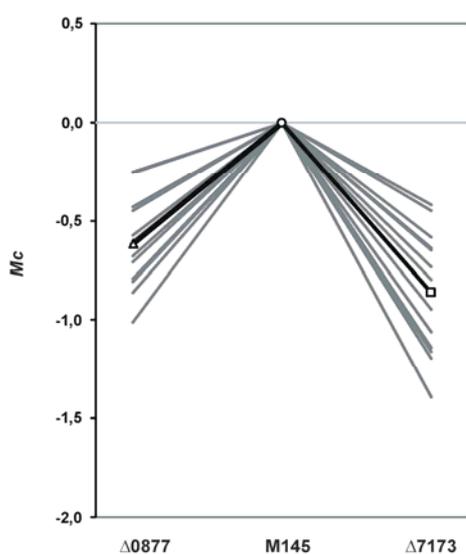
**Tabla III.3:** Tabla con los genes de biosíntesis de actinorrodina, su diferencia de expresión respecto a la cepa parental y el valor  $p$ . Los valores en rojo se corresponden con genes estadísticamente significativos (GES), los valores en azul con genes que poseen una  $p < 0,002$  y los valores en verde con aquellos genes con una  $p < 0,05$ , siendo éste el límite de fiabilidad.

En el mutante *S. coelicolor* M145: $\Delta$ 7173 existen otros cuatro genes que pertenecen al agrupamiento de biosíntesis de la actinorrodina que son GES y muestran un transcrito afectado negativamente (Tabla III.2). Además, el análisis de toda la agrupación de genes *act*, y la aplicación de limma no corregida con un valor  $p < 0,05$ , revela que 13 genes de la agrupación, incluyendo el activador SARP *actII-ORFIV*, muestran un descenso de la transcripción en ambos mutantes (Figura III.45). Este resultado explica el fenotipo de los mutantes en lo que se refiere a la producción de actinorrodina e indica una regulación positiva de los genes *act* por parte de ambos reguladores, aunque, este hecho es especialmente significativo en el caso de LAL 7173.

Estudios anteriores en *S. lividans* y *S. natalensis* usando mutantes con el sistema *phoRP* delecionado en medio líquido complejo revelaron que la interrupción de este sistema producía un aumento de la producción de actinorrodina o pimarcina, respectivamente (Sola-Landa y col., 2003; Mendes y col., 2007). Dado que los dos reguladores LAL reprimen el sistema *phoRP*, es posible que el efecto fenotípico observado pudiera ser producido via el sistema PhoR-PhoP. Además, ambos mutantes muestran una disminución de la transcripción del gen *afsS*, que codifica para una pequeña proteína "sigma-like" que regula la biosíntesis de antibióticos. Así, una sobreexpresión del gen *afsS* en *S. coelicolor* y en *S. lividans* causa un aumento en la producción

de actinorrodina (Vögtli y col., 1994; Floriano y Bibb, 1996), mientras que la interrupción del gen bloquea la producción completamente (Lian y col., 2008). Puesto que los mutantes LAL muestran una expresión reducida del gen *afsS*, esto podría contribuir también a la disminución de la producción de actinorrodina observada tras las mutaciones.

Además de los genes *act*, la epóxido hidrolasa *cpkE* de la agrupación *cpk* de una policétido sintasa críptica (Pawlik y col., 2007) es regulada positivamente por el regulador LAL 7173.



**Figura III.45:** Perfil de transcripción de algunos genes de la agrupación de actinorrodina. El valor  $M_c$  de transcripción diferencial fue obtenido restando del valor  $M_g$  de la cepa parental el valor  $M_g$  de cada mutante. En el gráfico se incluyen los perfiles de 13 genes: SCOs 5071, 5073, 5075-5077, 5079, 5080, 5083, 5085 y 5087-5090. Las líneas grises son los valores de transcripción de cada uno de los genes de cada mutante, las líneas negras se corresponden con el valor medio de los perfiles. Para visualizar mejor los resultados se han unido los puntos correspondientes a los valores  $M_c$  de cada uno de estos genes con el valor normalizado de la cepa parental M145.

### III.9.2.9. Genes reguladores.

Un gran número de genes con diversas funciones están bajo el control de los reguladores LAL 0877 y 7173, incluyendo varios genes reguladores. Esto sugiere que podría resultar interesante llevar a cabo un estudio transcripcional de otros reguladores diferencialmente expresados en los mutantes, ya que éstos podrían intervenir en el control regulatorio. En la tabla III.2 se incluye una lista de los genes reguladores cuya expresión está afectada en los mutantes.

Un total de 38 reguladores transcripcionales (GES) muestran un patrón de transcripción diferencialmente expresado en los mutantes cuando se los compara con la cepa parental, 19 de ellos en *S. coelicolor* M145:Δ0877 y 28 en *S. coelicolor* M145:Δ7173. El número tan elevado de reguladores afectados es un indicativo de la naturaleza pleiotrópica de ambos reguladores LAL y probablemente justifica todos los procesos biológicos afectados por las mutaciones.

Entre los reguladores afectados por LAL 0877, es interesante destacar el NsdA, un regulador negativo de la diferenciación y la síntesis de antibióticos en *S. coelicolor* (Li y col., 2006). Ya que el mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 muestra una mayor expresión del gen *nsdA* esto podría contribuir a la reducción de la producción de actinorrodina observada en el mutante. Además, tanto el factor sigma *sigU* como su factor anti-sigma *rsuA* muestran una disminución en su transcrito en ambos mutantes (Tabla III.2). Dado que las cepas con el gen *rsuA* delecionado muestran un retraso en la biosíntesis de actinorrodina (Gehring y col., 2001), esto podría también contribuir a la disminución de la producción de actinorrodina observada en los mutantes.

También es interesante destacar los resultados de transcripción obtenidos para el operón *afsQ*. El mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173 presenta por un lado un aumento de la transcripción

del sensor quinasa *afsQ2* y por otro lado una disminución de la transcripción del factor sigma *sigQ* (siendo ambos GES). Respecto al mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 los genes *afsQ2* y *afsQ1* muestran un patrón de transcripción aumentado respecto a la cepa parental. Por lo tanto, estos reguladores LAL actuarían disminuyendo la expresión del sistema de dos componentes *afsQ* y aumentando la expresión de su antagonista *sigQ*, lo cual implicaría una disminución de la producción de antibióticos a través de una vía totalmente diferente de la ruta de biosíntesis de éstos. Sin embargo, al inactivar los genes LAL *SCO0877* y *SCO7173* no se observa un aumento en la producción de ninguno de los tres antibióticos quizá debido a que el efecto provocado por la delección de los genes *afsQ1*, *afsQ2* y *sigQ* tan sólo se ha observado al crecer las cepas en medio mínimo con glutamato como fuente de nitrógeno (Shu y col., 2009).

### III.9.2.10. Diferencias entre los genes afectados por los dos mutantes.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la mutación de los reguladores LAL 0877 y 7173 altera el perfil de transcripción de 322 genes (GES) incluso en el mismo sentido. Sin embargo, hay pequeñas diferencias existentes entre ellos que no han sido incluidas en la Tabla III.2 y que se pretenden destacar en este apartado.

Un ejemplo de ello es la expresión de proteínas de membrana, la transcripción de 37 de ellas se ve afectada por las mutaciones (23 por la inactivación del gen *SCO7173* y 4 por la del *SCO0877*), 10 proteínas relacionadas con el transporte muestran un patrón de expresión alterado (8 por la inactivación del gen *SCO7173* y tan sólo 1 por la del *SCO0877*) y finalmente 25 proteínas secretadas o relacionadas con el sistema de secreción muestran su perfil de transcripción alterado (16 por la inactivación del gen *SCO7173* y 3 por la del *SCO0877*) (Material suplementario VII.5), entre ellas se encuentran quitinasas, celulasas, fitasas, hidrolasas, peptidasas, galactosidasas y manosidasas. Esto no es de extrañar puesto que el 7,8 % y el 10,5 % de las proteínas del genoma de *S. coelicolor* son proteínas relacionadas con el transporte y secretadas, respectivamente. Curiosamente 3 de las proteínas extracelulares afectadas (*SCO0762*, *SCO1572* y *SCO7631*) han sido identificadas en el secretoma de *S. lividans* TK21 (Escutia y col., 2006).

## III.10. Validación de los resultados de las micromatrices mediante RT-PCR a tiempo real.

La cuantificación del ARNm mediante RT-PCR a tiempo real permite validar los resultados obtenidos mediante micromatrices siendo útil a la hora de descartar los falsos positivos. La mayor flexibilidad, sensibilidad y potencial de optimización de la RT-PCR a tiempo real en dos pasos la hace una herramienta preferible, para estos experimentos, en lugar de la de un único paso (Nolan y col., 2006).

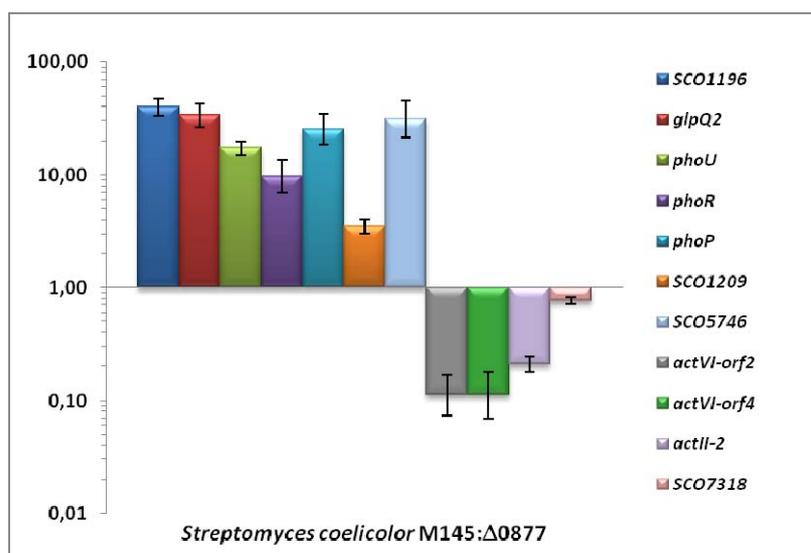
A la hora de diseñar el experimento para obtener datos fiables es recomendable introducir varias reacciones de control negativo en cada placa para comprobar si existe formación de dímeros o contaminación de las muestras de ARN con ADN.

La posibilidad de introducir en cada placa un control endógeno como el gen que codifica para el factor sigma HrdB (gen constitutivo, cuyo nivel de expresión permanece estable) para normalizar los valores obtenidos, brinda una ventaja a la hora de utilizar este método (Pang y col., 2004).

La cuantificación de la expresión de los genes estudiados en los mutantes es relativa ya que se hace comparándolos con la expresión de los mismos genes en la cepa parental a la que se asigna un valor relativo de 1,00.

Se eligieron un total de 11 genes para esta validación (*glpQ2*, *phoU*, *phoR*, *phoP*, *actVI-ORF2*, *actVI-ORF4*, *actII-2*, *SCO1196*, *SCO1209*, *SCO5746* y *SCO7318*). Los genes seleccionados incluyen tanto genes regulados positiva como negativamente. Los valores obtenidos son el resultado del análisis de dos réplicas biológicas de cada cepa y tres réplicas técnicas.

El perfil de regulación para el mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 obtenido mediante qRT-PCR para los genes analizados concuerda exactamente con el obtenido con micromatrices tal y como se puede observar en la Figura III.46.



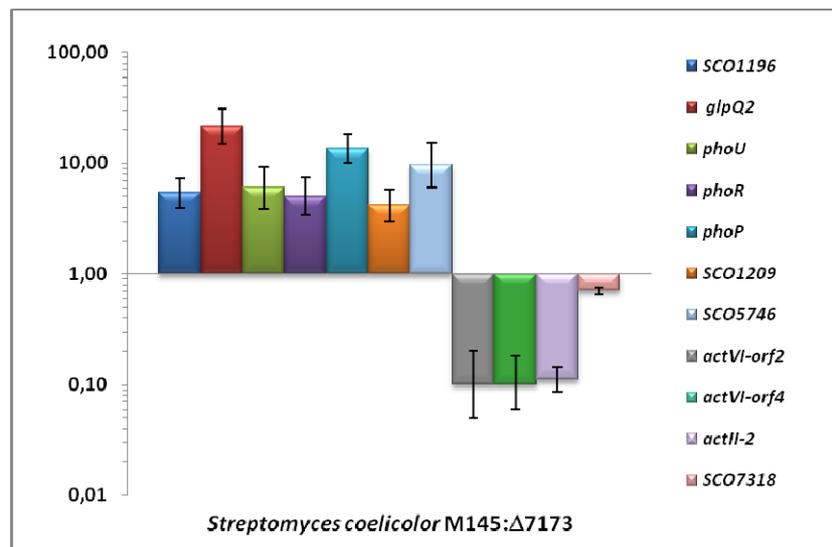
**Figura III.46:** Representación gráfica, en escala logarítmica, de los niveles de expresión relativa de los genes: *glpQ2*, *phoU*, *phoR*, *phoP*, *actVI-ORF2*, *actVI-ORF4*, *actII-2*, *SCO1196*, *SCO1209*, *SCO5746* y *SCO7318* en la cepa *S. coelicolor* M145:Δ0877 en relación con la parental *S. coelicolor* M145 a la que se le asigna un valor relativo de 1,00. Los niveles de expresión superiores a este valor equivalen a genes con transcripción diferencial positiva y los niveles de expresión inferiores se corresponden con genes que poseen una transcripción menor en el mutante. Las barras de error señalan la variación estándar entre réplicas biológicas.

Los niveles de transcripción relativa de los genes regulados positivamente para el mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 variaron desde 3,5 hasta 39,9 veces más que el parental. Los genes más afectados fueron el *SCO1196* que codifica para una proteína secretada, la glicerofosfodiéster fosfodiesterasa *glpQ2* y el gen *SCO5746* que muestra similitud con aminotransferasas de *Streptomyces griseus*. Los genes de respuesta a la escasez de fosfato *phoU*, *phoR* y *phoP* mostraron niveles de transcripción de 17,3; 6,7 y 25,4 veces más que el presentado por la cepa parental, lo cual confirma una relación de LAL 0877 con dicha respuesta. El gen *SCO1209*, hipotética acil-CoA deshidrogenasa mostró un aumento de la transcripción de 3,5 veces.

El valor relativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  obtenido para los niveles de transcripción de los genes regulados negativamente se sitúa entre 0-1 por lo que para obtener una equivalencia se aplica  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . De este modo los genes *actVI-ORF2* y *actVI-ORF4* mostraron un nivel de transcripción de 9 y 8,93 veces menor que el mostrado por la cepa parental, respectivamente. A su vez, los genes *actII-2* y *SCO7318* mostraron una transcripción de 4,8 y 1,3 veces menor que el observado en la cepa parental.

Por lo tanto, la disminución de la producción de actinorrodina observada en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 puede explicarse por la disminución de la transcripción de los genes que codifican para las oxidorreductasas y el transportador, entre otros.

El perfil de regulación para el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173 obtenido mediante qRT-PCR para los genes analizados concuerda con el obtenido con micromatrices tal y como se puede observar en la Figura III.47 y fue muy similar al mostrado por el mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877.



