



Universidad de León

Departamento de Biología Molecular

Área de Microbiología



Mecanismos Regulatorios Comunes que Controlan la Biosíntesis de Macrólidos Polienos

Cláudia Sofia Morgado Vicente

2015



universidad
de león



La presente tesis doctoral ha sido desarrollada en el Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) y en la Universidad de León, gracias al apoyo al doctorando por parte de la Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), con la concesión de una beca doctoral (SFRH/BD/64006/2009), y a través de los proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2007-67585 y BIO2010-19911), y de la Junta de Castilla y León (Grupo de Excelencia GR117).

Memoria presentada por Cláudia Sofia Morgado Vicente
para optar al grado de Doctor en Biología



INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)

El Dr. D. Jesús Aparicio Fernández como Director ¹de la Tesis Doctoral titulada “Mecanismos regulatorios comunes que controlan la biosíntesis de macrólidos polienos” realizada por Dña. Cláudia Sofia Morgado Vicente en el Departamento de Biología Molecular, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León

a ____ de _____ de _____.

¹ Si la tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.



ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

**(Art. 11.3 del R.D. 56/2005
y norma 7ª de las complementarias de la ULE)**

El Departamento de Biología Molecular en su reunión celebrada el día ____ de _____ de _____ ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Mecanismos regulatorios comunes que controlan la biosíntesis de macrólidos polienos”, dirigida por el Dr. D. Jesús Aparicio Fernández, elaborada por Dña. Cláudia Sofia Morgado Vicente, y cuyo título en inglés es el siguiente: “Commun regulatory mechanisms that govern the biosynthesis of polyene macrolides”

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León

a ____ de _____ de _____.

El Secretario,

Fdo: _____

Vº Bº

El Director del Departamento,

Fdo: _____

A mi familia,
en especial a los que ya no están.

“The woods are lovely, dark and deep,
But I have promises to keep,
And miles to go before I sleep,
And miles to go before I sleep.”

Robert Frost

Índice

Abreviaturas.....	xviii
1. Introducción	1
1.1. El género <i>Streptomyces</i>	3
1.1.1. Características generales.....	3
1.1.2. Características genéticas	6
1.1.2.1. Estructura y organización del cromosoma	6
1.1.2.2. Elementos extracromosomales	9
1.1.2.3. Inestabilidad genética.....	10
1.1.3. Ciclo de vida.....	11
1.1.3.1. Coordinación entre la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario	13
1.2. Metabolismo secundario en <i>Streptomyces</i>.....	14
1.3. Regulación del metabolismo secundario.....	17
1.3.1. Regulación nutricional y ppGpp	18
1.3.2. Respuesta a señales intercelulares	20
1.3.3. Reguladores pleiotrópicos	24
1.3.3.1. AfsR.....	24
1.3.3.2. Sistema de dos componentes PhoR-PhoP	25
1.3.4. Reguladores específicos de ruta.....	27
1.3.4.1. Reguladores de tipo SARP: el modelo de reguladores específicos de ruta	28
1.3.4.2. Reguladores de tipo LAL	30
1.3.4.3. Otras familias de reguladores.....	30
1.3.4.4. Redes complejas de reguladores específicos de ruta	31
1.3.5. Mejora de la producción de metabolitos secundarios: manipulación de la regulación.....	32
1.4. Los policétidos	34
1.4.1. Diversidad estructural	34
1.4.1.1. Policétidos aromáticos.....	34
1.4.1.2. Policétidos macrocíclicos	35
1.4.1.3. Policétidos poliéteres	35
1.4.2. Policétido sintetas: diversidad y contexto biosintético.....	35
1.4.2.1. Tipos de PKSs	38
1.4.2.2. Modificaciones post-PKS: funcionalización del policétido.....	40
1.4.3. Biosíntesis combinatoria: fuente de nuevos compuestos.....	42
1.5. Los macrólidos polienos.....	44
1.5.1. Características estructurales	44
1.5.2. Principales polienos.....	45
1.5.3. Modo de acción.....	47
1.5.4. Aplicaciones	49
1.5.5. La pimáricina: un modelo de polieno	49
1.5.5.1. Estructura y aplicación	50

1.5.5.2. Agrupación biosintética en <i>S. natalensis</i>	51
1.5.5.3. Biosíntesis de la pimaricina	52
1.5.5.4. Regulación de la producción de pimaricina en <i>S. natalensis</i>	54
1.6. <i>Streptomyces avermitilis</i> NRRL 8165: productor de filipina, un modelo de macrólido polieno no glicosilado	59
1.6.1. Características	59
1.6.2. Clusters biosintéticos de metabolitos secundarios	61
1.6.3. Regulación del metabolismo secundario	65
1.6.3.1. Regulación nutricional	65
1.6.3.2. Regulación por señales intercelulares	66
1.6.3.3. Reguladores pleiotrópicos	68
1.6.3.4. Reguladores específicos de ruta.....	69
1.6.4. <i>S. avermitilis</i> como hospedador para la expresión heteróloga de clusters biosintéticos	70
1.6.5. La filipina	71
1.6.5.1. Estructura y propiedades.....	71
1.6.5.2. Aplicaciones	72
1.6.5.3. Agrupación biosintética y biosíntesis de la filipina.....	72
1.6.5.4. Importancia de los polienos como la filipina	75
1.7. Objetivos	77
2. Materiales y Métodos	79
2.1. Cepas de microorganismos utilizadas	81
2.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	81
2.1.1.1. Conservación de cepas de <i>E. coli</i>	82
2.1.2. Cepas de <i>Streptomyces</i>	82
2.1.2.1. Conservación de cepas	82
2.1.2.2. Obtención de esporas	82
2.1.2.3. Cuantificación de esporas.....	83
2.1.3. Otros microorganismos	83
2.1.3.1. Conservación de <i>C. utilis</i>	83
2.2. Medios de cultivo	83
2.2.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	83
2.2.2. Medios de cultivo para <i>Streptomyces</i>	84
2.2.3. Otros medios de cultivo	85
2.2.4. Aditivos empleados en los medios de cultivo	85
2.2.4.1. Antibióticos	85
2.2.4.2. Otros aditivos.....	86
2.3. Crecimiento de los microorganismos	86
2.3.1. Crecimiento de <i>E. coli</i>	86
2.3.1.1. Estimación del crecimiento en cultivos líquidos.....	87
2.3.2. Crecimiento de <i>Streptomyces</i>	87
2.3.2.1. Estimación del crecimiento en cultivos líquidos.....	87
2.4. Vectores plasmídicos	87
2.5. Métodos de manipulación y análisis de DNA	89

2.5.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> (minipreparaciones)	89
2.5.10. Secuenciación del DNA	103
2.5.2. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> (lisis alcalina)	90
2.5.3. Aislamiento de DNA total de <i>Streptomyces</i> (<i>Salting out</i>)	91
2.5.4. Valoración de la concentración y pureza del DNA.....	92
2.5.5. Tratamiento enzimático del DNA	93
2.5.5.1. Digestión con endonucleasas de restricción.....	93
2.5.5.2. Modificación enzimática de extremos.....	94
2.5.5.3. Ligaciones	95
2.5.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	95
2.5.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	98
2.5.8. Recuperación de fragmentos de DNA separados en geles de agarosa.....	98
2.5.9. Hibridación de DNA transferido a una membrana (<i>Southern blot</i>).....	99
2.5.9.1. Transferencia a soportes sólidos	99
2.5.9.2. Marcaje de sondas de DNA.....	100
2.5.9.3. Hibridación DNA-DNA.....	101
2.6. Introducción de DNA en <i>E. coli</i>	104
2.6.1. Transformación.....	104
2.6.1.1. Inducción del estado de competencia	104
2.6.1.2. Transformación de células	105
2.6.2. Electroporación	105
2.6.2.1. Inducción del estado de electro-competencia.....	106
2.6.2.2. Electroporación de células	106
2.7. Introducción de DNA en <i>Streptomyces</i>	107
2.7.1. Conjugación intergenérica.....	107
2.8. Obtención de mutantes REDIRECT [®]	109
2.8.1. Purificación del casete de resistencia.....	109
2.8.2. Diseño de los <i>primers</i> para la obtención del producto de PCR	110
2.8.3. Amplificación por PCR del casete de resistencia	110
2.8.4. Introducción del cósmido de <i>Streptomyces</i> en la cepa de <i>E. coli</i> BW25113/pIJ790.....	110
2.8.5. Sustitución del gen de interés por el casete de resistencia en el cósmido	111
2.8.6. Transferencia del cósmido recombinante a <i>Streptomyces</i>	112
2.9. Métodos de manipulación y análisis de RNA.....	112
2.9.1. Purificación de RNA total de <i>Streptomyces</i>	113
2.9.2. Evaluación de la concentración, pureza e integridad del RNA	115
2.9.2.1. Concentración y pureza del RNA	115
2.9.2.2. Integridad del RNA.....	116
2.10. Estudio de la expresión génica	116
2.10.1 Análisis de la transcripción: RT-PCR a tiempo final	116
2.10.2. Análisis de la transcripción: RT-PCR a tiempo real	118
2.10.2.1. Retrotranscripción.....	119
2.10.2.2. PCR cuantitativa.....	120
2.10.2.3. Análisis de resultados.....	121
2.10.3. Determinación del inicio de transcripción mediante 5'-RACE.....	122

2.10.4. Micromatrices (<i>Microarrays</i>)	124
2.10.4.1. Chip de micromatrices.....	124
2.10.4.2. Marcaje de ácidos nucleicos.....	126
2.10.4.3. Hibridación de los ácidos nucleicos marcados con los <i>microarrays</i>	131
2.10.4.4. Lectura y cuantificación de la fluorescencia de los <i>microarrays</i>	133
2.10.4.5. Análisis estadístico	133
2.11. Métodos de manipulación de proteínas	135
2.11.1. Expresión heteróloga de proteínas	135
2.11.1.1. Inducción de la expresión de proteínas de fusión.....	135
2.11.1.2. Lisis celular.....	135
2.11.2. Purificación de proteínas de fusión	136
2.11.2.1. Cromatografía de afinidad	136
2.11.2.2. Concentración y conservación de las proteínas purificadas.....	136
2.11.3. Extracción de proteínas totales de <i>Streptomyces</i>	137
2.11.4. Cuantificación de proteínas	138
2.11.4.1. Método de Bradford	138
2.11.4.2. Otros métodos de cuantificación.....	139
2.11.5. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	139
2.12. Estudio de la interacción del DNA con proteínas	141
2.12.1. Ensayos de retraso en gel (EMSA)	141
2.12.2. Ensayos de protección frente a DNasa I (<i>Footprinting</i>)	143
2.12.2.1. Marcaje de la sonda de DNA con el fluoróforo 6FAM	144
2.12.2.2. Digestión con DNasa I	144
2.13. Estudios de proteómica mediante 2-D DIGE	145
2.13.1. Electroforesis bidimensional	146
2.13.1.1. Primera dimensión (IEF)	146
2.13.1.2. Segunda dimensión	148
2.13.2. Detección de proteínas	150
2.13.3. Escaneado y análisis de los geles	151
2.13.4. Digestión triptica de proteínas separadas mediante electroforesis 2-D PAGE	152
2.13.5. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	154
2.14. Métodos de producción, detección y cuantificación de metabolitos secundarios	156
2.14.1. Producción de metabolitos secundarios mediante fermentación en medio líquido	156
2.14.2. Valoración cualitativa de la producción de macrólidos	157
2.14.2.1. Bioensayo con <i>C. utilis</i>	157
2.14.3. Cuantificación de la producción de metabolitos secundarios	158
2.14.3.1. Extracción con solventes orgánicos	158
2.14.3.2. Cuantificación mediante HPLC	158
2.15. Recursos Bioinformáticos	159
3. Resultados y Discusión	161
3.1. Estudio de la cepa <i>S. avermitilis</i> NRRL 8165	163

3.1.1. Crecimiento	163
3.1.2. Producción de filipina.....	164
3.1.3. Manipulación genética	166
3.2. Análisis funcional de los reguladores del <i>cluster</i> biosintético de la filipina: PteF	166
3.2.1. Análisis de la secuencia	167
3.2.2. Construcción del mutante Δ <i>pteF</i>	168
3.2.3. La delección de <i>pteF</i> resulta en la disminución de la producción de filipina... 171	
3.2.4. Complementación del mutante <i>S. avermitilis</i> Δ <i>pteF</i>	172
3.2.4.1. Obtención de la cepa complementada <i>S. avermitilis</i> Δ <i>pteF</i> /pSETneo:: <i>pteF</i>	173
3.2.4.2. La complementación génica restaura la producción de filipina.....	174
3.2.5. Efecto de la complementación heteróloga del mutante <i>S. avermitilis</i> Δ <i>pteF</i> con el gen <i>pimM</i>	178
3.2.5. Efecto de la introducción de una copia adicional del gen <i>pteF</i>	175
3.2.6.1. Obtención de la construcción pSETneo:: <i>pimM</i>	178
3.2.6.2. La complementación heteróloga con PimM recupera la función de PteF.....	179
3.3. Análisis funcional de los reguladores del <i>cluster</i> biosintético de la filipina: PteR	180
3.3.1. Análisis de la secuencia	180
3.3.2. Construcción del mutante Δ <i>pteR</i>	181
3.3.3. La delección de <i>pteR</i> afecta a la producción de filipina.....	182
3.3.4. Complementación del mutante <i>S. avermitilis</i> Δ <i>pteR</i>	183
3.3.4.1. Obtención de la construcción /pSETneo:: <i>pteR</i>	183
3.3.4.2. La complementación génica restaura la producción de filipina.....	185
3.4. Efecto de la mutación Δ <i>pteF</i> sobre la diferenciación morfológica.....	187
3.5. Análisis de la expresión génica del <i>cluster</i> de la filipina.....	190
3.5.1. Organización transcripcional.....	190
3.5.2. Caracterización de los promotores.....	194
3.5.3. Análisis cuantitativo de la expresión de los genes <i>pte</i> en los mutantes.....	198
3.5.3.1. Expresión en el mutante Δ <i>pteF</i>	198
3.5.3.2. Expresión en el mutante Δ <i>pteR</i>	200
3.6. Identificación de las dianas moleculares de PteF/PimM en el <i>cluster pte</i>	201
3.6.1. Ensayos de retraso en gel con PimM ^{DBD}	203
3.6.2. <i>Footprintings</i>	207
3.7. Efecto global de PteF: análisis de las dianas moleculares existentes en el genoma de <i>S. avermitilis</i>	210
3.7.1. Búsqueda y análisis bioinformática	211
3.7.2. Validación de la búsqueda bioinformática	215
3.7.3 Prueba de concepto: análisis del efecto sobre la producción de oligomicina 222	
3.7.3.1. Análisis de la producción de oligomicina.....	222
3.7.3.2. Caracterización de los promotores de <i>olmA1</i> y <i>olmA2</i>	224
3.7.3.3. Análisis transcripcional del <i>cluster</i> biosintético de la oligomicina.....	225
3.8. Análisis transcripcional de los mutantes Δ <i>pteF</i> y Δ <i>pteR</i> mediante <i>microarrays</i>	230
3.8.1. Diseño experimental.....	230

3.8.2. Análisis estadístico de los resultados	232
3.8.2.1. Procesamiento de la información genética, metabolismo de aminoácidos y procesamiento de proteínas.....	235
3.8.2.10. Metabolismo secundario	242
3.8.2.2. Replicación, recombinación y reparación del DNA.....	236
3.8.2.3. Metabolismo de carbohidratos	236
3.8.2.4. Metabolismo de lípidos	237
3.8.2.5. Metabolismo de nucleótidos y metabolismo de vitaminas y cofactores	238
3.8.2.6. Fosforilación oxidativa y producción de energía	238
3.8.2.7. Transporte y procesamiento de señales externas.....	239
3.8.2.8. Regulación	240
3.8.2.9. Biosíntesis de la envuelta celular y diferenciación morfológica.....	241
3.8.3. Validación de los resultados mediante RT-qPCR	244
3.9. Estudios de proteómica de los mutantes $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$ mediante 2D-DIGE	249
3.9.1. Optimización de la purificación de proteínas intracelulares de <i>S. avermitilis</i>	249
3.9.2. Diseño experimental	254
3.9.3. Análisis estadístico del proteoma de las cepas mutantes	257
3.9.4. Identificación de proteínas diferencialmente sintetizadas	259
4. Visión global	266
5. Conclusiones	271
6. Bibliografía	274
7. Anexos	339
Anexo I. Listado de <i>primers</i>	341
Anexo II. Matriz de pesos para la búsqueda de sitios de unión de PteF/PimM.....	348
Anexo III. Listado de operadores de PteF en <i>S. avermitilis</i>	349
Anexo IV. Código en ‘R’ para el análisis estadístico de los datos de los <i>microarrays</i>	361
Anexo V. Tablas de genes cuya expresión es estadísticamente diferente	369
Anexo VI. Publicaciones.....	386

Abreviaturas

- 2-DE:** electrophoresis bidimensional
- 6-FAM:** 6-carboxifluoresceína
- A:** absorbancia
- aa:** aminoácidos
- AAA:** del inglés *ATPase associated with diverse cellular activities*
- ACP:** proteína transportadora de grupos acilo
- AHL:** acil-homoserina lactona
- AICE:** elementos integrativos y conjugativos de actinomicetos
- Amp:** ampicilina
- ANOVA:** *one-way analysis of variance*
- Apra:** apramicina
- APS:** persulfato amónico
- AT:** aciltransferasa
- bp:** del inglés, *base pairs* o pares de bases
- BrEt:** bromuro de etidio
- BSA:** albúmina sérica bovina
- BTAD:** del inglés, *bacterial transcriptional activator domain*
- BVA:** del inglés *Biological Variance Analysis*
- CHAPS:** (3-[3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfato)
- CIA:** cloroformo-alcohol isoamílico
- CLF:** factor de elongación de cadena
- Cm:** cloranfenicol
- CoA:** coenzima A
- CoAL:** acil coenzima A ligasa
- cpu:** unidades formadoras de colonias
- CTAB:** bromuro de cetiltrimetilamonio
- Da:** unidad de masa atómica (dalton)
- DEBS:** 6-desoxieritronólido B sintasa
- DH:** deshidratasa
- DIG:** digoxigenina
- DIGE:** del inglés *Difference Gel Electrophoresis*
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- DO:** densidad óptica
- DTT:** ditioneitol
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- EMSA:** ensayo de retraso en gel
- ER:** enoil reductasa
- FAS:** sintasa de ácidos grasos
- FDR:** del inglés *false discovery rate*
- FPLC:** cromatografía líquida rápida de proteínas
- GES:** genes estadísticamente significativos
- GRAS:** del inglés *generally regarded as safe*
- GST:** glutatión-S-transferasa
- HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia
- HTH:** hélice-vuelta-hélice
- IPTG:** 1-isopropil- β -D-galactopiranosido
- kb:** kilopares de bases
- Km:** kanamicina
- KR:** ceto-reductasa
- KS:** cetosintasa
- LAL:** proteína de gran tamaño de unión a ATP de la familia LuxR
- MALDI-TOF:** del inglés *matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight*
- Mb:** megapares de bases
- MCS:** del inglés *multiple cloning site*
- MES:** ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
- MOPS:** ácido morfolinopropanosulfónico
- mRNA:** RNA mensajero
- MS:** espectrometría de masas
- m/z:** relación masa/carga
- NRPS:** sintetasa de péptidos no ribosomales

nt: nucleótido

on: del inglés *over-night*

ORF: marco de lectura abierto

PAGE: electroforesis de proteínas en gel de acrilamida

PAS: dominio propio de las proteínas Per, ARTN y Sim

PCA: Principal Component Analysis

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: electroforesis en campo pulsante

Pi: fosfato inorgánico

pI: punto isoeléctrico

PI: factor inductor de la pimamicina

PKS: policétido sintasa

PMF: huella peptídica, del inglés *peptide mass fingerprinting*

POI: del inglés *proteins of interest*

ppGpp: 5'-difosfato 3'-difosfato

ppm: partes por millón

p/v: relación peso/volumen

qPCR: PCR cuantitativa

RACE: amplificación rápida de extremos de cDNA

RAPS: sintasa de rapamicina

RBS: sitio de unión al ribosoma

Rf: del inglés *ratio of front*

rpm: rotaciones por minuto

RIN: número de integridad del RNA

RT: temperatura ambiente

RT-PCR: PCR acoplada a retrotranscripción

RT-qPCR: PCR cuantitativa acoplada a retrotranscripción

SARP: del inglés *Streptomyces antibiotic regulatory protein*

SDS: dodecilsulfato sódico

TAE: tris-acetato-EDTA

TCA: ácido tricloroacético

TCA, ciclo: ciclo dos ácidos tricarboxílicos (del inglés, *tricarboxylic acids*)

TE: tioesterasa

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina

TIR: repeticiones invertidas terminales

Tm: temperatura de fusión

Tris: (hidroximetil)aminometano

TSP: del inglés *transcription start point*

UV: ultravioleta

Vh: voltios por hora

v/v: relación volumen/volumen

wt: cepa silvestre

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

1. INTRODUCCIÓN

“If you have to ask, you’ll never know.
But if you know, you need only ask”

J.K. Rowling

1.1. El género *Streptomyces*

1.1.1. Características generales

Streptomyces es un género del filo *Actinobacteria*, uno de los mayores filos dentro del dominio *Bacteria*, altamente robusto y diversificado. Este filo contiene bacterias Gram-positivas, poseedoras de genomas con un alto contenido en G+C, que puede variar entre un 41,5 % en *Gardnerella vaginalis* hasta de un 70 % en el género *Streptomyces* (Gao & Gupta 2012). Se piensa que esta característica puede ser una respuesta adaptativa frente a determinados bacteriófagos, al favorecer el uso de codones alternativos (Chater & Chandra 2006). También a nivel morfológico, fisiológico, ecológico y de patogenicidad existen importantes diferencias entre los miembros de este filo. Se pueden encontrar organismos fenotípicamente diversificados, desde aquellos con una sencilla organización celular como cocos simples (*Micrococcus*) o bacilos (*Arthrobacter*) hasta especies con formas hifales fragmentadas (*Nocardia*) o con micelios altamente diferenciados (*Streptomyces*). La mayoría de los miembros de este filo son saprófitos pero también existen patógenos de animales y plantas (*Mycobacterium*, *Streptomyces*), organismos que habitan en el medio terrestre o acuático (*Streptomyces*, *Rhodococcus*), simbiontes fijadores de nitrógeno (*Frankia*), comensales de plantas (*Leifsonia*) o incluso organismos que forman parte de la microbiota bacteriana intestinal del ser humano (*Bifidobacterium*) (Embley *et al.* 1994, Stach & Bull 2005, Ventura *et al.* 2007). La organización genómica encontrada en los miembros de este filo es otro reflejo de la variedad que éste abarca. Existen especies con cromosomas circulares o lineales (estos últimos sólo se encuentran en algunas especies de cuatro géneros, *Gordonibacter*, *Kineococcus*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*), y sus tamaños pueden oscilar entre 0,93 Mb (*Tophoery manhipplei*) y 12 Mb (*Streptomyces bingchenggensis*) (Gao & Gupta 2012).

La filogenética actual se basa, en gran medida, en el análisis de secuencias de nucleótidos de la subunidad pequeña del RNA ribosomal, en lugar de otras herramientas como datos fenotípicos (Garrity *et al.* 2005). Sin embargo las filogenias, como otras hipótesis experimentalmente derivadas, no son estáticas y pueden cambiar cuando quedan disponibles nuevos datos o métodos de análisis (Ludwig & Klenk 2005). Combinando la información de marcadores de rRNA y de proyectos de secuenciación de genomas completos, se ha actualizado la clasificación taxonómica del filo *Actinobacteria*, tal y como viene descrito en la nueva edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* publicada en 2012, que dedica íntegramente su quinto volumen a este filo (Figura 1.1). Así, en este

volumen del *Manual* este taxón incluye 6 clases, 22 órdenes, 53 familias y 222 géneros, y la clasificación taxonómica actual del género *Streptomyces* es la siguiente (Ludwig *et al.* 2012a,b):

Dominio Bacteria,

Filo XXVI. “*Actinobacteria*”

Clase I. “*Actinobacteria*”

Orden XIV. “*Streptomyces*”

Familia I. *Streptomycetaceae*

Género I. *Streptomyces*

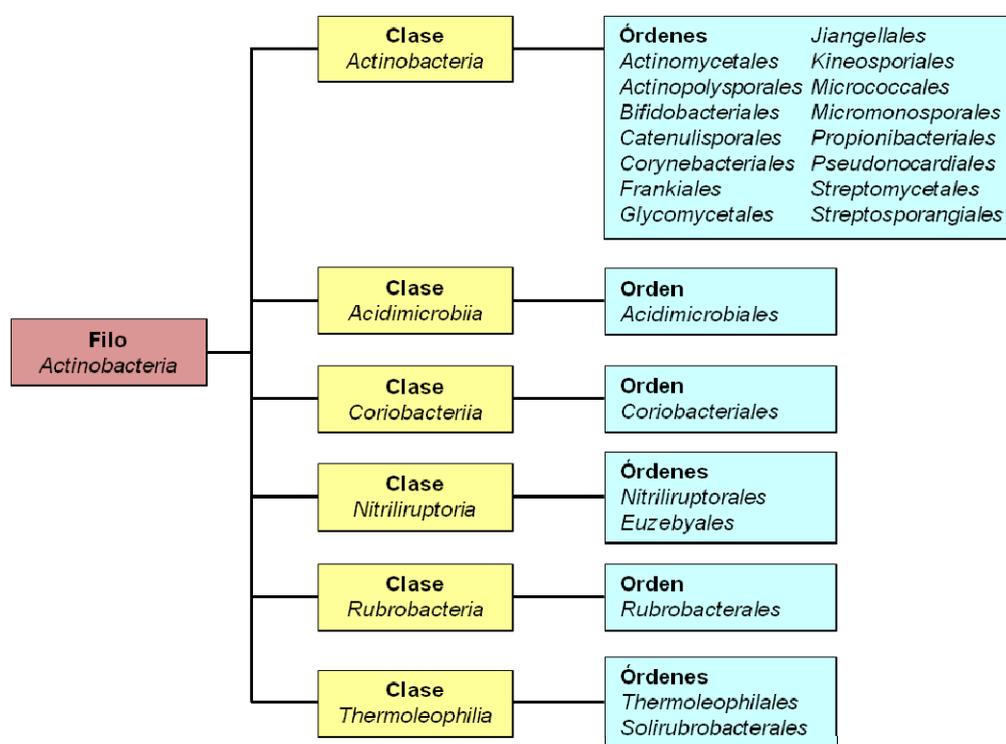


Figura 1.1. Clasificación taxonómica. Organización propuesta para *Actinobacteria* en el quinto volumen de la nueva edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (modificado de Gao & Gupta 2012).

El género *Streptomyces* se describe como un grupo de bacterias Gram-positivas aerobias estrictas, con crecimiento hifal diferenciado que da lugar a largas cadenas de esporas en un ciclo de vida complejo (Chater & Chandra 2006). Se caracterizan además por presentar una pared celular de tipo I, con ácido LL-diaminopimélico y glicina en la composición del peptidoglicano, y una membrana cuyo fosfolípido característico es la

fosfatidiletanolamina (Lechevalier 1989, Locci 1989). En cuanto a su adaptación a un ambiente rico en oxígeno, los miembros de este género cuentan con un gran número de genes y sistemas relacionados con la regulación del estrés oxidativo (Lee *et al.* 2005^a, Beites *et al.* 2011). Además, aunque se consideren por lo general aerobios estrictos, se han descrito *Streptomyces* que pueden crecer en anaerobiosis en determinadas condiciones (Kumon *et al.* 2002, van Keulen *et al.* 2003).