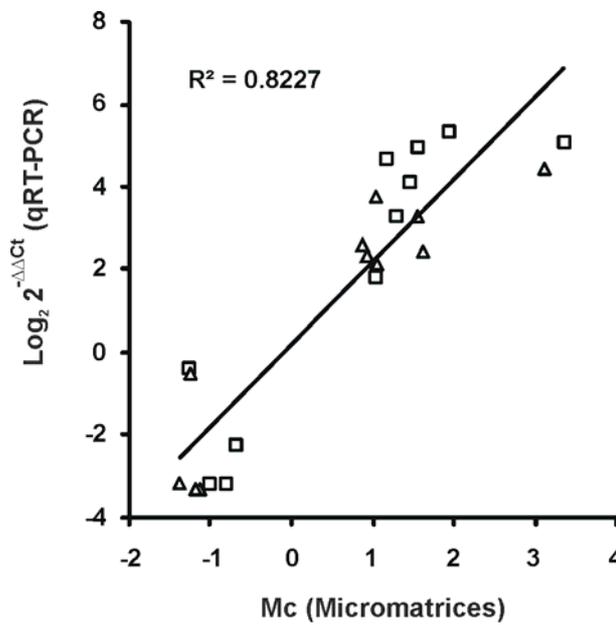
**Figura III.47:** Representación gráfica, en escala logarítmica, de los niveles de expresión relativa de los genes: *glpQ2*, *phoU*, *phoR*, *phoP*, *actVI-ORF2*, *actVI-ORF4*, *actII-2*, *SCO1196*, *SCO1209*, *SCO5746* y *SCO7318* en la cepa *S. coelicolor* M145:Δ7173 en relación con la parental *S. coelicolor* M145 a la que se le asigna un valor relativo de 1,00. Los niveles de expresión superiores a este valor equivalen a genes regulados positivamente y los niveles de expresión inferiores se corresponden con genes regulados negativamente en el mutante. Las barras de error señalan la variación estándar entre réplicas biológicas.

Los niveles de transcripción de los genes regulados positivamente obtenidos para el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173 fueron menores que los obtenidos para *S. coelicolor* M145:Δ0877 (Figura III.46 y 47). La glicerofosfodiéster fosfodiesterasa *glpQ2* se expresó 21,6 veces más que la parental y los genes *SCO1196*, *phoU*, *phoR* y *phoP* mostraron un nivel de expresión situado entre 5 y 13,5 veces superior al mostrado por la cepa parental *S. coelicolor* M145. Los genes *SCO1209* y *SCO5746* muestran una expresión de 4,2 y 9,7 veces más que la cepa parental, siendo este valor obtenido mucho menor al mostrado por el otro mutante.

En cuanto a los niveles de expresión de los genes con menor transcripción en el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173, la equivalencia obtenida para los genes *actVI-ORF2* y *actVI-ORF4* fue de 10 veces menor que en la cepa parental, mostrando una vez más que los genes más afectados de la ruta de biosíntesis de actinorrodina fueron las oxidorreductasas. El transportador de actinorrodina *actII-2* mostró un nivel de transcripción 9,06 veces menor y finalmente el gen *SCO7318* manifestó una transcripción 1,42 veces menor que el mostrado por la cepa *S. coelicolor* M145.

La concordancia obtenida entre los datos de las micromatrices y los de la qRT-PCR fue buena (Figura III.48). El rango obtenido en el  $\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct}$  de la qRT-PCR se mueve entre -3 y +5,3 siendo significativamente mayor que el *Mc* obtenido con las micromatrices que va de -1,4 a +3,3, indicando con ello que la técnica de qRT-PCR es más sensible. Esto probablemente se refleja en

el coeficiente de correlación obtenido ( $R^2 = 0,823$ ) ya que es más bajo de lo que podría esperarse.



**Figura III.48:** Correlación entre los resultados de qRT-PCR y micromatrices para 11 genes: *glpQ2*, *phoU*, *phoR*, *phoP*, *actVI-ORF2*, *actVI-ORF4*, *actII-ORF2*, *SCO1196*, *SCO1209*, *SCO5746* y *SCO7318*. Los triángulos son los valores obtenidos para el mutante *S. coelicolor* M145:Δ0877 y los cuadrados para el mutante *S. coelicolor* M145:Δ7173. Se incluye el valor del coeficiente de correlación ( $R^2$ ).

***Visión global***

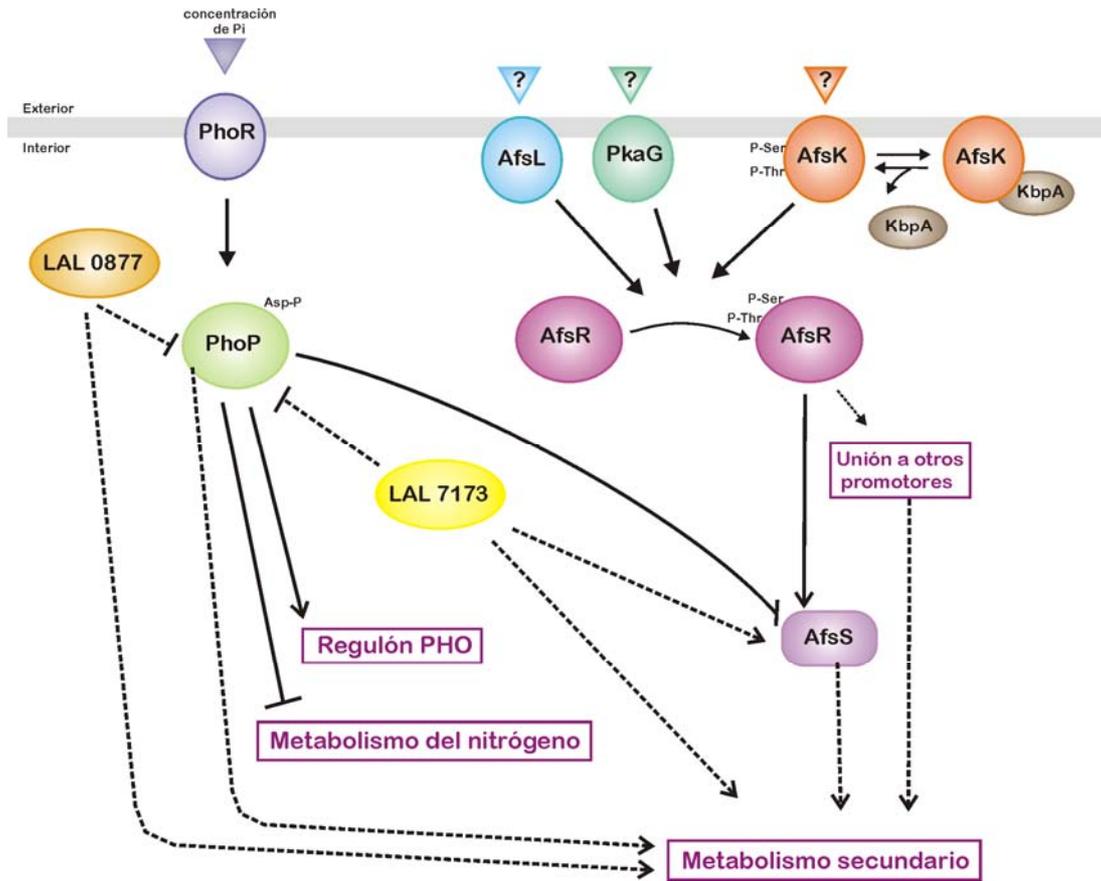
---



Una de las principales características de *Streptomyces* es su capacidad para producir una gran variedad de metabolitos secundarios. Generalmente, la producción de estos compuestos depende de la fase de crecimiento e implica la expresión de genes reguladores y biosintéticos agrupados en el cromosoma, pero además de estos genes participan otros, en su mayoría situados fuera de las agrupaciones de genes biosintéticos, que también afectan a la formación de cada compuesto (Bibb, 2005). El metabolismo secundario es, por lo tanto, un proceso complejo donde reguladores globales y específicos forman una red de interacciones cuyo resultado final es la producción del metabolito. Los reguladores globales ejercen un efecto pleiotrópico tanto sobre el metabolismo secundario como sobre el desarrollo morfológico (un ejemplo de ello son los genes *abs*, *afs* y *blt*), y este es el caso de los reguladores LAL estudiados. Este comportamiento pleiotrópico se refleja en el gran número de genes reguladores afectados por las mutaciones de los reguladores LAL 0877 y 7173 (Tabla III.2; Material suplementario sección VII.5).

Nuestros resultados indican que los reguladores LAL bajo estudio actúan globalmente afectando a varios procesos celulares, entre los cuales se encuentra la respuesta a la escasez de fosfato en *S. coelicolor*. Ambos producen un efecto opuesto al provocado por PhoP en la expresión de los genes del regulón PHO y este efecto es probablemente mediado por el sistema PhoR-PhoP, dado que ambos regulan negativamente el sistema. Curiosamente existe una regulación cruzada entre la escasez de fosfato y el metabolismo del nitrógeno, y se ha demostrado que está mediada por PhoP que actúa reprimiendo el regulador global GlnR y los genes *glnA*, *glnII* y el operón *amtB-glnD-glnK* (Rodríguez-García y col., 2007; Rodríguez-García y col., 2009). Además, los mutantes con el gen *afsS* delecionado presentan una expresión alterada de los genes asociados tanto con el nitrógeno como con la respuesta a la escasez de fosfato (Lian y col., 2008). Sin embargo, y a pesar de que el sistema PhoR-PhoP es reprimido por ambos reguladores LAL, no hay genes del nitrógeno afectados en los mutantes LAL. Esto probablemente indica que otros reguladores están participando en el control del metabolismo del nitrógeno junto con el sistema PhoR-PhoP.

Es necesario mencionar que ambos reguladores LAL afectan independientemente al sistema de dos componentes PhoR-PhoP. Este sistema es también controlado por la proteína "sigma-like" AfsS (Lian y col., 2008) que a su vez se ve afectada positivamente por LAL 7173 (Tabla III.2; Figura IV.1). Esto probablemente es reflejo de una red de regulación mucho más compleja de lo que se creía. Además, recientemente se ha descrito que reguladores globales como PhoP y AfsR poseen una regulación cruzada, de tal forma que AfsR se une al promotor de *phoR-phoP*, mientras que PhoP compite con AfsR por unirse al promotor de *afsS* (Santos-Beneit y col., 2009b). El hecho de que los dos reguladores LAL controlen los genes del regulón PHO de la misma forma (es decir, regulación negativa), bien podría reflejar que la respuesta a la escasez de fosfato es demasiado importante para *Streptomyces* como para dejarla en manos de una única vía por lo que requiere de una fina y equilibrada modulación. Esto es especialmente significativo si tenemos en cuenta los cambios en las condiciones nutricionales que se dan en su hábitat natural, el suelo.



**Figura IV.1:** Modelo de transducción de señales y regulación cruzada entre los sistemas PhoR-PhoP, AfsK-AfsR-AfsS y los reguladores LAL 0877 y 7173. El modelo tiene en cuenta datos aportados por los trabajos de Horinouchi (2003), Sola-Landa y col., (2005), Rodríguez-García y col., (2007), Rodríguez-García y col., (2009), Santos-Beneit y col., (2009b) y por este trabajo. Las flechas continuas indican un control directo ejercido mediante una unión a un promotor y las discontinuas un efecto indirecto o no comprobado mediante estudios de unión. —| indica una represión y → una activación

Otro proceso celular afectado por ambos reguladores es la biosíntesis del antibiótico pigmentado actinorrodina. En ambos mutantes, la producción de actinorrodina está severamente afectada. El análisis del transcriptoma de los mutantes revela que ambos reguladores controlan la transcripción del gen *actVI-ORF2 (SCO5073)*, mientras que el LAL 7173 controla también otros cuatro genes de la agrupación *act*. En todos los casos disminuye la transcripción en los mutantes, lo que podría contribuir al fenotipo observado. Aunque una interacción directa de cualquiera de los dos reguladores LAL sobre los promotores de la agrupación *act* no puede ser excluida, es probable que el efecto se produzca a través de otros reguladores como PhoP, AfsS, NsdA o RsuA. Sin embargo, es necesario realizar más trabajo para confirmar estas posibilidades. En cualquier caso, se ha demostrado que ambos reguladores LAL son reguladores globales tanto de la respuesta a la escasez de fósforo como de la biosíntesis de actinorrodina en *S. coelicolor*.

Nuestros resultados también indican la participación del regulador LAL 7093 en la biosíntesis de actinorrodina, pero se desconoce a qué nivel o si podría formar parte de una cascada de regulación incluyendo algún otro regulador LAL. Es de esperar que el análisis del transcriptoma del mutante  $\Delta 7093$  arroje alguna luz sobre el modo de actuación de este regulador. Todos estos resultados deberían proporcionar importantes claves para comprender el entramado de la maquinaria de regulación que modula la biosíntesis de antibióticos en *Streptomyces*.

---

Los estudios llevados a cabo con los genes *SCO6334* y *SCO7143* en el medio MG complejo, muestran que estos reguladores ejercen su probable función sin afectar a la producción de actinorrodina, undecilprodigiosina o CDA, por lo que aún se desconocen sus dianas. Estudios transcriptómicos en ambos reguladores, ahora en curso, previsiblemente permitirán desvelar el modo de acción de estos reguladores LAL.

Este trabajo constituye el primero de su clase en el que se ha llevado a cabo una caracterización de reguladores pertenecientes a la familia LAL de moduladores transcripcionales, y ha contribuido a desvelar una pequeña parte de la diversa y compleja regulación del metabolismo secundario de *Streptomyces*. Más concretamente, ha permitido revelar por primera vez la implicación de los reguladores LAL en cascadas tan importantes como la respuesta a la escasez de fosfato o la producción de metabolitos secundarios. Asimismo, el trabajo plantea nuevos retos para la comprensión de las cascadas de regulación que unen las señales ambientales y del desarrollo con los reguladores pleiotrópicos, y en última instancia con los reguladores específicos del metabolismo secundario. La disponibilidad de la secuencia de múltiples genomas así como el desarrollo de tecnologías y técnicas para el análisis de transcriptomas, proteomas y metabolomas permitirán en un futuro cercano desvelar esta compleja red de interacciones.



## ***Conclusiones***

---



- 
1. La inactivación del gen *SCO0877* de *S. coelicolor* afecta a la transcripción de 121 genes, mientras que la inactivación del gen *SCO7173* altera el perfil de transcripción de 263 genes, prevaleciendo en ambos casos la función represora.
  2. Los reguladores LAL 0877 y 7173 de *S. coelicolor* actúan de un modo global afectando a múltiples procesos celulares entre los que se encuentran la respuesta a la escasez de fosfato y la biosíntesis de actinorrodina.
  3. Ambos reguladores actúan de forma independiente uno de otro.
  4. Los reguladores LAL 0877 y 7173 afectan positivamente a la biosíntesis de actinorrodina controlando la transcripción del gen *actVI-ORF2* (el regulador 0877) y de los genes *actVI-ORF4*, *actVA5*, *actII-2* y *actI-ORF2* (el regulador 7173). La inactivación de los mismos provoca una severa reducción en la producción de actinorrodina.
  5. El regulador LAL 7093 controla positivamente la biosíntesis de actinorrodina en *S. coelicolor* ya que su inactivación provoca una disminución de la producción, sin embargo no afecta a la producción de undecilprodigiosina ni a la de CDA.
  6. Los reguladores LAL 6334 y 7143 no afectan a la producción de actinorrodina, undecilprodigiosina en medio complejo, ni a la de CDA.



## ***Bibliografía***

---



**A**

**Adamidis T, Riggle P y Champness W** (1990). Mutations in a new *Streptomyces coelicolor* locus which globally block antibiotic biosynthesis but not sporulation. *J Bacteriol.* 172(6):2962-2969.

**Aínsa JA, Parry HD y Chater KF** (1999). A response regulator-like protein that functions at an intermediate stage of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 34(3):607-619.

**Aínsa JA, Ryding NJ, Hartley N, Findlay KC, Bruton CJ y Chater KF** (2000). WhiA, a protein of unknown function conserved among gram-positive bacteria, is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 182(19):5470-5478.

**Allan EJ y Prosser JI** (1983). Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor* A3(2) on solid medium. *J Gen Microbiol.* 129:2029-2036.

**Anderson TB, Brian P y Champness WC** (2001). Genetic and transcriptional analysis of *absA*, an antibiotic gene cluster-linked two-component system that regulates multiple antibiotics in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 39(3):553-566.

**Antón N, Mendes MV, Martín JF y Aparicio JF** (2004). Identification of PimR as a positive regulator of pimarin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *J Bacteriol.* 186(9):2567-2575.

**Antón N, Santos-Aberturas J, Mendes MV, Guerra SM, Martín JF y Aparicio JF** (2007). PimM, a PAS domain positive regulator of pimarin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *Microbiology.* 153(Pt 9) 3174-3183.

**Aparicio JF, Molnár I, Schwecke T, König A, Haydock SF, Khaw LE, Staunton J, Leadlay PF** (1996). Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene.* 169(1):9-16.

**Apel AK, Sola-Landa A, Rodríguez-García A y Martín JF** (2007). Phosphate control of *phoA*, *phoC* and *phoD* gene expression in *Streptomyces coelicolor* reveals significant differences in binding of PhoP to their promoter regions. *Microbiology.* 153(Pt 10):3527-3537.

**Arias P, Fernández-Moreno MA y Malpartida F** (1999). Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein. *J Bacteriol.* 181(22):6958-6968.

**B**

**Baltz RH** (1998). Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Trends Microbiol.* 6(2):76-83. Review.

**Baltz RH y Seno ET** (1988). Genetics of *Streptomyces fradiae* and tylosin biosynthesis. *Annu Rev Microbiol.* 42:547-574.

**Bassler BL** (2002). Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell.* 109(4):421-424. Review.

**Bate N, Butler AR, Gandecha AR y Cundliffe E** (1999). Multiple regulatory genes in the tylosin biosynthetic cluster of *Streptomyces fradiae*. *Chem Biol.* 6(9):617-624.

**Bate N, Stratigopoulos y Cundliffe E** (2002). Differential roles of two SARP-encoding regulatory genes during tylosin biosynthesis. *Mol Microbiol.* 43(2):449-458.

**Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA** (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417(6885):141-147.

**Bibb M** (1996). The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* 142( Pt 6):1335-1334. Review.

**Bibb MJ** (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol.* 8(2):208-215. Review.

**Bibb MJ, Ward JM, Kieser T, Cohen SN y Hopwood DA** (1981). Excision of chromosomal DNA sequences from *Streptomyces coelicolor* forms a novel family of plasmids detectable in *Streptomyces lividans*. *Mol Gen Genet.* 184(2):230-40.

**Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN y Schoner BE** (1992) Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene.* 116(1):43-49.

**Birch A, Häusler A y Hütter R** (1990). Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp. *J Bacteriol.* 172(8):4138-4142.

**Birnboim HC y Doly J** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-1523.

**Boos W y Shuman H** (1998). Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(1):204-229. Review.

**Braña AF, Manzanal MB y Hardisson C** (1982). Mode of cell wall growth of *Streptomyces antibioticus*. *FEMS Microbio Lett.* 13:231-235.

**Braña AF, Méndez C, Díaz LA, Manzanal MB y Hardisson C** (1986). Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*. *J Gen Microbiol.* 132(5):1319-1326.

**Brautaset T, Sekurova ON, Sletta H, Ellingsen TE, Strom AR, Valla S y Zotchev SB** (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem Biol.* 7(6):395-403.

**Breitling R, Armengaud P, Amtmann A y Herzyk P** (2004). Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett.* 573(1-3):83-92.

**Brian P, Riggle PJ, Santos RA y WC Champness** (1996). Global negative regulation of *Streptomyces coelicolor* antibiotic synthesis mediated by an *absA*-encoded putative signal transduction system. *J Bacteriol.* 178(11):3221-3231.

**Brockmann H y Hieronymus E** (1955). Über Actinomycetenfarbstoff, V. Mitteil.: zur Konstitution des Actinorhodins, III. Mitteil Chem. Berlin. 88:1379-1390.

**Brown DP, Chiang SJ, Tuan JS y Katz L** (1988). Site-specific integration in *Saccharopolyspora erythraea* and multisite integration in *Streptomyces lividans* of actinomycete plasmid pSE101. J Bacteriol. 170(5):2287-2295.

**Bucca G, Laing E, Mersinias V, Allenby N, Hurd D, Holdstock J, Brenner V, Harrison M y Smith CP** (2009). Development and application of versatile high density microarrays for genome-wide analysis of *Streptomyces coelicolor*: characterization of the HspR regulon. Genome Biol. 10(1):R5.

**Bustin SA** (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. 25(2):169-193. Review.

**Butler AR, Bate N, Kiehl DE, Kirst HA y Cundliffe** (2002). Genetic engineering of aminodeoxyhexose biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. Nat Biotechnol. 20(7):713-716.

**Buttner MJ, Chater KF y Bibb MJ** (1990). Cloning, disruption and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Bacteriol. 172(6):3367-3378.

**Bystrykh LV, Fernández-Moreno MA, Herrema JK, Malpartida F, Hopwood DA y Dijkhuizen L** (1996). Production of actinorhodin-related "blue-pigment" by *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Bacteriol. 178(8):2238-2244.

## C

**Carmody M, Byrne B, Murphy B, Breen C, Lynch S, Flood E, Finnan S y Caffrey P** (2004). Analysis and manipulation of amphotericin biosynthetic genes by means of modified phage KC515 transduction techniques. Gene. 343(1):107-15.

**Cases I y de Lorenzo V** (2005). Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. Nat Rev Microbiol. 3(2):105-118.

**Chakraborty R y Bibb M** (1997). The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. J Bacteriol 179(18):5854-5861.

**Challis GL y Hopwood DA** (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. Proc Natl Acad Sci USA. 100 Suppl 2:14555-61.

**Chang PC y Cohen SN** (1994). Bidirectional replication from an internal origin in a linear streptomyces plasmid. Science. 265(5174):952-954.

**Chaphalkar SR y Dey S** (1998). Thermostable alkaline metalloprotease from newly alkalophilic *Streptomyces diastaticus* strain SS1. Indian J Biochem Biophys. 35: 34-40.

**Chapon C** (1982). Role of the catabolite activator protein in the maltose regulon of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 150(2):722-729.

**Chapon C y Kolb A** (1983). Action of CAP on the *malT* promoter in vitro. J Bacteriol. 156(3):1135-1143.

- 
- Chater K y Bibb M** (1997). Regulation of bacterial antibiotic production. En *Biotechnology*, Vol 7 *Products of secondary metabolism*. Kleinkauf H y von Dören H (eds) Weinheim: VCH. 7: 59-10.
- Chater KF** (1980). Actinophage DNA. *Devel Ind Microbiol*. 21:65-74.
- Chater KF** (1990). The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing *Streptomyces*. *Biotechnology (NY)*. 8(2):115-121.
- Chater KF** (1993). Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu Rev Microbiol*. 47:685-713. Review.
- Chater KF** (2006). *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 361(1469):761-768.
- Chater KF y Hopwood DA** (1993). *Streptomyces*. In *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. Sonenshein AL, Hoch JA y Losick R (eds). American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 83-99.
- Chater KF y Horinouchi S** (2003). Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. *Mol Microbiol*. 48(1):9-15.
- Chater KF, Bruton CJ, Foster SG y Tobek I** (1985). Physical and genetic analysis of *IS110*, a transposable element of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Gen Genet*. 200(2):235-239.
- Chater KF, Hopwood DA, Kieser T y Thompson** (1982). Gene cloning in *Streptomyces*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 96:69-95. Review.
- Chen CW** (1995). The unstable end of the *Streptomyces* linear chromosomes: A nuisance without cures?. *Trends in Biotechnology*. 13:157-160.
- Chen CW, Yu TW, Chung HM y Chou CF** (1992). Discovery and characterization of a new transposable element, *Tn4811*, in *Streptomyces lividans* 66. *J Bacteriol*. 174(23):7762-7769.
- Chen CW, Yu TW, Lin YS, Kieser HM y Hopwood DA** (1993). The conjugative plasmid SLP2 of *Streptomyces lividans* is a 50 kb linear molecule. *Mol Microbiol*. 7(6):925-932.
- Chen S, Huang X, Zhou X, Bai L, He J, Jeong KJ, Lee SY y Deng Z** (2003). Organizational and mutational analysis of a complete FR-008/candicidin gene cluster encoding a structurally related polyene complex. *Chem Biol*. 10(11):1065-1076.
- Choi SH y Greenberg EP** (1992). Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J Bacteriol*. 174(12):4064-4069.
- Choi SU, Lee CK, Hwang YI, Kinoshita H y Nihira T** (2003). Gamma-butyrolactone autoregulators and receptor proteins in non-*Streptomyces* actinomycetes producing commercially important secondary metabolites. *Arch Microbiol*. 180(4):303-307.
- Christiansen P** (1970). Isolierung, Strkturemittlung und absolute Konfiguration neuer actinorhodine. Ph.D. Thesis. University of Göttingen.
- Chung ST** (1987). *Tn4556*, a 6.8-kilobase-pair transposable element of *Streptomyces fradiae*. *J Bacteriol*. 169(10):4436-4441.

**Cohen A, Bar-Nir D, Goedeke ME y Parag Y** (1985). The integrated and free states of *Streptomyces griseus* plasmid pSG1. *Plasmid*. 13(1):41-50.

**Cole S T, R Brosch, J Parkhill, T Garnier, C Churcher, D Harris, S V Gordon, K Eiglmeier, S Gas, C E Barry III, F Tekaia, K Badcock, D Basham, D Brown, T Chillingworth, R Connor, R Davies, K Devlin, T Feltwell, S Gentles, N Hamlin, S Holroyd, T Hornsby, K Jagels, A Krogh, J McLean, S Moule, L Murphy, K Oliver, J Osborne, M A Quail, M A Rajandream, J Rogers, S Rutter, K Seeger, J Skelton, R Squares, S Squares, J E Sulston, K Taylor, S Whitehead y B G Barrell** (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393(6685):537-544.

**Combes P, Till R, Bee S, Smith MC** (2002). The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-attB sites for the  $\Phi$ C31-encoded site-specific recombination system. *J Bacteriol*. 184(20):5746-5752.

**Cullum J, Altenbuchner J, Flett F, Piendl W** (1986). DNA amplification and genetic instability in *Streptomyces*. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 4:59-78. Review.

## D

**Datsenko KA y Wanner BL** (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(12):6640-6645.

**Davis NK y Chater KF** (1990). Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. *Mol Microbiol*. 4(10):1679-1691.

**De Schrijver A y De Mot R** (1999). A subfamily of MalT-related ATP-dependent regulators in the LuxR family. *Microbiolgy*. 145 ( Pt 6):1287-1288.

**Débarbouillé M y Schwartz M** (1979). The use of gene fusions to study the expression of *malT*, the positive regulator gene of the maltose regulon. *J Mol Biol*. 132(3):521-534.

**Demain AL** (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 52(4):455-463.

**DeRisi JL, Iyer VR y Brown PO** (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*. 278(5338):680-686.

**Doull JL y Vining LC** (1989). Culture conditions promoting dispersed growth and biphasic production of actinorhodin in shaken cultures of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett*. 53(3):265-268.

## E

**Enquist LW y Bradley SG** (1971). Characterization of deoxyribonucleic acid from *Streptomyces venezuelae* species. *Dev Ind Microbiol*. 12:225-236.

**Ensign JC** (1978). Formation, properties and germination of actinomycetes spores. *Annu Rev Microbiol*. 32:185-219. Review.

---

**Escutia MR, Val G, Palacín A, Geukens N, Anné J y Mellado RP** (2006). Compensatory effect of the minor *Streptomyces lividans* type I signal peptidases on the SipY major signal peptidase deficiency as determined by extracellular proteome analysis. *Proteomics*. 6(14):4137-4146.

## F

**Feinberg AP y Volgelstein B** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*. 132(1):6-13.

**Fernández-Moreno MA, Caballero JL, Hopwood DA y Malpartida F** (1991). The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *blaD* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell*. 66(4):769-780.

**Fernández-Moreno MA, Martínez E, Caballero JL, Ichinose K, Hopwood DA y Malpartida F** (1994). DNA sequence and functions of the *actVI* region of the actinorhodin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Biol Chem*. 269(40):24854-24863.

**Floriano B y Bibb M** (1996). *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol*. 21(2):385-396.

**Flowers TH y Williams ST** (1978). The influence of pH on the growth rate and viability of neutrophilic and acidophilic streptomycetes. *Microbios*. 18(73-74):223-228.

**Fuqua C** (2006). The QscR quorum-sensing regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: an orphan claims its identity. *J Bacteriol*. 188(9):3169-3171.

**Fuqua C, Parsek MR y Greenberg EP** (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet*. 35:439-468. Review

## G

**Garrity G, Bell J y Lilburn T** (2004). Taxonomic Outline of the Prokaryotes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition*. Bergey's Manual Trust, Springer-Verlag, New York.

**Gehring AM, Yoo NJ y Losick R** (2001). RNA polymerase sigma factor that blocks morphological differentiation by *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*. 183(20):5991-5996.

**Gerritse G, Ure R, Bizoullier F y Quax WJ** (1998). The phenotype enhancement method identifies the Xcp outer membrane secretion machinery from *Pseudomonas alcaligenes* as a bottleneck for lipase production. *J Biotechnol*. 64(1):23-38.

**Ghorbel S, Kormanec J, Artus A y Virolle MJ** (2006). Transcriptional studies and regulatory interactions between the phoR-phoP operon and the *phoU*, *mtpA*, and *ppk* genes of *Streptomyces lividans* TK24. *J Bacteriol*. 188(2):677-686.

**Gilson E, Rousset JP, Charbit A, Perrin D y Hofnung M** (1986). *malM*, a new gene of the maltose regulon in *Escherichia coli* K12. I. *malM* is the last gene of the *malk-lamB* operon and encodes a periplasmic protein. *J Mol Biol*. 191(3):303-311.

**Goodfellow M** (1989). Suprageneric classification of the Actinomycetes. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams S, Sharpe ME y Holt JG. Editores: Williams & Wilkins, Baltimore. 4:2333-2339.

**Gramajo HC, Takano E y Bibb MJ** (1993). Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated. *Mol Microbiol.* 7(6):837-845.

**Gregory MA, Till R y Smith MCM** (2003). Integration site for *Streptomyces* phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors. *J Bacteriol.* 185(17):5320-5323.

**Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T y Chater KF** (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(4):1541-1546.

**Gust B, Kieser T y Chater KF** (2002). ReDirect technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. The John Innes Centre, Norwich. Protocol.

## H

**Hagedorn C** (1976). Influences of soil acidity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 32(3):368-375.

**Hakenbeck R y Stock JB** (1996). Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Methods Enzymol.* 273:281-300. Review.

**Hanahan D** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166(4):557-580.

**Hanahan D** (1985). Techniques for transformation of *E. coli* DNA cloning: a practical approach. Ed. Glover, D.M. IRL Press. Oxford. pp. 109-135.

**Hansen GHA** (1874). "Undersøgelser Angående Spedalskhedens Årsager (Investigations concerning the etiology of leprosy)" (in Norwegian). *Norsk Mag. Laegervidenskaben.* 4:1-88.

**Hardisson C y Manzanal MB** (1976). Ultrastructural studies of sporulation in *Streptomyces*. *J Bacteriol.* 127(3):1443-1454.

**Hardisson C, Manzanal MB, Salas JA y Suárez JE** (1978). Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *J Gen Microbiol.* 105(2):203-214.

**He W, Lei J, Liu Y y Wang Y** (2008). The LuxR family members GdmRI and GdmRII are positive regulators of geldanamycin biosynthesis in *Streptomyces hygrosopicus* 17997. *Arch Microbiol.* 189(5):501-510.

**Henderson DJ, Brolle DF, Kieser T, Melton RE y Hopwood DA** (1990). Transposition of *IS117* (the *Streptomyces coelicolor* A3(2) mini-circle) to and from a cloned target site and into secondary chromosomal sites. *Mol Gen Genet.* 224(1):65-71.

**Henikoff S, Haughn GW, Calvo JM y Wallace JC** (1988). A large family of bacterial activator proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(18):6602-6606.

**Hesketh AR, Chandra G, Shaw AD, Rowland JJ, Kell DB, Bibb MJ y Chater KF** (2002). Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 46(4):917-932.