Se piensa que los estreptomicetos aparecieron por primera vez hace 440 millones de años, tiempo que coincide con la colonización del medio terrestre por parte de las plantas, por lo que parece probable que estas bacterias tuvieron un papel importante en la evolución del medio terrestre (Chater *et al.* 2010). De hecho, la gran mayoría de *Streptomyces* son saprófitos habitantes del suelo, cuya adaptación consiste en utilizar los restos orgánicos de vegetales, hongos, y otros organismos. Para ello disponen de un arsenal enzimático con propiedades hidrolíticas extracelulares que les permite obtener nutrientes. Enzimas hidrolíticas de la celulosa, xilosa y quitina (celulasas, xilanasas y quitinasas, respectivamente) constituyen un ejemplo de esta notable capacidad (Chater *et al.* 2010). Sin embargo existen otras alternativas a este modo de vida saprófito. La diversidad de su metabolismo permite a estos microorganismos colonizar diferentes hábitats y se pueden encontrar *Streptomyces* en sedimentos de medios acuáticos (e.g. *Streptomyces indicus* (Luo *et al.* 2011)), como patógenos de plantas (e.g. *Streptomyces scabies* (Lerat *et al.* 2009)) y de humanos (e.g. *Streptomyces sudanensis* y *Streptomyces somaliensis* (Quintana *et al.* 2008, Kirby *et al.* 2012)), e incluso en relaciones simbióticas con insectos (e.g. *Streptomyces* sp. (Kaltenpoth 2009)).

Otra característica interesante de *Streptomyces*, y probablemente la más notoria, es su capacidad para producir un amplio abanico de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas. En la naturaleza, estos compuestos confieren una ventaja adaptativa a los microorganismos productores sobre otros que comparten el mismo hábitat. Muchos de estos metabolitos tienen aplicaciones terapéuticas, con una sorprendente variedad de inhibidores químicamente distintos para muchos procesos celulares como sean antibióticos, inmunosupresores o anti-cancerígenos, entre otros.

En la última edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* se describen un total de 533 especies pertenecientes a este género.

1.1.2. Características genéticas

1.1.2.1 Estructura y organización del cromosoma

Las especies del género *Streptomyces* presentan un cromosoma lineal cuyo tamaño puede variar entre 6 y 12 Mb, los más grandes que se conocen dentro del dominio Bacteria (Ventura *et al.* 2007) (Tabla 1.1). Esta característica no es exclusiva de este género ya que existen otras actinobacterias que también presentan cromosomas lineales (Gao & Gupta 2012). Sin embargo la relación filogenética entre la estructura del clado y la presencia de cromosomas lineales no es clara, lo que sugiere la hipótesis de que la linealidad es un acontecimiento tardío y que su origen dentro de las actinobacterias ha ocurrido probablemente varias veces, incluso dentro del mismo género *Streptomyces*. Este grupo habría divergido de un ancestro común de los actinomicetos, adquiriendo un cromosoma lineal como resultado de procesos de recombinación homóloga, transposición y translocación de plásmidos (Chen *et al.* 2002, Volff & Altenbuchner 2000). Existen dos hallazgos que apoyan la hipótesis de más de un evento de linealización: los brazos del cromosoma lineal son asimétricos y existen dos estructuras diferentes de repeticiones terminales, una estándar presente en *Streptomyces coelicolor* que puede representar la linealización original y otra diferente como la que se encuentra en *Streptomyces griseus* que puede representar eventos más recientes de linealización. La existencia de dos estructuras terminales respalda la idea de que un cromosoma lineal puede ser ventajoso cuando se trata de un cromosoma grande y con un alto contenido G+C. Además, con la excepción de *Saccharopolyspora erythraea* y *Streptosporangium roseum*, la linealidad cromosomal parece estar asociada al tamaño del cromosoma (en su mayoría superior a 6,5 Mb), pudiendo constituir una ventaja selectiva, permitiendo la formación de cromosomas más grandes y con ello la incorporación de nuevos genes (Kirby 2011). El primer cromosoma lineal descrito dentro del género fue el de *Streptomyces lividans* 66, utilizando la técnica de electroforesis en campo pulsante (PFGE) (Lin *et al.* 1993), y posteriormente otras seis especies, entre ellas *Streptomyces coelicolor* A3(2), fueron analizadas confirmándose así que la linealidad cromosómica es una característica común a todo el género (Kirby 2011).

El origen de replicación (*oriC*) de este cromosoma lineal está localizado en el centro de la molécula y constituye el único punto a partir del cual ocurre la replicación bidireccional del DNA (Chang & Cohen 1994, Musialowski *et al.* 1994). Los extremos 5' del cromosoma presentan proteínas unidas covalentemente denominadas proteínas Tpg (Bao & Cohen 2001), que funcionan como *primers* para la DNA polimerasa en la síntesis del

último fragmento de Okazaki, en una función análoga a la de los telómeros de los cromosomas eucarióticos que evitan el acortamiento del cromosoma (Chen 1996). Además, a los extremos 3' se une la proteína Tag, reconociendo secuencias específicas, la cual es responsable por reclutar las proteínas Tpg para los intermediarios de replicación (Bao & Cohen 2003). Estos extremos del cromosoma se componen de secuencias repetidas e invertidas denominadas TIR (del inglés, *terminal inverted repeats*), de tamaño variable según la especie (24 a 600 kb), y en cuyas proximidades aparecen numerosas repeticiones directas, inserciones y elementos transponibles (Kieser *et al.* 2000). Se piensa que todos estos elementos estructurales pueden ser responsables de la elevada inestabilidad genética presentada por algunas especies del género (Volff & Altenbuchner 1998).

Tabla 1.1. Comparación de genomas de algunas especies de *Streptomyces* y otras actinobacterias.

Organismo	Tamaño (Mb)	% G+C	Genes	Proteínas	Numero de acceso	Año
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	8,67	72,1	7910	7767	NC_003888.3	2002
<i>S. avermitilis</i> MA-4680	9,03	70,7	7669	7574	NC_003155.4	2003
<i>S. griseus</i> NBRC 13350	8,55	72,2	7224	7136	NC_010572.1	2008
<i>S. scabiei</i> 87.22	10,15	71,5	8901	8746	NC_013929.1	2009
<i>S. bingchenggensis</i> BCW-1	11,94	70,8	10107	10022	NC_016582.1	2010
<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	9,13	72,4	7266	7155	NZ_CM001015.1	2010
<i>S. violaceusniger</i> Tü 4113	10,66	71,0	9062	8482	NC_015957.1	2011
<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	8,23	72,4	7536	7448	NC_018750.1	2011
<i>S. albus</i> J1074	6,84	73,3	5937	5832	NC_020990.1	2013
<i>S. glaucescens</i> GLA.O	7,45	73,0	6490	6398	CP_009438.1	2014
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	4,41	65,6	4008	3906	NC_000962.3	2001
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	3,28	53,8	3057	2959	NC_006958.1	2004

El primer genoma de un estreptomiceto al ser completamente secuenciado fue el de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.* 2002), el organismo modelo para el género, y

seguidamente se secuenció el genoma de otro organismo de interés industrial, *S. avermitilis* (Ikeda *et al.* 2003). Actualmente existen 33 genomas de especies de *Streptomyces* completamente secuenciados y anotados, según la base de datos GOLD (*Genomes Online Database*). El desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación como la pirosecuenciación (Ronaghi *et al.* 1996), así como de análisis y anotación automática de secuencias como el RAST (Aziz *et al.* 2008), han permitido agilizar todo el proceso así que es de esperar que el número de genomas secuenciados siga aumentando y de manera exponencial.

Típicamente los cromosomas de *Streptomyces* spp. son anormalmente grandes, con un tamaño medio de 8 Mb y que varía en función de la especie, llegando incluso a duplicar en tamaño a los cromosomas de otras actinobacterias (Tabla 1.1). El cromosoma de *S. coelicolor* A3(2) tiene 8,7 Mb, con 7910 marcos de lectura y 7767 posibles proteínas, y un contenido en G+C de 72 % (Bentley *et al.* 2002). Debido al elevado contenido en guanina y citosina, que puede oscilar entre el 68 % y el 74 %, las especies de este género utilizan preferentemente codones que contienen estos nucleótidos en la tercera posición y por ello los codones TTA (leucina), CTA (leucina) y TTT (fenilalanina) raramente se encuentran (Wright & Bibb 1992).

El análisis de la organización genómica en *Streptomyces* muestra que los genes relacionados con el metabolismo primario se encuentran agrupados en la región central del cromosoma (el núcleo del cromosoma, de 4 a 6 Mb), y que los extremos del mismo contienen los genes involucrados en las respuestas adaptativas al hábitat, incluyendo los genes responsables por la biosíntesis de metabolitos secundarios (Bentley *et al.* 2002, Ikeda *et al.* 2003, Hopwood 2006). Además, la comparación con los genomas de otras actinobacterias revela un alto grado de sintenia en la región central del cromosoma, mientras que en los extremos del cromosoma son frecuentes los genes con baja similitud con otros genes de actinobacterias (Bentley *et al.* 2002, Chen *et al.* 2002, Ikeda *et al.* 2003).

El estudio de los genomas secuenciados de *Streptomyces* ha demostrado que los genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, localizados en los extremos del cromosoma, están casi siempre organizados en agrupaciones génicas o *clusters* (Aparicio *et al.* 1999, 2000), aunque éste no es un tipo de organización exclusivo de las actinobacterias, pudiéndose también encontrar por ejemplo en *Bacillus* spp. (Altena *et al.* 2000). Cada genoma de *Streptomyces* tiene de media 20 agrupaciones génicas capaces de producir diferentes moléculas, si bien muchas de ellas se consideran crípticas y no se expresan en condiciones normales de laboratorio (Challis 2008). La presencia de estas agrupaciones

génicas crípticas ha suscitado mucho interés en la comunidad científica, dado que multiplica las posibilidades de encontrar nuevos productos de interés farmacéutico utilizando como herramienta las búsquedas genómicas (Corre *et al.* 2008, Medema *et al.* 2010, Aigle *et al.* 2014).

1.1.2.2. Elementos extracromosomales

Es habitual encontrar elementos extracromosomales en especies de *Streptomyces*, siendo los **plásmidos** los más usuales. Se trata de plásmidos lineales o circulares con un contenido en G+C similar al del cromosoma y cuyo tamaño oscila entre 10 kb y 1,8 Mb (Kieser *et al.* 2000, Medema *et al.* 2010). Poseen un origen de replicación propio que es reconocido por la maquinaria que se encuentra codificada en el plásmido, de modo que la replicación plasmídica es independiente de la cromosomal aunque se desarrolla de manera análoga en el caso de los plásmidos lineales (Chang & Cohen 1994). En la mayoría de los casos estos plásmidos poseen además los elementos necesarios para su transferencia en procesos de conjugación inter e intraespecífica (Kieser *et al.* 2000). Aunque no es muy frecuente, pueden contener agrupaciones biosintéticas como sucede en el caso del pSCP1 de *S. coelicolor*, que contiene los genes necesarios para la síntesis de la metilnomicina y la resistencia a la misma (Kirby & Hopwood 1977, Bentley *et al.* 2004), y con el megaplásmido pSCL4 (1,8 Mb) de *S. clavurigerus*, que constituye un reservorio inmenso de información genética exclusivamente relacionada con la síntesis de múltiples compuestos (Medema *et al.* 2010). Por su carácter transferidor de información genética con el cromosoma, los plásmidos lineales parecen haber tenido un papel importante en la rápida evolución del metabolismo secundario que presenta el género *Streptomyces* (Kinashi 2011). Se ha demostrado además que los plásmidos lineales pueden ser transferidos entre especies de *Streptomyces* y que desempeñan un papel importante en la transferencia de genes entre estreptomicetos en su hábitat (Ravel *et al.* 2000). En el caso de los plásmidos circulares, éstos se pueden dividir en dos grupos. Existen aquellos que son no integrativos, que utilizan el sistema del círculo rodante (sistema sigma) o el sistema “theta” para la replicación y normalmente su número de copias es inversamente proporcional a su tamaño, y también plásmidos integrativos, que se pueden integrar en el cromosoma de la célula replicándose junto a él pero que conservan la capacidad de transferencia independiente a otra cepa sin plásmido (Kieser *et al.* 2000). La integración es específica de sitio y ocurre en genes que codifican un tRNA altamente conservado (Mazodier *et al.* 1990). El plásmido se

integra en el cromosoma mediante la recombinación del sitio específico *attB* del cromosoma con el sitio *attP* del plásmido.

Otro ejemplo de elementos extracromosomales ampliamente difundidos son los **AICE** (del inglés, *actinomycete integrative and conjugative elements*). Estos elementos genéticos tienen características intermedias entre los bacteriófagos y los plásmidos. Los AICE son integrativos específicos de sitio y se replican juntamente con el cromosoma de la cepa hospedadora, persistiendo a lo largo de generaciones hasta que en presencia de ciertos estímulos son capaces de excindirse, se transfieren mediante conjugación a una cepa diferente y se integran nuevamente en el cromosoma mediante recombinación específica de sitio en genes que codifican un tRNA. Sin embargo, son también capaces de una replicación autónoma semejante a la de un plásmido (te Poole *et al.* 2008a,b).

Además de los plásmidos, se han descubierto numerosos **transposones** y **bacteriófagos** en *Streptomyces*. Existen transposones integrativos específicos de sitio así como elementos capaces de integrarse al azar en el genoma aunque ninguno posee un marcador de selección natural. Con respecto a los fagos, se ha descrito un gran número en especies de *Streptomyces*, tanto líticos como atemperados y con un rango de cepas hospedadoras variado, pero todos ellos presentan DNA de doble cadena. Estos elementos genéticos, junto con los plásmidos, han sido determinantes para la obtención de elementos transponibles empleados en técnicas de mutagénesis aleatoria, así como de vectores que permiten la manipulación genética de estos microorganismos (Baltz *et al.* 1997, Kieser *et al.* 2000).

1.1.2.3. Inestabilidad genética

Cuando se cultivan cepas silvestres de *Streptomyces* en laboratorio es habitual encontrar mutantes, con una frecuencia tan alta como el 0,1 % de las esporas viables producidas. Este fenómeno de inestabilidad genética puede afectar diferentes propiedades fenotípicas, muchas veces de manera pleiotrópica, y es uno de los rasgos característicos del género (Leblond & Decaris 1994, Dharmalingam & Cullum 1996).

Inicialmente se creía que la linealidad del cromosoma era el factor responsable de la inestabilidad genética, pero más tarde se verificó que cromosomas circulares derivados a partir de la unión de los extremos de una forma lineal previa por procesos de recombinación o deleción (ya sean espontáneos naturales o construidos en el laboratorio, donde las regiones terminales son dispensables por no contener genes esenciales) son aún

más inestables (Lin *et al.* 1993, Volff *et al.* 1997). Sin embargo, la inestabilidad sí está normalmente asociada con la reorganización (delecciones y ampliaciones de DNA) a gran escala que ocurre en los extremos del cromosoma (hasta 2 Mb). Las delecciones son casi siempre responsables de los fenotipos mutantes que surgen por la inestabilidad genética. Esto sugiere que la región inestable del cromosoma de *Streptomyces* incluye el extremo de replicación y que la inestabilidad cromosomal está relacionada con el proceso de replicación (Leblond & Decaris 1994).

Las dos características principales de los cromosomas de *Streptomyces*, la linealidad y la inestabilidad genética, pueden ser la explicación a la diversidad del género. Cromosomas lineales permiten la transferencia de grandes segmentos de material genético a través de eventos de recombinación homóloga simples con plásmidos lineales conjugativos y, a pesar de que muchas de las reorganizaciones que ocurren frecuentemente en el genoma son neutras o desfavorables, la inestabilidad genética tiene un potencial enorme para haber creado la gran diversidad de cepas y metabolitos secundarios que se encuentran hoy en día, y puede haber constituido una estrategia importante para propocionar respuestas adaptativas a los cambios en el hábitat (Fischer *et al.* 1997, Volff & Altenbuchner 1998).

1.1.3. Ciclo de vida

Las bacterias del género *Streptomyces* presentan un ciclo de vida característicamente complejo, especialmente cuando se compara con el de otros procariontes. A lo largo del ciclo de vida se observan varias estructuras diferenciadas, combinándose fases de crecimiento micelial y de diferenciación con la formación de esporas (Figura 1.2).

En condiciones ambientales favorables, el ciclo se inicia con la germinación de una spora. Con la energía obtenida a partir de la degradación de las reservas de carbohidratos endógenas de la spora (casi el 12 % de su peso seco), mayoritariamente el disacárido trehalosa, uno o dos tubos germinativos empiezan a desarrollarse con crecimiento apical, formando hifas multigenómicas y escasamente septadas. Las hifas se ramifican y penetran en el sustrato para la obtención de nutrientes que transforman en biomasa de manera eficaz (McBride & Ensign 1987). Este crecimiento vegetativo da origen a un entramado de hifas ramificadas denominado **micelio vegetativo** o sustrato. Tras el agotamiento de los nutrientes disponibles en medio, el micelio vegetativo sufre una diferenciación morfológica y comienzan a formarse hifas menos ramificadas que crecen hacia el aire y sobre el micelio vegetativo de una manera casi parasítica, utilizando los nutrientes procedentes de procesos

de muerte celular controlada en el mismo (Méndez *et al.* 1985), dando lugar así al **micelio aéreo**. Este micelio típicamente blanco y con propiedades hidrófobas, está formado por largas hifas aseptadas multigenómicas (de hasta 100 μm de tamaño y decenas de copias del genoma). La diferenciación morfológica ocurre de manera coordinada con la diferenciación fisiológica, i.e. producción de metabolitos secundarios. Las cascadas reguladoras que controlan ambos procesos de diferenciación comparten muchos componentes, por lo que las diferenciaciones morfológica y fisiológica constituyen una respuesta coordinada (Chater & Horinouchi 2003, Chater & Chandra 2006, Claessen *et al.* 2006). Cuando finaliza la elongación del micelio aéreo, ocurre un proceso de septación sincronizada creándose compartimentos unigenómicos que dan lugar a esporas típicamente hidrófobas, inmóviles y pigmentadas, poco resistentes al calor pero bien adaptadas a condiciones de sequedad y la dispersión por medio del viento, agua o via animales (Chater & Losick 1997). Estas esporas, habitualmente abundantes en el suelo y que pueden permanecer viables durante largos periodos de tiempo, tienen la capacidad de reiniciar el ciclo de vida.

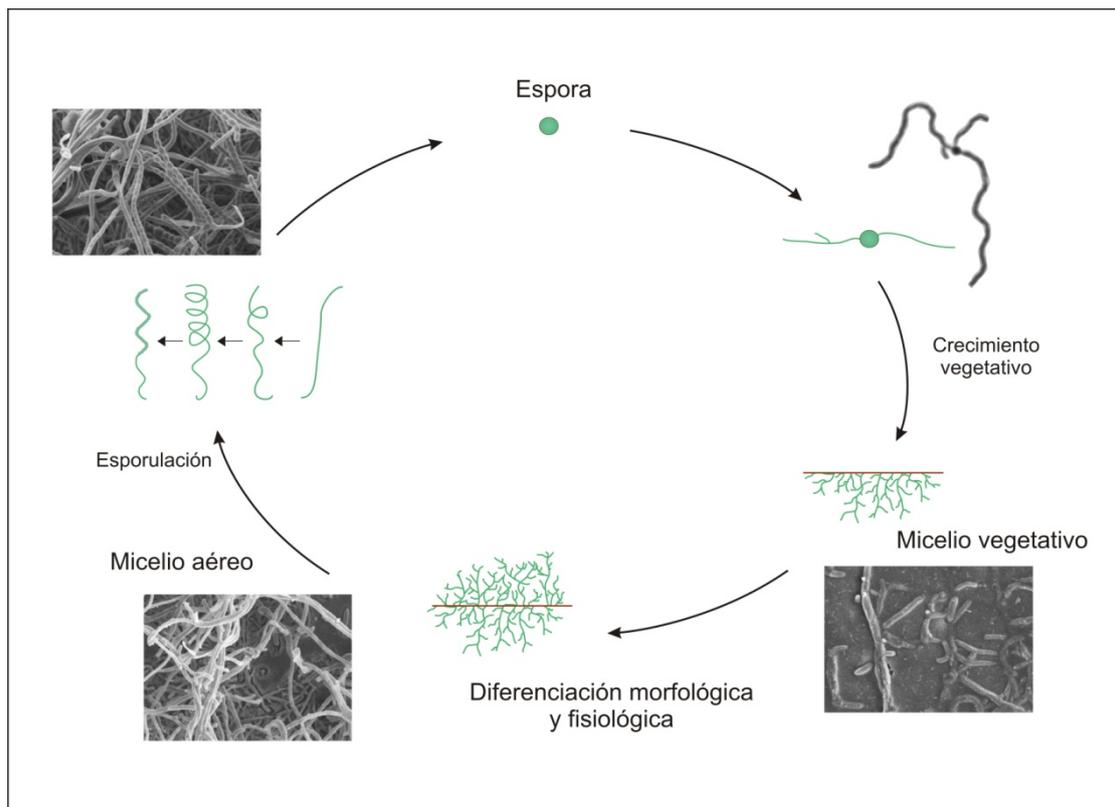


Figura 1.2. Ciclo de vida de *Streptomyces*. Esquema modificado de Angert 2005. Imágenes de microscopía de Claessen *et al.* 2006 y Hopwood 2006.

1.1.3.1. Coordinación entre la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario

A lo largo de varias décadas, el estudio de la genética del género *Streptomyces* ha permitido identificar un gran número de mutaciones puntuales que resultan en fenotipos morfológicos diferentes de la cepa silvestre, casi siempre relacionadas con la diferenciación morfológica y la esporulación (Hopwood 2007). En *S. coelicolor* los dos principales fenotipos que han permitido identificar dichas mutaciones son el “*bald*” y el “*white*”.

El fenotipo “*bald*” (mutantes ***bld***) se caracteriza por una parada del crecimiento en la fase de micelio vegetativo, y la ausencia de micelio aéreo da a las colonias un aspecto “calvo” (Hopwood 1967, Merrick 1976). Este fenotipo está casi siempre asociado a la pérdida de producción de metabolitos secundarios. Los genes *bld* fueron los primeros *loci* estudiados que causan este fenotipo y establecen una única cascada de señales extracelulares (Merrick 1976, Champness 1988). Sin embargo, otros genes se han demostrado también esenciales para la correcta formación del micelio aéreo: los genes *ram* y *chp*, que son inducidos por la cascada *bld*, y los genes *rdl*. El operón de los genes *ramCSAB* juntamente con el regulador transcripcional positivo *ramR*, resultan en la síntesis y secreción de SapB, un surfactante importante que ayuda a la elevación de las hifas del micelio aéreo (Keijser *et al.* 2002). Los genes *chp* llevan a la síntesis de chaplinas, una familia de proteínas estructurales hidrófobas que confieren hidrofobicidad al micelio aéreo y a las esporas (Claessen *et al.* 2003, Elliot *et al.* 2003). Los genes *rdl* son responsables de la síntesis de las rodlinas, también ellas proteínas hidrófobas que cubren el micelio aéreo y las esporas (Claessen *et al.* 2002).

Un gen *bld* que desempeña un papel importante en la cascada reguladora que desencadena la formación de micelio aéreo es el gen *bldA* (Piret & Chater 1985). Éste codifica el único tRNA existente en el genoma de los *Streptomyces* capaz de reconocer el codón TTA (leucina). Se estima que dada la elevada proporción G+C del genoma, apenas el 2-3 % de los genes de *Streptomyces* contienen el codón TTA aunque sorprendentemente la mayoría de ellos están involucrados en la diferenciación morfológica y metabolismo secundario (Leskiw *et al.* 1991, Chandra & Chater 2008). Sólo se ha descrito un caso en el que *bldA* no afecta la expresión de un gen que contiene el codón TTA: el regulador positivo específico de ruta *ccaR* (Pérez-Llarena *et al.* 1997) para ambos metabolitos cefamicina C y ácido clavulánico en *S. clavurigerus*. El mRNA de este gen contiene un codón UUA pero sorprendentemente el mutante en *bldA* no tiene afectada la producción de estos dos metabolitos, a pesar de que sí presenta el fenotipo típico con ausencia de esporulación

(Trepanier *et al.* 2002). Se sugiere que esto se debe a una traducción errónea del mRNA de *ccaR*, en las condiciones de fermentación probadas.

En el fenotipo “*white*” (mutantes *whi*) las células son deficientes en la producción de esporas maduras en el micelio aéreo, por lo que las colonias no llegan a adquirir el color típico de las esporas y mantienen el aspecto “blanco” del micelio aéreo (Hopwood *et al.* 1970, Chater 1972). Estos genes codifican proteínas reguladoras que actúan en diferentes fases de la formación de esporas y, después de los inicialmente estudiados *whiA,B,D,E,G,H,I*, se han identificado otros genes *whi* haciendo un total de 13 *loci* (Ryding *et al.* 1999). Una de las interacciones mejor estudiadas ocurre entre los genes *whiH,I* y *whiG*, que codifica un factor σ que forma parte de una holoenzima de RNA polimerasa y sin el cual no es posible el correcto reconocimiento y transcripción a partir de los promotores de los genes *whiH* y *whiI*. La única interacción directa de genes que se conoce entre las cascadas *bld* y *whi* es la represión de *whiG* por BldD (Elliot *et al.* 2001).

1.2. Metabolismo secundario en *Streptomyces*

Se pueden diferenciar dos tipos de metabolismo que ocurren durante el ciclo biológico de *Streptomyces*, el metabolismo primario y el secundario. Se define el **metabolismo primario** como el conjunto de reacciones anabólicas y catabólicas que aseguran el mantenimiento de los procesos vitales de la célula y el incremento de la biomasa total (Turner 1973), y es común a todas las células vivas. El **metabolismo secundario** se define como el conjunto de rutas anabólicas que no son vitales para la célula pero que le confieren ciertas ventajas ecológicas en su hábitat natural, siendo estas rutas específicas de cada cepa y que llevan a la producción de compuestos con estructuras químicas diversas, inusuales y muchas veces complejas. Sin embargo estas definiciones son simplistas y la separación no es tan clara, dado que los metabolismos primario y secundario están íntimamente relacionados. De hecho, todos los metabolitos secundarios derivan de metabolitos primarios o intermediarios de los mismos, y existen compuestos difíciles de clasificar como metabolitos secundarios, e.g. las γ -butirolactonas, o los sideróforos que parecen importantes para el crecimiento y desarrollo de la célula durante el crecimiento vegetativo.

En condiciones de laboratorio, la producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces* ocurre de manera dependiente de la fase de crecimiento del cultivo. Así, en medio sólido el inicio del metabolismo secundario coincide con la diferenciación

morfológica a micelio aéreo, mientras que en cultivos líquidos (donde sólo algunas cepas son capaces de esporular regularmente, como *S. griseus*, *S. venezuelae* o *S. brasiliensis* (Daza *et al.* 1989, Novella *et al.* 1992, Rueda *et al.* 2001)) la biosíntesis de metabolitos secundarios empieza en la transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria (Bibb 2005). En estas condiciones, se ha descrito que la diferenciación fisiológica ocurre después de una ronda de crecimiento rápido RG1 (del inglés, *first round of rapid growth*), con una parada en el crecimiento acompañada del cambio de metabolismo primario a secundario, siguiéndose otra ronda de crecimiento rápido RG2 (Novotna *et al.* 2003). Este cambio en el tipo de metabolismo se desencadena con el agotamiento de los nutrientes, por lo que se asemeja a los mecanismos que llevan a la formación del micelio aéreo. Estudios recientes sobre el desarrollo del micelio de *S. coelicolor* en cultivos líquidos han evidenciado que en estas condiciones también ocurre una diferenciación morfológica con el cambio de metabolismo (Manteca *et al.* 2008). Durante la primera ronda de crecimiento se desarrolla un micelio joven altamente septado que crece con un patrón radial formándose agregados de células, denominado micelio primario (MI). Entonces se instalan mecanismos de muerte celular programada en el centro de los agregados, lo que desencadena la formación de un micelio multigenómico no compartimentalizado a partir de las células de la periferia denominado micelio segundo (MII), con la capacidad de producir metabolitos secundarios (Manteca *et al.* 2008).