- 
- Higgins CE, Hamill RL, Sands TH, Hoehn MM y Davis NE** (1974). Letter: The occurrence of deacetoxycephalosporin C in fungi and streptomycetes. *J Antibiot (Tokyo)*. 27:298-300.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G y Watson R** (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. 11(9):1026-1030.
- Hirsch CF y Ensign JC** (1978). Some properties of *Streptomyces viridochromogenes* spores. *J Bacteriol*. 134(3):1056-1063.
- Ho TF, Ma CJ, Lu CH, Tsai YT, Wei YH, Chang JS, Lai JK, Cheuh PJ, Yeh CT, Tang PC, Tsai Chang J, Ko JL, Liu FS, Yen HE y Chang CC** (2007). Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53. *Toxicol Appl Pharmacol*. 225(3):318-328.
- Hobbs G, Frazer CM, Gardner DCJ, Cullum JA y Oliver SG** (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Applied microbiology and biotechnology*. 31(3):272-277.
- Holmes DS y Quigley M** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal Biochem*. 114(1):193-197.
- Hopwood DA** (1999). Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology*. 145 ( Pt 9):2183-2202. Review.
- Hopwood DA** (2007). *Streptomyces* in Nature and Medicine. The antibiotic makers. John Innes Center. Oxford University Press.
- Hopwood DA y Kieser T** (1993). Conjugative plasmids in *Streptomyces*. In *Bacterial Conjugation*. D.B. Clewell (eds). Plenum Press, New York. pp. 293-312.
- Hopwood DA y Sherman DH** (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet*. 24:37-66. Review.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF y Kieser T** (1987). Plasmid and phage vectors for gene cloning and analysis in *Streptomyces*. *Methods Enzymol*. 153:116-166.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM y Schrempt H** (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. The John Innes Foundation. Norwich, U.K.
- Hopwood DA, Hintermann G, Kieser T y Wright HM** (1984). Integrated DNA sequences in three streptomycetes form related autonomous plasmids after transfer to *Streptomyces lividans*. *Plasmid*. 11(1):1-16.
- Hopwood DA, Kieser T, Bibb MJ, Lydiate DJ, Bibb MJ** (1986a). En: *The bacteria* (Eds: SW Queener y LE Day). Academic Press, New York. 9:159.
- Horbal L, Rebets Y, Rabyk M, Luzhetskyy A, Ostash B, Welle E, Nakamura T, Fedorenko V y Bechthold A** (2010). Characterization and analysis of the regulatory network involved in control of lipomycin biosynthesis in *Streptomyces aureofaciens* Tü117. *Appl Microbiol Biotechnol*. 85(4):1069-1079.

**Horinouchi S** (2003). AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 30(8):462-467. Review.

**Horinouchi S, Ihnishi Y y Kang D-K** (2001). The A-factor regulatory cascade and cAMP in the regulation of physiological and morphological development in *Streptomyces griseus*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 27(3):177-182.

**Horinouchi S, Malpartida F, Hopwood DA y Beppu T** (1989a). *afsB* stimulates transcription of the actinorhodin biosynthetic pathway in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. *Mol Gen Genet.* 215(2):355-257.

**Huang CH, Lin YS, Yang YL, Huang SW y Chen CW** (1998). The telomeres of *Streptomyces* chromosomes contain conserved palindromic sequences with potential to form complex secondary structures. *Mol Microbiol.* 28(5):905-916.

**Huang J, Lih CJ, Pan KH, Cohen SN** (2001). Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays. *Genes Dev.* 15(23):3183-3192.

**Huang J, Shi J, Molle V, Sohlberg B, Weaver D, Bibb MJ, Karoonuthaisiri N, Lih CJ, Kao CM, Buttner MJ y Cohen SN** (2005). Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 58(5):1276-1287.

**Hur YA, Choi SS, Sherman DH y Kim ES** (2008). Identification of TmcN as a pathway-specific positive regulator of tautomycetin biosynthesis in *Streptomyces* sp. CK4412. *Microbiology.* 154(Pt 10):2912-2919.

**Hutchings MI, Hoskisson PA, Chandra G y Buttner MJ** (2004). Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* 150(Pt 9):2795-2806. Review.

## I

**Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M y Omura S** (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol.* 21(5):526-531.

**Ishizuka H, Horinouchi S, Kieser HM, Hopwood DA y Beppu T** (1992). A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp. *J Bacteriol.* 174(23):7585-7594.

## J

**Jacob N, Niladevi KN, Anisha GS y Prema P** (2008). Hydrolysis of pectin: an enzymatic approach and its application in banana fiber processing. *Microbiol Res.* 163(5):538-544.

## K

**Kaiser P** (1971). Pectinolytic activity of Actinomycetes. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 121(3):389-404.

**Kang SH, Huang J, Lee HN, Hur YA, Cohen SN y Kim ES** (2007). Interspecies DNA microarray analysis identifies WblA as a pleiotropic down-regulator of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *J Bacteriol.* 189(11):4315-4319.

**Kato JY, Funa N, Watanabe H, Ohnishi Y y Horinouchi S** (2007). Biosynthesis of gamma-butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(7):2378-2383.

**Kempton C, Kaiser D, Haag, S, Nicholson G, Gnau V, Walk T, Gierling KH, Decker H, Zähler H, Jung G y Metzger JW** (1997). CDA: calcium-dependent peptide antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) containing unusual residues. *Angew Chem. Znt Ed Engl.* 36(5):498-501.

**Kendall MG y Garey JR** (2001). The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology.* 147(Pt 8):2379-2387.

**Khokhlov AS, Anisova LN, Tovarova II, Kleiner EM, Kovalenko IV, Krasilnikova OI, Kornitskaya EY y Pliner SA** (1973). Effect of A-factor on the growth of asporogenous mutants of *Streptomyces griseus*, not producing this factor. *Z Allg Mikrobiol.* 13(8):647-655.

**Khokhlov AS, Tovarova II, Borisova LN, Pliner SA, Shevchenko LA, Kornitskaya EYa, Ivkina NS y Rapoport IA** (1967). The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 177(1):232-235.

**Kieser HM, Kieser T y Hopwood DA** (1992). A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *J Bacteriol.* 174(17):5496-5507.

**Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF y Hopwood DA** (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, England.

**Kim D y Forst S** (2001). Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology.* 147(Pt 5):1197-1212.

**Kinashi H y Shimaji-Murayama M** (1991). Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 173(4):1523-1529.

**Kinashi H, Shimaji M y Sakai A** (1987). Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes. *Nature.* 328(6129):454-456.

**Kirby R y Hopwood DA** (1977). Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol.* 98(1):239-252.

**Kitani S, Ikeda H, Sakamoto T, Noguchi S y Nihira T** (2009). Characterization of a regulatory gene, *aveR*, for the biosynthesis of avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 82(6):1089-1096.

**Knirschová R, Nováková R, Fecková L, Timko J, Turna J, Bistáková J y Kormanec J** (2007). Multiple regulatory genes in the salinomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces albus* CCM 4719. *Folia Microbiol (Praha).* 52(4):359-365.

**Koch R** (1882). Die Aetiologie der Tuberkulose. (The cause of tuberculosis). *Berliner klinische Wochenschrift.* 19:211-230.

**Kodani S, Hudson ME, Durrant MC, Buttner MJ, Nodwell JR y Willey JM** (2004). The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(31):11448-11453.

**Kukolya J, Nagy I, Láday M, Tóth E, Oravec O, Márialigeti K y Hornok L** (2002). *Thermobifida cellulolytica* sp. nov., a novel lignocellulose-decomposing actinomycete. Int J Syst Evol Microbiol. 52(Pt 4):1193-1199.

## L

**Labes G, Bibb M y Wohleben W** (1997). Isolation and characterization of a strong promoter element from the *Streptomyces ghanaensis* phage I19 using the gentamicin resistance gene (*aacC1*) of Tn1696 as reporter. Microbiology. 143: 1503-1512.

**Lakey JH, Lea EJ, Rudd BA, Wright HM y Hopwood DA** (1983). A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity. J Gen Microbiol. 129(12):3565-3573.

**Leblond P, Demuyter P, Simonet JM y Decaris B** (1990a). Genetic instability and hypervariability in *Streptomyces ambofaciens*: towards an understanding of a mechanism of genome plasticity. Mol Microbiol. 4(5):707-714. Review.

**Leblond P, Demuyter P, Simonet JM y Decaris B** (1991). Genetic instability and associated genome plasticity in *Streptomyces ambofaciens*: pulsed-field gel electrophoresis evidence for large DNA alterations in a limited genomic region. J Bacteriol. 173(13):4229-4233.

**Leblond P, Fischer G, Francou FX, Berger F, Guérineau M y Decaris B** (1996). The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA. Mol Microbiol. 19(2):261-271.

**Leblond P, Francou FX, Simonet JM y Decaris B** (1990b). Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of *Streptomyces ambofaciens* strains. FEMS Microbiol Lett. 60(1-2):79-88.

**Leblond P, Redenbach M y Cullum J** (1993). Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Bacteriol. 175(11):3422-3429.

**Lee EJ, Karoonuthaisiri N, Kim HS, Park JH, Cha CJ, Kao CM y Roe JH** (2005). A master regulator sigmaB governs osmotic and oxidative response as well as differentiation via a network of sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol. 57(5):1252-1264.

**Lee PC, Umeyama T y Horinouchi S** (2002). *afsS* is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol Microbiol. 43(6):1413-1430.

**Lee Y, Kim K, Suh JW, Rhee S y Lim Y** (2007). Binding study of AfsK, a Ser/Thr kinase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) and S-adenosyl-L-methionine. FEMS Microbiol Lett. 266(2):236-240.

**Leipe DD, Koonin EV y Aravind L** (2004). STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *J Mol Biol.* 343(1):1-28. Review.

**Leskiw BK, Bibb MJ y Chater KF** (1991). The use of a rare codon specifically during development?. *Mol Microbiol.* 5(12):2861-2867. Review.

**Leskiw BK, Mevarech M, Barritt LS, Jensen SE, Henderson DJ, Hopwood DA, Bruton CJ y Chater KF** (1990). Discovery of an insertion sequence, *IS116*, from *Streptomyces clavuligerus* and its relatedness to other transposable elements from actinomycetes. *J Gen Microbiol.* 136(7):1251-1258.

**Lezhava A, Mizukami T, Kajitani T, Kameoka D, Redenbach M, Shinkawa H, Nimi O y Kinashi H** (1995). Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 177(22):6492-6498.

**Li J, Swanson RV, Simon MI y Weis RM** (1995). The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA. *Biochemistry.* 34(45):14626-14636.

**Li W, Ying X, Guo Y, Yu Z, Zhou X, Deng Z, Kieser H, Chater KF y Tao M** (2006). Identification of a gene negatively affecting antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 188(24):8368-8375.

**Lian W, Jayapal KP, Charaniya S, Mehra S, Glod F, Kyung YS, Sherman DH y Hu WS** (2008). Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, *AfsS*, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *BMC Genomics.* 9:56.

**Lin YS, Kieser HM, Hopwood DA y Chen CW** (1993). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol.* 10(5):923-933.

**Livak KJ y Schmittgen TD** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> method. *Methods.* 25(4):402-408.

**Lombó F, Braña AF, Méndez C y Salas JA** (1999). The mithramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster. *J Bacteriol.* 181(2):642-647.

**Luo ZQ y Farrand SK** (1999). Signal-dependent DNA binding and functional domains of the quorum-sensing activator TraR as identified by repressor activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(16):9009-9014.

**Lyon GJ y Novick RP** (2004). Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides.* 25(9):1389-13403. Review.

## M

**Machida K, Arisawa A, Takeda S, Tsuchida T, Aritoku Y, Yoshida M y Ikeda H** (2008). Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide antitumor macrolide, pladienolide, in *Streptomyces platensis* Mer-11107. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72(11):2946-2952.

**Madduri K y Hutchinson CR** (1995). Functional characterization and transcriptional analysis of the *dnrR1* locus, which controls daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*. *J Bacteriol.* 177(5):1208-1215.

**Martín JF** (1989). Molecular mechanism for the control by phosphate of the biosynthesis of antibiotic and secondary metabolites. In: *Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes*, S. Shapiro (ed). CRC Press Inc. Boca Raton, Fla. 213-237.

**Martín JF** (2004). Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J Bacteriol.* 186(16):5197-5201. Review.

**Martín JF y Liras P** (1989). Enzymes involved in penicillin, cephalosporin and cephamycin biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 39:153-187. Review.

**Martín JF, Gutiérrez S y Aparicio JF** (2000). Secondary Metabolites. *Encyclopedia of Microbiology*. Volume 4. Second Edition.

**Martínez-Costa OH, Arias P, Romero NM, Parro V, Mellado RP y Malpartida F** (1996). A *relA/spoT* homologous gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) controls antibiotic biosynthetic genes. *J Biol Chem.* 271:10627-10634.

**Matsumoto A, Hong S-K, Ishizuka H, Horinouchi S y Beppu T** (1994). Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene.* 146(1):47-56.

**Mazodier P, Thompson C y Boccard F** (1990). The chromosomal integration site of the *Streptomyces* element pSAM2 overlaps a putative tRNA gene conserved among actinomycetes. *Mol Gen Genet.* 222(2-3):431-434.

**McCarthy AJ y Williams ST** (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review. *Gene.* 115(1-2):189-192.

**McNeil HP, Reynolds DS, Schiller V, Ghildyal N, Gurley DS, Austen KF y Stevens RL** (1992). Isolation, characterization, and transcription of the gene encoding mouse mast cell protease 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(23):11174-11178.

**Mehra S, Lian W, Jayapal KP, Charaniya SP, Sherman DH y Hu W-S** (2006). A framework to analyze multiple time series data: A case study with *Streptomyces coelicolor*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 33(2):159-172.

**Mendes MV** (2002). Análisis funcional de genes tardíos de la ruta biosintética de la pimaricina de *Streptomyces natalensis* ATCC 27448. Tesis doctoral. Universidad de León.

**Mendes MV, Tunca S, Antón N, Recio E, Sola-Landa A, Aparicio JF y Martín JF** (2007). The two-component phoR-phoP system of *Streptomyces natalensis*: Inactivation or deletion of phoP reduces the negative phosphate regulation of pimaricin biosynthesis. *Metab Eng.* 9(2):217-227.

**Mendes MV, Tunca S, Antón N, Recio E, Sola-Landa A, Aparicio JF y Martín JF** (2007). The two-component phoR-phoP system of *Streptomyces natalensis*: Inactivation or deletion of *phoP* reduces the negative phosphate regulation of pimaricin biosynthesis. *Metab Eng.* 9(2):217-227.

**Méndez C y Salas JA** (2003). On the generation of novel anticancer drugs by recombinant DNA technology: The use of combinatorial biosynthesis to produce novel drugs. *Comb Chem High Throughput Screen.* 6(6):513-526. Review.

---

**Méndez C, Braña AF, Manzanal MB y Hardisson C** (1985). Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can J Microbiol.* 31(5):446-450.

**Merrick MJ** (1976). A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol.* 96(2):299-315.

**Mezei LM y Storts DR** (1994). Purification of PCR products. En: *PCR Technology: Current Innovations*, Griffin HG y Griffin AM, eds, CRC Press Boca Ratón, FL, 21.

**Miguélez EM, Martín C, Manzanal MB y Hardisson C** (1992). Growth and morphogenesis in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett.* 79(1-3):351-359.

**Mikulik K, Janda I, Weiser J, Stastna J y Jiranova A** (1984). RNA and ribosomal protein patterns during aerial spore germination in *Streptomyces granaticolor*. *Eur J Biochem.* 145(2):381-388.

**Miller JH** (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, New York. 352-355.

**Minogue TD, Wehland-von Trebra M, Bernhard F y von Bodman SB** (2002). The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*: evidence for a repressor function. *Mol Microbiol.* 44(6):1625-1635.

**Mizuno T y Tanaka I** (1997). Structure of the DNA-binding domain of the OmpR family of response regulators. *Mol. Microbiol.* 24(3):665-667.

**Molnár I, Aparicio JF, Haydock SF, Khaw LE, Schwecke T, König A, Staunton J y Leadlay PF** (1996). Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: análisis of genes flanking the polyketide synthase. *Gene.* 169(1):1-7.

**Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M, Yee H, Dubrow R, Nagle R y Iisley D** (2000). A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis.* 21(1):128-134.

**Musialowski MS, Flett F, Scott GB, Hobbs G, Smith CP y Oliver SG** (1994). Functional evidence that the principal DNA replication origin of the *Streptomyces coelicolor* chromosome is close to the dnaA-gyrB region. *J Bacteriol.* 176(16):5123-5125.

## N

**Narva KE y Feitelson JS** (1990). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *redD* locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 172(2):326-333.

**Nasser W y Reverchon S** (2007). New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal Bioanal Chem.* 387(2):381-390.

**Nealson KH y Hastings JW** (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev.* 43(4):496-518. Review.

**Nieselt K, Battke F, Herbig A, Bruheim P, Wentzel A, Jakobsen OM, Sletta H, Alam MT, Merlo ME, Moore J, Omara WA, Morrisey ER, Juarez-Hermosillo MA, Rodriguez-Garcia A, Nentwich M, Thomas L, Iqbal M, Legaie R, Gaze WH, Challis GL, Jansen RC, Dijkhuizen L, Rand DA, Wild DL, Bonin M, Reuther J, Wohlleben W, Smith MC, Burroughs NJ, Martin JF,**

**Hodgson DA, Takano E, Breitling R, Ellingsen TE y Wellington EM** (2010). The dynamic architecture of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. BMC Genomics. 11:10.

**Nolan T, Hands RE y Bustin SA** (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. Nat Protoc. 1(3):1559-1582.

**Noriega CE, Lin HY, Chen LL, Williams SB y Stewart V** (2010). Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12. Mol Microbiol. 75(2):394-412.

## O

**Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M y Horinouchi S** (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. J Bacteriol. 190(11):4050-4060.

**Ohnishi Y, Yamazaki H, Kato JY, Tomono A y Horinouchi S** (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(3):431-439. Review.

**Ohno T, Armand S, Hata T, Nikaidou N, Henrissat B, Mitsutomi M y Watanabe T** (1996). A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. J Bacteriol. 178(17):5065-5070.

**Oliynyk M, Stark CB, Bhatt A, Jones MA, Hughes-Thomas ZA, Wilkinson C, Oliynyk Z, Demydchuk Y, Staunton J y Leadlay PF** (2003). Analysis of the biosynthetic gene cluster for the polyether antibiotic monensin in *Streptomyces cinnamonensis* and evidence for the role of *monB* and *monC* genes in oxidative cyclization. Mol Microbiol. 49(5):1179-1190.

**Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Nakazawa H, Osonoe T, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M** (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(21):12215-12220.

**Onaka H, Nakagawa T y Horinouchi S** (1998). Involvement of two A-factor receptor homologues in *Streptomyces coelicolor* A3(2) in the regulation of secondary metabolism and morphogenesis. Mol Microbiol. 28(4):743-753.

## P

**Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ y Buttner MJ** (1999). Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Bacteriol. 181(1):204-211.

**Pandza K, Pfalzer G, Cullum J y Hranueli D** (1997). Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. Microbiology. 143(Pt 5):1493-1501.

- Pang X, Aigle B, Girardet JM, Mangenot S, Pernodet JL, Decaris B y Leblond P** (2004). Functional angucycline-like antibiotic gene cluster in the terminal inverted repeats of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(2):575-588.
- Paradkar AS, Aidoo KA y Jensen SE** (1998). A pathway-specific transcriptional activator regulates late steps of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Microbiol.* 27(4):831-843.
- Parajuli N, Basnet DB, Chan Lee H, Sohng JK y Liou K** (2004). Genome analyses of *Streptomyces peuceetius* ATCC 27952 for the identification and comparison of cytochrome P450 complement with other *Streptomyces*. *Arch Biochem Biophys.* 425(2):233-241.
- Park HS, Shin SK, Yang YY, Kwon HJ y Suh JW** (2005). Accumulation of S-adenosylmethionine induced oligopeptide transporters including BldK to regulate differentiation events in *Streptomyces coelicolor* M145. *FEMS Microbiol Lett.* 249(2):199-206.
- Parkinson JS y Kofoid EC** (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet.* 26:71-112. Review.
- Patankar AV y González JE** (2009). Orphan LuxR regulators of quorum sensing. *FEMS Microbiol Rev.* 33(4):739-756. Review.
- Pawlik K, Kotowska M, Chater KF, Kuczek K y Takano E** (2007). A cryptic type I polyketide synthase (*cpk*) gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch Microbiol.* 187(2):87-99.
- Peng HL, Yang YH, Deng WL, Chang HY** (1997). Identification and characterization of *acoK*, a regulatory gene of the *Klebsiella pneumoniae* acoABCD operon. *J Bacteriol.* 179(5):1497-1504.
- Pérez-Llarena FJ, Liras P, Rodríguez-García A y Martín JF** (1997). A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both beta-lactam compounds. *J Bacteriol.* 179(6):2053-2059.
- Pérez-Redondo R, Rodríguez-García A, Martín JF y Liras P** (1998). The *clar* gene of *Streptomyces clavuligerus*, encoding a LysR-type regulatory protein controlling clavulanic acid biosynthesis, is linked to the clavulanate-9-aldehyde reductase (*car*) gene. *Gene.* 211(2):311-321.
- Pernodet JL, Simonet JM y Guérineau M** (1984). Plasmids in different strains of *Streptomyces ambofaciens*: free and integrated form of plasmid pSAM2. *Mol Gen Genet.* 198(1):35-41.
- Pospiech A y Neumann B** (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 11(6):217-218.

## R

- Raghava GP, Solanki RJ, Soni V y Agrawal P** (2000). Fingerprinting method for phylogenetic classification and identification of microorganisms based on variation in 16S rRNA gene sequences. *Biotechniques.* 29(1):108-112, 114-116.
- Raibaud O y Richet E** (1987). Maltotriose is the inducer of the maltose regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 169(7):3059-3061.

**Rascher A, Hu Z, Buchanan GO, Reid R y Hutchinson CR** (2005). Insights into the biosynthesis of the benzoquinone ansamycins geldanamycin and herbimycin, obtained by gene sequencing and disruption. *Appl Environ Microbiol.* 71(8):4862-4871.

**Reiter WD, Palm P y Yeats S** (1989). Transfer RNA genes frequently serve as integration sites for prokaryotic genetic elements. *Nucleic Acids Res.* 17(5):1907-1914.

**Rhodus VA y Busby SJ** (1998). Positive activation of gene expression. *Curr Opin Microbiol.* 1(2):152-159. Review.

**Richet E y Raibaud O** (1989). MalT, the regulatory protein of the *Escherichia coli* maltose system, is an ATP-dependent transcriptional activator. *EMBO J.* 8(3):981-987.

**Ritchie ME, Diyagama D, Neilson J, van Laar R, Dobrovic A, Holloway A y Smyth GK** (2006). Empirical array quality weights in the analysis of microarray data. *BMC Bioinformatics.* 7:261.

**Robles J y Doers M** (1994). pGEM-T Easy Vector Systems troubleshooting guide. *Promega Notes.* 45:19-20.

**Rodríguez M, Núñez LE, Braña AF, Méndez C, Salas JA y Blanco G** (2008). Identification of transcriptional activators for thienamycin and cephamycin C biosynthetic genes within the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*. *Mol Microbiol.* 69(3):633-645.

**Rodríguez-García A, Barreiro C, Santos-Beneit F, Sola-Landa A y Martín JF** (2007). Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a  $\Delta$ phoP mutant. *Proteomics.* 7(14):2410-2429.

**Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Apel K, Santos-Beneit F y Martín JF** (2009). Phosphate control over nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: direct and indirect negative control of *glnR*, *glnA*, *glnII* and *amtB* expression by the response regulator PhoP. *Nucleic Acids Res.* 37(10):3230-3242.

**Rudd BA y Hopwood DA** (1980). A pigmented mycelial antibiotic in *Streptomyces coelicolor*: control by a chromosomal gene cluster. *J Gen Microbiol.* 119(2):333-340.

**Ryding NJ, Anderson TB y Champness WC** (2002). Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by *absA*, encoding a cluster-linked two-component system. *J of bacteriol.* 184(3):794-805.

## §

**Salas M** (1988). Initiation of DNA replication by primer proteins: bacteriophage phi 29 and its relatives. *Curr Top Microbiol Immunol.* 136:71-88. Review.

**Sambrook J y Russell D** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

**Sanger F, Nicklen S y Coulson AR** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5463-5467.

- 
- Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Apel AK, Martín JF** (2009a). Phosphate and carbon source regulation of two PhoP-dependent glycerophosphodiester phosphodiesterase genes of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*. 155(Pt 6):1800-1811.
- Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Franco-Domínguez E, Martín JF** (2008). Phosphate-dependent regulation of the low- and high-affinity transport systems in the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology*. 154(Pt 8):2356-2370.
- Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Martín JF** (2009b). Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. *Mol Microbiol*. 72(1):53-68.
- Sartor M, Schwanekamp J, Halbleib D, Mohamed I, Karyala S, Medvedovic M y Tomlinson CR** (2004). Microarray results improve significantly as hybridization approaches equilibrium. *Biotechniques*. 36(5):790-796.
- Sawai R, Suzuki A, Takano Y, Lee PC y Horinouchi S** (2004). Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene*. 334:53-61.
- Schirmer T, Keller TA, Wang YF y Rosenbusch JP** (1995). Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science*. 267(5197):512-514.
- Schlegel A, Böhm A, Lee SJ, Peist R, Decker K y Boos W** (2002). Network regulation of the *Escherichia coli* maltose system. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 4(3):301-307. Review.
- Schreiber V y Richet E** (1998). Self-association of the *Escherichia coli* transcription activator MalT in the presence of maltotriose and ATP. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(47):33220-33226.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M y Ragg T** (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 7:3.
- Sekurova ON, Brautaset T, Sletta H, Borgos SE, Jakobsen M ØM, Ellingsen TE, Strøm AR, Valla S y Zotchev SB** (2004). In vivo analysis of the regulatory genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces noursei* ATCC 11455 reveals their differential control over antibiotic biosynthesis. *J Bacteriol*. 186(5):1345-1354.
- Shu D, Chen L, Wang W, Yu Z, Ren C, Zhang W, Yang S, Lu Y y Jiang W** (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(6):1149-1160.
- Smyth GK** (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 3: Article3.
- Smyth GK y Speed T** (2003). Normalization of cDNA microarray data. *Methods*. 31(4):265-273.
- Smyth GK, Michaud J y Scott HS** (2005). Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics*. 21(9):2067-2075.

**Sola-Landa A, Moura RS y Martín JF** (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(10):6133-6138.

**Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Apel AK y Martín JF** (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(4):1358-1368.

**Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Franco-Domínguez E y Martín JF** (2005). Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. Mol Microbiol. 56(5):1373-1385.

**Solenberg PJ y Burgett SG** (1989). Method for selection of transposable DNA and characterization of a new insertion sequence, *IS493*, from *Streptomyces lividans*. J Bacteriol. 171(9):4807-4813.

**Southern EM** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol. 98(3):503-517.

**Stackebrandt E, Liesack W y Witt D.** (1992). Ribosomal RNA and rDNA sequence analyses. Gene. 115(1-2):255-260. Review.

**Stock AM, Robinson VL y Goudreau PN** (2000). Two-component signal transduction. Annu Rev Biochem. 69:183-215. Review.

**Süsstrunk U, Pidoux J, Taubert S, Ullmann A y Thompson CJ** (1998). Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol. 30(1):33-46.

## T

**Takano E** (2006). Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. Curr Opin Microbiol. 9(3):287-294. Review.

**Takano E, Chakraborty R, Nihira T, Yamada Y y Bibb MJ** (2001). A complex role of the  $\gamma$ -butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol Microbiol. 41(5):1015-1028.

**Takano E, Kinoshita H, Mersinias V, Bucca G, Hotchkiss G, Nihira T, Smith CP, Bibb M, Wohlleben W, Chater K** (2005). A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol. 56(2):465-479.

**Takano E, Nihira T, Hara Y, Jones JJ, Gershater CJ, Yamada Y y Bibb M** (2000). Purification and structural determination of SCB1, a gamma-butyrolactone that elicits antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Biol Chem. 275(15):11010-11016.

**Takano E, Tao M, Long F, Bibb MJ, Wang L, Li W, Buttner MJ, Bibb MJ, Deng ZX y Chater KF** (2003). A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol. 50(2):475-486.

**Tautz D y Renz M** (1983). An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem.* 132(1):14-19.

**Taylor BL y Zhulin IB** (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63(2):479-506. Review.

**Thomas L y Crawford DL** (1998). Cloning of clustered *Streptomyces viridosporus* T7A lignocellulose catabolism genes encoding peroxidase and endoglucanase and their extracellular expression in *Pichia pastoris*. *Can J Microbiol.* 44(4):364-372.

**Thompson CJ, Fink D, Nguyen LD** (2002). Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biol.* 3(7): Reviews1020.

**Tsao S-W, Rudd BAM, He X-G, Chang C-J y Floss HG** (1985). Identification of a red pigment from *S. coelicolor* A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives. *J Antibiot.* 38(1):128-131.

**Turner WB** (1973). Secondary metabolism with special reference to Actinomycetales. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 2:209-217. Review.

## U

**Uguru GC, Stephens KE, Stead JA, Towle JE, Baumberg S y McDowall KJ** (2005). Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 58(1):131-150.

**Umeyama T y Horinouchi S** (2001). Autophosphorylation of a bacterial serine/threonine kinase, AfsK, is inhibited by KbpA, an AfsK-binding protein. *J Bacteriol.* 183(19):5506-5512.

**Umeyama T, Lee P-C y Horinouchi S** (2002). Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59(4-5):419-425.

**Umeyama T, Lee P-C, Ueda K y Horinouchi S** (1999). An AfsK/AfsR system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in *Streptomyces griseus*. *Microbiology.* 145(Pt 9):2281-2292.

## V

**Vendeville A, Winzer K, Heurlier K, Tang CM y Hardie KR** (2005). Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 3(5):383-396. Review.

**Vicente CM, Santos-Aberturas J, Guerra SM, Payero TD, Martín JF y Aparicio JF** (2009). PimT, an amino acid exporter controls polyene production via secretion of the quorum sensing pimarin-inducer PI-factor in *Streptomyces natalensis*. *Microb Cell Fact.* 8:33.

**Vieira J y Messing J** (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 153:3-11.

**Vining LC** (1992). Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity--a review. *Gene.* 115(1-2):135-140. Review.

**Voeykova T, Emelyanova L, Tabakov V y Mkrtumyan N** (1998). Transfer of plasmid pTO1 from *Escherichia coli* to various representatives of the order Actinomycetales by intergeneric conjugation. FEMS Microbiol Lett. 162(1):47-52.

**Vögtli M, Chang PC y Cohen SN** (1994). *afsR2*: a previously undetected gene encoding a 63-amino-acid protein that stimulates antibiotic production in *Streptomyces lividans*. Mol Microbiol. 14(14):643-653.

**von Bodman SB, Ball JK, Faini MA, Herrera CM, Minogue TD, Urbanowski ML y Stevens AM** (2003). The quorum sensing negative regulators EsaR and ExpREcc, homologues within the LuxR family, retain the ability to function as activators of transcription. J Bacteriol. 185(23):7001-7007.

## W

**Walker JE, Saraste M, Runswick MJ y Gay NJ** (1982). Distantly related sequences in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. Embo J. 1(8):945-951.

**Waters CM y Bassler BL** (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu Rev Cell Dev Biol. 21:319-346. Review.

**White J y Bibb M** (1997). *bldA* dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade. J Bacteriol. 179(3):627-633.

**Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ y Salmond GP** (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev. 25(4):365-404. Review.

**Widdick DA, Dilks K, Chandra G, Bottrill A, Naldrett M, Pohlschröder M y Palmer T** (2006). The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor*. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(47):17927-17932.

**Wietzorrek A y Bibb M** (1997). A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like KNA-binding fold. Mol Microbiol. 25(6):1177-1184.

**Wildermuth H** (1970). Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. J Gen Microbiol. 60(1):43-50.

**Williams RP y Qadri SM** (1980). The pigment of *Serratia*. 31-79. von Graevenitz A and Rubin SJ (ed) The genus *Serratia*. Boca Raton. CRC Press.

**Williams RP, Gott CL y Qadri SM** (1971). Induction of pigmentation in nonproliferating cells of *Serratia marcescens* by addition of single amino acids. J Bacteriol. 106(2):444-448.