El gran interés que suscitan las actinobacterias, en especial el género *Streptomyces*, radica en su capacidad para producir una inmensa variedad de metabolitos secundarios. Dado que muchos de ellos tienen aplicaciones de gran importancia, desde un punto de vista antropocéntrico los estreptomicetos se consideran fábricas farmacéuticas microscópicas. De hecho, los actinomicetos son responsables de la producción de más de dos tercios de los compuestos con actividad biológica conocidos actualmente, y de éstos los miembros del género *Streptomyces* representan el 70-80 %. (Challis & Hopwood 2003). Las actividades biológicas de estos compuestos varían bastante y pueden ser antibióticos, antitumorales, antivirales, moduladores de la respuesta inmune y antiparasitarios, además de presentar otras aplicaciones como efectores de crecimiento vegetal, herbicidas, insecticidas, o como pigmentos. Estos microorganismos poseen una versatilidad metabólica enorme, por lo que es de suponer que aún queden muchos nuevos compuestos bioactivos por descubrir. Un análisis estadístico del descubrimiento de antibióticos predice que las bacterias del género *Streptomyces* pueden tener la capacidad de producir hasta 10^5 metabolitos secundarios, de los cuales sólo se conoce un 3 % (Watve *et al.* 2001).

Aunque las ventajas clínicas de los metabolitos secundarios son indiscutibles, particularmente las de los antibióticos, en la naturaleza pocas veces se ha podido comprobar su efecto de manera convincente (Turpin *et al.* 1992). Pese a ello, la posibilidad de que los metabolitos secundarios sean elementos neutros en la evolución o meros productos de desecho no es plausible. El sentido adaptativo de estos compuestos está patente en la clara determinación genética compleja para su biosíntesis y en la adaptación notable de muchas clases de compuestos para interactuar con sus dianas (Williams *et al.* 1989). Los *Streptomyces* son en su mayoría habitantes del suelo, un ambiente repleto de condiciones estresantes (químicas, físicas y biológicas) de naturaleza cambiante, a las que estos microorganismos tienen que enfrentarse por ser inmóviles, por lo que una respuesta posible estaría en el gran número de genes que permiten funciones adaptativas condicionales (e.g. el uso de fuentes de carbono complejas alternativas, como la celulosa y quitina) y que se encuentran en los extremos del cromosoma (Challis & Hopwood 2003).

Las agrupaciones génicas responsables de la síntesis de metabolitos secundarios también se encuentran en los extremos del cromosoma y en algunos casos como en *S. avermitilis* constituyen más del 6 % del genoma (Ikeda *et al.* 2003). La verdad es que el verdadero papel de estos compuestos en la naturaleza es aún una pregunta sin respuesta definitiva. Estudios recientes demuestran que las concentraciones de antibióticos que se alcanzan en el suelo están muy por debajo de aquellas necesarias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, y podrían actuar más bien modulando la transcripción en otras bacterias o como moléculas señaladoras, siendo quizá la acción antibiótica que observamos fruto de una concentración extraordinariamente alta de esas señales, i.e. artificial (Linares *et al.* 2006, Yim *et al.* 2007, Clardy *et al.* 2009). En este sentido, por ejemplo, se han descrito sideróforos capaces de ser utilizados por cepas distintas a la productora, y otros incluso necesarios para otras bacterias de la comunidad (Challis & Hopwood 2003, D'Onofrio *et al.* 2010), antibióticos que participan en relaciones simbióticas con insectos (Clardy *et al.* 2009, Haeder *et al.* 2009, Kroiss *et al.* 2010), además de las antes mencionadas funciones de antibióticos como reguladores del desarrollo y en la comunicación inter e intra-celular (Chater *et al.* 2010). Así mismo, la amplia presencia de genes de resistencia a antibióticos en bacterias de las comunidades microbianas naturales, donde ya se ha visto que no existen concentraciones letales de antibióticos para ejercer presión selectiva, apunta hacia otras funciones añadidas para estas mismas moléculas (Aminov 2009).

A pesar de que el metabolismo secundario está presente en todo el género *Streptomyces*, las rutas biosintéticas son específicas de cada cepa. Esto se traduce en compuestos con una amplia variedad de estructuras químicas como macrólidos, beta-lactámicos, aminoglicósidos, antraciclinas, quinonas, oligopéptidos, tetraciclinas, poliéteres, y nucleósidos, entre otros.

Los genes responsables de la biosíntesis de un determinado metabolito secundario aparecen normalmente contiguos en el genoma, organizados en agrupaciones génicas o *clusters*. Este tipo de organización no es exclusiva de *Streptomyces*, sino que constituye la forma típica en que estos genes aparecen, desarrollada a lo largo de los procesos de evolución (Liras & Martín 2006). En algunos casos, además de los genes biosintéticos, forman parte de estos *clusters* los genes que codifican proteínas implicadas en el transporte del metabolito, genes de regulación de la expresión, y genes que confieren resistencia al microorganismo productor, de ser necesarios, y pueden llegar a alcanzar los 100 kb de tamaño (Schwecke *et al.* 1995, Bentley *et al.* 2002, 2004; Ikeda *et al.* 2003). Esta organización ha facilitado enormemente el estudio de la genética que controla la producción de metabolitos secundarios y ayudado en la identificación y búsqueda de nuevos compuestos.

1.3. Regulación del metabolismo secundario

En *Streptomyces*, el control de la producción de metabolitos secundarios está íntimamente relacionado con la fase de crecimiento y en él participan numerosas señales internas y externas. Mientras que el metabolismo primario se desarrolla en la fase de crecimiento exponencial, el inicio del metabolismo secundario coincide con la disminución de la tasa de crecimiento en la fase estacionaria (Granozzi *et al.* 1990, Novotna *et al.* 2003).

Los numerosos mecanismos implicados en la regulación actúan a varios niveles y para integrar toda esa información, tanto en el desarrollo como en el metabolismo secundario, es necesaria una compleja red de sistemas reguladores (Figura 1.3). Tradicionalmente, se considera que funcionalmente las cascadas de regulación están organizadas de manera jerárquica. En los niveles más elevados están los reguladores globales o pleiotrópicos que controlan simultáneamente el desarrollo y el metabolismo secundario (lo que explica la coordinación entre estos procesos), mientras que en la base de la jerarquía están los reguladores responsables de una regulación más concreta o específica, como la producción de un metabolito secundario en particular. Sin embargo, la regulación es un proceso flexible, con relaciones y límites difusos, por lo que este modelo jerárquico

no siempre se ajusta a la realidad. Muchas veces los niveles cambian de posición, tanto verticalmente, i.e. del nivel específico de ruta hacia el pleiotrópico (Huang *et al.* 2005), como horizontalmente, i.e. regulación cruzada entre diferentes reguladores pleiotrópicos (Martín *et al.* 2012) y entre reguladores específicos de ruta (Huang *et al.* 2005). El estudio de los mecanismos de regulación es una herramienta especialmente importante para mejorar la producción de metabolitos secundarios (Chen *et al.* 2010b, Olano *et al.* 2008).

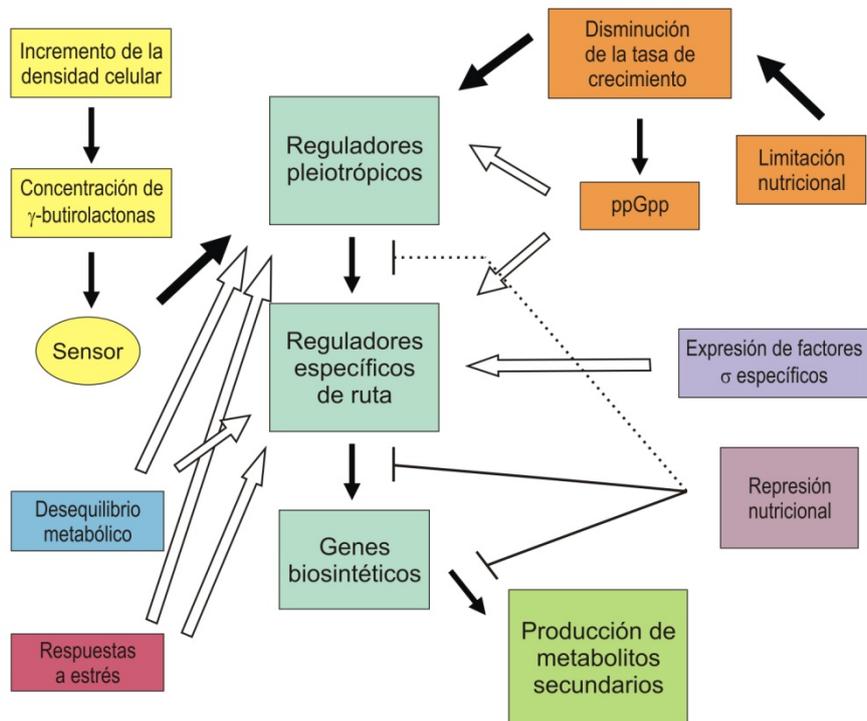


Figura 1.3. Modelo clásico de regulación del metabolismo secundario en *Streptomyces*, con interacciones entre los diferentes niveles de regulación. Las flechas negras representan regulaciones positivas, mientras que las blancas representan interacciones plausibles sin comprobación experimental directa. Las flechas acabadas en romo representan fenómenos de represión, y la de trazo discontinuo, en particular, una interacción que carece de pruebas directas (modificado de Bibb 1996).

1.3.1. Regulación nutricional y ppGpp

Los estreptomicetos tienen la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono. A pesar de que la **glucosa** es una fuente de carbono de fácil asimilación, excelente para el crecimiento, se han descrito muchos casos de interferencia con la producción de metabolitos secundarios. (Martín & Demain 1980). Aunque es necesaria para la biosíntesis de muchos metabolitos secundarios, grandes cantidades de este monosacárido tienen un efecto negativo en la producción, en un proceso de represión catabólica por carbono

(Martín & McDaniel 1977) como se ha demostrado en la producción de nistatina por *S. noursei* (Jonsbu *et al.* 2002).

La biosíntesis de metabolitos secundarios está también controlada por la concentración de **fosfato** disponible en el medio, en su mayoría a través de mecanismos de represión (Martín & Demain 1976). Aunque se trata de un nutriente esencial para el crecimiento, en *Streptomyces* y también en otras especies de microorganismos, concentraciones elevadas de fosfato llevan a la represión de la síntesis de una gran variedad de compuestos, como la pimaricina, candicidina, estreptomycin, cefamicina C, ácido clavulánico, oxytetraciclina, entre otros (Martín 2004, Martín & Demain 1976, Mendes *et al.* 2007b). Estos estudios han sido útiles para perfeccionar las condiciones de fermentación para la producción industrial de estos compuestos. Por ejemplo, se puede disminuir o eliminar por completo la presión ejercida por la represión catabólica por carbono a través de mutaciones, y las fermentaciones han de realizarse en medios que contengan una cantidad limitante de fosfato.

Una de las señales endógenas más estudiadas en *Streptomyces* es el nucleótido 5'-difosfato 3'-difosfato (**ppGpp**). En condiciones de escasez de aminoácidos se desencadena una respuesta estricta y la célula empieza a producir ppGpp. Esta molécula es sintetizada por RelA, una proteína asociada a los ribosomas, cuando se detecta la llegada al ribosoma de moléculas de tRNA que no transportan un aminoácido. Así, cuando se agotan los aminoácidos disponibles la célula acumula estos nucleósidos de guanina altamente fosforilados, (p)ppGpp, lo que a su vez desencadena un cambio en el patrón transcripcional iniciándose el metabolismo secundario. Inicialmente descrito en *E. coli* (Magnusson *et al.* 2005), en el género *Streptomyces* este fenómeno fue demostrado por primera vez en *S. hygroscopicus* (Riesenber *et al.* 1984). En *S. coelicolor*, el mutante *relA* es incapaz de producir los antibióticos undecilprodigiosina y actinorrodina en condiciones limitantes de nitrógeno (pero no en condiciones limitantes de fosfato, donde debe existir un mecanismo de control del metabolismo secundario independiente de ppGpp), y su desarrollo morfológico también se ve afectado con un retraso en la formación del micelio aéreo (Chakraborty & Bibb 1997). En *S. clavuligerus*, sin embargo, se ha demostrado por primera vez el papel represor de ppGpp en la síntesis de cefamicina C y ácido clavulánico (Gomez-Escribano *et al.* 2008).

Además del ppGpp, existen otras señales intracelulares capaces de conectar el estado del metabolismo primario de la célula con el desencadenamiento del metabolismo

secundario, como la S-adenosil-L-metionina (Kim *et al.* 2003, Okamoto *et al.* 2003), el cAMP (Süsstrunk *et al.* 1998, Horinouchi *et al.* 2001) y el cGMP (den Hengst *et al.* 2010).

1.3.2. Respuesta a señales intercelulares

Los mecanismos de comunicación intercelular o *quorum sensing* son conocidos desde hace mucho tiempo y el ejemplo clásico es el de la N-acil-homoserina lactona en la bacteria simbiótica marina *Vibrio fischeri* (Nealson *et al.* 1970, Nealson & Hastings 1979). El *quorum sensing* permite a las bacterias percibir una densidad celular crítica en la población de la que forman parte. En *Streptomyces* se han descrito varias moléculas señalizadoras de este tipo, que difieren en su tamaño, estructura, y tipo de cadena lateral, y que actúan a muy bajas concentraciones (del orden nanomolar) promoviendo el metabolismo secundario y, en algunos casos, la morfogénesis (Takano 2006). De entre estas señales químicas u hormonas microbianas, las γ -butirolactonas fueron las primeras en ser descubiertas y son las más estudiadas, en especial el factor A de *S. griseus* (Khokhlov *et al.* 1967).

En *S. griseus*, productor de estreptomycinina, el **factor A** (2-isocaprilol-3R-hidroxi-metil- γ -butirolactona) controla simultáneamente la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario (Figura 1.6). El factor A es sintetizado por la proteína AfsA (Ando *et al.* 1997, Kato *et al.* 2007) en una producción dependiente del crecimiento. Cuando alcanza una concentración crítica, el factor A se une a su receptor ArpA (que no participa directamente en su síntesis, al contrario de lo que pasa con otras γ -butirolactonas (Kitani *et al.* 2001, Takano *et al.* 2001)), propiciando su disociación del promotor de *adpA* y permitiendo su transcripción, lo que desencadena la formación de micelio aéreo y la producción de la mayoría de los metabolitos secundarios de esta especie. ArpA es un regulador transcripcional de la familia AraC/XylS que activa la transcripción de diferentes genes involucrados en la diferenciación morfológica y en el metabolismo secundario a través de *adpA*, su única diana conocida donde actúa como represor (Higo *et al.* 2011). AdpA, además de regular su propia síntesis (Kato *et al.* 2005), es un regulador pleiotrópico que controla la expresión de hasta 72 genes a lo largo de la fase de crecimiento relacionados con la morfogénesis y el metabolismo secundario, el denominado regulón AdpA (Ohnishi *et al.* 2005, Hara *et al.* 2009, McCormick & Flärdh 2012). Esto significa que el efecto del factor A se amplía considerablemente a través de AdpA (Figura 1.4). En contraste con el factor A de *S. griseus*, la mayoría de las γ -butirolactonas de otras especies de *Streptomyces* se producen sólo al final de la fase exponencial del crecimiento y controlan de manera

exclusiva el metabolismo secundario (Bibb 2005, Ohnishi *et al.* 2005). El factor A constituye también otra rara excepción en cuanto a la posición de los genes de síntesis y receptor, que en el caso de otras γ -butirolactonas están habitualmente juntos y cerca de la agrupación biosintética que controlan (Takano 2006, Chater *et al.* 2010).

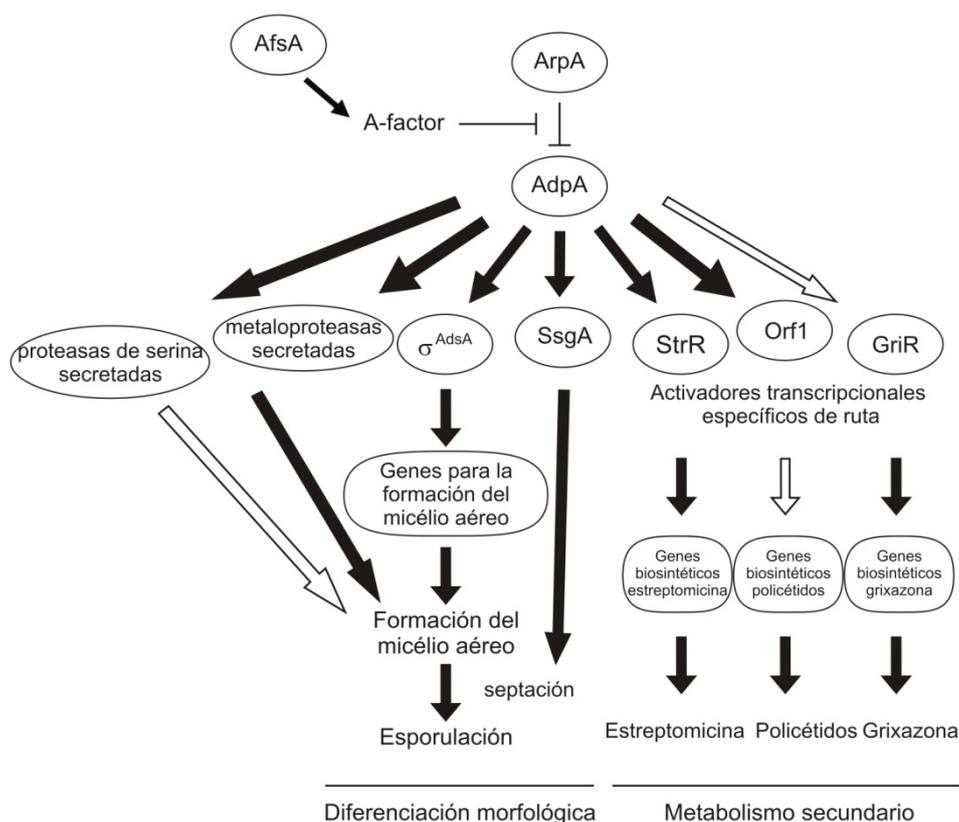


Figura 1.4. Cascada reguladora en respuesta al factor A para la diferenciación morfológica y producción de metabolitos secundarios en *S. griseus*. Las flechas negras representan fenómenos de regulación directa, mientras que las blancas simbolizan un efecto indirecto (modificado de Ohnishi *et al.* 2005).

Resulta también sumamente interesante la relación entre el uso del codón raro TTA y el gen *adpA*. En *S. griseus* el mRNA de *adpA* contiene un codón UUA (Ohnishi *et al.* 1999, Chater & Chandra 2006), lo que indica que *bldA* es necesario para que la proteína AdpA se produzca (Chater & Chandra 2008), y se ha demostrado que existe un loop de retroalimentación positiva en el que AdpA se une al promotor de *bldA* y activa su transcripción (Higo *et al.* 2011). Además, la influencia de *bldA* en la producción de metabolitos secundarios es parcialmente mediada por *adpA* (Chater & Chandra 2006).

En el caso de *S. coelicolor*, el codón TTA es la principal vía por la que el gen *bldA* afecta la diferenciación morfológica, pero aparentemente AdpA no parece estar regulado

por una señal intercelular como las γ -butirolactonas, ni involucrado en la regulación del metabolismo secundario, dos diferencias fundamentales con respecto a *S. griseus* (Chater & Horinouchi 2003), aunque sí es necesario para el desarrollo correcto del micelio aéreo (fue inicialmente identificado como *bldH* en mutantes morfológicos de *S. coelicolor* (Champness 1988, Takano *et al.* 2003) (Figura 1.5). El gen *adpA* está altamente conservado en el género *Streptomyces* y tiene ortólogos en muchas especies. En *S. griseus* y *S. coelicolor* (además de varios otros), *adpA* contiene un único codón TTA y además en la misma posición, lo que sugiere una conexión ancestral y evolutiva *bldA-adpA* (Chater & Chandra 2006).

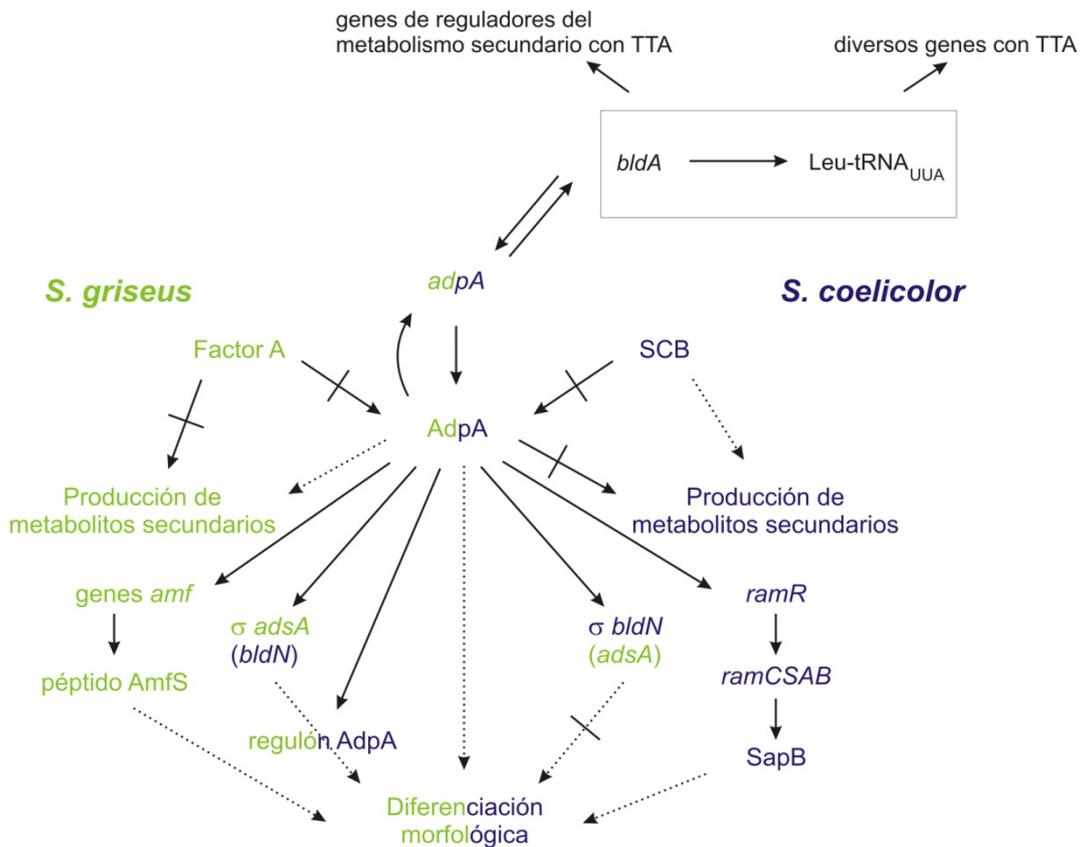


Figura 1.5. Diferencias entre *S. griseus* y *S. coelicolor* en cuanto al inicio de la diferenciación morfológica y el papel que desempeñan *adpA* y *bldA*. Flechas negras simbolizan una relación reguladora directa, mientras que flechas con barra representan ausencia de relación. Flechas de trazo discontinuo representan relación que incluye múltiples pasos. Los factores comunes a ambas especies están en negro.

Otro ejemplo de señales extracelulares que controlan la diferenciación morfológica y la producción de metabolitos secundarios es el **factor C**, aislado por primera vez a partir de la cepa *S. griseus* 45H (posteriormente designada *S. flavofungini*) y que curiosamente es una proteína de 324 aminoácidos (Biró *et al.* 1980). Aunque el modo de acción del factor C

sigue sin esclarecerse, sorprendentemente se ha demostrado que la expresión del gen que lo codifica, *facC*, es capaz de restablecer la producción de factor A y las características que se le atribuyen en un mutante espontáneo de *S. griseus* deficiente en la producción de factor A (Birkó *et al.* 2007). Esto parece indicar que existen componentes comunes a las dos rutas, dado que *S. griseus* no posee un ortólogo de *facC*.

En *S. natalensis* se ha identificado un nuevo tipo de molécula señalizadora, el factor **PI** (2,3-diamino-2,3-(hidroximetil)-1,4-butanodiol) (Figura 1.6), con una estructura química completamente nueva cuando se compara con otras moléculas de sistemas de *quorum sensing*. Un mutante de *S. natalensis* denominado *npi287*, obtenido mediante tratamiento con nitrosoguanidina, no produce factor PI y es incapaz de producir pimarcina, el principal metabolito secundario producido por la cepa silvestre (Recio *et al.* 2004). Curiosamente, el factor A de *S. griseus* es capaz de restablecer la producción de pimarcina, en otro ejemplo de integración cruzada de diferentes señales (Recio *et al.* 2004). La acción especie-específica de las γ -butirolactonas permanece como algo poco conocido y durante mucho tiempo éste fue el único ejemplo del salto de la barrera de especiación por estos compuestos (Nodwell 2014). Pese a ello, un estudio reciente en *S. venezuelae* y la producción de jadomicina demuestra que diferentes especies de *Streptomyces* comparten γ -butirolactonas (Zou *et al.* 2014). En él se identifica una nueva γ -butirolactona, el SVB1 que controla la biosíntesis de jadomicina y que es estructuralmente idéntico a SCB3, una γ -butirolactona de *S. coelicolor* que junto con SCB1 y SCB2 controla la biosíntesis del policétido Kas e indirectamente la de actinorrodina (Takano *et al.* 2005, Hsiao *et al.* 2009), sugiriendo así la posibilidad de una comunicación entre estas dos especies y la mútua coordinación de la producción de metabolitos secundarios. Se hablará en mayor profundidad del factor PI en el apartado 1.5.5.4.

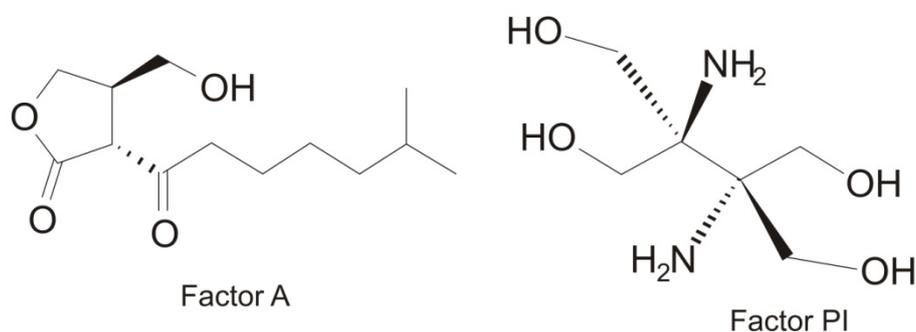


Figura 1.6. Moléculas señalizadoras. Estructura del factor A y del factor PI.

1.3.3. Reguladores pleiotrópicos

Los reguladores pleiotrópicos responden a una gran variedad de señales y controlan de esta forma la morfogénesis y el metabolismo secundario, incluso pueden influenciar varias rutas biosintéticas a la vez. En un sistema jerárquico teórico e ideal, los genes que los codifican se localizan fuera de las agrupaciones biosintéticas, actuando sobre los reguladores específicos de ruta sin ejercer control directo sobre los genes biosintéticos. No obstante, en biología no todo es tan simple, además del gran número de reguladores pleiotrópicos que existen en un genoma de *Streptomyces* (e.g. en *S. coelicolor* se conocen más de veinte de estos reguladores que controlan la biosíntesis de los cuatro antibióticos clásicamente producidos por esta bacteria (Bibb 1996) y hay que tener en mente que existen otros 18 *clusters* responsables de la biosíntesis de otros tantos metabolitos secundarios (Bentley *et al.* 2002)) éstos actúan en múltiples niveles y muchas veces esas interacciones se asemejan más a una compleja red de señales (Huang *et al.* 2005). Algunos reguladores pleiotrópicos como el ya mencionado AdpA (ver apartado 1.3.2) controlan a la vez la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario, operando a niveles muy elevados de la cascada. A continuación se indican ejemplos de reguladores pleiotrópicos conocidos por controlar la biosíntesis de varios metabolitos secundarios.

1.3.3.1. AfsR

La proteína reguladora AfsR es probablemente el ejemplo de regulador pleiotrópico mejor conocido. Se trata de una proteína de 993 aminoácidos y una masa molecular de 106 kDa, miembro de la familia STAND (del inglés *signal transduction ATPases with numerous domains*) (Tanaka *et al.* 2007) que contiene en la región N-terminal un dominio de unión a DNA de tipo SARP (del inglés *Streptomyces antibiotic regulatory protein*) y dominios de unión a ATP de tipo A y B en la región central (Horinouchi *et al.* 1990, Bibb 2005). Este regulador integra múltiples señales que son transducidas a través de cascadas de fosforilación. El proceso de fosforilación-desfosforilación es un elemento clave en los mecanismos celulares para la detección, transmisión e integración de señales intra y extracelulares, tanto en eucariotas como en procariontes (Horinouchi 2003). En *S. coelicolor* al menos tres serina-treonina quinasas diferentes son capaces de autofosforilarse en respuesta a ciertos estímulos ambientales y transferir ese grupo fosfato a AfsR: AfsK, AfsL y PkaG (Sawai *et al.* 2004). La forma fosforilada de AfsR se une al promotor de *afsS* (la fosforilación de hecho aumenta la capacidad de unión), reclutando la RNA polimerasa para activar la transcripción (Lee *et al.* 2002, Tanaka *et al.* 2007). AfsS es un activador transcripcional de

pequeño tamaño (93 aminoácidos) que incluye el dominio 3 conservado de factores sigma y que afecta a la transcripción de hasta 117 genes en *S. coelicolor*, incluyendo reguladores positivos específicos de ruta como el *actII-ORF4* para la producción de actinorrodina y *reD* para la de undecilprodigiosina. Mediante un mecanismo que aún se desconoce, AfsS no sólo modula la biosíntesis de antibióticos sino que también controla las respuestas en condiciones de estrés nutricional (Lian *et al.* 2008). En *S. coelicolor* AfsR está involucrado en el metabolismo secundario, terminando por afectar además otros procesos a través de AfsS, mientras que en *S. griseus* se ha descrito su implicación en la diferenciación morfológica, específicamente en la formación de micelio aéreo (Umeyama *et al.* 1999).

1.3.3.2. Sistema de dos componentes PhoR-PhoP

Como se ha mencionado anteriormente, el fosfato constituye una señal importante en la regulación del metabolismo secundario. Es un nutriente esencial que entra en la composición de muchas biomoléculas, como los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y el ATP, por lo que condiciones de escasez de este nutriente afectan negativamente al crecimiento. En *Streptomyces*, condiciones limitantes de fosfato inducen una transición en el crecimiento, desencadenándose la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario. El control ejercido por el fosfato sobre la biosíntesis de antibióticos en *Streptomyces* está mediado por el sistema de dos componentes PhoR-PhoP (Sola-Landa *et al.* 2003, Martín 2004). Este tipo de sistemas son la principal vía de señalización ambiental y fisiológica en bacterias. Típicamente están compuestos por una histidina quinasa sensora, que se encuentra en la membrana celular y percibe el estímulo, y un regulador de respuesta, que recibe la señal de la proteína sensora. La interacción entre la proteína sensora y el regulador de respuesta induce un cambio conformacional en el dominio efector del regulador de respuesta, generalmente permitiendo su unión a secuencias de DNA específicas presentes en el promotor, modulando la expresión de esos genes. En *S. coelicolor* y *S. lividans* este sistema pertenece a la clase IIIA de sistemas de dos componentes (Fabret *et al.* 1999, Hutchings *et al.* 2004).

En el sistema PhoR-PhoP de *Streptomyces* la quinasa sensora PhoR posee el residuo de histidina conservado que es fosforilado y presenta un dominio transmembrana en la región N-terminal, tal y como es habitual para la localización típica en la membrana de estas proteínas. En condiciones de escasez de fosfato esta quinasa se autofosforila, transfiriendo después ese grupo fosfato a PhoP que de este modo queda activado. PhoP es un regulador transcripcional de la familia OmpR que presenta en la región N-terminal el residuo de

aspartato que recibe el grupo fosfato y en la región C-terminal un dominio de unión a DNA de tipo hélice-giro-hélice o HTH (del inglés *helix-turn-helix*). Los genes *phoR* y *phoP* están localizados de manera contigua en los genomas de especies de *Streptomyces*, acompañados habitualmente de otro gen localizado inmediatamente antes y de manera divergente, *phoU*, un modulador de la respuesta por fosfato a través de PhoR-PhoP (Ghorbel *et al.* 2006). Estos tres genes se transcriben a partir del promotor bidireccional situado en la región intergénica que también está bajo el control positivo de PhoP (*positive feed-back* o retroalimentación positiva) (Sola-Landa *et al.* 2005).

PhoP controla la expresión del llamado regulón *pho*, con fenómenos de activación y represión transcripcional (Rodríguez-García *et al.* 2007, 2009). Se trata de un conjunto de genes definido inicialmente en *E. coli* involucrados en la respuesta celular en condiciones de escasez de fosfato (Wanner 1993). PhoP modula la expresión de los genes de este regulón uniéndose a secuencias específicas de DNA en sus regiones promotoras, las cajas PHO (Sola-Landa *et al.* 2005, 2008). En *S. coelicolor* estas secuencias están presentes en los promotores de los genes del regulón *pho*, pero se encuentran ausentes en un gran número de genes afectados por la mutación $\Delta phoP$, como los genes biosintéticos de metabolitos secundarios (Sola-Landa *et al.* 2005), lo que sugiere que PhoP actúa como un regulador máster, controlando otros reguladores (Rodríguez-García *et al.* 2007, Allenby *et al.* 2012). Se entiende pues que el control que los niveles de fosfato ejercen sobre el metabolismo secundario es de tipo indirecto.

De entre los genes directamente controlados por PhoP cabe destacar el antes mencionado activador transcripcional AfsS, lo que demuestra una clara conexión entre condiciones de escasez de fosfato con el metabolismo secundario y la diferenciación morfológica. Un estudio reciente demuestra que PhoP se une al promotor de *afsS* en una región que solapa con la secuencia de unión de AfsR en *S. coelicolor*, habiendo así un fenómeno de competencia entre estos dos reguladores. El mismo estudio relata también la unión de AfsR a promotores de genes regulados por PhoP, como *pstS* y *phoRP*, vinculando de manera definitiva a PhoP con el control del metabolismo secundario (Santos-Beneit *et al.* 2009) (Figura 1.7).

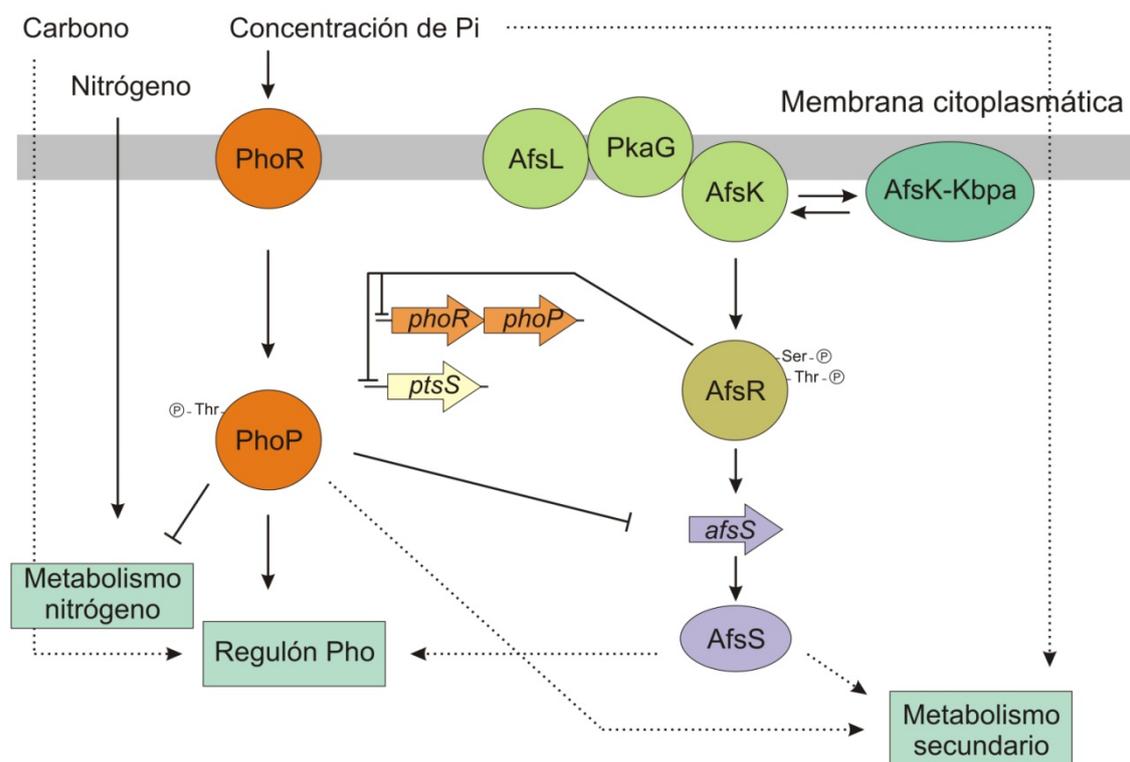


Figura 1.7. Red de mecanismos de regulación global. Comunicación y cascadas de transducción de señales entre AfsR y PhoP en *S. coelicolor*. Las flechas negras representan regulación positiva directa, mientras que flechas discontinuas representan regulación indirecta y las líneas acabadas en romo represión (modificado de Martín & Liras 2010).

1.3.4. Reguladores específicos de ruta

En los *clusters* responsables de la biosíntesis de metabolitos secundarios es muy frecuente encontrar uno o más reguladores encargados de la modulación directa de la transcripción de los restantes genes de la agrupación. Como ya se ha mencionado, se denominan reguladores específicos de ruta y efectúan dicho control uniéndose al DNA. Sin embargo, en algunos casos pueden también controlar otras agrupaciones génicas diferentes a la que pertenecen (Huang *et al.* 2005). De entre los varios tipos de proteínas de unión a DNA en procariontas, la gran mayoría contienen un motivo hélice-giro-hélice o HTH como motivo de unión al DNA, y apenas un 5 % contienen otros motivos más habituales en los eucariotas, como los dedos de zinc, las hélice-bucle-hélice o HLH (del inglés *helix-loop-helix*) o las láminas β antiparalelas (Harrison 1991). Los reguladores específicos de ruta pertenecen al grupo más representativo y poseen en todos los casos conocidos hasta ahora diferentes versiones del motivo HTH en sus dominios de unión al DNA.

1.3.4.1. Reguladores de tipo SARP: el modelo de reguladores específicos de ruta

Las proteínas SARP, del inglés *Streptomyces antibiotic regulatory proteins*, son el grupo de reguladores mejor representado en las agrupaciones génicas biosintéticas de metabolitos secundarios de *Streptomyces* y constituyen el paradigma de un regulador específico de ruta (Wietzorrek & Bibb 1997). El dominio de unión a DNA de estas proteínas es de tipo HTH y presenta una elevada similitud, tanto a nivel de secuencia como estructural, con los de las proteínas de la familia OmpR (Wietzorrek & Bibb 1997). Además, junto al dominio HTH estos reguladores poseen un dominio BTAD (de inglés, *bacterial transcriptional activator domain*) (Tanaka *et al.* 2007). De acuerdo con los niveles de similitud existentes y siguiendo los criterios ordinarios que se emplean para la clasificación de los reguladores transcripcionales, estas proteínas se pueden agrupar formando subfamilias (Pérez-Rueda & Collado-Vides 2000). De hecho, es de resaltar que los SARP, al contrario de la mayoría de miembros de la familia OmpR y siendo también activadores transcripcionales, presentan su dominio HTH en la región N-terminal, una característica mucho más corriente entre los represores (Pérez-Rueda & Collado-Vides 2000).

Los reguladores SARP se pueden agrupar según su tamaño. Así, existen los “small SARPs” con menos de 300 residuos de aminoácidos (e.g. ActII-ORF4, regulador de la biosíntesis de actinorrodina en *S. coelicolor* (Arias *et al.* 1999), CcaR, regulador de la cefamicina C y del ácido clavulánico en *S. clavurigerus* (Pérez-Llarena *et al.* 1997, Santamarta *et al.* 2002) y DnrI, regulador de la daunorubicina en *S. peucetius* (Madduri & Hutchinson 1995, Tang *et al.* 1996)), los “medium SARPs” con aproximadamente 600 residuos de aminoácidos y con una clara similitud entre todos sus miembros a lo largo de la secuencia proteica completa (e.g. CdaR, regulador de la biosíntesis del antibiótico dependiente de calcio en *S. coelicolor* (Ryding *et al.* 2002)) y los “large SARPs”, con cerca de 1000 residuos de aminoácidos. Estos últimos son en realidad reguladores híbridos, probablemente resultantes de la adquisición de elementos modulares por parte de dominios de unión al DNA, en sí un fenómeno habitual en la evolución de los reguladores transcripcionales (Pérez-Rueda & Collado-Vides 2000). Todos los “large SARPs” poseen los mismos tres dominios funcionales, un dominio SARP en la región N-terminal, un dominio AAA (del inglés, *ATPase associated with diverse cellular activities*) en la región central y un dominio C-terminal conservado con función desconocida (Liu *et al.* 2013).

PimR fue el primer regulador de la síntesis de pimarcina en ser descrito (Antón *et al.* 2004), y es el modelo para este último grupo de reguladores transcripcionales. Esta

proteína reguladora tiene 1198 residuos de aminoácidos, presentando como es característico un dominio de unión a DNA de tipo SARP en su región N-terminal y un dominio AAA en su región central (incluyendo los motivos característicos Walker A y Walker B (Walker *et al.* 1982)). Además, la secuencia de aminoácidos del residuo 350 al 800 presenta una alta similitud con el extremo N-terminal de diversos reguladores de la subfamilia LAL (del inglés, *Large ATP-binding regulator of the LuxR family*), y hay una identidad del 25 % con guanilato ciclasas en la secuencia desde el aminoácido 350 hasta el extremo C-terminal de la proteína (Figura 1.8). PimR actúa como un regulador positivo de la síntesis de pimarcina, ya que su delección provoca la total pérdida de la producción de este compuesto (Antón *et al.* 2004). Este tipo de reguladores están presentes en muchas agrupaciones génicas en *Streptomyces* y existen varios genes ortólogos a *pimR*, como *pteR* en el *cluster* de la filipina en *S. avermitilis* (Ikeda *et al.* 2003), *sanG*, regulador positivo de la síntesis de nikkomicina en *S. ansochromogenes* (Liu *et al.* 2005), *polR*, regulador de la polioxina en *S. cacaoi* (Li *et al.* 2009b) o *scnRI*, regulador de la pimarcina en *S. chattanoogensis* (Du *et al.* 2009). De hecho, se ha especulado sobre la posibilidad de que este tipo de reguladores específicos de ruta “large SARPs” puedan reconocer una señal común, dado que todos los ejemplos existentes se encuentran en agrupaciones génicas para la biosíntesis de compuestos antifúngicos, estando dicha señal relacionada con la actividad antifúngica (Santos-Aberturas *et al.* 2012).

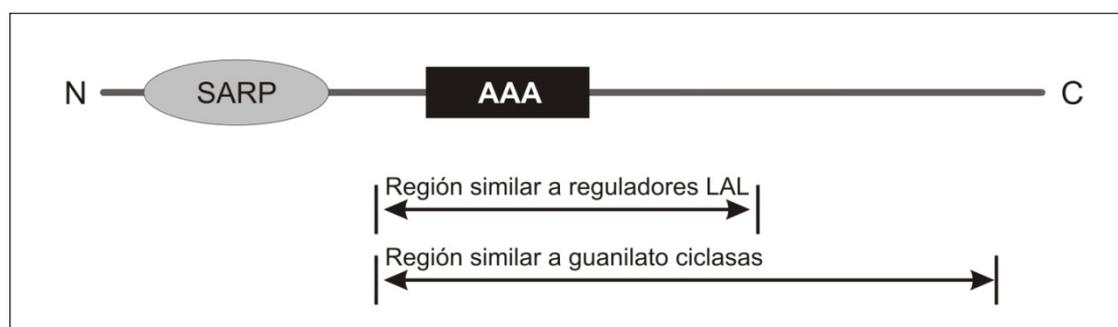


Figura 1.8. Estructura de PimR. Se muestran las regiones con similitudes características (modificado de Antón *et al.* 2004).

Aunque los reguladores SARP parecen generalmente funcionar como reguladores específicos de ruta, existe por lo menos un ejemplo de un regulador pleiotrópico, el ya varias veces mencionado AfsR de *S. coelicolor* (apartados 1.3.3.1 y 1.3.3.3). Este regulador se diferencia de los reguladores SARP específicos de ruta en que su estructura incluye dominios adicionales de unión a ATP en su extremo C-terminal (Tanaka *et al.* 2007), y se

han identificado varios reguladores ortólogos como Poly en *S. cacaoi* (Li et al. 2010b), o AfsRsv en *S. venezuelae* (Maharjan et al. 2009).

1.3.4.2. Reguladores de tipo LAL

Los reguladores de la subfamilia LAL, perteneciente a la familia LuxR (De Schrijver & De Mot 1999), son relativamente grandes (870 a 1200 aminoácidos) y tienen como modelo la proteína reguladora MalT del regulón de la maltosa en *E. coli* (Boos & Shuman 1998). Se caracterizan por poseer un dominio de unión a ATP/GTP en la región N-terminal, que incluye el motivo Walker A (Walker et al. 1982), y en la región C-terminal un dominio de unión a DNA tipo HTH característico de la familia LuxR. Reguladores de la subfamilia LAL están presentes en las agrupaciones génicas de al menos 13 policétidos y dos glicopéptidos (Bibb 2005). De entre los policétidos se pueden citar PikD, regulador de la picromicina en *S. venezuelae* (Wilson et al. 2001), RapH, regulador de la síntesis de rapamicina en *S. hygroscopicus* (Kuscer et al. 2007) o NysRI, NysRII y NysRIII en el caso de la nistatina en *S. noursei* (Sekurova et al. 2004), y de entre los glicopéptidos el caso de GlmRI y GlmRII, ambos reguladores de la síntesis de geldanamicina en *S. hygroscopicus* (He et al. 2008). Aunque la mayoría de los reguladores LAL son específicos de ruta, recientemente se han descrito dos reguladores pleiotrópicos pertenecientes a esta subfamilia en *S. coelicolor* (Guerra et al. 2012).

1.3.4.3. Otras familias de reguladores

La subfamilia SARP es la más conocida de las familias de reguladores transcripcionales y a la que pertenecen la mayoría de los reguladores específicos de ruta de *Streptomyces*. Sin embargo existen otras familias como la LysR, a la que pertenece el regulador específico del ácido clavulánico en *S. clavurigerus* ClaR (Pérez-Redondo et al. 1998), la familia TetR con el regulador Gel19 como ejemplo, implicado en la síntesis de geldanamicina en *S. hygroscopicus* (Kim et al. 2010), o la familia AraC, con el regulador específico de ruta RapG en la síntesis de rapamicina en *S. hygroscopicus* (Kuscer et al. 2007).

Resulta notable que en todas las agrupaciones génicas para la biosíntesis de macrólidos polienos secuenciadas hasta la fecha se encuentre un regulador transcripcional con una arquitectura muy particular, combinando un dominio de unión a DNA C-terminal de tipo LuxR y un dominio sensor N-terminal de tipo PAS. Los dominios PAS (nombrados por su homología con la proteína Per de *Drosophila*, el translocador nuclear

ARNT y la proteína Sim de *Drosophila*) (Hefti *et al.* 2004) son abundantes en la naturaleza y se piensa que actúan como sensores, pudiendo detectar cambios de luz, potencial redox, oxígeno, niveles energéticos o pequeños ligandos (Taylor & Zhulin 1999). Al contrario de las proteínas bacterianas que contienen dominios PAS, estos reguladores no forman parte de un sistema de dos componentes.

El regulador PAS-LuxR mejor estudiado es **PimM** (Figura 1.9), el segundo regulador descrito en la agrupación para la biosíntesis de pimaricina en *S. natalensis* (Antón *et al.* 2007). PimM es un regulador esencial para la producción de pimaricina, ejerciendo un control positivo sobre la transcripción de varios genes del *cluster*, reconociendo una secuencia específica de DNA para unirse a sus promotores (Santos-Aberturas *et al.* 2011b). Como se indicó anteriormente, existen varias proteínas ortólogas a PimM distribuidas por diferentes *clusters* para la producción de macrólidos polienos, como son: PteF en la agrupación génica de la filipina en *S. avermitilis* (Vicente *et al.* 2014), NysRIV en la de nistatina en *S. noursei* (Sekurova *et al.* 2004), AmphRIV en la agrupación de la anfotericina en *S. nodosus* (Carmody *et al.* 2004), FscRI para la candicidina en *S. griseus* (Chen *et al.* 2003), SalRIII para la salinomicina en *S. albus* (Knirschová *et al.* 2007), o ScnRII en el *cluster* de la pimaricina en *S. chattanoogensis* (Du *et al.* 2009).

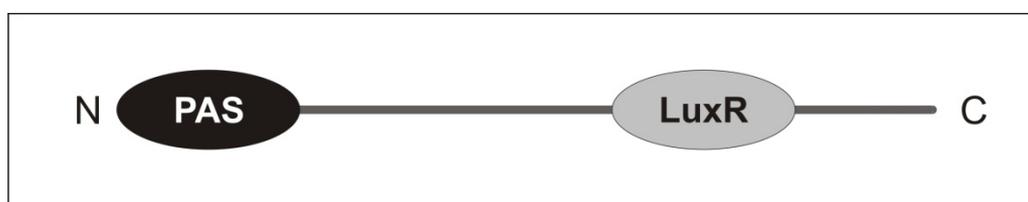


Figura 1.9. Estructura de PimM. Los dominios característicos se distribuyen a lo largo de la estructura primaria de la proteína (modificado de Antón *et al.* 2007).

1.3.4.4. Redes complejas de reguladores específicos de ruta

En *Streptomyces* es frecuente encontrar *clusters* de metabolitos secundarios que contienen varios reguladores, y cuando es así, las relaciones entre reguladores pueden ser muy complejas. Un ejemplo se observa en el *cluster* de la tilosina en *S. fradiae*, en el que coexisten nada menos que cinco reguladores (Bate *et al.* 2002, 2006; Stratigopoulos *et al.* 2004). Sin embargo parece que sólo TylR interactúa directamente sobre los promotores de los genes biosintéticos, activando su transcripción. Por el contrario, también se conocen

agrupaciones génicas de metabolitos secundarios en las que parecen no existir reguladores específicos de ruta, como es el caso de la eritromicina (Rawlings 2001).

La regulación del metabolismo secundario es muy compleja y la visión jerárquica tradicional parece ahora demasiado simplista para explicar las redes reguladoras con numerosas interacciones que se han ido identificando. Incluso los reguladores específicos de ruta pueden desempeñar funciones menos evidentes, llegando a modular reguladores pleiotrópicos (Huang *et al.* 2005) o mediar relaciones de regulación cruzada entre diferentes *clusters* biosintéticos (de la Fuente *et al.* 2002).

1.3.5. Mejora de la producción de metabolitos secundarios: manipulación de la regulación

El género *Streptomyces* es responsable de la producción de casi la mitad de todos los antibióticos conocidos a día de hoy, entre otros compuestos bioactivos (Challis & Hopwood 2003), y la mejora de cepas es indispensable durante el proceso de producción de estos productos naturales, dado que la productividad de las cepas silvestres es demasiado baja para los requisitos industriales. Además, la búsqueda de mejores niveles de producción es un fenómeno siempre presente en industria. El método tradicional, con rondas de mutación al azar seguidas de selección empírica de cepas mejoradas, se ha mostrado eficaz a lo largo de los años. Se trata, no obstante, de una metodología laboriosa y lenta. Las nuevas metodologías de ingeniería metabólica, con el uso de tecnologías de DNA recombinante, son una reserva importante de estrategias alternativas para mejorar la producción que complementan el método empírico utilizado en industria. Sin embargo estas alternativas dependen del conocimiento de la biosíntesis de la molécula en cuestión, y los flujos metabólicos relacionados con ella, así como de las herramientas y metodologías disponibles para llevar a cabo las manipulaciones génicas pertinentes. A lo largo de las últimas décadas, el conocimiento de la maquinaria biosintética y de las redes de regulación de la producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces*, así como el desarrollo de nuevas metodologías de manipulación genética, ha aumentado considerablemente, haciendo posible la mejora de los títulos de producción de metabolitos secundarios (Adrio & Demain 2006, Olano *et al.* 2008, Chen *et al.* 2010b, Luo *et al.* 2012). Sin embargo a veces no se consiguen alcanzar los objetivos, por lo que conseguir una ingeniería metabólica más predecible requiere conocer más a fondo las redes de regulación que controlan la producción de metabolitos secundarios (Chen *et al.* 2010b).

Una de las estrategias de ingeniería metabólica es la manipulación de reguladores específicos de ruta, y los métodos y mecanismos utilizados con el objetivo de mejorar la producción de metabolitos secundarios son varios (Chen *et al.* 2010b). Los reguladores que controlan la producción de metabolitos secundarios son dianas importantes en ingeniería metabólica, y su manipulación en las **cepas productoras nativas** es una estrategia clara para mejorar la producción. La manipulación genética de reguladores pleiotrópicos tiene la ventaja de que con una única diana se podrían afectar muchos aspectos de la producción de metabolitos secundarios.

Por otro lado, la manipulación de un regulador específico de ruta (y como antes se ha mencionado, la mayoría de las agrupaciones génicas biosintéticas de metabolitos secundarios incluyen uno o más de estos reguladores), es una manera directa de modular la producción de un compuesto concreto. En el caso de la **regulación positiva**, una estrategia común para mejorar la producción natural es la sobreexpresión de reguladores específicos de ruta, como se ha demostrado por ejemplo para los reguladores *pimM*, en el caso de la producción de pimaricina y otros polienos (Santos-Aberturas *et al.* 2011a), *pteF* para la filipina (Vicente *et al.* 2014), o *aurj3M* para la aureofuscina (Wei *et al.* 2011). Cuando existe **regulación negativa**, la opción es la delección del represor, como se ha demostrado en el caso del regulador *aveI* en *S. avermitilis*, cuya delección aumenta la producción de avermectina (Chen *et al.* 2008).

Otra estrategia pasa por el uso de **cepas hospedadoras de producción heteróloga**, i.e. llevar a cabo la producción en una cepa que no es la productora natural. La secuenciación de genomas permite el acceso a una gran cantidad de información que en última instancia facilita la introducción de *clusters* completos en una nueva cepa para la expresión heteróloga de agrupaciones biosintéticas. Esta técnica permite superar dificultades que puedan surgir en la manipulación genética de la cepa nativa, así como posibles mecanismos de modulación desconocidos que puedan reprimir la producción. Además, es una técnica eficaz en el aumento de la producción, como se demostró con expresión heteróloga de los genes biosintéticos de la tetracenomicina, nativos de *S. glaucescens*, en la cepa industrial *S. cinnamomensis* C730.7, que resultó en un aumento considerable en la producción del compuesto (de 0,3 a 5 g/L) (Li *et al.* 2009a). En consecuencia, se han construido mediante técnicas moleculares, cepas diseñadas con el único objetivo de permitir la expresión heteróloga de agrupaciones biosintéticas (Gomez-Escribano & Bibb 2011). No obstante, la ausencia en la cepa hospedadora de posibles

“señales” o precursores presentes en la cepa nativa, y necesarias para la producción, hace que esta estrategia no siempre sea viable. Así, la combinación de diferentes técnicas de ingeniería metabólica debe ser considerada cuando se pretende mejorar la producción de metabolitos secundarios.

1.4. Los policétidos

Los policétidos constituyen una de las familias más extensas y variadas de metabolitos secundarios y son producidos por casi todos los tipos de organismos vivos excepto por arqueas (Rawlings 1997). Se trata de compuestos orgánicos complejos, con diversas características estructurales y actividades biológicas. Muchos de los productos farmacológicos disponibles hoy en día son compuestos de este tipo o derivados. Así, existen antibacterianos (e.g. la eritromicina o la azitromicina), antifúngicos (anfotericina B), antivirales (quatromicinas), antiparasitarios (avermectina), insecticidas (espinosinas), antitumorales (daunorubicina), inmunosupresores (rapamicina), anticolesterolémicos (lovastatina), entre otros (Shen 2003, Hopwood 2007). Pese a la diversidad de estructuras químicas, los policétidos comparten arquitectura biosintética en la cual enzimas denominadas policétido sintasas (PKS, del inglés *polyketide synthase*) realizan condensaciones descarboxilativas sucesivas de precursores acil-CoA de cadena corta. La cadena policétídica así producida es muchas veces modificada en el producto bioactivo natural final.