**Williams ST y Flowers TH** (1978). The influence of pH on starch hydrolysis by neutrophilic and acidophilic streptomycetes. Microbios. 20(80):99-106.

**Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EM, Sneath PH y Sackin MJ** (1983a). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. J Gen Microbiol. 129(6):1743-1813.

**Williams ST, Goodfellow M, Wellington EM, Vickers JC, Alderson G, Sneath PH, Sackin MJ y Mortimer AM** (1983b). A probability matrix for identification of some *Streptomyces*. J Gen Microbiol. 129(6):1815-1830.

**Williams ST, Locci R, Beswick A, Kurtboke DI, Kuznetsov VD, Monnier FJ, Long PF, Maycroft KA, Palma RA, Petrolini B y col.** (1993). Detection and identification of novel actinomycetes. *Res Microbiol.* 144(8):653-656.

**Williamson NR, Fineran PC, Gristwood T, Chawrai SR, Leeper FJ y Salmond GP** (2007). Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines. *Future Microbiol.* 2:605-618.

**Wilson DJ, Xue Y, Reynolds KE y Sherman DH** (2001). Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae*. *J Bacteriol.* 183(11):3468-3475.

**Winzer K, Hardie KR y Williams P** (2002). Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now - gone to lunch!. *Curr Opin Microbiol.* 5(2):216-222.

**Woodyer RD, Shao Z, Thomas PM, Kelleher NL, Blodgett JA, Metcalf WW, van der Donk WA y Zhao H** (2006). Heterologous production of fosfomicin and identification of the minimal biosynthetic gene cluster. *Chem Biol.* 13(11):1171-1182.

**Wright F y Bibb MJ** (1992). Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene.* 113(1):55-65.

**Wright LF y Hopwood DA** (1976a). Actinorhodin is a chromosomally-determined antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol.* 96(2):289-297.

**Wright LF, Hopwood DA** (1976b). Identification of the antibiotic determined by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol.* 95(1):96-106.

**Wu K, Chung L, Reville WP, Katz L y Reeves CD** (2000). The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene.* 251(1):81-90.

**Wu W, Xing EP, Myers C, Mian IS y Bissell MJ** (2005). Evaluation of normalization methods for cDNA microarray data by k-NN classification. *BMC Bioinformatics.* 6:191.

**Wu X y Roy KL** (1993). Complete nucleotide sequence of a linear plasmid from *Streptomyces clavuligerus* and characterization of its RNA transcripts. *J Bacteriol.* 175(1):37-52.

## Y

**Yuste L, Canosa I, Rojo F** (1998). Carbon-source-dependent expression of the PalkB promoter from the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *J Bacteriol.* 180(19):5218-5226.

## Z

**Zakrzewska-Czerwińska J y Schrempf H** (1992). Characterization of an autonomously replicating region from the *Streptomyces lividans* chromosome. *J Bacteriol.* 174(8):2688-2693.

**Zhang H, Zhan J, Su K y Zhang Y** (2004). A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*: Characteristics of blue pigment and identification of a novel compound,  $\lambda$ -actinorhodin. *Food Chemistry.* 95(2):186-192.

---

**Zotchev S, Haugan K, Sekurova O, Sletta H, Ellingsen TE y Valla S** (2000). Identification of a gene cluster for antibacterial polyketide-derived antibiotic biosynthesis in the nystatin producer *Streptomyces noursei* ATCC 11455. *Microbiology*. 146(Pt 3):611-619.



***Anexo***

---



**Tabla VII.1.** Genes estadísticamente significativos de los contrastes mutantes-silvestre.

SCO	Gene name	Product	Mc BvA	Mc CvA	p-value BvA	p-value CvA
SCO0107		putative aminoglycoside nucleotidyltransferase	<b>1.02</b>	<b>0.55</b>	<b>0.0003</b>	0.0403
SCO0144		hypothetical protein SCJ33.08	<b>1.28</b>	<b>0.88</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0016</b>
SCO0148		putative transcriptional regulatory protein	<b>1.17</b>	<b>0.79</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0007</b>
SCO0254		conserved hypothetical protein	<b>0.72</b>	<b>1.00</b>	0.0126	<b>0.0011</b>
SCO0268		hypothetical protein	<b>0.70</b>	<b>1.03</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0000</b>
SCO0275		putative transcriptional repressor protein	<b>0.85</b>	<b>0.38</b>	<b>0.0001</b>	0.0636
SCO0307		putative DNA-binding protein	<b>1.03</b>	<b>0.34</b>	<b>0.0003</b>	0.2035
SCO0330		putative 3-ketoacyl-ACP/CoA reductase	<b>0.91</b>	<b>0.70</b>	<b>0.0001</b>	0.0021
SCO0343		hypothetical protein SCF41.02	<b>0.75</b>	<b>1.31</b>	0.0203	<b>0.0002</b>
SCO0399		putative pyruvyl transferase peptidoglycan biosynthesis	<b>-0.37</b>	<b>-1.06</b>	0.2179	<b>0.0011</b>
SCO0465		non-heme chloroperoxidase (chloride peroxidase)	<b>0.66</b>	<b>1.01</b>	0.0051	<b>0.0001</b>
SCO0471		putative araC family transcriptional regulator	<b>0.86</b>	<b>1.10</b>	0.0019	<b>0.0002</b>
SCO0475		ABC transporter protein, integral membrane subunit	<b>1.08</b>	<b>1.53</b>	<b>0.0005</b>	<b>0.0000</b>
SCO0482		secreted chitinase	<b>0.80</b>	<b>0.97</b>	0.0010	<b>0.0001</b>
SCO0559		hypothetical protein SCF73.06c	<b>0.69</b>	<b>1.04</b>	0.0133	<b>0.0005</b>
SCO0562		putative integral membrane protein	<b>-0.61</b>	<b>-1.00</b>	0.0249	<b>0.0007</b>
SCO0605		putative AraC-family transcriptional regulator	<b>0.75</b>	<b>0.88</b>	0.0043	<b>0.0012</b>
SCO0613	<i>arcA</i>	arginine deiminase	<b>0.42</b>	<b>0.76</b>	0.0359	<b>0.0004</b>
SCO0638		putative lipoprotein	<b>-0.96</b>	<b>-1.11</b>	0.0040	<b>0.0012</b>
SCO0641	<i>terD</i>	tellurium resistance protein	<b>0.37</b>	<b>1.35</b>	0.1932	<b>0.0000</b>
SCO0647		short chain oxidoreductase	<b>0.73</b>	<b>1.24</b>	<b>0.0005</b>	<b>0.0000</b>
SCO0655	<i>gvpJ</i>	putative gas vesicle synthesis protein.	<b>-1.22</b>	<b>-1.48</b>	0.0017	<b>0.0003</b>
SCO0699		hypothetical protein SCF42.09c	<b>1.81</b>	<b>1.01</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO0701	<i>abaA-orfD</i>	hypothetical protein SCF42.11c.	<b>1.04</b>	<b>1.10</b>	0.0020	<b>0.0014</b>
SCO0702	<i>abaA-orfA</i>	putative acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase	<b>0.87</b>	<b>0.16</b>	<b>0.0413</b>	0.6953
SCO0705		conserved hypothetical protein	<b>0.65</b>	<b>1.17</b>	0.0417	<b>0.0007</b>
SCO0715		hypothetical protein SCF42.25c.	<b>-0.25</b>	<b>-1.13</b>	0.2959	<b>0.0001</b>
SCO0736		putative secreted protein	<b>-0.87</b>	<b>-1.59</b>	0.0024	<b>0.0000</b>
SCO0752	<i>salO</i>	protease precursor	<b>-0.82</b>	<b>-1.13</b>	0.0016	<b>0.0001</b>
SCO0761		hypothetical protein SCF81.20	<b>-0.10</b>	<b>-0.92</b>	0.5457	<b>0.0000</b>
SCO0762	<i>sti1</i>	protease inhibitor precursor	<b>-0.16</b>	<b>-1.07</b>	0.4083	<b>0.0000</b>
SCO0766		putative secreted beta-galactosidase	<b>-0.44</b>	<b>-0.93</b>	0.0347	<b>0.0001</b>
SCO0910		conserved hypothetical protein SCM1.43	<b>0.55</b>	<b>0.82</b>	0.0199	<b>0.0011</b>
SCO0920		putative acyltransferase	<b>1.77</b>	<b>1.00</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO0934		putative integral membrane protein	<b>0.87</b>	<b>1.41</b>	0.0016	<b>0.0000</b>
SCO0980		hypothetical protein (fragment)	<b>1.25</b>	<b>0.89</b>	<b>0.0001</b>	0.0026
SCO0992		putative cysteine synthase	<b>0.79</b>	<b>0.61</b>	<b>0.0004</b>	0.0048
SCO1036		putative phosphotriesterase-family protein	<b>1.16</b>	<b>0.62</b>	<b>0.0001</b>	0.0237
SCO1045		putative metal associated protein	<b>0.94</b>	<b>1.32</b>	0.0010	<b>0.0000</b>
SCO1048		putative phospholipase A2	<b>1.47</b>	<b>1.32</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0003</b>

**Tabla VII.1.** Genes estadísticamente significativos de los contrastes mutantes-silvestre. (Continuación).

SCO	Gene name	Product	Mc BvA	Mc CvA	P-value BvA	P-value CvA
SCO1054		putative aminotransferase	<b>0.78</b>	<b>0.67</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0012</b>
SCO1066		putative LacI-family transcriptional regulator	<b>1.07</b>	<b>1.69</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0000</b>
SCO1113		conserved hypothetical protein	<b>0.51</b>	<b>1.02</b>	0.0852	<b>0.0014</b>
SCO1119		putative AsnC-family transcriptional regulatory protein	<b>0.45</b>	<b>1.01</b>	0.0746	<b>0.0002</b>
SCO1167		putative helicase	<b>1.39</b>	<b>1.01</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO1179		conserved hypothetical protein SCG11A.10c	<b>0.74</b>	<b>0.77</b>	0.0012	<b>0.0010</b>
SCO1195		putative membrane protein	<b>2.09</b>	<b>2.02</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO1196		putative Tat dependent secreted protein	<b>1.94</b>	<b>1.62</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO1202		putative DNA ligase	<b>1.01</b>	<b>0.70</b>	<b>0.0003</b>	0.0100
SCO1209		putative short chain acyl-CoA dehydrogenase	<b>1.18</b>	<b>1.04</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0001</b>
SCO1218		putative transmembrane transport protein	<b>-0.07</b>	<b>0.88</b>	0.7265	<b>0.0002</b>
SCO1222		putative amidinotransferase	<b>1.31</b>	<b>0.63</b>	<b>0.0000</b>	0.0030
SCO1232	<i>ureG</i>	urease accessory protein	<b>1.10</b>	<b>1.04</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO1276	<i>sigJ</i>	RNA polymerase ECF sigma factor	<b>1.16</b>	<b>0.78</b>	<b>0.0003</b>	0.0115
SCO1278		putative ATP/GTP-binding protein	<b>1.20</b>	<b>0.73</b>	<b>0.0001</b>	0.0117
SCO1293		hypothetical protein	<b>2.29</b>	<b>1.51</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO1361		conserved hypothetical protein	<b>-0.18</b>	<b>-0.88</b>	0.3984	<b>0.0003</b>
SCO1364		hypothetical protein SC10A9.06c	<b>-1.43</b>	<b>-1.31</b>	0.0059	<b>0.0122</b>
SCO1370		putative two component system DNA binding response regulator	<b>0.93</b>	<b>1.02</b>	0.0020	<b>0.0009</b>
SCO1373		conserved hypothetical protein	<b>0.88</b>	<b>0.52</b>	<b>0.0000</b>	0.0092
SCO1419	<i>ugpQ2</i>	putative glicerophosphoryl diester phosphodiesterase.	<b>1.70</b>	<b>0.97</b>	<b>0.0000</b>	0.0031
SCO1426		hypothetical protein SC6D7.13c.	<b>0.71</b>	<b>0.33</b>	<b>0.0004</b>	0.0782
SCO1457		putative transport protein	<b>0.66</b>	<b>1.11</b>	0.0219	<b>0.0004</b>
SCO1492		putative peptidase	<b>-0.18</b>	<b>-0.92</b>	0.4819	<b>0.0009</b>
SCO1505	<i>rspD</i>	30S ribosomal protein S4	<b>-0.31</b>	<b>-1.20</b>	0.2140	<b>0.0000</b>
SCO1522	<i>pdxT</i>	Glutamine amidotransferase subunit pdxT (EC 2.6.-.-)	<b>-0.06</b>	<b>-0.88</b>	0.7860	<b>0.0003</b>
SCO1532		hypothetical protein	<b>0.91</b>	<b>0.30</b>	<b>0.0001</b>	0.1598
SCO1533		hypothetical protein SCL2.23c	<b>0.84</b>	<b>-0.16</b>	<b>0.0002</b>	0.4404
SCO1538		putative transport system membrane protein	<b>1.00</b>	<b>0.35</b>	<b>0.0000</b>	0.1077
SCO1550		putative small membrane protein	<b>-1.49</b>	<b>-1.99</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0000</b>
SCO1572		putative secreted protein	<b>2.22</b>	<b>1.92</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0004</b>
SCO1588		putative integral membrane protein	<b>-0.41</b>	<b>-0.62</b>	0.0128	<b>0.0005</b>
SCO1592	<i>nudF</i>	hypothetical protein	<b>-0.70</b>	<b>-0.71</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0003</b>
SCO1633	<i>tatA</i>	putative Tat dependent secreted protein	<b>1.00</b>	<b>1.22</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0000</b>
SCO1657		putative methionine synthase	<b>0.84</b>	<b>0.73</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0003</b>
SCO1682		putative zinc-binding alcohol dehydrogenase	<b>0.33</b>	<b>0.72</b>	0.0897	<b>0.0008</b>
SCO1800	<i>chpE</i>	putative small secreted protein	<b>-1.09</b>	<b>-0.79</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0013</b>
SCO1819		putative integral membrane protein	<b>0.72</b>	<b>0.59</b>	<b>0.0002</b>	0.0020
SCO1822		putative transmembrane transport protein	<b>0.48</b>	<b>0.78</b>	0.0366	<b>0.0013</b>
SCO1860		putative secreted protein	<b>-0.29</b>	<b>-0.73</b>	0.1270	<b>0.0006</b>
SCO1863		hypothetical protein SCI39.10c	<b>0.63</b>	<b>1.04</b>	0.0169	<b>0.0003</b>
SCO1873		putative acetyltransferase	<b>-0.52</b>	<b>-1.09</b>	0.0899	<b>0.0011</b>

**Tabla VII.1.** Genes estadísticamente significativos de los contrastes mutantes-silvestre. (Continuación).

SCO	Gene name	Product	Mc BvA	Mc CvA	P-value BvA	P-value CvA
SCO1916	<i>dapD</i>	putative transferase	<b>1.07</b>	<b>1.25</b>	0.0018	<b>0.0005</b>
SCO1934	<i>cyoE</i>	putative cytochrome oxidase assembly factor	<b>-1.15</b>	<b>-0.12</b>	<b>0.0007</b>	0.7079
SCO1935	<i>tktA1</i>	transketolase A	<b>0.00</b>	<b>-0.90</b>	0.9945	<b>0.0003</b>
SCO1950	<i>whiA</i>	hypothetical sporulation regulatory protein	<b>1.78</b>	<b>1.02</b>	<b>0.0030</b>	0.0865
SCO1955		putative Rieske iron sulphur binding protein	<b>0.70</b>	<b>1.18</b>	0.0385	<b>0.0011</b>
SCO1958	<i>uvrA</i>	ABC excision nuclease subunit A	<b>-0.64</b>	<b>-1.10</b>	0.0416	<b>0.0011</b>
SCO1968	<i>glpQ2</i>	putative secreted glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	<b>3.35</b>	<b>3.13</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO1981		conserved hypothetical protein	<b>0.67</b>	<b>0.74</b>	0.0021	<b>0.0009</b>
SCO2001		putative secreted protein	<b>0.79</b>	<b>0.95</b>	0.0034	<b>0.0007</b>
SCO2018		putative aminopeptidase N	<b>0.75</b>	<b>1.07</b>	0.0056	<b>0.0002</b>
SCO2031		hypothetical protein	<b>0.48</b>	<b>0.79</b>	0.0422	<b>0.0015</b>
SCO2041		putative membrane protein	<b>-0.19</b>	<b>-0.74</b>	0.3860	<b>0.0015</b>
SCO2078		putative membrane protein	<b>-0.16</b>	<b>-1.35</b>	0.6717	<b>0.0015</b>
SCO2096		putative membrane protein	<b>0.65</b>	<b>0.91</b>	0.0136	<b>0.0011</b>
SCO2161		conserved hypothetical protein	<b>-0.41</b>	<b>-1.06</b>	0.0618	<b>0.0000</b>
SCO2162		putative quinolinate synthetase (fragment)	<b>1.13</b>	<b>0.67</b>	<b>0.0000</b>	0.0061
SCO2187		putative acetylmuramoyl-L-alanine amidase	<b>0.96</b>	<b>0.86</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0002</b>
SCO2194	<i>lipA</i>	putative lipoic acid synthetase	<b>0.82</b>	<b>0.72</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0005</b>
SCO2195		hypothetical protein	<b>0.94</b>	<b>1.51</b>	0.0018	<b>0.0000</b>
SCO2196		putative integral membrane protein	<b>0.68</b>	<b>0.96</b>	0.0046	<b>0.0002</b>
SCO2267		probable heme oxygenase	<b>0.49</b>	<b>0.82</b>	0.0128	<b>0.0001</b>
SCO2268		conserved hypothetical protein	<b>1.32</b>	<b>0.88</b>	<b>0.0000</b>	0.0023
SCO2283		possible secreted esterase	<b>0.85</b>	<b>1.01</b>	0.0024	<b>0.0005</b>
SCO2320		hypothetical protein	<b>0.53</b>	<b>0.97</b>	0.0496	<b>0.0010</b>
SCO2322		putative secreted protein	<b>-0.21</b>	<b>-0.59</b>	0.2114	<b>0.0012</b>
SCO2327		conserved hypothetical protein	<b>-1.31</b>	<b>-1.08</b>	<b>0.0003</b>	0.0022
SCO2328		putative D-ala-D-ala dipeptidase	<b>0.83</b>	<b>1.40</b>	0.0867	<b>0.0066</b>
SCO2332		putative hydrolase	<b>0.69</b>	<b>1.11</b>	0.0346	<b>0.0014</b>
SCO2364		conserved hypothetical protein	<b>1.01</b>	<b>1.07</b>	0.0020	<b>0.0015</b>
SCO2374		putative TetR-family transcriptional regulator	<b>0.87</b>	<b>0.56</b>	<b>0.0005</b>	0.0195
SCO2428		putative phosphate binding protein (putative secreted protein)	<b>1.57</b>	<b>1.31</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0001</b>
SCO2492		putative membrane protein	<b>-0.96</b>	<b>-1.10</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO2496		putative secreted protein	<b>-0.02</b>	<b>0.77</b>	0.9211	<b>0.0017</b>
SCO2530		hypothetical protein SCC117.03.	<b>-0.44</b>	<b>-1.04</b>	0.1147	<b>0.0006</b>
SCO2549		possible protease	<b>0.72</b>	<b>1.05</b>	0.0219	<b>0.0017</b>
SCO2560		conserved hypothetical protein	<b>-0.32</b>	<b>-0.98</b>	0.2322	<b>0.0008</b>
SCO2582		conserved hypothetical protein SCC123.20.	<b>0.64</b>	<b>0.80</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0000</b>
SCO2592		putative transferase	<b>-1.02</b>	<b>-0.77</b>	<b>0.0003</b>	0.0048
SCO2618	<i>clpP2</i>	ATP dependent Clp protease proteolytic subunit 2	<b>-0.37</b>	<b>-0.73</b>	0.0857	<b>0.0015</b>
SCO2629		putative membrane protein	<b>0.65</b>	<b>0.89</b>	0.0019	<b>0.0001</b>
SCO2630		putative biotin synthase	<b>1.18</b>	<b>0.89</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>

**Tabla VII.1.** Genes estadísticamente significativos de los contrastes mutantes-silvestre. (Continuación).

SCO	Gene name	Product	Mc BvA	Mc CvA	P-value BvA	P-value CvA
SCO2702		putative secreted protein	<b>0.04</b>	<b>-0.59</b>	0.7907	<b>0.0012</b>
SCO2733		conserved hypothetical protein SCC57A.04c.	<b>0.47</b>	<b>0.94</b>	0.0784	<b>0.0011</b>
SCO2753		putative LacI-family transcriptional regulator.	<b>-0.34</b>	<b>-0.77</b>	0.0920	<b>0.0005</b>
SCO2775		putative TetR-family regulatory protein	<b>1.26</b>	<b>0.88</b>	<b>0.0002</b>	0.0076
SCO2858		hypothetical protein SCE20.32c.	<b>0.43</b>	<b>1.05</b>	0.0233	<b>0.0000</b>
SCO2883		putative cytochrome P450.	<b>1.02</b>	<b>1.03</b>	0.0004	<b>0.0004</b>
SCO2922		putative membrane protein	<b>0.35</b>	<b>1.22</b>	0.3062	<b>0.0011</b>
SCO2924	<i>ssgG</i>	putative sporulation regulator	<b>1.23</b>	<b>0.37</b>	<b>0.0000</b>	0.1680
SCO2932		putative permease membrane component	<b>0.52</b>	<b>1.53</b>	0.1812	<b>0.0004</b>
SCO2953	<i>rsuA</i>	probable anti-sigma factor	<b>-0.79</b>	<b>-1.19</b>	0.0261	<b>0.0015</b>
SCO2954	<i>sigU</i>	RNA polymerase sigma factor	<b>-0.85</b>	<b>-1.27</b>	0.0370	<b>0.0029</b>
SCO3027		hypothetical protein SCD84.08c	<b>0.42</b>	<b>0.89</b>	0.0634	<b>0.0004</b>
SCO3031		hypothetical protein SCE34.12	<b>0.85</b>	<b>0.63</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0007</b>
SCO3116		hypothetical protein SCE41.25c	<b>0.71</b>	<b>1.62</b>	0.0735	<b>0.0002</b>
SCO3299		conserved hypothetical protein	<b>-0.99</b>	<b>-0.99</b>	0.0011	<b>0.0012</b>
SCO3319	<i>hemA</i>	putative glutamyl-tRNA reductase	<b>-0.55</b>	<b>-0.81</b>	0.0065	<b>0.0002</b>
SCO3327		hypothetical protein	<b>0.52</b>	<b>1.30</b>	0.0935	<b>0.0002</b>
SCO3347		putative AP endonuclease	<b>-0.32</b>	<b>-0.73</b>	0.0978	<b>0.0005</b>
SCO3372		putative large ATP-binding protein	<b>0.73</b>	<b>0.72</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0003</b>
SCO3383	<i>panC</i>	putative pantoate-amino acid ligase	<b>0.91</b>	<b>0.67</b>	<b>0.0004</b>	0.0068
SCO3397		putative integral membrane lysyl-tRNA synthetase	<b>0.98</b>	<b>1.29</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0000</b>
SCO3401	<i>folK</i>	putative hydroxymethylidihydropteridine pyrophosphokinase	<b>0.48</b>	<b>0.90</b>	0.0209	<b>0.0001</b>
SCO3455		putative ABC-transporter transport protein	<b>0.94</b>	<b>1.25</b>	0.0013	<b>0.0001</b>
SCO3544		putative membrane protein	<b>0.75</b>	<b>1.25</b>	0.0249	<b>0.0005</b>
SCO3616		hypothetical protein	<b>0.61</b>	<b>0.98</b>	0.0045	<b>0.0000</b>
SCO3647		conserved hypothetical protein	<b>1.16</b>	<b>0.57</b>	<b>0.0000</b>	0.0269
SCO3653		putative two-component system regulator	<b>0.53</b>	<b>0.67</b>	0.0034	<b>0.0004</b>
SCO3662		hypothetical protein SCH44.02c	<b>0.58</b>	<b>1.23</b>	0.0091	<b>0.0000</b>
SCO3663		putative membrane protein	<b>1.13</b>	<b>0.72</b>	<b>0.0001</b>	0.0074
SCO3685		conserved hypothetical protein	<b>0.59</b>	<b>0.36</b>	<b>0.0004</b>	0.0237
SCO3739		putative epimerase	<b>0.67</b>	<b>0.76</b>	0.0018	<b>0.0006</b>
SCO3744		hypothetical protein SCH22A.22	<b>-0.56</b>	<b>-0.83</b>	0.0035	<b>0.0001</b>
SCO3750		putative two-component sensor histidine kinase	<b>0.69</b>	<b>1.13</b>	0.0261	<b>0.0007</b>
SCO3753		putative integral membrane	<b>-0.21</b>	<b>-0.92</b>	0.2987	<b>0.0001</b>
SCO3755		putative ABC transport system ATP binding protein	<b>-0.12</b>	<b>-0.71</b>	0.5375	<b>0.0008</b>
SCO3801		putative aspartyl aminopeptidase	<b>0.66</b>	<b>1.08</b>	0.0047	<b>0.0000</b>
SCO3806		hypothetical protein	<b>0.03</b>	<b>1.00</b>	0.9084	<b>0.0001</b>
SCO3838		putative membrane protein	<b>0.55</b>	<b>0.67</b>	0.0013	<b>0.0002</b>
SCO3842		putative dioxygenase	<b>0.27</b>	<b>0.76</b>	0.1882	<b>0.0006</b>
SCO3846	<i>ftsW</i>	putative FtsW/RodA/SpoVE family cell cycle protein	<b>1.31</b>	<b>1.58</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO3857		putative regulatory protein	<b>-0.74</b>	<b>-1.02</b>	0.0081	<b>0.0006</b>

**Tabla VII.1.** Genes estadísticamente significativos de los contrastes mutantes-silvestre. (Continuación).

SCO	Gene name	Product	Mc BvA	Mc CvA	P-value BvA	P-value CvA
SCO3873	<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	<b>-0.83</b>	<b>-1.62</b>	0.0189	<b>0.0000</b>
SCO3883		putative membrane protein	<b>-0.32</b>	<b>-0.78</b>	0.0782	<b>0.0001</b>
SCO3892	<i>sigT</i>	putative RNA polymerase sigma factor	<b>-0.61</b>	<b>-0.92</b>	0.0038	<b>0.0001</b>
SCO3916		hypothetical protein	<b>0.61</b>	<b>0.74</b>	0.0065	<b>0.0015</b>
SCO3975		putative regulator	<b>1.52</b>	<b>1.56</b>	<b>0.0005</b>	<b>0.0004</b>
SCO3979		putative TetR-family transcriptional regulator	<b>0.59</b>	<b>0.76</b>	0.0067	<b>0.0009</b>
SCO4058		hypothetical protein 2SCD60.24	<b>-0.52</b>	<b>-1.27</b>	0.0508	<b>0.0000</b>
SCO4079	<i>purL</i>	phosphoribosyl formylglycinamide synthase II (EC 6.3.5.3)	<b>0.63</b>	<b>0.56</b>	<b>0.0008</b>	0.0028
SCO4088		hypothetical protein SCD25.24c	<b>-0.60</b>	<b>-1.23</b>	0.0632	<b>0.0005</b>
SCO4122		putative MarR-family transcriptional regulator	<b>0.74</b>	<b>0.36</b>	<b>0.0007</b>	0.0793
SCO4126		putative membrane protein	<b>0.96</b>	<b>0.60</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0002</b>
SCO4131		putative integral membrane protein	<b>-0.07</b>	<b>-1.02</b>	0.7453	<b>0.0000</b>
SCO4140	<i>pstA</i>	phosphate ABC transport system permease protein	<b>1.03</b>	<b>0.71</b>	<b>0.0001</b>	0.0032
SCO4154		hypothetical protein SCD84.21	<b>0.64</b>	<b>1.18</b>	0.0492	<b>0.0008</b>
SCO4162		putative integral membrane protein	<b>0.55</b>	<b>0.63</b>	0.0016	<b>0.0005</b>
SCO4174		putative integral membrane protein	<b>-2.41</b>	<b>-1.26</b>	<b>0.0008</b>	0.0644
SCO4187		putative membrane protein	<b>1.00</b>	<b>1.12</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0000</b>
SCO4198		putative DNA-binding protein	<b>0.77</b>	<b>0.67</b>	<b>0.0008</b>	0.0032
SCO4209	<i>pgm1</i>	phosphoglycerate mutase	<b>0.82</b>	<b>1.03</b>	0.0019	<b>0.0002</b>
SCO4226		hypothetical protein	<b>0.91</b>	<b>0.54</b>	<b>0.0002</b>	0.0180
SCO4227	<i>mtpA</i>	hypothetical metallothionein protein	<b>1.15</b>	<b>0.28</b>	<b>0.0000</b>	0.2728
SCO4228	<i>phoU</i>	phosphate transport system regulator	<b>1.45</b>	<b>0.87</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0013</b>
SCO4229	<i>phoR</i>	PhoR sensor kinase	<b>1.29</b>	<b>0.93</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0007</b>
SCO4230	<i>phoP</i>	PhoP response regulator	<b>1.17</b>	<b>1.04</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0001</b>
SCO4234		2C-methyl-D-erythriol 2,4-cyclodiphosphate synthase	<b>0.55</b>	<b>1.24</b>	0.1071	<b>0.0013</b>
SCO4239		putative small membrane protein	<b>0.88</b>	<b>0.66</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0012</b>
SCO4252		hypothetical protein SCD8A.25c	<b>0.96</b>	<b>0.10</b>	<b>0.0001</b>	0.6219
SCO4253		conserved hypothetical protein SCD8A.26c	<b>1.15</b>	<b>0.29</b>	<b>0.0001</b>	0.2826
SCO4263		LAL-family transcriptional regulator	<b>0.81</b>	<b>0.82</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0005</b>
SCO4276	<i>senR</i>	putative response regulatory protein	<b>0.81</b>	<b>1.11</b>	0.0068	<b>0.0004</b>
SCO4278		conserved hypothetical protein SCD95A.11	<b>-0.12</b>	<b>-0.57</b>	0.4747	<b>0.0014</b>
SCO4305		hypothetical protein SCD95A.38c	<b>1.39</b>	<b>1.30</b>	<b>0.0007</b>	<b>0.0014</b>
SCO4323		putative hydrolase	<b>0.99</b>	<b>0.49</b>	<b>0.0001</b>	0.0396
SCO4366		putative phosphoserine aminotransferase	<b>0.64</b>	<b>0.43</b>	<b>0.0005</b>	0.0157
SCO4384		putative enoyl CoA hydratase	<b>0.32</b>	<b>1.44</b>	0.2886	<b>0.0000</b>
SCO4405		putative ABC transport system ATP-binding protein	<b>0.63</b>	<b>1.02</b>	0.0103	<b>0.0001</b>
SCO4434		putative LysR-family transcriptional regulator	<b>0.45</b>	<b>0.81</b>	0.0439	<b>0.0008</b>
SCO4442		hypothetical protein SCD6.20	<b>1.46</b>	<b>1.80</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0000</b>
SCO4478		putative transferase	<b>-1.06</b>	<b>-1.66</b>	0.0040	<b>0.0000</b>
SCO4479		putative secreted hydrolase	<b>0.91</b>	<b>1.22</b>	0.0034	<b>0.0002</b>
SCO4506		conserved hypothetical protein	<b>-0.33</b>	<b>-0.71</b>	0.0954	<b>0.0008</b>