1.4.1. Diversidad estructural

Desde el punto de vista químico, los policétidos se pueden dividir en tres grupos principales: los policétidos aromáticos, los policétidos macrocíclicos y los policétidos poliéteres.

1.4.1.1. Policétidos aromáticos

Como su nombre indica, los policétidos aromáticos se caracterizan por presentar uno o varios anillos aromáticos en su estructura química. Por lo general son sintetizados por PKSs de tipo II (ver apartado 1.4.2) y en su biosíntesis se utiliza como unidad iniciadora y en los sucesivos ciclos de extensión el malonil-CoA, aunque otros substratos, como el acetil-CoA, propionil-CoA o isobutiril-CoA también son posibles, especialmente en el caso de la unidad iniciadora (Das & Khosla 2009). La molécula más representativa y mejor estudiada de este grupo es la actinorrodina de *S. coelicolor* (Malpartida & Hopwood

1984). Las tetraciclinas, potentes antibacterianos inhibidores de la síntesis de proteínas debido a su interacción con la subunidad 30S de los ribosomas, y la daunorrubicina, antitumoral profusamente utilizado en quimioterapia, son dos ejemplos de compuestos de gran importancia farmacéutica que pertenecen a este grupo (Das & Khosla 2009).

1.4.1.2. Policétidos macrocíclicos

Estos compuestos, también denominados macrólidos, están constituidos por grandes anillos macrocíclicos cerrados por un enlace tipo lactona, son sintetizados por PKSs de tipo I (apartado 1.4.2) y normalmente sufren modificaciones químicas post-PKS para su funcionalización. Este grupo se puede dividir en **macrólidos polienos**, con grandes anillos macrólidos que se caracterizan por la presencia de tres a ocho dobles enlaces conjugados (de los que se tratará en profundidad en el apartado 1.5), y **macrólidos no polienos**, con anillos macrocíclicos de 12 a 16 átomos de carbono que carecen de dobles enlaces conjugados y presentan hidroxilaciones y metilaciones, estando siempre unidos al menos a un azúcar. En cuanto a la función biológica, los polienos son conocidos por su actividad antifúngica (e.g. pimaricina y nistatina), mientras que los macrólidos no poliénicos son potentes antibacterianos (e.g. eritromicina) (Mazzei *et al.* 1993, Nedal & Zotchev 2004).

1.4.1.3. Policétidos poliéteres

Los policétidos poliéteres son moléculas lineales con un esqueleto policetídeo sintetizado por una PKS de tipo I que puede ser modificado por una epoxidasa y una o más epóxido hidrolasas para dar lugar al producto final con el patrón característico de enlaces éter (Liu *et al.* 2009). Las monensinas A y B son policétidos poliéteres que se emplean con gran profusión en medicina veterinaria como antibacterianos debido a su capacidad para transportar cationes monovalentes a través de membranas celulares, actuando como ionóforos (Butaye *et al.* 2003, Chapman *et al.* 2010).

1.4.2. **Policétido sintasas: diversidad y contexto biosintético**

La biosíntesis de los policétidos tiene lugar mediante la condensación sucesiva de ácidos carboxílicos de cadena corta, procedentes de formas activadas de acil-CoA, a través de la acción de enzimas PKSs, en un proceso muy similar a la síntesis de ácidos grasos por la acción de las sintasas de ácidos grasos o FAS (del inglés *fatty acid synthase*) (Hopwood & Sherman 1990).

La actividad de la PKS incluye varias actividades enzimáticas diferentes. Así, el núcleo básico de la actividad PKS está formado por las actividades acil transferasa o AT (encargada de la selección de la unidad extensora en cada ciclo de elongación), cetosintasa o KS (del inglés *β -ketoacyl-ACP-synthase*, encargada de catalizar la condensación descarboxilativa de la unidad extensora con la cadena creciente) y la proteína transportadora de grupos acilo o ACP (del inglés *acyl-carrier protein*, encargada de portar la cadena policetídica en crecimiento y presentarla al resto de dominios enzimáticos responsables de la formación de la cadena). Además de estas actividades esenciales existen otras tres actividades, cuyo papel es modificar el grupo β -ceto de la última unidad extensora incorporada a la cadena policetídica, sometiénolo a sucesivos grados de reducción: cetorreductasa o KR (del inglés *ketoreductase*, que lleva a cabo la cetorreducción a hidroxilo), deshidratasa o DH (del inglés *dehydratase*, encargada de la deshidratación a enoilo) y enoilreductasa o ER (del inglés *enoylreductase*, que reduce el enoilo a una función alcanos). El último paso consiste en liberar la cadena policetídica ya completada de la ACP, a través de una actividad tioesterasa o TE (del inglés *thioesterase*) (Hopwood & Sherman 1990).

El proceso de **biosíntesis de los policétidos** es muy similar a la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga y se puede resumir en un esquema básico (Figura 1.10). Se inicia con la condensación de una unidad iniciadora (e.g. acetilo, procedente de acetil-CoA) generalmente captada por una AT, y cargada a través de un enlace tioéster a un residuo de cisteína del centro activo de la KS, y una unidad extensora (e.g. malonilo, procedente de malonil-CoA), que es transferida al grupo prostético de la ACP (una 4'-fosfopantoteína) mediante la misma AT. A continuación, la KS cataliza una condensación de Claisen entre las dos unidades, produciéndose la consiguiente descarboxilación de la unidad extensora y quedando la nueva cadena de cuatro átomos de carbono así formada unida a la ACP a través del brazo de fosfopantoteína. De los dos grupos ceto presentes, el situado en el carbono β de la cadena puede sufrir a continuación una o más de las reducciones sucesivas catalizadas por las actividades KR, DH y ER, de existir las mismas. En el último paso del ciclo, la cadena completa se transfiere de nuevo a la cisteína de la KS, para ser empleada de nuevo como “unidad iniciadora” (esta vez de cuatro átomos de carbono en lugar de dos) en el siguiente ciclo de elongación de la cadena. Este ciclo de reacciones se repite hasta que la cadena policetídica alcance su tamaño final, momento en que es liberada por la acción de una TE.

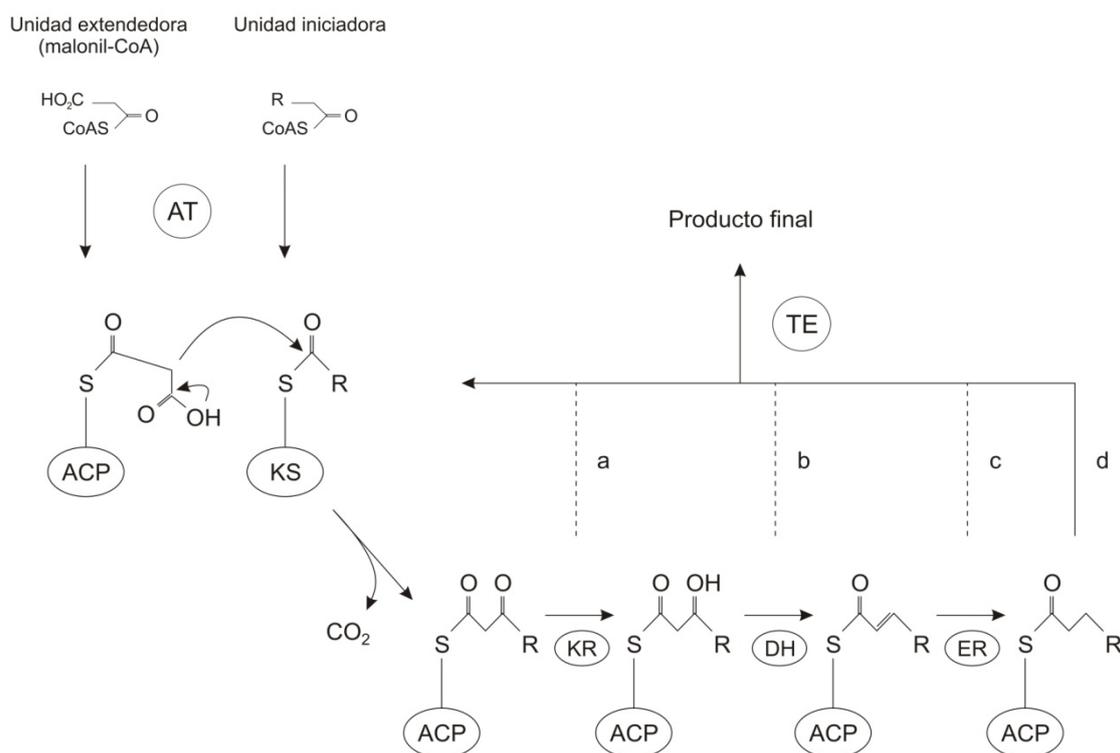


Figura 1.10. Biosíntesis de ácidos grasos saturados y policétidos. En la biosíntesis de ácidos grasos, la reducción de cada unidad siempre es completa, llegando al paso “d”, mientras que en el caso de los policétidos ésta puede detenerse en los pasos “a”, “b” o “c”, o bien llevarse a término, “d”, originándose un grupo ceto, enoilo o alcano, respectivamente. Modificado de Aparicio *et al.* 2004.

Aunque son procesos muy similares, la biosíntesis de policétidos y la de ácidos grasos difieren en varios aspectos con respecto a la actuación de las PKSs y las FAS, de tal modo que los policétidos constituyen un grupo estructuralmente mucho más diverso (Hopwood & Sherman 1990, Katz & Donadio 1993). Esas diferencias son:

1. tanto las unidades iniciadoras como las extensoras utilizadas por las PKSs pueden ser mucho más diversas que en el caso de las FAS;
2. el grado de reducción del grupo ceto es variable en cada uno de los pasos de extensión (mientras que la reducción siempre es total en el caso de la síntesis de ácidos grasos);
3. aparecen en los policétidos numerosos centros quirales, como consecuencia de la estructura de las unidades extensoras (con posibles cadenas laterales) y de las reducciones parciales hasta el grupo hidroxilo;
4. la estructura primaria del policétido se completa normalmente con ciclaciones, plegamientos y otras modificaciones.

Además, también hay que considerar que una vez liberada la cadena policetílica de la ACP por acción de la TE, ésta puede ser objeto de diversas funcionalizaciones llevadas a cabo por otras enzimas relacionadas con la biosíntesis de cada metabolito secundario en particular (e.g. la adición de azúcares a su estructura final) (Sasaki *et al.* 1996). Todos estos elementos y factores implicados en la biosíntesis de los policétidos determinan la estructura química final de la molécula, y contribuyen a la enorme diversidad que caracteriza este grupo de compuestos.

1.4.2.1. Tipos de PKSs

Las PKSs se pueden dividir en tres grupos principales en función de su organización, arquitectura y mecanismo de acción: tipo I, tipo II y tipo III (Shen 2003).

Las **PKSs de tipo I**, o PKSs modulares, son grandes enzimas multifuncionales que incluyen diferentes dominios con actividades catalíticas diversas agrupadas en módulos. Generalmente cada uno de estos módulos contiene al menos tres dominios necesarios para el ciclo de elongación, el antes mencionado núcleo básico (AT, KS y ACP). Adicionalmente, un módulo puede también incluir dominios que alteran el estado de reducción de los grupos ceto (KR, DH o ER), pudiendo contener en total entre tres y ocho dominios. La proteína encargada del inicio de la biosíntesis contiene al menos el módulo de “carga”, responsable de tomar la unidad iniciadora, y éste puede variar bastante: puede estar constituido por los dominios AT y ACP, como en la eritromicina (Pereda *et al.* 1998), o consistir en un dominio completamente diferente como el CoAL, con actividad ácido carboxílico-CoA ligasa, en el caso de la rapamicina (Schwecke *et al.* 1995, Aparicio *et al.* 1996). Además, el módulo de carga o módulo 0 puede estar asociado al primer módulo de elongación formando parte de la misma proteína multienzimática (e.g. candidicina (Campelo & Gil 2002)), o formar por sí solo una proteína diferente (e.g. como ocurre en la biosíntesis de pimáricina (Aparicio *et al.* 1999, 2000) y anfotericina (Caffrey *et al.* 2001)). Durante el proceso de elongación, la cadena policetílica en crecimiento es presentada de manera sucesiva a los diferentes módulos en cada ciclo, en lo que se conoce como “colinealidad”, de tal modo que cada módulo actúa una única vez sobre la cadena (por lo que se dice que estas PKSs no son iterativas). En la síntesis de un policétido pueden estar implicadas varias de estas proteínas, portando cada una de ellas entre uno y seis módulos. Tan solo el último módulo de la última proteína contiene el dominio TE para liberar la cadena policetílica del dominio ACP (Aparicio *et al.* 2003). Se puede decir que las PKSs de tipo I son equivalentes a las FAS de tipo I, propias de hongos y animales (Smith 1994), y

funcionan asociándose como dímeros con orientación antiparalela, formando una doble hélice (Staunton *et al.* 1996).

La 6-desoxieritronólido B sintasa (DEBS) de *Saccharopolyspora erythraea*, responsable de la síntesis del precursor del antibiótico eritromicina, es el arquetipo de PKS de tipo I (Cortes *et al.* 1990, Donadio *et al.* 1991). Otros compuestos sintetizados por PKSs modulares son la rapamicina (Schwecke *et al.* 1995, Aparicio *et al.* 1996), la nistatina (Brautaset *et al.* 2000), la pimáricina (Aparicio *et al.* 1999, 2000), la filipina (Ikeda *et al.* 2003), entre otros. Este tipo de enzimas son bastante comunes en *Streptomyces* y el análisis de los genomas de *S. coelicolor* (Bentley *et al.* 2002) y *S. avermitilis* (Ikeda *et al.* 2003) mostró que contienen tres y ocho PKSs de tipo I, respectivamente.

Las **PKSs de tipo II** (aromáticas o iterativas), son complejos multienzimáticos en los cuales las diferentes actividades enzimáticas son catalizadas por proteínas diferentes que interactúan entre sí en el proceso de elongación de la cadena policetílica. Cada PKS tiene un núcleo básico de tres proteínas; KS_{α} , que presenta las actividades KS y AT; KS_{β} o factor de elongación de cadena (CLF del inglés *chain length factor*), cuya función es homóloga a la KS_{α} pero carece de las actividades KS y AT, estando por lo tanto relacionada con el control del número de elongaciones que producen; y la ACP. La reducción de los grupos ceto sólo se produce cuando existen enzimas con la actividad KR. Así, las moléculas sintetizadas por estas PKSs muestran en general un menor grado de reducción que los sintetizados por las PKSs de tipo I. Sin embargo pueden existir otras actividades, como la aromatasas y ciclasas, que contribuyen a la formación del característico anillo aromático. Debido a su diferente arquitectura, se dice que estas PKSs son equivalentes a las FAS de tipo II, propias de bacterias y plantas (Hertweck *et al.* 2007). Las PKSs de tipo II son responsables de la síntesis de compuestos como la doxorubicina, un importante antitumoral, (Di Marco *et al.* 1969, Grimm *et al.* 1994) y la oviedomicina (Lombó *et al.* 2004), entre otros.

Las **PKSs de tipo III** son diferentes de las otras PKSs tanto estructural como funcionalmente. Son enzimas iterativas homodiméricas de monómeros KS que emplean directamente como sustrato las unidades acil-CoA, de manera independiente de la ACP, de la que carecen. Estas PKSs son propias de plantas pero se han identificado también en *Streptomyces* y otras bacterias (Funa *et al.* 1999), así como en hongos (Seshime *et al.* 2005). Las chalcona sintasas y las estilbeno sintasas son las enzimas de este grupo que han sido estudiadas con mayor profundidad (Schröder & Schröder 1990), en el caso de las primeras debido a su papel en la biosíntesis de flavonoides (Abe & Morita 2010).

No obstante, nuevos estudios en estos últimos años han permitido encontrar numerosas **excepciones** a este modelo general de tres tipos de PKSs (Shen 2003). Así, se han descubierto PKSs de tipo I que funcionan de manera iterativa (e.g. la enzima responsable de la síntesis de la lovastatina (Hendrickson *et al.* 1999, Kennedy *et al.* 1999)), no iterativas de tipo II que carecen de ACP (Kwon *et al.* 2001), e incluso algunas PKSs capaces de catalizar la formación de enlaces carbono-oxígeno, en lugar de los habituales carbono-carbono (Kwon *et al.* 2002).

Además de estas excepciones existen también otro tipo de moléculas, los **policétidos-péptidos no ribosomales**. Este grupo de compuestos se sintetizan por la acción de un sistema híbrido PKS tipo I/NRPS (sintetasas de péptidos no ribosomales, del inglés *non-ribosomal peptide synthetase*). Las NRPSs utilizan una estrategia de biosíntesis similar a las PKSs modulares, con la diferencia de que utilizan aminoácidos como unidades estructurales. Así, los compuestos híbridos derivan de aminoácidos y ácidos carboxílicos de cadena corta. Ejemplos de compuestos policétido-péptido no ribosomales son la bleomicina (Shen *et al.* 2001) y la micobactina (Quadri *et al.* 1998).

Recientemente se ha demostrado que el núcleo básico necesario para que una PKS sea funcional (KS, AT y ACP) puede tener menos de tres dominios. En la síntesis de leinamicina actúan PKSs cuyos módulos no contienen dominios AT, función desempeñada por un dominio AT universal presente en otra proteína (Cheng *et al.* 2003). Pese a ser la primera evidencia de una actividad PKS sin dominio AT, si se analiza en profundidad otras PKSs y enzimas multifuncionales como las NRPSs, este nuevo paradigma no es completamente novedoso porque ya se habían descrito enzimas monofuncionales como componentes de NRPSs, enzimas modulares, sistemas NRPS/PKS y PKSs de tipo II (Hutchinson 1997, Gehring *et al.* 1998, Quadri *et al.* 1998). Lo que sí demuestra es que la modularidad, definida por la presencia de al menos tres dominios enzimáticos (AT, KS y ACP) dentro de la misma proteína, no es precisamente una característica esencial e indispensable de las PKSs modulares (Hutchinson 2003).

1.4.2.2. Modificaciones post-PKS: funcionalización del policétido

Después de ser liberado de la PKS, el esqueleto carbonado del policétido generalmente es sometido a una serie de modificaciones catalizadas por diferentes enzimas, cuyos genes codificantes muchas veces pertenecen al *cluster* biosintético. Estas modificaciones, además de contribuir a la diversidad química estructural de los policétidos,

también funcionalizan la molécula y son muchas veces esenciales para la actividad biológica. Por ejemplo, la estructura básica del policétido puede ser oxidada para introducir grupos hidroxilo o carbonilo, metilada en oxígenos, nitrógenos o carbonos, e incluso adornada con moléculas de desoxiazucars.

Entre las enzimas oxidativas, las más usuales en las agrupaciones génicas biosintéticas de policétidos son las monooxigenasas P450, también denominadas citocromo P450 (CYP). Éstos son citocromos de tipo *b* que contienen la protoporfina IX como cofactor hemo y catalizan reacciones de oxidación estéreo- y regio- específicas del aglicón del policétido. Entre los policétidos en cuya síntesis participan este tipo de enzimas están por ejemplo la picromicina (Xue *et al.* 1998), la oleandomicina (Rodríguez *et al.* 1995), la avermectina (Ikeda *et al.* 1999), la pimaricina (Mendes *et al.* 2001, 2005) y la filipina (Xu *et al.* 2009, 2010). La importancia para estas moléculas de los grupos hidroxilo o epoxi introducidos por las citocromo P450 monooxigenasas se traduce normalmente en un aumento significativo de la actividad biológica. En algunos casos, junto a los genes CYP están genes que codifican ferredoxinas, enzimas cuya función es mediar el transporte de electrones requeridos por los citocromo P450 (O'Keefe & Harder 1991).

Las transferasas son otro tipo de enzimas muchas veces implicadas en estos procesos de modificación del esqueleto carbonado de policétidos. Son capaces de reconocer una gran variedad de estructuras y transferirles diferentes grupos funcionales. En función del grupo funcional que introducen en la molécula se denominan glicosiltransferasas, acetiltransferasas, metiltransferasas, aminotransferasas, etc. Las glicosiltransferasas son especialmente importantes y frecuentes durante la biosíntesis de los policétidos, habitualmente uniendo un desoxiazúcar o aminoazúcar a la aglicona por enlaces glucosídicos. De hecho, en muchos casos la glicosilación parece ser esencial para la actividad biológica del compuesto (Byrne *et al.* 2003, Nedal *et al.* 2007), aunque también existen polienos como la filipina o la micotocina B que presentan actividad antifúngica sin poseer un residuo de azúcar, lo que indica que el azúcar no es estrictamente necesario para la actividad biológica (Martín & McDaniel 1977). Al contrario del resto de los policétidos, entre los polienos hay sin embargo una gran consistencia en cuanto a la glicosilación, utilizando solamente la micosamina u ocasionalmente su isómero, la perosamina, probablemente debido a la gran especificidad presentada por las glicosiltransferasas que modifican estas moléculas.

1.4.3. Biosíntesis combinatoria: fuente de nuevos compuestos

La búsqueda de nuevos fármacos es constante e indispensable, ya sea para hacer frente al creciente número de nuevas infecciones y casos de resistencias a antibióticos, o para mejorar los tratamientos existentes con compuestos más eficaces y, a la vez, con menos efectos secundarios (Walsh 2002, Kong *et al.* 2013). La biosíntesis de policétidos y péptidos no ribosomales ocurre a través de la repetición de los mismos tipos de reacción, la condensación Claisen en el caso de los policétidos y la formación de enlaces peptídicos en el caso de los péptidos no ribosomales. La diversidad estructural de estos productos naturales se alcanza con reacciones de oxidación y reducción, y el empleo de diferentes unidades extensoras. El esqueleto carbonado puede aún sufrir modificaciones, específicas de cada compuesto, que contribuyen a aumentar la complejidad estructural.

La naturaleza modular de las PKSs y las NRPSs, en especial la relación colineal existente entre dominios proteicos y módulos responsables de las diferentes secciones del producto final, hace posible la biosíntesis combinatoria de nuevos productos a través de la manipulación y expresión de estos dominios y módulos (Figura 1.11). Aunque existe un gran número de dianas para la biosíntesis combinatoria y las permutaciones de módulos pueden generar un número enorme de moléculas nuevas, su alcance y el número de variantes estructurales que se pueden generar generalmente dependen de la especificidad de los diferentes dominios y módulos para iniciar, extender y terminar la cadena policetídica o péptido no ribosomal, o la combinación de ambos. Sin embargo se han desarrollado recientemente técnicas de ingeniería genética para la manipulación de sintetasas y así la especificidad de sustrato, actividad e interacciones de estas enzimas (Williams 2013). El cada vez mayor conocimiento del proceso de biosíntesis por parte de PKSs y NRPSs, así como de las modificaciones posteriores, han ayudado al crecimiento de la biosíntesis combinatoria, y al desarrollo de nuevas técnicas, lo que ha permitido mejorar la predicción de resultados (Van Lanen & Shen 2008). La biosíntesis combinatoria llega incluso a ser una herramienta que sobrepasa en muchos aspectos a la síntesis química, puesto que muchos tipos de reacciones son imposibles de reproducir químicamente y, en compuestos tan complejos como éstos, partes de la molécula permanecen inaccesibles para modificaciones químicas (McDaniel *et al.* 1999). Demostrada por primera vez en 1985 (Hopwood *et al.* 1985), la biosíntesis combinatoria se ha empleado con éxito en la síntesis de compuestos con relevancia industrial como la doramectina (Cropp *et al.* 2000) y la epirubicina (Madduri *et al.* 1998).

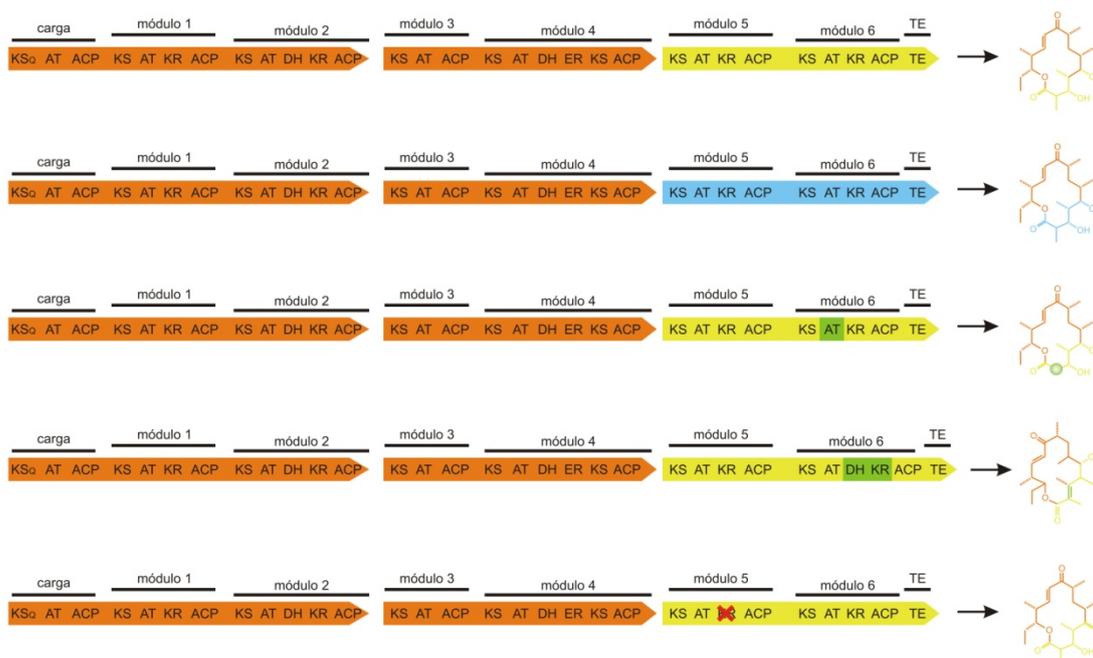


Figura 1.11. Policétido sintetas híbridas y sus productos. Enzimas híbridas obtenidas a partir de subunidades de sintetas para la picromicina (rojo), DEBS para la eritromicina (amarillo) y oleandomicina (azul). Algunas PKSs resultan de versiones alteradas de la DEBS 3, conteniendo dominios de la sintasa para la rapamicina RAPS (en verde), o la delección de un dominio (indicado con una cruz roja). Modificado de Staunton & Weissman 2001.

La manipulación genética para la obtención de nuevos y mejores compuestos es un área en fuerte expansión y ha visto grandes avances, principalmente en el trabajo con macrólidos no polienos. El proceso de biosíntesis se puede modular utilizando diversos abordajes, básicamente eliminando, sustituyendo o añadiendo actividades. Por ejemplo, se puede variar los estados de reducción-oxidación de la molécula interfiriendo con los dominios enzimáticos responsables, intercambiar dominios para sustituir las unidades precursoras, variar la unidad iniciadora interfiriendo con el módulo de carga o eliminar porciones de la molécula final saltando la acción de módulos completos para imposibilitar la introducción de sus unidades precursoras (Brautaset *et al.* 2002, Long *et al.* 2002, Cheng *et al.* 2003, Bruheim *et al.* 2004, Power *et al.* 2008, Murphy *et al.* 2010, Heia *et al.* 2011). También las modificaciones posteriores son objeto de cambios para alterar la molécula final. La glicosilación de policétidos es una fuente de diversidad y se han obtenido muchos nuevos compuestos alterando el azúcar presente en la molécula, su posición, número, etc (Gaisser *et al.* 2000, Hutchinson *et al.* 2010, Shepherd *et al.* 2011, Núñez *et al.* 2012). La manipulación de los citocromo P450 también permite obtener diversos compuestos

análogos interesantes (Mendes *et al.* 2001, Carmody *et al.* 2005, Seco *et al.* 2005, Brautaset *et al.* 2011, Lee *et al.* 2012, Santos-Aberturas *et al.* 2015.).

1.5. Los macrólidos polienos

Los macrólidos poliénicos, o simplemente polienos, constituyen un amplio y diverso grupo de policétidos con actividad antifúngica esencialmente producidos por *Streptomyces* spp. (Martín 1977).

1.5.1. Características estructurales

Los polienos se caracterizan por un anillo macrocíclico polihidroxilado de 20 a 44 átomos de carbono (hasta el doble de los que forman los macrólidos no poliénicos (Aparicio *et al.* 2004)), ciclado por la formación de un enlace lactona, y con tres a ocho dobles enlaces conjugados que constituyen como cromóforo. Este cromóforo confiere al polieno muchas de sus propiedades físicas y químicas como su espectro de absorción característico en el ultravioleta-visible y su fotolabilidad. En función del número de dobles enlaces que forman el cromóforo, los polienos se pueden clasificar como trienos, tetraenos, pentaenos, y así sucesivamente. Adicionalmente, el anillo macrolactona (o aglicón) contiene un anillo secundario de tipo hemicetal de seis miembros que se forma de manera espontánea entre un grupo cetónico y un hidroxilo (Martín & Aparicio 2009), y que habitualmente contiene un grupo carboxilo exocíclico derivado a partir de la oxidación de un radical metilo. Otra característica estructural de los polienos es la presencia de un residuo de azúcar, generalmente un aminoazúcar, unido al aglicón por un enlace glucosídico, si bien en algunos casos no existen azúcares, y en otros existen dos. En la mayoría de los casos este azúcar es una micosamina (3-amino-3,6-didesoxi-D-manopiranososa), un aminoazúcar derivado de la manosa (Nedal & Zotchev 2004b, Nedal *et al.* 2007) que en la naturaleza aparece exclusivamente asociado a este tipo de compuestos (Aparicio *et al.* 2004). También están descritos azúcares neutros, como la 2,6-dideoxi-L-ribohexopiranososa en la molécula de la polifungina B, y la perosamina (el isómero de la micosamina), en el caso de la perimicina (Pawlak *et al.* 1995). En la Figura 1.12 se puede observar la estructura química de algunos de estos compuestos. Estas moléculas son característicamente anfipáticas. La región del cromóforo tiene una naturaleza lipofílica, plana y rígida, mientras que la región hidroxilada es flexible e hidrofílica.

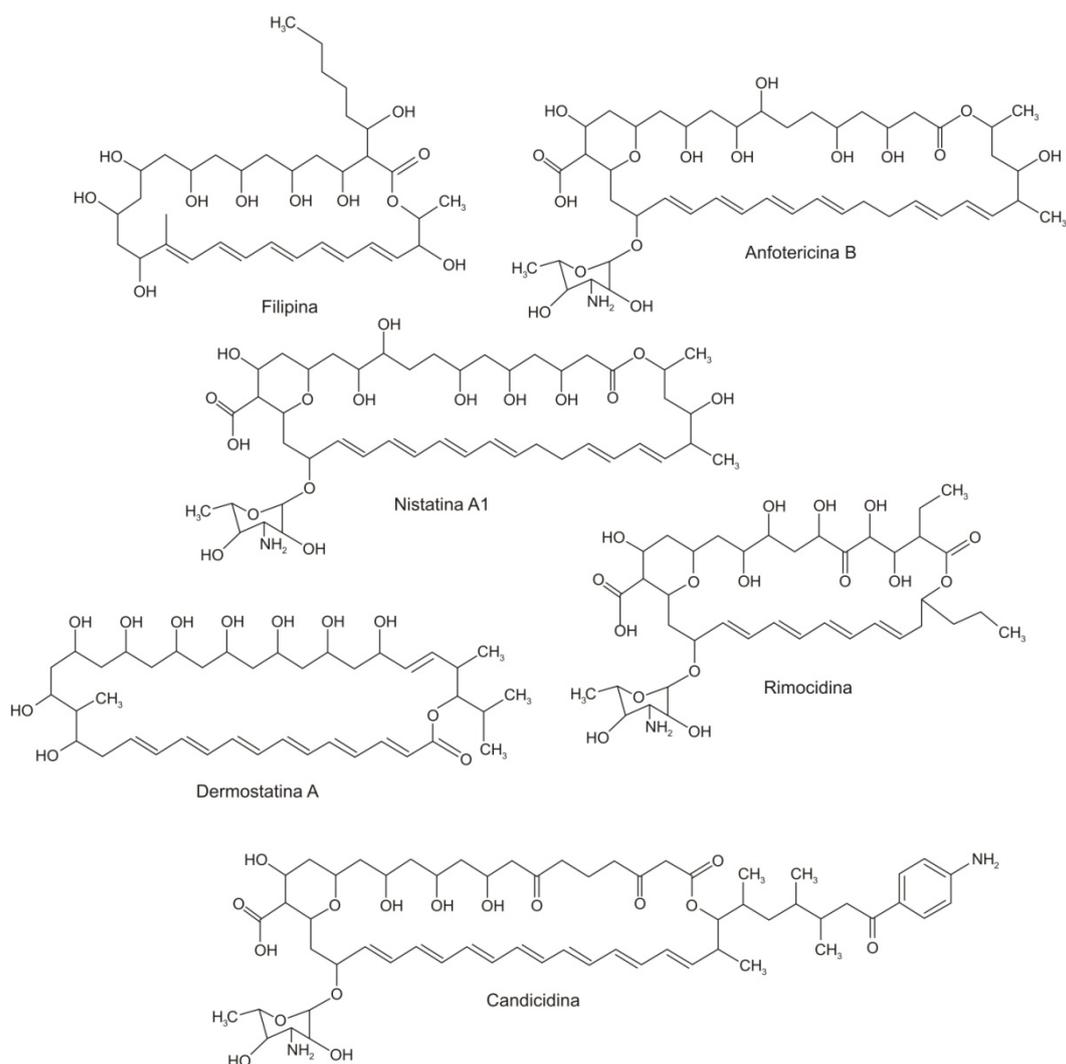


Figura 1.12. Estructura química de algunos macrólidos polienos glicosilados (anfotericina, nistatina, rimocidina y candicidina) y no glicosilados (filipina y dermostatina). Nótese las características estructurales distintivas de estos compuestos (ver texto).

1.5.2. Principales polienos

Desde el descubrimiento de la nistatina en la década de los 50 (Hazen & Brown 1950), se han descrito más de 200 antibióticos macrólidos polienos. Los más importantes y característicos del grupo son la anfotericina B, la nistatina, la pimarcina, la filipina y la candicina.

La **nistatina** (cuyo nombre en inglés, *nystatin*, deriva de *New York State*) fue el primer antibiótico antifúngico en ser descubierto. Se trata de un tetraeno glicosilado producido por *S. noursei*, pero dada su estructura es habitual referirse a la nistatina como un

pseudotetraeno o heptaeno degenerado, ya que sólo la actividad ER del módulo 5 de la PKS NysC evita que la molécula final contenga siete dobles enlaces conjugados. La agrupación génica responsable de la biosíntesis de la nistatina, así como la ruta biosintética en sí, están completamente caracterizadas (Brautaset *et al.* 2000, Zotchev & Caffrey 2009). La nistatina se usa mayoritariamente en el tratamiento de infecciones fúngicas tópicas. Debido a su baja actividad antifúngica y capacidad de penetración en la piel, además de la toxicidad que presenta cuando se administra por vía intravenosa, resulta ineficaz en el tratamiento de las micosis sistémicas.

La **pimaricina**, o **natamicina** como también es conocida, es un tetraeno glicosilado con fuerte actividad antifúngica. La agrupación génica que codifica las proteínas implicadas en la ruta biosintética, así como las reacciones que llevan a su síntesis, han sido completamente caracterizadas (Aparicio *et al.* 1999, 2000; Martín & Aparicio 2009). La naturaleza antifúngica de este compuesto hace que tenga aplicaciones en la práctica clínica, esencialmente en el campo de la oftalmología para la prevención y tratamiento de queratitis de origen fúngico o queratomycosis (Thomas 2003), y en la industria alimentaria donde su uso está aún más extendido. Se hablará con más profundidad de este compuesto en el apartado 1.5.5.

La **filipina** es un polieno de cinco dobles enlaces conjugados y modelo de los macrólidos polienos no glicosilados. Por ello, es una parte esencial de este trabajo y se tratará con más profundidad en el apartado 1.6.

De entre todos los polienos, la **anfotericina B** es probablemente el más importante por su utilización en clínica. Se trata de un heptaeno glicosilado (Kotler-Brajtburg *et al.* 1979), obtenido por primera vez a partir de una cepa de *S. nodosus* (Oura *et al.* 1955), y su nombre proviene de su naturaleza anfótera. La anfotericina es utilizada como antifúngico desde que fue autorizada por la FDA en 1975 y constituye la herramienta terapéutica más poderosa que existe frente a las micosis sistémicas. Sin embargo, varios factores como su insolubilidad en medios acuosos, la falta de una formulación que permita su administración por vía oral, y sus numerosos efectos secundarios impiden la extensión de su uso. La agrupación biosintética responsable de la producción de este compuesto ha sido estudiada en profundidad y completamente caracterizada (Caffrey *et al.* 2001, Zotchev & Caffrey 2009).

Algunos polienos, como la candicidina y la aureofungina, se incluyen en el subgrupo de los **polienos aromáticos** (Kotler-Brajtburg *et al.* 1979) por emplear en su biosíntesis el ácido *para*-aminobenzoico (PABA) como unidad iniciadora (Martín & Aparicio 2009), generándose un anillo aromático en una cadena lateral del compuesto final. La **candicidina** es producida por *S. griseus* IMRU 3570 y se describió por primera vez en 1953 como antibiótico C135 (Lechevalier 1953). Más tarde fue renombrada como candicidina por su potente acción frente a especies del género *Candida*. Recientemente también se ha demostrado que el polieno FR-008 producido por *Streptomyces* sp. FR-008 y la candicidina son compuestos idénticos (Chen *et al.* 2003). La candicidina tiene la peculiaridad de ser uno de los pocos metabolitos secundarios cuya función antibiótica en la naturaleza ha sido demostrada. Una cepa de *S. griseus* que la produce es utilizada de forma simbiótica por hormigas cortadoras de hojas para prevenir la contaminación de sus cultivos de hongos (resistentes a la candicidina y cuyo sustrato nutricional son las hojas recogidas) con hongos oportunistas (Haeder *et al.* 2009, Kaltenpoth 2009). La biosíntesis de la candicidina así como la agrupación génica responsable por la ruta biosintética han sido estudiadas en profundidad (Gil & Hopwood 1983, Criado *et al.* 1993, Campelo & Gil 2002, Gil & Campelo-Diez 2003). Los polienos aromáticos tienen una fuerte actividad contra *Candida* y *Saccharomyces* y varios hongos filamentosos. Sin embargo, son más tóxicos que los polienos no aromáticos por lo que tienen un uso limitado como agentes antifúngicos.

1.5.3. Modo de acción

Los macrólidos polienos presentan una potente actividad antifúngica que se asienta en su capacidad para interactuar con los esteroides de membrana. Sin embargo, la naturaleza de dicha interacción no se conoce todavía con exactitud. Lo que sí se sabe es que la diferencia de composición entre las membranas fúngicas, que contienen ergosterol, y las membranas de células animales, que contienen colesterol, es la base para la toxicidad selectiva de los polienos para los hongos (Aparicio *et al.* 2004). Además, aunque todos comparten la misma diana, el modo de acción de cada tipo de polieno es diferente.

En el caso de polienos como la nistatina o la anfotericina B se piensa que sus características estructurales (el cromóforo, el anillo hemicetal y el azúcar) son la base de su modo de acción (Aparicio *et al.* 2004). Se asocian al ergosterol de las membranas celulares de hongos, interactuando con él a través de su región hidrófoba y dando lugar a estrechos poros con los residuos hidroxilo girados hacia dentro, a través de los cuales se pierden

caciones monovalentes como K^+ , provocando la muerte celular por cambios en los gradientes electroquímicos. En el caso de la anfotericina B, recientemente se ha demostrado que la unión de la molécula del polieno al ergosterol es suficiente para la actividad fungicida y que la formación del poro representa un segundo mecanismo complementario que contribuye para aumentar aún más la tasa de muerte celular y con ello la eficacia del fármaco (Gray *et al.* 2012).

Sorprendentemente la pimaricina, un polieno de pequeño tamaño de naturaleza anfipática, no actúa alterando la permeabilidad de la membrana celular como inicialmente se creía. Se ha demostrado que, pese a la unión específica de la pimaricina al ergosterol, la muerte celular no resulta de este tipo de fenómenos (de Welscher *et al.* 2008) sino inhibiendo aquellos procesos celulares que requieren la interacción del ergosterol con determinadas proteínas, e.g. la endocitosis durante la germinación de las conidiosporas de *Penicillium discolor* (Van Leeuwen *et al.* 2009) o la fusión vacular en *Saccharomyces cerevisiae* (de Welscher *et al.* 2010).

Por otro lado, polienos no glicosilados y sin grupo carboxílico exocíclico (y por tanto de carácter predominantemente hidrófobo, como la filipina) interactúan con el ergosterol de manera diferente. En este caso, las moléculas del polieno se asocian con los esteroides formando una micela de exterior totalmente hidrófobo, que se sitúa entre las dos capas lipídicas de la membrana provocando una distorsión que altera la permeabilidad de la misma y puede incluso llevar a su ruptura (Aparicio *et al.* 2004).

Al contrario de lo que ocurre con la filipina, la afinidad que la nistatina, la anfotericina o la pimaricina presentan por el ergosterol es mucho mayor que por el colesterol, lo que explica su relativa baja toxicidad y posibilita, si bien de manera restringida, su uso terapéutico frente a las micosis sistémicas. Independientemente de esto, resulta notable que todos los polienos actúen sobre una diana bioquímica evolutivamente tan estable como los esteroides de membrana, difícilmente sujeta a cambios estructurales. Esto explica el escaso número de cepas de hongos resistentes a su acción, que si bien no son inexistentes, sí resultan más raras que en el caso de otros antifúngicos. Un caso de ineficacia de los polienos frente a un hongo es *Pneumocystis carinii*, un patógeno oportunista que carece de ergosterol en sus membranas celulares, siendo el principal esteroide presente en ellas el colesterol que toma de su hospedador (Kaneshiro 2004).

1.5.4. Aplicaciones

Las propiedades antifúngicas características de los polienos hacen que su principal aplicación sea en clínica, para el tratamiento de infecciones fúngicas (y en el caso de la pimaricina, sobre la que se hablará con más detalle en el apartado 1.5.5, también tiene un uso extendido como antifúngico en la industria alimentaria). Se han desarrollado diversas formulaciones para hacer frente a micosis superficiales y sistémicas, y como se ha mencionado anteriormente, el máximo representante de este grupo de polienos es la anfotericina B. Sin embargo, se han ido descubriendo otras actividades biológicas que posibilitan diferentes aplicaciones.

Algunos polienos con propiedades antibióticas pueden ser utilizados como antivirales (Kessler *et al.* 1981, Malewicz *et al.* 1984, Pontani *et al.* 1989), para estimular el sistema inmune (Yamaguchi *et al.* 1993), como inmunosupresores (Calne *et al.* 1989), antitumorales (Aszalos *et al.* 1968, Pawlak *et al.* 1980) o antibacterianos (Aizawa *et al.* 1971, Nishikiori *et al.* 1978). Por ejemplo el pentaeno faerifungina, producido por *S. griseus* var. *autotrophicus*, es un potente antibiótico de amplio espectro, activo frente a hongos, bacterias, nemátodos y larvas de mosquitos (Nair *et al.* 1989). Otros, como la nistatina o la anfotericina B muestran actividad antiparasitaria (Cohen K. 1990, Ali *et al.* 1997), e incluso otros como la filipina (de la que se hablará en mayor profundidad en el apartado 1.6) y la anfotericina B se han utilizado para prevenir la acumulación patológica de proteínas priónicas en ciertas escefalopatías (Mangé *et al.* 2000, Marella *et al.* 2002, Soler *et al.* 2008). Los polienos pueden también actuar sinérgicamente con otros fármacos como antitumorales, por lo que se suministran de forma combinada para potenciar su efecto (Valeriotte *et al.* 1984, Bolard 1986).

1.5.5. La pimaricina: un modelo de polieno

La pimaricina, también conocida como natamicina, es un tetraeno glicosilado y constituye un interesante prototipo para el estudio de este tipo de polienos. La primera cepa productora de este compuesto en ser aislada fue *S. natalensis* en 1958, a partir de una muestra de suelo de la región sudafricana de Natal (“Natividad”, en portugués, por haber desembarcado Vasco da Gama en sus costas el 25 de diciembre de 1497, y de ahí su nombre) (Struyk *et al.* 1957). Sin embargo se conocen al menos otras dos especies capaces de sintetizar pimaricina, *S. gilvosporeus* y *S. chattonoogensis*.

Pese a que el genoma de *S. natalensis* aún no está publicado, el *cluster* génico responsable de la biosíntesis de pimáricina ha sido completamente secuenciado y caracterizado (Aparicio *et al.* 1999, 2000; Antón *et al.* 2004, 2007; Vicente *et al.* 2009). Además, existen estudios que inciden sobre otras regiones del cromosoma y éstas están también disponibles, como la del plásmido pSNA1 (Mendes *et al.* 2000), los genes reguladores *phoU*, *phoR* y *phoP* (Mendes *et al.* 2007b), y los genes relacionados con la síntesis y recepción de γ -butirolactonas (Lee *et al.* 2005b, 2008).

1.5.5.1. Estructura y aplicación

La molécula de pimáricina (Figura 1.13) es relativamente pequeña, con un anillo macrolactona formando por 26 átomos de carbono con cuatro dobles enlaces conjugados. Se caracteriza por la presencia de un grupo epóxido formado entre los carbonos 4 y 5 del anillo, el aminoazúcar micosamina unido al carbono 15, un anillo interno hemicetal de seis miembros formando de manera espontánea entre los carbonos 9 (con un grupo ceto) y 13 (con un grupo hidroxilo), y además cuenta con un grupo carboxilo exocíclico, derivado de la oxidación de un grupo metilo preexistente en el carbono 12 (Golding & Rickards 1966, Martín & Aparicio 2009).

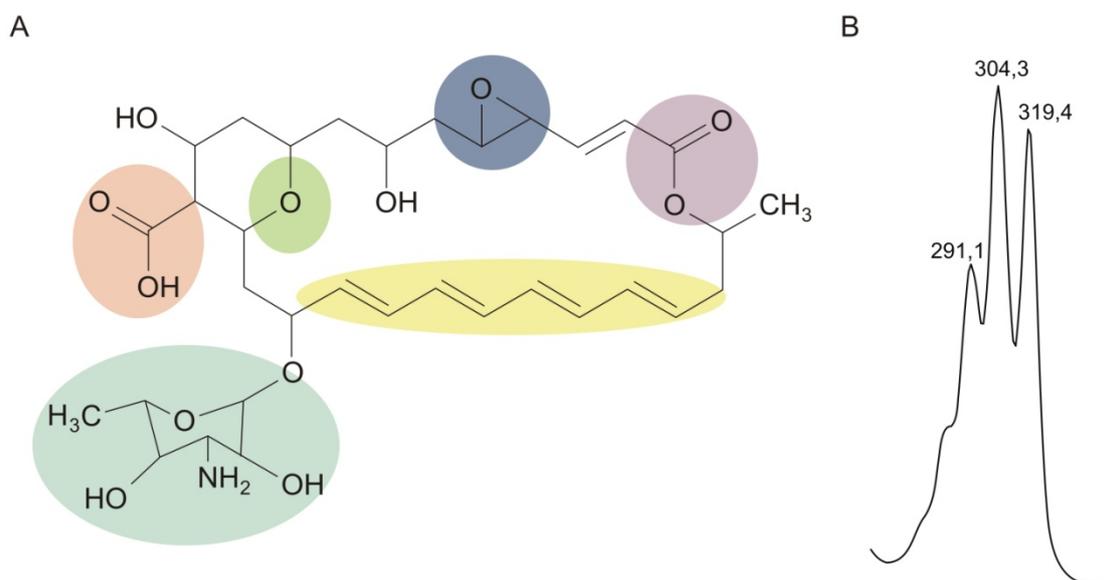


Figura 1.13. La pimáricina. (A) Estructura química de la pimáricina. Los círculos coloreados destacan las características distintivas de este compuesto, específicamente el grupo carboxilo exocíclico (rosa), el enlace hemicetal que cierra el anillo secundario (verde), el grupo epóxido (azul oscuro), el enlace lactona que circulariza el anillo macrocíclico (púrpura), el cromóforo de dobles enlaces conjugados (amarillo) y la micosamina (azul claro). (B) Espectro de absorción de la pimáricina, con tres picos máximos de absorción típicos del cromóforo de los tetraenos. Las longitudes de onda (nm) están indicadas.

Las mencionadas propiedades antifúngicas de la pimaricina, junto con su amplio espectro de actividad y la baja posibilidad de causar resistencias microbianas, hacen que sea empleada en clínica, particularmente en oftalmología para el tratamiento y prevención de queratitis de origen fúngico y, en menor medida, en dermatología. Sin embargo, el uso más extendido de este compuesto se produce en la industria alimentaria, donde se utiliza como aditivo alimentario para prevenir la contaminación por hongos y las inherentes intoxicaciones por micotoxinas de alimentos no estériles, como quesos y carnes curadas. De hecho, es el único macrólido polieno con estatus GRAS (del inglés *generally regarded as safe*) y aprobado por la FDA (agencia reguladora de alimentos y medicamentos, del inglés *Food and Drug Administration*) en Estados Unidos y en la Unión Europea, donde su código como aditivo alimentario es el E-235. En otros países, como Australia, Chile o Sudáfrica, su utilización se amplía a muchos otros productos, como bebidas, salsas, yogures, comidas preparadas y alimentos frescos. El hecho de que por norma se prohíba la adición de antibióticos a los alimentos hace de la pimaricina una excepción notoria y explica su importancia económica y sanitaria. La seguridad del uso de este compuesto radica en su afinidad específica para el ergosterol presente en las membranas citoplasmáticas de hongos, y su consecuente baja afinidad para el colesterol, principal esteroide de las membranas citoplasmáticas de células de mamífero.

1.5.5.2. Agrupación biosintética en *S. natalensis*

El *cluster* biosintético de la pimaricina (Figura 1.14) está formado por 19 genes que abarcan una región de aproximadamente 100 kb.

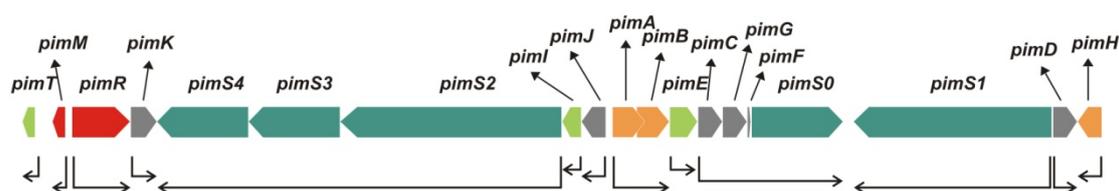


Figura 1.14. El *cluster* génico para la biosíntesis de pimaricina. Se representan los 19 genes que constituyen la agrupación con diferentes colores, según su función: PKSs (azul), modificaciones post-PKS (gris), secreción de pimaricina (naranja), reguladores específicos de ruta (rojo) y otros mecanismos regulatorios (verde). Las flechas negras representan la organización transcripcional (Santos-Aberturas *et al.* 2011b).

De entre los genes del *cluster*, cinco codifican PKSs de tipo I (*pimS0*, *pimS1*, *pimS2*, *pimS3* y *pimS4*). Estas enzimas contienen, en conjunto, los 13 módulos necesarios para la

síntesis del esqueleto policetídeo de la pimaricina, denominado pimaricinolida: PimS0 constituye el módulo de carga, PimS1 contiene los módulos 1 a 4, PimS2 los módulos 5 a 10, PimS3 el módulo 11, y PimS4 el módulo 12 (Aparicio *et al.* 1999). Además, seis genes codifican proteínas responsables de las modificaciones post-PKS (*pimC*, *pimD*, *pimF*, *pimG*, *pimK* y *pimJ*), otros tres codifican transportadores posiblemente relacionados con la secreción de la molécula de pimaricina (*pimA*, *pimB* y *pimH*) (Aparicio *et al.* 2000), y cuatro genes están implicados en la regulación que controla la producción de este compuesto (*pimE*, *pimM*, *pimR* y *pimT*) (Antón *et al.* 2004, 2007; Mendes *et al.* 2007a, Vicente *et al.* 2009). Por último, *pimI* codifica una enzima con actividad TE discreta (independiente del dominio TE presente en PimS4, que libera y cicla la cadena policetídea), que parece realizar un proceso de control de calidad del proceso de elongación de la cadena policetídea, eliminando grupos acilo descarboxilados de manera prematura tras su unión a la ACP que de otro modo bloquearían la condensación de Claisen (Kim *et al.* 2002).

1.5.5.3. Biosíntesis de la pimaricina

La **síntesis de la pimaricinolida** (Figura 1.15) se inicia en el módulo de carga PimS0, empleándose como unidad iniciadora un acetato procedente de una molécula de acetil-CoA. Este módulo presenta una estructura peculiar e incluye varios dominios, que van desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal en el siguiente orden: acil-CoA ligasa, ACP, KS^S (del inglés, *β -ketoacyl synthase serine*), AT y otro ACP. Se cree que la acil-CoA ligasa activa el acetato, que más tarde es transferido por la ACP N-terminal hasta el dominio KS^S. Por su parte, el dominio KS^S, que presenta en su centro activo la sustitución del residuo de cisteína característico de estos dominios por uno de serina y por eso no cataliza una reacción de condensación, transfiere el grupo acetilo hasta el ACP C-terminal, que a su vez lo cederá al residuo de cisteína del dominio KS N-terminal del módulo 1 de la PimS1. Este módulo catalizará el primer ciclo de elongación de la cadena utilizando como unidad extensora un malonil-CoA. Las restantes condensaciones descarboxilativas tendrían lugar en los módulos siguientes, repitiendo el proceso realizado por el módulo 1 y utilizando las siguientes unidades extensoras: 12 grupos acetato procedentes del malonil-CoA y un propionato de un metilmalonil-CoA (introducido por el módulo 7 en PimS2). El módulo 9 contiene un KR inactivo, a causa de la existencia de dos sustituciones no conservativas en su sitio de unión a NADP(H) (Aparicio *et al.* 1999, 2000). Por último, el dominio TE C-terminal del módulo 12 en PimS4 libera la cadena policetídea como una lactona macrocíclica, la pimaricinolida (Martín & Aparicio 2009).

A continuación, la pimarínolida sufre tres de **modificaciones post-PKS** (Figura 1.15).

La primera de estas modificaciones es la **oxidación del grupo metilo** situado en el carbono 12 y, pese a la falta de comprobación experimental directa, parece claro que esta reacción la lleva a cabo el citocromo P450 PimG junto con la ferredoxina PimF (Omura 2010). La prueba para este modelo viene de un estudio en que la interrupción del gen homólogo a *pimG* en el *cluster* biosintético de la anfotericina en *S. nodosus*, *amphN*, resulta en la pérdida del grupo carboxilo exocíclico (Carmody *et al.* 2005). De este modo, se formaría el siguiente precursor de la ruta biosintética de la pimaricina, la 12-carboxipimarínolida.