**Tabla VII.1.** Genes estadísticamente significativos de los contrastes mutantes-silvestre. (Continuación).

SCO	Gene name	Product	Mc BvA	Mc CvA	P-value BvA	P-value CvA
SCO4508		putative cell division-related protein	<b>-0.45</b>	<b>-0.96</b>	0.0317	<b>0.0001</b>
SCO4582		conserved hypothetical protein	<b>1.46</b>	<b>1.37</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0005</b>
SCO4649	<i>rtpA</i>	50S ribosomal protein L1	<b>-0.06</b>	<b>-0.65</b>	0.7334	<b>0.0008</b>
SCO4659	<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S12	<b>-0.10</b>	<b>-1.17</b>	0.7476	<b>0.0007</b>
SCO4665		putative membrane protein	<b>0.80</b>	<b>1.18</b>	0.0197	<b>0.0013</b>
SCO4669		putative membrane protein	<b>0.70</b>	<b>1.11</b>	0.0023	<b>0.0000</b>
SCO4686		conserved hypothetical protein SCD31.11	<b>0.62</b>	<b>0.95</b>	0.0195	<b>0.0008</b>
SCO4720	<i>rpmD</i>	50S ribosomal protein L30	<b>-0.02</b>	<b>-1.50</b>	0.9529	<b>0.0006</b>
SCO4742		conserved hypothetical protein	<b>-0.90</b>	<b>-1.36</b>	0.0069	<b>0.0001</b>
SCO4753		hypothetical protein	<b>-0.22</b>	<b>-0.90</b>	0.2786	<b>0.0001</b>
SCO4769	<i>ECF</i>	ECF sigma factor	<b>-0.44</b>	<b>-1.03</b>	0.0817	<b>0.0002</b>
SCO4825		putative integral membrane protein	<b>0.87</b>	<b>1.12</b>	0.0014	<b>0.0001</b>
SCO4842		putative oxidoreductase	<b>0.68</b>	<b>0.98</b>	0.0094	<b>0.0004</b>
SCO4865		hypothetical protein SCK20.06	<b>-0.57</b>	<b>-0.89</b>	0.0309	<b>0.0014</b>
SCO4880	<i>neuA</i>	ácido CMP-N-acetilneuramínico sintetasa	<b>0.78</b>	<b>0.34</b>	<b>0.0005</b>	0.1048
SCO4902		putative secreted protein	<b>1.00</b>	<b>0.97</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0001</b>
SCO4906	<i>afsQ2</i>	sensor kinase protein	<b>0.62</b>	<b>0.83</b>	0.0046	<b>0.0003</b>
SCO4908	<i>sigQ</i>	putative RNA polymerase sigma factor	<b>-0.10</b>	<b>-1.25</b>	0.7094	<b>0.0000</b>
SCO4920		putative DeoR-family transcriptional regulator	<b>-0.22</b>	<b>-1.48</b>	0.5297	<b>0.0002</b>
SCO4948	<i>narH3</i>	nitrate reductase beta chain NarH3	<b>0.67</b>	<b>0.99</b>	0.0017	<b>0.0000</b>
SCO4958	<i>metB</i>	cystathionine gamma-synthase	<b>-0.64</b>	<b>-1.04</b>	0.0022	<b>0.0000</b>
SCO4971		putative xanthine dehydrogenase	<b>0.86</b>	<b>1.32</b>	0.0073	<b>0.0001</b>
SCO4982		putative membrane protein	<b>-0.94</b>	<b>-1.34</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0000</b>
SCO5030		putative integral membrane protein	<b>1.56</b>	<b>1.43</b>	<b>0.0005</b>	<b>0.0013</b>
SCO5032	<i>ahpC</i>	alkyl hydroperoxide reductase	<b>0.77</b>	<b>0.41</b>	<b>0.0001</b>	0.0201
SCO5037		hypothetical protein SCK7.10c	<b>-0.47</b>	<b>-0.65</b>	0.0052	<b>0.0003</b>
SCO5039		putative penicillin-binding protein pbp2	<b>0.40</b>	<b>0.75</b>	0.0349	<b>0.0003</b>
SCO5069		putative oxidoreductase	<b>0.70</b>	<b>0.75</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0000</b>
SCO5073	<i>actVI-ORF2</i>	putative enoyl reductase	<b>-1.01</b>	<b>-1.14</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0001</b>
SCO5075	<i>actVI-ORF4</i>	putative oxidoreductase	<b>-0.80</b>	<b>-1.19</b>	0.0012	<b>0.0000</b>
SCO5080	<i>actVA5</i>	putative hydrolase	<b>-0.79</b>	<b>-1.06</b>	0.0107	<b>0.0011</b>
SCO5083	<i>actII-2</i>	putative actinorhodin transporter	<b>-0.68</b>	<b>-1.39</b>	0.0456	<b>0.0002</b>
SCO5088	<i>actI-ORF2</i>	actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase beta subunit	<b>-0.86</b>	<b>-1.16</b>	0.0123	<b>0.0014</b>
SCO5124		hypothetical protein	<b>0.41</b>	<b>0.84</b>	0.0606	<b>0.0005</b>
SCO5128		putative membrane protein	<b>0.62</b>	<b>1.60</b>	0.1700	<b>0.0012</b>
SCO5145		conserved hypothetical protein	<b>-0.51</b>	<b>-1.18</b>	0.0510	<b>0.0001</b>
SCO5166		putative helicase	<b>-0.31</b>	<b>-0.95</b>	0.2297	<b>0.0007</b>
SCO5173		conserved hypothetical protein	<b>-0.66</b>	<b>-1.12</b>	0.0291	<b>0.0005</b>
SCO5174		putative transferase	<b>-0.28</b>	<b>-0.86</b>	0.2415	<b>0.0010</b>
SCO5192		hypothetical protein	<b>1.80</b>	<b>1.92</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO5195		conserved hypothetical protein	<b>0.25</b>	<b>0.81</b>	0.2742	<b>0.0010</b>

**Tabla VII.1.** Genes estadísticamente significativos de los contrastes mutantes-silvestre. (Continuación).

SCO	Gene name	Product	Mc BvA	Mc CvA	<i>p</i> -value BvA	<i>p</i> -value CvA
SCO5228		putative acetyltransferase	<b>0.62</b>	<b>0.93</b>	0.0054	<b>0.0001</b>
SCO5280		putative ATP-binding protein	<b>0.10</b>	<b>0.82</b>	0.6552	<b>0.0014</b>
SCO5285	<i>lon</i>	ATP-dependent protease	<b>-0.38</b>	<b>-0.69</b>	0.0418	<b>0.0006</b>
SCO5312		pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein	<b>1.25</b>	<b>0.87</b>	<b>0.0001</b>	0.0036
SCO5368	<i>atpE</i>	ATP synthase C chain	<b>-0.36</b>	<b>-1.01</b>	0.1929	<b>0.0010</b>
SCO5372	<i>atpG</i>	ATP synthase gamma chain	<b>-0.19</b>	<b>-1.08</b>	0.4572	<b>0.0002</b>
SCO5396		putative cellulose-binding protein	<b>0.95</b>	<b>0.62</b>	<b>0.0005</b>	0.0189
SCO5424	<i>ackA</i>	acetate kinase	<b>0.82</b>	<b>0.52</b>	<b>0.0003</b>	0.0156
SCO5428		putative integral membrane transport protein	<b>0.18</b>	<b>1.10</b>	0.5247	<b>0.0005</b>
SCO5439		putative helicase	<b>-0.63</b>	<b>-1.01</b>	0.0215	<b>0.0006</b>
SCO5465		putative NADPH oxidoreductase coenzyme F420 dependent	<b>0.67</b>	<b>-0.01</b>	<b>0.0007</b>	0.9370
SCO5466		putative hydrolase	<b>0.81</b>	<b>0.36</b>	<b>0.0002</b>	0.0718
SCO5530		putative membrane protein	<b>0.91</b>	<b>1.25</b>	0.0033	<b>0.0002</b>
SCO5532		putative transcriptional regulator	<b>0.41</b>	<b>1.27</b>	0.1847	<b>0.0003</b>
SCO5538	<i>cvnC2</i>	conserved hypothetical protein SC1C2.19c	<b>0.88</b>	<b>1.29</b>	0.0173	<b>0.0010</b>
SCO5582	<i>nsdA</i>	putative negative regulator of differentiation	<b>0.93</b>	<b>0.32</b>	<b>0.0003</b>	0.1732
SCO5610		hypothetical protein SC2E1.27c	<b>1.13</b>	<b>1.25</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO5645		conserved hypothetical protein SC6A9.22c	<b>1.11</b>	<b>0.88</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO5660		putative secreted peptidase	<b>0.53</b>	<b>1.04</b>	0.0450	<b>0.0005</b>
SCO5746		hypothetical protein SC7C7.01	<b>1.49</b>	<b>1.55</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO5751		putative membrane protein	<b>0.72</b>	<b>0.33</b>	<b>0.0000</b>	0.0454
SCO5770	<i>recX</i>	putative recombination regulatory protein	<b>-0.88</b>	<b>-1.08</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0000</b>
SCO5781		putative secreted protein	<b>0.87</b>	<b>1.18</b>	0.0044	<b>0.0003</b>
SCO5842		putative acyl-CoA synthetase	<b>0.72</b>	<b>1.07</b>	0.0089	<b>0.0003</b>
SCO5865		hypothetical protein SC2E9.06	<b>0.60</b>	<b>0.93</b>	0.0297	<b>0.0014</b>
SCO5917		putative MerR-family transcriptional regulator	<b>0.71</b>	<b>1.20</b>	0.0411	<b>0.0012</b>
SCO5922		possible oxidoreductase	<b>0.64</b>	<b>0.88</b>	0.0039	<b>0.0002</b>
SCO6047		ABC-transporter ATP-binding protein	<b>0.70</b>	<b>1.01</b>	0.0014	<b>0.0000</b>
SCO6060	<i>murC</i>	putative UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine ligase	<b>0.61</b>	<b>0.93</b>	0.0015	<b>0.0000</b>
SCO6200		hypothetical protein SC2G5.21c	<b>0.67</b>	<b>0.93</b>	0.0113	<b>0.0008</b>
SCO6201	<i>gcl</i>	putative glyoxylate carboligase	<b>0.57</b>	<b>0.60</b>	<b>0.0007</b>	<b>0.0005</b>
SCO6232		putative beta-mannosidase	<b>0.11</b>	<b>0.79</b>	0.5461	<b>0.0002</b>
SCO6234	<i>manA</i>	secreted beta-mannosidase	<b>0.33</b>	<b>0.66</b>	0.0528	<b>0.0003</b>
SCO6244		conserved hypothetical protein	<b>-0.72</b>	<b>-0.79</b>	0.0021	<b>0.0010</b>
SCO6277	<i>cpkE</i>	putative epoxide hydrolase	<b>-0.29</b>	<b>-0.77</b>	0.1689	<b>0.0007</b>
SCO6373		putative integral membrane protein	<b>0.43</b>	<b>1.22</b>	0.1421	<b>0.0002</b>
SCO6374		putative membrane sugar transferase	<b>-0.58</b>	<b>-0.92</b>	0.0115	<b>0.0002</b>
SCO6470		putative MaoC-like protein (Acyl dehydratase)	<b>0.69</b>	<b>1.15</b>	0.0016	<b>0.0000</b>
SCO6489		conserved hypothetical protein	<b>1.46</b>	<b>0.98</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0015</b>
SCO6548		putative secreted cellulase	<b>0.20</b>	<b>0.79</b>	0.2939	<b>0.0003</b>
SCO6593		hypothetical protein	<b>0.30</b>	<b>1.11</b>	0.2854	<b>0.0004</b>

**Tabla VII.1.** Genes estadísticamente significativos de los contrastes mutantes-silvestre. (Continuación).

SCO	Gene name	Product	Mc BvA	Mc CvA	<i>p</i> -value BvA	<i>p</i> -value CvA
SCO6632		hypothetical protein SC4G2.06	<b>0.66</b>	<b>0.92</b>	0.0115	<b>0.0009</b>
SCO6682	<i>ramS</i>	putative developmental protein	<b>0.60</b>	<b>1.01</b>	0.0292	<b>0.0007</b>
SCO6691		putative Tat dependent secreted protein	<b>0.91</b>	<b>0.29</b>	<b>0.0003</b>	0.2043
SCO6737		hypothetical protein	<b>0.87</b>	<b>1.04</b>	0.0047	<b>0.0010</b>
SCO6743		putative transcriptional accessory protein	<b>-0.27</b>	<b>-0.62</b>	0.1372	<b>0.0014</b>
SCO6753		putative nucleotide sugar-1-phosphate transferase	<b>-0.72</b>	<b>-0.83</b>	0.0009	<b>0.0002</b>
SCO6777		putative beta-lactamase	<b>0.83</b>	<b>1.21</b>	0.0035	<b>0.0001</b>
SCO6859		hypothetical protein SC7F9.11c	<b>1.12</b>	<b>1.42</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO6873		hypothetical protein SC7F9.25c	<b>0.78</b>	<b>0.46</b>	<b>0.0003</b>	0.0237
SCO6879		hypothetical protein	<b>0.87</b>	<b>1.09</b>	0.0008	<b>0.0001</b>
SCO6887		hypothetical protein SC7F9.39	<b>0.52</b>	<b>0.87</b>	0.0237	<b>0.0004</b>
SCO6888		hypothetical protein SC7F9.40	<b>0.95</b>	<b>0.98</b>	0.0019	<b>0.0016</b>
SCO6896		putative integral membrane protein	<b>0.67</b>	<b>0.97</b>	0.0066	<b>0.0002</b>
SCO6900		hypothetical protein SC1B2.06	<b>0.58</b>	<b>1.08</b>	0.0515	<b>0.0008</b>
SCO6939		conserved hypothetical protein SC1G8.11c.	<b>0.26</b>	<b>0.92</b>	0.2897	<b>0.0007</b>
SCO7006		putative oxidoreductase.	<b>0.63</b>	<b>0.94</b>	0.0095	<b>0.0003</b>
SCO7021		putative secreted protein.	<b>0.48</b>	<b>0.66</b>	0.0073	<b>0.0005</b>
SCO7054		putative PadR-like family transcriptional regulator	<b>1.05</b>	<b>1.02</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>
SCO7062		putative methylase	<b>0.46</b>	<b>0.89</b>	0.0660	<b>0.0010</b>
SCO7080		putative insertion element transposase.	<b>0.73</b>	<b>0.32</b>	<b>0.0002</b>	0.0741
SCO7089		probable two-component system sensor kinase	<b>-0.82</b>	<b>-0.28</b>	<b>0.0008</b>	0.2299
SCO7172		putative membrane protein	<b>0.31</b>	<b>0.93</b>	0.2251	<b>0.0010</b>
SCO7298		putative thioredoxin reductase.	<b>1.03</b>	<b>1.32</b>	0.0008	<b>0.0001</b>
SCO7306	<i>wblK</i>	whiB-family transcriptional regulator	<b>0.48</b>	<b>1.23</b>	0.0611	<b>0.0000</b>
SCO7318		putative membrane protein	<b>-1.17</b>	<b>-1.26</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0000</b>
SCO7344		putative secreted protein	<b>1.57</b>	<b>0.98</b>	<b>0.0000</b>	0.0025
SCO7485		putative oxidoreductase	<b>0.90</b>	<b>0.73</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0003</b>
SCO7524		conserved hypothetical protein	<b>-0.75</b>	<b>-1.10</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0000</b>
SCO7592		conserved hypothetical protein	<b>0.84</b>	<b>1.01</b>	0.0046	<b>0.0011</b>
SCO7631		putative Tat dependent secreted protein	<b>0.73</b>	<b>0.99</b>	0.0047	<b>0.0003</b>
SCO7686		putative cytochrome P450	<b>1.02</b>	<b>1.18</b>	0.0034	<b>0.0010</b>
SCO7697		putative secreted phytase	<b>1.09</b>	<b>0.71</b>	<b>0.0001</b>	0.0072
SCO7725		hypothetical protein SC8D11.16	<b>1.03</b>	<b>0.62</b>	<b>0.0000</b>	0.0046
SCO7743		hypothetical protein SC8D11.34c	<b>0.57</b>	<b>1.57</b>	0.1364	<b>0.0002</b>
SCO7771		pseudogene, conserved hypothetical protein	<b>0.23</b>	<b>1.36</b>	0.4978	<b>0.0003</b>

**Tabla VII.1.** Genes estadísticamente significativos de los contrastes mutantes-silvestre. Mc y valor *p* de los contrastes entre las condiciones indicadas (A: cepa *S. coelicolor* A3(2) M145, B: cepa *S. coelicolor*: $\Delta$ 0877 y C: cepa *S. coelicolor*: $\Delta$ 7173).