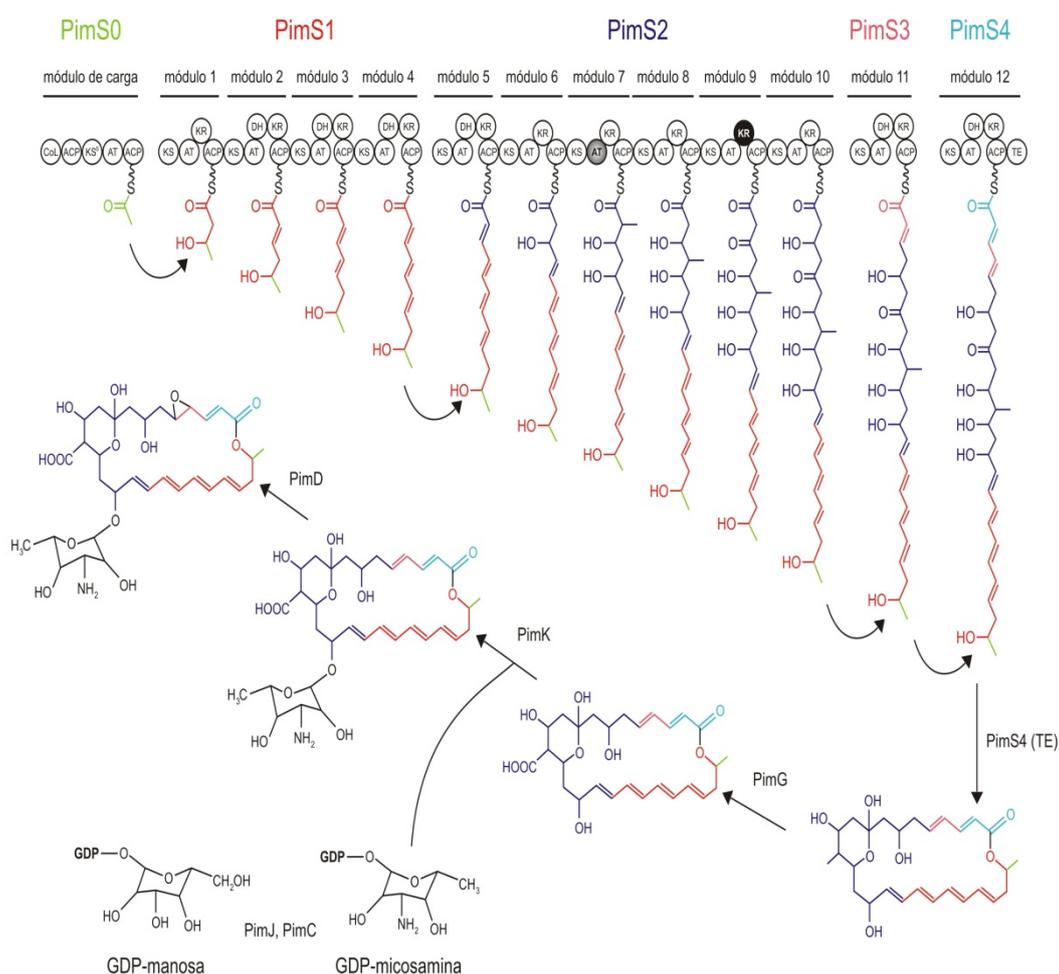


Figura 1.15. Biosíntesis de la pimaricina. Cada círculo representa un dominio (ver texto). El dominio AT del módulo 7 (gris) incorpora una unidad de propionato a la cadena. El dominio KR del módulo 9 (negro) no es funcional. Modificado de Martín & Aparicio 2009.

La **glucosilación** de la 12-carboxipimarínolida es el paso siguiente. La adición de la molécula de micosamina al carbono 15 ocurre en un proceso catalizado por la acción

secuencial de PimJ (GDP-manosa deshidratasa), PimC (aminotransferasa) y PimK (glicosiltransferasa) utilizando GDP-manosa como precursor (Aparicio *et al.* 2000, Nedal & Zotchev 2004) (Figura 1.15). Así se obtiene el último precursor de la pimaricina, la 4,5-desepoxipimaricina.

Por último, la **epoxidación** de la 4,5-desepoxipimaricina es catalizada por PimD, una citocromo P450, y resulta en la molécula final de pimaricina (Figura 1.15). Esta enzima oxida el doble enlace existente entre los carbonos 4 y 5 dando lugar al grupo epóxido (Mendes *et al.* 2005, Kells *et al.* 2010). Curiosamente, PimD parece exhibir especificidad de sustrato ya que la presencia de la micosamina unida a la 12-carboxipimaricinolida parece ser indispensable para el reconocimiento del sustrato, puesto que la mutación de *pimK* da lugar a la acumulación de 12-carboxipimaricinolida y no de un glicón epoxidado (Mendes *et al.* 2001).

1.5.5.4 Regulación de la producción de pimaricina en *S. natalensis*

La red reguladora que controla el metabolismo secundario, como ya se ha mencionado, es compleja y pueden existir muchas y diversas interacciones entre los diferentes niveles. En el caso de los macrólidos polienos, casi todo el conocimiento que existe sobre la regulación de la producción de estos compuestos se debe a estudios que inciden sobre la modulación de la biosíntesis de pimaricina en *S. natalensis*. Así, se conocen mecanismos reguladores que abarcan casi todos los niveles de la jerarquía del modelo clásico de regulación. Pese a ello, el hecho de que la secuencia completa del genoma de *S. natalensis* aún no esté disponible dificulta la obtención de una visión global de la red de regulación. En los últimos años, sin embargo, se ha avanzado mucho en el conocimiento de estos procesos.

Estudios sobre el control por **fosfato** muestran que la producción de pimaricina en *S. natalensis* responde a las concentraciones de fosfato inorgánico (Pi) presentes en el medio, del mismo modo que muchos otros metabolitos secundarios. Concentraciones de Pi en el medio superiores a 1 mM resultan en una disminución drástica de la producción de pimaricina, y con una concentración por encima de 10 mM la expresión del *cluster* biosintético está completamente bloqueada (Mendes *et al.* 2007b). Mutantes con *phoP* interrumpido y mutantes con *phoR-phoP* delecionados muestran una atenuación del control ejercido por el Pi sobre la producción de pimaricina. Además, en medios no suplementados con fosfato, ambas cepas mutantes presentan un aumento considerable en la producción de

pimaricina cuando se comparan con la cepa silvestre. Se ha visto un efecto de modulación de la expresión de *pimS1*, *pimS4*, *pimC* y *pimG* en dichos mutantes. Sin embargo, no se han encontrado cajas PHO en el *cluster* biosintético, por lo que se piensa que el control que el sistema PhoR-PhoP ejerce sobre la producción de pimaricina es indirecto (Mendes *et al.* 2007b).

Fue en *S. natalensis* donde se identificó un compuesto con características de señal de *quorum sensing* pero con una estructura nunca antes vista en compuestos de este tipo, el 2,3-diamino-2,3-(hidroximetil)-1,4-butanodiol, el inductor de pimaricina o **factor PI** (Recio *et al.* 2004) (Figura 1.6). El mecanismo por el que el factor PI controla la producción de pimaricina aún se desconoce pero un mutante denominado *npi287* y obtenido al azar con nitrosoguanidina es incapaz de producir PI y pimaricina. En estudios posteriores se ha identificado la proteína transportadora PimT, perteneciente a la familia de transportadores de aminoácidos LysE, como una de las vías a través de las cuales el factor PI es secretado hacia el exterior de la célula, y además se ha demostrado que el factor PI es capaz de inducir la expresión de *pimT* (Vicente *et al.* 2009). Recientemente se ha llevado a cabo la síntesis artificial completa de este compuesto, lo que podrá facilitar futuros estudios de su efecto regulador (Morin & Sello 2010).

Pese a que no se han detectado γ -butirolactonas en *S. natalensis* (Recio *et al.* 2004, Lee *et al.* 2008), sí se conocen dos genes relacionados con su síntesis y recepción, y que participan en la **regulación pleiotrópica de la producción de pimaricina**. El gen *sngR* codifica un receptor de γ -butirolactonas que regula negativamente y de forma simultánea la producción de pimaricina y la esporulación (Lee *et al.* 2005b). El otro gen, *sngA*, codifica un regulador pleiotrópico (homólogo de BarX, regulador pleiotrópico que controla la producción de una γ -butirolactona y de virginamicina en *S. virginiae* (Kawachi *et al.* 2000)) y su disrupción interfiere con los procesos de síntesis de pimaricina y de diferenciación morfológica, actuando como regulador positivo (Lee *et al.* 2008). Pese a esto, el factor A de *S. griseus* es capaz de restablecer la producción de pimaricina en el mutante *npi287* (Recio *et al.* 2004). Además, se ha observado que altas concentraciones de determinados compuestos como el glicerol, el etilenglicol, el 1,2-propanodiol y el 1,3-propanodiol son también capaces de inducir la síntesis de pimaricina en la misma cepa, aunque probablemente por una vía diferente al factor PI (Recio *et al.* 2006).

En el *cluster* de la pimaricina en *S. natalensis* se ha identificado una **colesterol oxidasa**, PimE; cuyo efecto sobre la producción de pimaricina es peculiar. Se trata de una

proteína extracelular y sin dominio de unión a ADN, que no participa directamente en el proceso de biosíntesis de la molécula de pimaricina. Sin embargo, un mutante interrumpido en *pimE* es incapaz de producir este compuesto tratándose así de un gen esencial para la biosíntesis (Mendes *et al.* 2007a). El hecho de que existan genes ortólogos situados en *clusters* de otros macrólidos como la filipina (*pteG*) y la rimocidina (*rimD*) sugiere que éste es un fenómeno conservado, si bien el papel exacto que juega la colesterol oxidasa en la biosíntesis de estos compuestos aún queda por elucidar.

Se han identificado además dos **reguladores específicos de ruta** en el lado izquierdo del *cluster* de la pimaricina: PimR y PimM. Ambos ejercen una función de regulación positiva sobre la biosíntesis de pimaricina y presentan una arquitectura peculiar.

PimR es un regulador transcripcional de gran tamaño (1198 aa) de tipo “large SARP”, que combina un dominio de unión al DNA de tipo SARP en la región N-terminal y un dominio AAA en la región central. La región C-terminal posee una alta similitud con la región N-terminal de reguladores de tipo LAL, así como una identidad del 25 % con guanilato ciclasas (ver Figura 1.8 y apartado 1.3.4.1). Esta arquitectura sugiere que este regulador resulta de la asociación de un dominio de unión de tipo SARP con el dominio regulador de una proteína de tipo LAL, y por ello, y por haber sido el primero de su clase en ser descrito, PimR se consideró como el arquetipo de una nueva familia de reguladores transcripcionales (Antón *et al.* 2004).

Mutantes en *pimR*, obtenidos tanto por disrupción como por delección del gen, son incapaces de producir pimaricina lo que sugiere que PimR es un regulador positivo de la biosíntesis de este tetraeno (Antón *et al.* 2004, Santos-Aberturas *et al.* 2012). El análisis transcripcional del mutante Δ *pimR* muestra una importante disminución de la expresión de todos los genes biosintéticos de la agrupación, especialmente en el caso del gen que codifica la colesterol oxidasa *pimE*, cuya transcripción está completamente bloqueada (Antón *et al.* 2004).

Estudios recientes muestran que PimR reconoce una secuencia con tres repeticiones heptaméricas directas separadas por cuatro nucleótidos, localizada en la región intergénica entre *pimM* y *pimR*. Ésta es la única diana de PimR en el *cluster* de la pimaricina. De hecho, la expresión de *pimM* depende completamente de la presencia de PimR. La sobreexpresión de *pimM* circunvala la mutación Δ *pimR* en cuanto a la producción de pimaricina, demostrando así que el efecto positivo de PimR sobre la biosíntesis ocurre vía

el regulador PimM, que controla la expresión de la mayoría de los genes del *cluster*. PimR está así en una posición superior a PimM en la cascada reguladora de la biosíntesis de pimaricina en *S. natalensis* (Santos-Aberturas *et al.* 2012). Sin embargo, aún se desconocen ciertos aspectos de los mecanismos que controlan la biosíntesis de la pimaricina en *S. natalensis* y de las funciones de estos reguladores. Por ejemplo, *pimH* no es regulado directamente por PimM pero sus niveles de transcripción bajan en el mutante $\Delta pimR$, lo que indica que otros reguladores ajenos al cluster participan en el control de la biosíntesis.

Existen varios ortólogos a PimR en *clusters* biosintéticos de *Streptomyces* pero de entre los macrólidos polienos el único es PteR, del *cluster* de la filipina en *S. avermitilis*. No obstante, resulta notable que otros ortólogos de PimR como SanG (nikkomicina) y PolR (polioxina) regulen la producción de compuestos estructuralmente diferentes y con modos de acción distintos, pero siendo todos ellos, incluyendo la filipina, antifúngicos.

El otro regulador presente en el *cluster* de la pimaricina es **PimM**, un regulador transcripcional de tipo PAS-LuxR de pequeño tamaño (192 aa) que, como su nombre indica, combina un dominio de unión al DNA de tipo LuxR en la región C-terminal con un dominio sensor de tipo PAS en la región N-terminal (ver Figura 1.9 y apartado 1.3.4.3) (Antón *et al.* 2007).

El mutante $\Delta pimM$ no produce pimaricina y además, a nivel transcripcional, muestra la represión generalizada de los genes del *cluster*, lo que indica que PimM es un regulador positivo (Antón *et al.* 2007). Su efecto regulador es especialmente fuerte en la expresión de los genes *pimB*, *pimC*, *pimG*, *pimF*, *pimS0*, *pimS1* y *pimD* dado que no se consiguió llegar a detectar sus transcritos en el mutante, mientras que otros genes presentan una disminución en su expresión (*pimK*, *pimS4*, *pimS3*, *pimS2*, *pimI*, *pimJ* y *pimA*). Los genes *pimE* y *pimH* son los únicos cuya expresión no se ve afectada por la mutación del regulador, así como los genes que codifican los reguladores *pimM* y *pimR*, descartándose de este modo un mecanismo de autoregulación entre los reguladores del *cluster* (Antón *et al.* 2007).

Recientemente se ha demostrado que PimM reconoce y se une a una secuencia palindrómica de 16 bp que solapa con la región -35 del promotor de los genes cuya expresión modula (Figura 1.16). El dominio de unión al DNA LuxR es el responsable de esa asociación, mientras que el dominio PAS, al contrario que en otros reguladores con dominios PAS, no modula la especificidad por la secuencia reconocida, sino que afecta a la afinidad de unión al DNA y de manera negativa (una versión truncada de la proteína sin el

dominio PAS presenta una afinidad por el DNA 500 veces superior que la proteína completa). La unión directa de PimM a varios promotores ha sido comprobada: *pimK*, *pimS2*, *pimI*, *pimJ*, *pimA*, *pimE*, *pimS1* y *pimD*. Teniendo en cuenta la organización transcripcional de los genes del *cluster* y que existen varios mRNAs policistrónicos, se puede decir que PimM regula directamente la mayoría de los genes del *cluster*, con la excepción de *pimT*, *pimM*, *pimR*, *pimH* y el operón *pimCGFS0* (Santos-Aberturas *et al.* 2011b).



Figura 1.16. Logotipo de la secuencia nucleotídica de reconocimiento de PimM. Se representa la secuencia consenso de unión de 16 bp. La altura de cada letra es proporcional a la frecuencia de la base en distintos sitios de reconocimiento, y la altura acumulada de cada columna de letras representa la conservación en bits en esa posición (Schneider & Stephens 1990). La información total (R_{sequence}) para el sitio de unión es 12,01 bits (0,75 bits por base). Santos-Aberturas *et al.* 2011a.

Estos resultados dejan en evidencia ciertos aspectos. Sorprendentemente, indican que a pesar de que la expresión de *pimE* no se vé afectada en el mutante ΔpimM , el regulador PimM reconoce y se une al promotor de este gen. Por otro lado, la transcripción del operón *pimCGFS0* cambia en el mutante pero PimM no se une a la región promotora de *pimC*. Esto parece indicar que existen otros mecanismos de regulación que ocurren paralelamente a PimM.

Al contrario de PimR, que sólo tiene una diana en el *cluster* y por lo tanto su expresión es poco probable que constituya un cuello de botella para la producción de pimaricina, la sobreexpresión de *pimM* lleva a un aumento considerable de la producción de este tetraeno (Antón *et al.* 2007, Jang *et al.* 2011).

Estos reguladores, PimR y PimM, resultan especialmente interesantes por su representación a lo largo de los *clusters* biosintéticos de macrólidos polienos y constituyen paradigmas reguladores para este tipo de compuestos. Así, todas las agrupaciones biosintéticas de macrólidos polienos secuenciadas contienen un gen que codifica un

regulador homólogo a PimM, lo que sugiere que esta función reguladora es una característica conservada entre este tipo de compuestos. De hecho, se ha demostrado que el modo de acción de los reguladores PAS-LuxR está conservado en varias especies de *Streptomyces*, e incluso que su función está conservada. Así, PimM es capaz de reconocer los promotores de genes que están modulados por su homólogo en otros *clusters* como el de la filipina en *S. avermitilis*, anfotericina en *S. nodosus* y nistatina en *S. noursei*. Además, los genes homólogos a *pimM* existentes en esas agrupaciones, *pteF* (filipina), *amphRIV* (anfotericina) y *nysRIV* (nistatina), son capaces de sustituir a *pimM* y restablecer la producción de pimaricina en la cepa mutante Δ *pimM*. Por otro lado, la expresión de *pimM* en *S. avermitilis* y *S. nodosus* resulta en un aumento considerable de la producción de filipina y anfotericina, respectivamente (Santos-Aberturas *et al.* 2011a).

La conservación funcional existente entre este tipo de reguladores, así como la alta similitud entre las proteínas homólogas presentes en diferentes *clusters* biosintéticos de macrólidos polienos, resulta muy interesante y convierte a PimR y PimM en modelos de regulación. Aunque su modo de acción está bastante caracterizado, ciertos aspectos permanecen intrigantes y se necesitan estudios más a fondo para su elucidación.

1.6. *Streptomyces avermitilis* NRRL 8165: productor de filipina, un modelo de macrólido polieno no glicosilado

1.6.1. Características

Esta especie fue aislada por primera vez a partir de una muestra de suelo de la región de Shizuoka de Japón en 1978, como parte de un programa para descubrir nuevos metabolitos antiparasitarios. Su nombre deriva de su capacidad de producir avermectina, un potente antihelmíntico (Burg *et al.* 1979). La cepa tipo es la NRRL 8165 (=MA-4690, ATCC31267, NCBIM 12804, JCM 5070).

El genoma de *S. avermitilis* ha sido completamente secuenciado y editado (Omura *et al.* 2001, Ikeda *et al.* 2003). El cromosoma es lineal y tiene 9,03 Mb con un contenido G+C de 70,7 %. El microorganismo alberga además dos plásmidos lineales, SAP1 y SAP2. El último, SAP2 (ca. 200 kb) (Ikeda *et al.* 2014), se pierde con facilidad en condiciones de cultivo mientras que el otro, SAP1, es mucho más estable y tiene aproximadamente 94 kb (Tabla 1.2). Como otras especies de *Streptomyces*, el cromosoma de *S. avermitilis* presenta una región interna altamente conservada de 6-6,5 Mb, donde se localizan la mayor parte de los

genes esenciales. Esta región tiene además una estructura similar a la de cromosomas de otros *Streptomyces*, presentando estos genes esenciales disposición y orientación semejantes (Ikeda *et al.* 2003, Ohnishi *et al.* 2008). Por otro lado, las regiones laterales del cromosoma de *S. avermitilis* son variables y menos conservadas como suele ser habitual en *Streptomyces* spp., y es donde se localizan más de la mitad de los genes relacionados con el metabolismo secundario. Las secuencias TIR en los telómeros de *S. avermitilis* son de las más pequeñas entre todos los genomas secuenciados de la familia *Streptomycetaceae* (varian de 49 bp a 132 kb) (Ikeda *et al.* 2014). El origen de replicación (*oriC*) se encuentra desplazado aproximadamente 800 kb del centro del cromosoma, al contrario de lo que pasa con otros cromosomas lineales como el de *S. coelicolor* A3(2) o *S. griseus* IFO 13350 (Ikeda *et al.* 2003).

Tabla 1.2. Características del genoma de *S. avermitilis*.

		Cromosoma	Plásmido SAP1
Tamaño (bp)		9.025.608	94.287
Contenido G+C (%)		70,7	69,2
ORFs	Conservadas con función conocida	4563	33
	Conservadas con función desconocida	2738	45
	No conservadas	273	18
	Total	7574	96
	Tamaño medio de ORF (bp)	1034	898
	Porción codificante (%)	86,2	79,0
RNA	rRNA (16S-23S-5S)	6	0
	tRNA	68 (43 tipos)	0

S. avermitilis es conocido principalmente por la producción de avermectina, un grupo de ocho lactonas macrocíclicas glicosiladas de 16 átomos de carbono con propiedades antihelmínticas. Un derivado de este compuesto es la ivermectina, una lactona semisintética obtenida a partir la avermectina B1 y con las mismas propiedades antiparasitarias pero con niveles de toxicidad más bajos. La ivermectina se ha empleado como agente antiparasitario y pesticida agrícola desde los años 80, y actualmente se usa en el tratamiento sanitario de ganado y animales de compañía. Además, se ha mostrado eficaz en el tratamiento de enfermedades humanas como la oncocercosis (Aziz *et al.* 1982) y la

estrongiloidiasis (Shikiya *et al.* 1992), y como acaricida. *S. avermitilis* debe así su gran importancia industrial a la producción de agentes antiparasitarios y antihelmínticos.

1.6.2. *Clusters* biosintéticos de metabolitos secundarios

Dos de los principales metabolitos secundarios de *S. avermitilis*, las avermectinas y la oligomina, se conocen desde hace varios años y en el caso de las avermectinas lo mismo se puede decir de su estructura y ruta biosintética (Burg *et al.* 1979, Ikeda *et al.* 1999). Posteriormente a la secuenciación y anotación completas del genoma de *S. avermitilis* en 2003, se encontraron muchos otros *clusters* biosintéticos de PKSs deducidos a partir de la secuencia genómica, además de sideróforos, terpenoides, NRPSs, y pigmentos, entre otros. Se han identificado un total de 38 *clusters* génicos para metabolitos secundarios que representan casi el 7 % del genoma del microorganismo (Ikeda *et al.* 2014), un número sorprendentemente elevado cuando es comparado con los 29 *clusters* encontrados en el genoma de *S. coelicolor* (Bentley *et al.* 2002). Los *clusters* biosintéticos de *S. avermitilis* se indican en la Tabla 1.3.

Las **avermectinas** (Figura 1.17) son lactonas macrocíclicas de 16 átomos de carbono pentacíclicas glicosiladas. Forman un grupo de ocho compuestos policetídicos estructuralmente relacionados que son el A1a, A1b, A2a, B1a, B1b, B2a y B2b (Burg *et al.* 1979, Miller *et al.* 1979). Se piensa que los compuestos “A” derivan de los “B”, a través de la metilación del carbono 5, y el grupo “1” deriva del grupo precursor “2” por medio de la deshidratación del C22 y C23. Los compuestos “a” poseen un grupo 2-metilbutiril en el C25 derivado de una isoleucina, mientras que los compuestos “b” poseen un grupo isobutil derivado de una valina en el mismo carbono (Cane *et al.* 1983, Omura *et al.* 1991, Ikeda & Omura 1997). La fracción B1 (una mezcla de más del 80 % de B1a y menos del 20 % de B1b) es la que exhibe mayor actividad antiparasitaria y por ello es el habitual principio activo de productos comerciales (Egerton *et al.* 1979) utilizados en medicina, veterinaria, y el sector agrario. Al contrario de otros antibióticos macrólidos, las avermectinas carecen de actividad antibacteriana o antifúngica significativas (Burg *et al.* 1979, Hotson 1982).

Tabla 1.3. *Clusters* biosintéticos de metabolitos secundarios en *S. avermitilis*.

Tipo compuesto	<i>Cluster/Genes</i>	Producto (real o previsto) ²	
Policétidos	<i>ave</i>	Avermectina	
	<i>olm</i>	Oligomicina	
	<i>pte</i>	Filipina	
	<i>pks1</i>	Policétido	
	<i>pks2</i>	Policétido	
	<i>pks3</i>	Policétido	
	<i>pks4</i>	Policétido	
	<i>pks5</i>	Policétido	
	<i>pks11</i>	Policétido	
	<i>pks8</i>	Policétido aromático	
	<i>pks9</i>	Policétido aromático	
	Péptidos	<i>rpb</i>	Tetrahidroxinafataleno
		<i>nrps1</i>	Péptido no ribosomal
<i>nrps2</i>		Péptido no ribosomal	
<i>nrps3</i>		Péptido no ribosomal	
<i>nrps4</i>		Péptido no ribosomal	
<i>nrps5</i>		Péptido no ribosomal	
<i>nrps6</i>		Péptido no ribosomal (sideróforo)	
<i>nrps7</i>		Péptido no ribosomal	
<i>nrps8</i>		Híbrido policétido-nrps	
Terpenoides	<i>ams</i>	Avermitilol, avermitilona	
	<i>crt</i>	Isorenierateno	
	<i>hop</i>	Squaleno	
	<i>geo</i>	Geosmina, germacradienol	
	<i>ptl</i>	Neopentalenocetolactona	
	<i>ezs</i>	Albaflavenol, albaflavenona	
Moléculas señalización	SAV3704 y SAV3706	Avenolida	
	<i>ava</i>	γ -Butirolactona?	
Pigmentos	<i>spp</i>	Pigmento de esporas	
	<i>hpd</i>	Pigmento ocrónico	
	<i>melC-1</i>	Melanina	
	<i>melC-2</i>	Melanina	
Sideróforos	<i>sid</i>	Nocardamina, deferrioxamina B	
	<i>avs</i>	sideróforo tipo-vibrioferrina	
	SAV2465-2467	Sideróforo	
Otros	<i>ect</i>	Ectoína, 5-hidroxiectoína	
	<i>mcj1</i>	Microcina	
	<i>mcj2</i>	Microcina	

² A negrita están los productos comprobados experimentalmente, a través de cultivos generalizados o bien mediante manipulación genética de genes biosintéticos.

Las **ivermectinas** (22, 23-dihidroavermectinas B1) (Figura 1.17) son derivados semisintéticos de las avermectinas B1, con su misma eficaz actividad antiparasitaria y menores efectos secundarios tóxicos. Se emplean en todo el mundo en el tratamiento de enfermedades parasitarias animales y humanas. El proceso industrial para la producción de ivermectinas implica la extracción de la mezcla de avermectinas del caldo fermentativo, la separación de la fracción B1, y la reducción química del doble enlace entre el C22 y C23 de las avermectinas B1 con cloruro de rodio como catalizador especial para la hidrogenación específica de este enlace (Chabala *et al.* 1980). Se trata de un proceso costoso que se refleja en el precio del producto final, más caro que las avermectinas convencionales. Hace unos años surgió una alternativa, se construyó una cepa capaz de producir directamente ivermectinas. Se utilizó para ello el intercambio de dominios en una PKS de la ruta biosintética de la avermectina, concretamente la sustitución de los dominios DH y KR del módulo 2 por los dominios DH y KR del módulo 4 de la PKS de *S. venezuelae* para la biosíntesis de pikromicina. La cepa recombinante así obtenida produce una pequeña cantidad de 22, 23-dihidroavermectina B1a junto con avermectina B1a y B2a (Zhang *et al.* 2006). Aunque el rendimiento obtenido es bajo, éste es un ejemplo más de las muchas aplicaciones de la biosíntesis combinatoria (ver apartado 1.4.3).

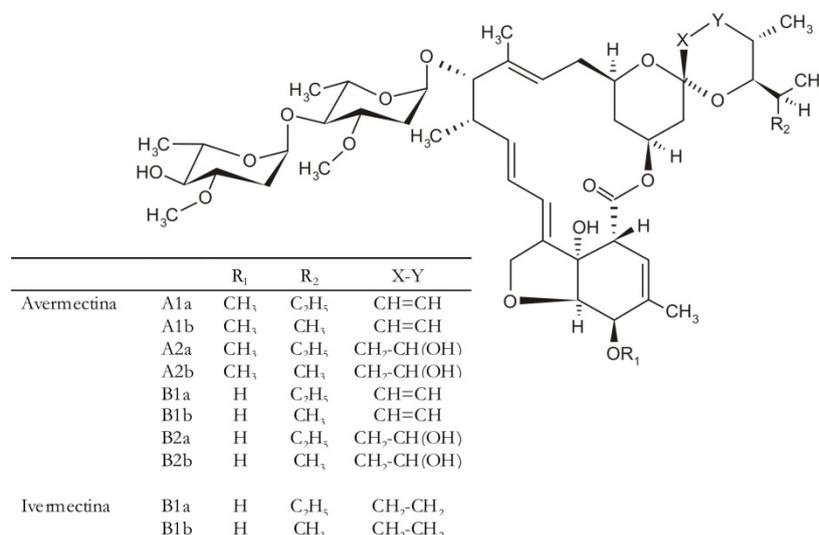


Figura 1.17. Estructuras de las avermectinas e ivermectinas.

La **oligomicina** (Figura 1.18) fue descrita por primera vez en los años 50 en *S. diastatochromogenes* (Smith *et al.* 1954), y entonces ya se había identificado como un complejo (Marty & McCoy 1959, Larson & Peterson 1960). Las oligomicinas A, B y C y sus

análogos estructurales son un grupo de macrólidos de 26 átomos de carbono que presentan una variedad de importantes actividades biológicas, como antifúngica y nematocida (Masamune *et al.* 1958), antitumoral (Kobayashi *et al.* 1987, Yamazaki *et al.* 1992, Korystov *et al.* 2003, Li *et al.* 2004) e inmunosupresora (Laatsch *et al.* 1993). Éstas se basan en su capacidad para inhibir específicamente la ATPasa-F1F0 mitocondrial, uniéndose al canal de protones (subunidad F0) que es necesario para la producción de ATP (fosforilación de ADP a ATP) (Tzagoloff & Meagher 1972, Lardy *et al.* 1975). La oligomicina puede también alterar procesos celulares en varios tipos de células, induciendo apoptosis, tornando las células más susceptibles al proceso de muerte celular, y puede cambiar el proceso apoptótico a necrosis (Fitch *et al.* 2000, Miyoshi *et al.* 2006).

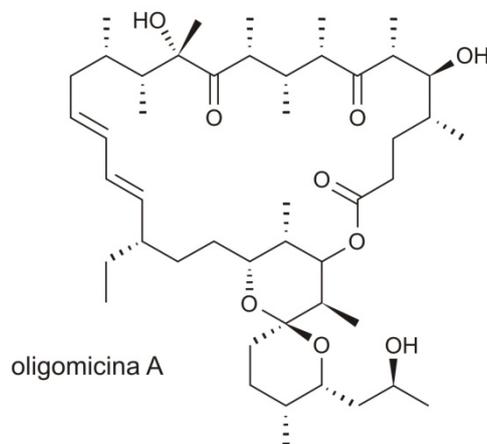


Figura 1.18. Estructura de la oligomicina A.

La **filipina** es un pentaeno y también un complejo producido por *S. avermitilis* con propiedades antifúngicas. Se hablará en más detalle de este compuesto en el apartado 1.6.5.

Muchos microorganismos *Actinomycetales* producen alcoholes terpenoides volátiles. Uno de ellos, la **geosmina**, es producida por *Streptomyces* spp. entre otros organismos (e.g. mixobacterias (Dickschat *et al.* 2004), algunos hongos filamentosos (Pisarnitskii & Egorov 1988, Mattheis & Roberts 1992) y algunas plantas (Lu *et al.* 2003)), y es responsable de el característico olor a tierra húmeda (Gerber & Lechevalier 1965). *S. avermitilis* también produce una gran cantidad de geosmina y de su precursor germacradienol. Su genoma alberga al menos seis *clusters* génicos de metabolitos terpenoides (Tabla 1.3), y de entre las sintasas de sesquiterpenos *geoA* (SAV2163) codifica una germacradienol/geosmina sintasa homóloga a la enzima SCO6073p de *S. coelicolor* A3(2). Se ha demostrado que GeoA cataliza

la conversión de farnesil difosfato (FPP, del inglés *farnesyl diphosphate*) a germacradienol y geosmina en un único paso (Cane *et al.* 2006).

El hierro es un elemento esencial para muchas vías metabólicas y de señalización celular en microorganismos. Dado que en condiciones aerobias existe bajo una forma insoluble oxidada, estos microorganismos han desarrollado componentes quelantes para captar dicho hierro, los **sideróforos**, que lo solubilizan e incorporan a la célula como complejos hierro-sideróforo. En el genoma de *S. avermitilis* se han encontrado *clusters* relacionados con la biosíntesis de sideróforos que se pueden clasificar en tres grupos: péptido no ribosomal (*nrrps6*), hidroxamato (*sid*), y catecolato (*avs*). En condiciones limitantes de hierro, *S. avermitilis* produce sideróforos de hidroxamato tipo desferrioxamina, nocardamina y deferrioxamina B (Ueki *et al.* 2009). A pesar de que tiene la capacidad genética, *S. avermitilis* no produce otros sideróforos en ausencia de hierro al contrario de lo que ocurre en *S. coelicolor* A3(2) (Lautru *et al.* 2005). La desferrioxamina B es el único agente terapéutico usado en clínica, comercializado como Desferal[®], en el tratamiento de intoxicaciones agudas de hierro y casos de sobrecarga crónica de hierro que ocurren en situaciones de anemias crónicas que requieren múltiples transfusiones de sangre incrementando los niveles de hierro.

1.6.3. Regulación del metabolismo secundario

Debido a su importancia industrial, el estudio de la regulación del metabolismo secundario en *S. avermitilis* es especialmente importante. La disponibilidad del genoma completo posibilita estudios más globales y aunque se conocen muchos aspectos de su regulación, especialmente en la producción de avermectinas, varios componentes quedan por aclarar.

1.6.3.1. Regulación nutricional

La producción de antibióticos se puede ver afectada por varios parámetros, físicos y nutricionales. La supresión relacionada con la **glucosa** está bien descrita. En *S. avermitilis* se ha observado que añadir glucosa en la fase temprana de la fermentación suprime la producción de avermectinas, a pesar de que no tiene efecto en el crecimiento, y sólo se empiezan a detectar avermectinas en una fase más tardía. Sin embargo, no pasa lo mismo si la adición de glucosa se hace en la fase tardía, donde por el contrario la producción de avermectinas aumenta considerablemente (hasta dos veces más). Aunque la glucosa es una

fuelle de carbono que habitualmente es metabolizada de manera rápida, *S. avermitilis* parece asimilarla lentamente, y la producción continúa hasta que esta se agote. En consecuencia, parece evidente que la cepa utiliza la glucosa como fuente de energía no sólo para el metabolismo primario sino también para la producción de avermectinas (Ikeda *et al.* 1988).

En relación con el **fosfato**, *S. avermitilis* constituye una excepción a la regulación por este nutriente. Al contrario que otras especies de *Streptomyces*, concentraciones elevadas de fosfato inorgánico no afectan a la producción de avermectinas en *S. avermitilis*. Se puede decir que la avermectina presenta cierta tolerancia a concentraciones elevadas de fosfato en el medio (Curdová *et al.* 1989), aunque son necesarios más estudios para conocer el efecto sobre otros metabolitos secundarios.

1.6.3.2. Regulación por señales intercelulares

Las señales intercelulares desempeñan un papel importante en la regulación del metabolismo secundario, así como en la diferenciación morfológica. Aunque nunca se ha observado la producción de ninguna γ -butirolactona en *Streptomyces* spp. productoras de polienos, se han descrito tanto receptores para este tipo de moléculas como otros posibles compuestos inductores (ver apartado 1.3.2). En *S. avermitilis* se ha identificado una nueva molécula señalizadora, la **avenolida** ((4*S*, 10*R*)-10-hidroxi-10-metil-9-oxo-dodec-2-en-1,4-olida) (Kitani *et al.* 2011, Uchida *et al.* 2011). La avenolida (de *S. avermitilis* butenolida) (Figura 1.19) es un autoregulador esencial para la producción de avermectina. Existen homólogos a este compuesto en *S. fradie*, *S. ghanaensis* y *S. griseoauranticus* (Bignell *et al.* 2007, Kitani *et al.* 2011). El locus SAV3702-3706 contiene los genes relacionados con la avenolida: tres genes, *avaR1* (SAV3705), *avaR2* (SAV3702) y *avaR3* (SAV3703), que codifican proteínas homólogas a receptores de γ -butirolactonas y dos genes, *aco* (SAV3706) y *cyp17* (SAV3704), que codifican una acil-CoA oxidasa y una citocromo P450 monooxigenasa (CYP154B2), respectivamente (Kitani *et al.* 2011, Miyamoto *et al.* 2011, Wang *et al.* 2014). Ambos genes *aco* y *cyp17* están involucrados en la biosíntesis de la avenolida. Un mutante Δ *aco* es incapaz de producir este compuesto (y avermectina) y *cyp17* parece ser responsable de la conversión de (4*S*)-10-desoxi-avenolida en avenolida. Por el contrario, *avaA* (SAV2269), que codifica un homólogo a AfsA (una síntasa de γ -butirolactonas), no participa en la producción de la avenolida (Kitani *et al.* 2011). AvaR1 es un receptor de avenolida que se une al promotor de *aco*, reconociendo una secuencia diana tipo ARE. Además, la avenolida es capaz de inhibir dicha unión, por lo que esta molécula puede controlar su propia biosíntesis. Se ha demostrado que el receptor AvaR1 es un regulador

negativo indirecto de la biosíntesis de avermectina (dado que no actúa sobre ningún gen del *cluster* de la avermectina), y que la avenolida controla la producción de avermectina a través de AvaR1 (Wang *et al.* 2014). También se ha caracterizado AvaR3, otro receptor presente en el *cluster* de la avenolida (Miyamoto *et al.* 2011). AvaR3 actúa como un regulador global de la producción de avermectina y de la morfología celular, tanto en medio líquido como sólido. El mutante Δ avaR3 es incapaz de producir avermectina y presenta cambios en los niveles de expresión de algunos genes del *cluster* génico *ave* (en especial en el regulador positivo específico de ruta *aveR*, lo que explica la ausencia del metabolito), actuando así como regulador positivo. Además, en algunos medios sólidos, el mutante Δ avaR3 presenta una formación de micelio aéreo y producción de esporas deficientes. Curiosamente, AvaR3 también controla negativamente la transcripción de *avaR1* y *avaR2* (el promotor de ambos genes posee una secuencia ARE), aunque como el fenotipo del mutante Δ avaR1 es distinto del de Δ avaR3, se concluye que AvaR3 controla la producción de avermectina y la morfología celular de manera independiente de AvaR1 (Miyamoto *et al.* 2011). Respecto a los otros dos antibióticos policétidos producidos por *S. avermitilis*, filipina y oligomicina, AvaR3 no parece afectar a la producción de oligomicina pero tiene un efecto negativo en la producción de filipina aunque sin controlar la transcripción del *cluster* génico *pte* (Miyamoto *et al.* 2011). A pesar de ello, se desconoce el papel de la avenolida en la producción de filipina. La disponibilidad de avenolida sintética seguramente facilitará estudios futuros (Uchida *et al.* 2011).

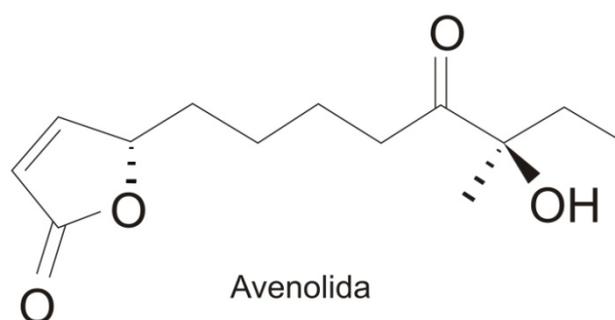


Figura 1.19. Compuestos inductores. Estructura de la avenolida y comparación con el factor A y el factor PI, como representantes de las γ -butirolactonas y nuevas moléculas inductoras, respectivamente.

1.6.3.3. Reguladores pleiotrópicos

Dos de los reguladores pleiotrópicos mejor descritos en *S. avermitilis* son AveI y AfsK.

La fosforilación y desfosforilación de proteínas es un elemento central en los mecanismos de detección, transmisión e integración de señales celulares en eucariotas y procariotas. La serina/treonina quinasa AfsK es responsable por la fosforilación del regulador transcripcional AfsR, en un sistema bien descrito en *Streptomyces* (Horinouchi 2003). En *S. avermitilis* se ha caracterizado un ortólogo de esta proteína, **AfsKav** (SAV3816), una quinasa serina/treonina de tipo eucariota con un papel regulador global controlando la esporulación, producción de melanina y avermectina (Rajkarnikar *et al.* 2006, 2007). Sin embargo, en el genoma de *S. avermitilis* existe al menos otro ortólogo de AfsK, el gen SAV3804, cuya función se desconoce.

La proteína **AveI** de *S. avermitilis* es un ortólogo de AtrA, un activador transcripcional de la biosíntesis de actinorrodina en *S. coelicolor* A3(2) perteneciente a la familia de reguladores TetR (Uguru *et al.* 2005). Aunque existe una conservación funcional entre los dos reguladores con respecto a la producción de avermectina en *S. avermitilis* (el mutante Δ *aveI* presenta un aumento considerable en la producción de avermectina por lo que el regulador actúa de forma negativa y ambos genes, *aveI* y *atrA*, complementan la mutación), en *S. coelicolor* A3(2) el efecto es positivo y la introducción de *aveI* se traduce en un aumento significativo de la biosíntesis de actinorrodina (Chen *et al.* 2008). Curiosamente, AveI reconoce y se une al promotor del regulador específico de ruta *actII-ORF4* de *S. coelicolor* del mismo modo que AtrA, pero no al de *aveR* de *S. avermitilis*. Así, AveI actuaría sobre la producción de avermectina vía AveR pero de manera indirecta. Éste es un ejemplo de reguladores ortólogos cuya forma de actuar y efecto modulador pueden variar entre especies (Chen *et al.* 2008). Posteriores estudios de transcriptómica muestran que los efectos de la mutación Δ *aveI* no se restringen al *cluster* de la avermectina, sino que son más globales. El regulador AveI afecta la expresión de los *clusters* biosintéticos de la filipina y oligomicina, así como genes involucrados en la biosíntesis de precursores de antibióticos y otros reguladores, cuya expresión se ve aumentada en el mutante Δ *aveI*. Por otro lado, afecta positivamente a algunos genes de importantes rutas del metabolismo primario (e.g. síntesis de proteínas y metabolismo de ácidos grasos). Se puede decir entonces que AveI es un regulador negativo global que actúa dirigiendo el flujo de carbono del metabolismo primario al secundario (Chen *et al.* 2009).

Otro regulador pleiotrópico descrito en *S. avermitilis* es **SdrA** (SAV3339), un regulador transcripcional de la familia DeoR (Valentin-Hansen *et al.* 1985) que constituye una nueva clase de reguladores pleiotrópicos. SdrA controla la diferenciación morfológica y actúa como regulador positivo de la producción de avermectina y regulador negativo de la producción de filipina y oligomicina (Ulanova *et al.* 2013).

1.6.3.4. Reguladores específicos de ruta

Dada la importancia industrial de *S. avermitilis* en la producción de avermectinas, no sorprende que los reguladores específicos de ruta mejor caracterizados estén relacionados con este metabolito secundario.

El gen **aveR** del *cluster* biosintético de la avermectina pertenece a la familia de genes reguladores LAL (Ikeda *et al.* 1999). Se trata de un regulador positivo y el mutante Δ aveR es incapaz de producir avermectina acumulándose un intermediario de la ruta, lo que sugiere que actúa controlando la expresión de genes estructurales y de modificaciones post-PKS (Kitani *et al.* 2009). Concretamente, AveR es necesario para la transcripción de todos los genes biosintéticos de la avermectina (Guo *et al.* 2010). Sin embargo, AveR también tiene un efecto pleiotrópico. El mutante Δ aveR presenta un aumento de la producción de oligomicina. Se piensa que AveR afecta a la transcripción de genes biosintéticos y reguladores (*olmRI* y *olmRII*) del *cluster*, aunque todavía no está claro si actuando directamente sobre los genes del *cluster* o a través de los reguladores *olmRI* y *olmRII*. Tampoco se descarta que el aumento de producción de oligomicina se deba a una redistribución del flujo de carbono puesto que ambos compuestos, avermectina y oligomicina, necesitan unidades extensoras de acetato y propionato para la síntesis de la cadena policétidica (Ikeda *et al.* 2001, 2003). Luego, una disminución de la producción de avermectina en el mutante puede facilitar un mayor número de unidades de acetato y propionato para la síntesis de oligomicina estimulando así la producción (Guo *et al.* 2010), fenómeno demostrado anteriormente (Wei *et al.* 2006).

Recientemente se han descrito dos reguladores de la familia TetR capaces de controlar la producción de avermectina, SAV576 y SAV577 (Guo *et al.* 2013, 2014). Son reguladores negativos de la biosíntesis de avermectina que ejercen su acción a través del gen SAV575 (una P450/reductasa ferrihemoproteína-NADHP) (Choi *et al.* 2011) y de los genes *ave*. Ambos reguladores reprimen la expresión de SAV575 (de manera competitiva), que a su vez es necesario para la síntesis de precursores de la avermectina (Guo *et al.* 2013). Por

otro lado, mutantes de ambos reguladores presentan un aumento en la expresión de *aveR* y *aveA1* aunque la regulación no es directa. El efecto regulador sobre SAV575, y en consecuencia sobre *aveR* y *aveA1*, explica la disminución en la producción de avermectina observada en los mutantes de los reguladores (Guo *et al.* 2014).

El *cluster* de la oligomicina en *S. avermitilis* contiene dos reguladores transcripcionales de la familia LuxR, **OlmRI** y **OlmRII** (Ikeda *et al.* 2003). Estos reguladores afectan positivamente a la biosíntesis de oligomicina, a través del control de la expresión de 12 genes del *cluster* (estructurales y de modificaciones post-PKS) (Yu *et al.* 2012). Sorprendentemente, también en este caso, los mutantes de ambos reguladores presentan un aumento en la producción de avermectina, demostrando una vez más que las rutas biosintéticas de estos metabolitos están interconectadas (Yu *et al.* 2012).

1.6.4. *S. avermitilis* como hospedador para la expresión heteróloga de *clusters* biosintéticos

Conocer los factores reguladores en profundidad ha permitido su manipulación para a activación de *clusters* génicos crípticos, i.e., agrupaciones biosintéticas que no se expresan en condiciones normales de laboratorio y se encuentran silenciadas. Una de las estrategias para dicha activación es la expresión heteróloga de dichos *clusters* en diferentes cepas hospedadoras, técnica que también se usa para la confirmación de la integridad de *clusters* que sintetizan metabolitos secundarios (Zaleta-Rivera *et al.* 2010, Young & Walsh 2011). La primera cepa hospedadora construida para tal fin fue *S. coelicolor* CH999 (Martin *et al.* 2001).

Recientemente se han construido cepas mutantes de *S. avermitilis* con grandes deleciones de partes del cromosoma que no producen ninguno de los principales metabolitos secundarios nativos. Estas cepas son SUKA4, SUKA5 (sin la región grande izquierda subtelomérica del cromosoma y sin el *cluster* génico *olm*), SUKA17 (derivada de las anteriores pero con dos regiones menos, una en cada lado del cromosoma) (Komatsu *et al.* 2010) y SUKA22 (isogénica de SUKA17) (Komatsu *et al.* 2013). Los dos últimos mutantes tienen apenas un 81,46 % del cromosoma original. La idoneidad de los mutantes para la producción de metabolitos ajenos se demostró primero con la expresión heteróloga de tres *clusters* biosintéticos: el de la estreptomina de *S. griseus*, el de la cefamicina C de *S. clavurigerus*, y el de la pladienolida de *S. platensis* (Komatsu *et al.* 2010). En algunos casos fue necesario utilizar promotores alternativos o acoplar la expresión de un gen regulador

con un promotor alternativo para conseguir la producción de los metabolitos secundarios. Más tarde, las cepas SUK17 y SUK22 se emplearon para producir con éxito hasta 20 metabolitos secundarios de otras especies de *Streptomyces*, consiguiéndose en algunos casos niveles de producción superiores a los observados en las cepas nativas, demostrando así la versatilidad de *S. avermitilis* como cepa hospedadora (Komatsu *et al.* 2013).

1.6.5. La filipina

La filipina es un pentaeno no glicosilado y constituye un interesante prototipo para el estudio de este tipo de macrólidos polienos. Su nombre deriva de las Islas Filipinas, en las que en 1955 se aisló por primera vez la cepa productora del compuesto, *S. filipinensis* (Ammann *et al.* 1955, Whitfield *et al.* 1955). Aunque se detectó inicialmente en esta especie, se conocen otros productores de filipina como *S. avermitilis* (Ikeda *et al.* 2003) y *S. miharaensis* (Kim *et al.* 2012).

1.6.5.1. Estructura y propiedades

La molécula de filipina presenta cinco dobles enlaces conjugados en un anillo macrocíclico de 28 átomos, que a diferencia de otros macrólidos polienos, no está glicosilado. Como en el caso de las avermectinas y oligomicinas, la filipina consiste en un grupo de cuatro componentes estructuralmente relacionados (Figura 1.20): filipina I, II, III y IV (Bergy & Eble 1968). El componente principal es la filipina III (53 %) y su fórmula molecular es $C_{35}H_{58}O_{11}$. La filipina I (4 %) carece de dos grupos hidroxilo en los carbonos 1' y 26 con respecto a la filipina III (Pandey & Rinehart 1970), la filipina II (25 %) es la 1'-desoxifilipina III (Edwards 1989) y la filipina IV (18 %) es una forma isomérica de la filipina III (Pandey *et al.* 1972).

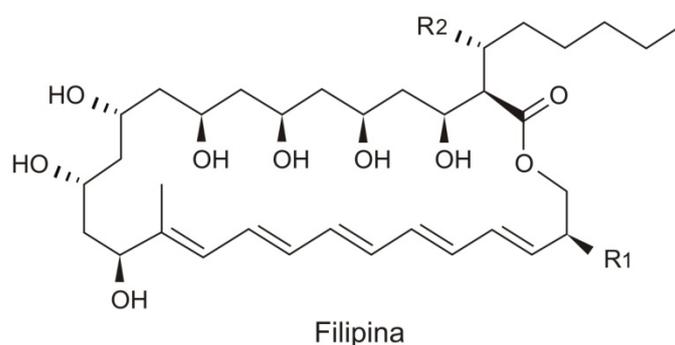


Figura 1.20. Estructura de la filipina. Filipina I: $R_1 = H$, $R_2 = H$; filipina II: $R_1 = OH$, $R_2 = H$; filipina III: $R_1 = OH$, $R_2 = OH$. La filipina IV es un estereoisómero de la filipina III.

El anillo macrocíclico de la filipina es rígido mientras que la cadena lateral alifática es extremadamente flexible (Volpon & Lancelin 2000). Su espectro de absorción es típico de este tipo de compuestos, con cuatro picos de absorción máxima característicos: pico 1 = 311 nm, pico 2 = 320 nm, pico 3 = 338 nm y pico 4 = 356 nm (Whitfield *et al.* 1955).

1.6.5.2. Aplicaciones

La filipina posee fuertes propiedades antifúngicas pero al contrario que la mayoría de los polienos que presentan mayor afinidad para el ergosterol que para otros esteroides, la filipina muestra una afinidad similar para el ergosterol y el colesterol. Esto hace de la filipina un compuesto tóxico e impide su uso en tratamientos de infecciones de origen fúngico, pero esa misma característica permite las dos principales aplicaciones de este pentaeno. La filipina tiene un uso extendido como sonda para detectar y cuantificar histológicamente la presencia de colesterol en las membranas celulares (Börnig & Geyer 1974, Beknke *et al.* 1984) y como herramienta para el diagnóstico de la enfermedad Niemann-Pick de tipo C, un trastorno lisosomal de origen genético (Kruth *et al.* 1986).

1.6.5.3. Agrupación biosintética y biosíntesis de la filipina

En el genoma de *S. avermitilis* se ha identificado un **cluster** génico responsable de la biosíntesis de filipina (Ikeda *et al.* 2003). Esta agrupación (*pte*) se extiende por aproximadamente 80 kb e incluye 13 genes (Figura 1.21). De estos, cinco genes (*pteA1*, *pteA2*, *pteA3*, *pteA4* y *pteA5*) codifican PKSs de tipo I encargadas de la síntesis del esqueleto policetídeo. Estas enzimas contienen entre ellas un total de 14 módulos: PteA1 posee el módulo de carga y los módulos 1 a 4, PteA2 los módulos 5 y 6, PteA3 el módulo 7, PteA4 los módulos 8 a 11, y PteA5 los módulos 12 y 13. Existen además tres genes con funciones biosintéticas auxiliares y de modificación post-PKS (*pteB*, *pteC* y *pteD*) (Xu *et al.* 2010, Yoo *et al.* 2011) y otros tres genes que están implicados en la regulación de la biosíntesis de filipina, los reguladores *pteF* y *pteR* (ortólogos de *pimM* y *pimR* de *S. natalensis*, respectivamente; ver apartado 1.5.5.4), y la colesterol oxidasa *pteG*. Los genes *pteH* y *pteE* codifican una tioesterasa discreta y una ferredoxina, respectivamente.

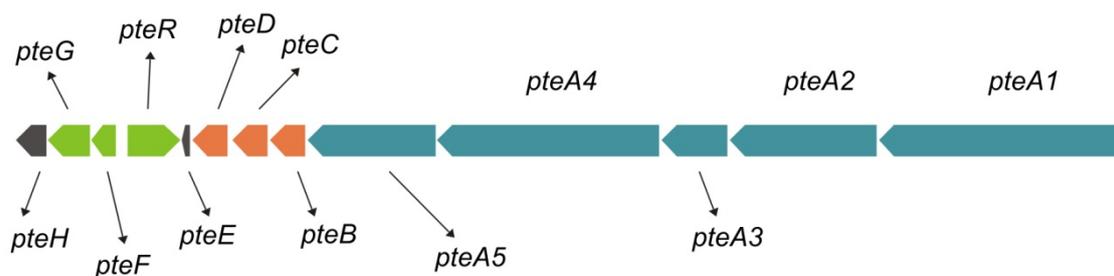


Figura 1.21. Cluster biosintético de la filipina en *S. avermitilis*. El esquema incluye los 13 genes que constituyen la agrupación con diferentes colores, según su función: PKSs (azul), modificaciones post-PKS (naranja), mecanismos reguladores (verde) y genes con otras funciones (gris).

La **síntesis** del anillo macrocíclico de filipina (Figura 1.22) se inicia en el módulo de carga de PteA1 con un acetato procedente de una molécula de acetyl-CoA como unidad iniciadora. Este módulo incluye, desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal, un dominio KS^Q , AT y un dominio ACP, por este orden. El dominio KS^Q presenta una sustitución en su centro activo de la característica cisteína por un residuo de glutamina, por lo que no tiene actividad descarboxilasa. Los restantes cuatro módulos de PteA1 catalizarían los primeros cuatro ciclos de elongación de la cadena utilizando como unidad extensora moléculas de malonil-CoA. Las restantes condensaciones descarboxilativas tendrían lugar en los módulos siguientes, repitiendo el proceso realizado por el módulo 1 y utilizando las siguientes unidades extensoras: 7 grupos acetato procedentes del malonil-CoA, 1 propionato de un metilmalonil-CoA (introducido por el módulo 6 en PteA2) y 1 caprilato (octanoato) de un hexilmalonil-CoA (introducido por el módulo 13 en PteA5), este último suministrado por PteB (una 2-octenoil-CoA carboxilasa/reductasa) (Yoo *et al.* 2011). El módulo 7 contiene un dominio DH inactivo (Ikeda *et al.* 2014). Se pueden además distinguir dos tipos de dominios KR: los KR de tipo-A, que contienen un triptófano en su centro activo que lleva a la producción de grupos β -hidroxilo de estereoquímica “S”, y los de tipo-B, con motivos LDD (un residuo de leucina y dos de ácido aspártico conservados) y que producen grupos β -hidroxilo de estereoquímica “R” (Caffrey 2003). Las enzimas PteA1, PteA2 y PteA3 tienen KR de tipo-B, mientras que PteA4 y PteA5 tienen KR de tipo-A (Ikeda *et al.* 2014). Por último, el dominio TE en el extremo C-terminal del módulo 13 de PteA5 cicla la cadena policetídica como una lactona macrocíclica y libera el producto final, la filipina I.

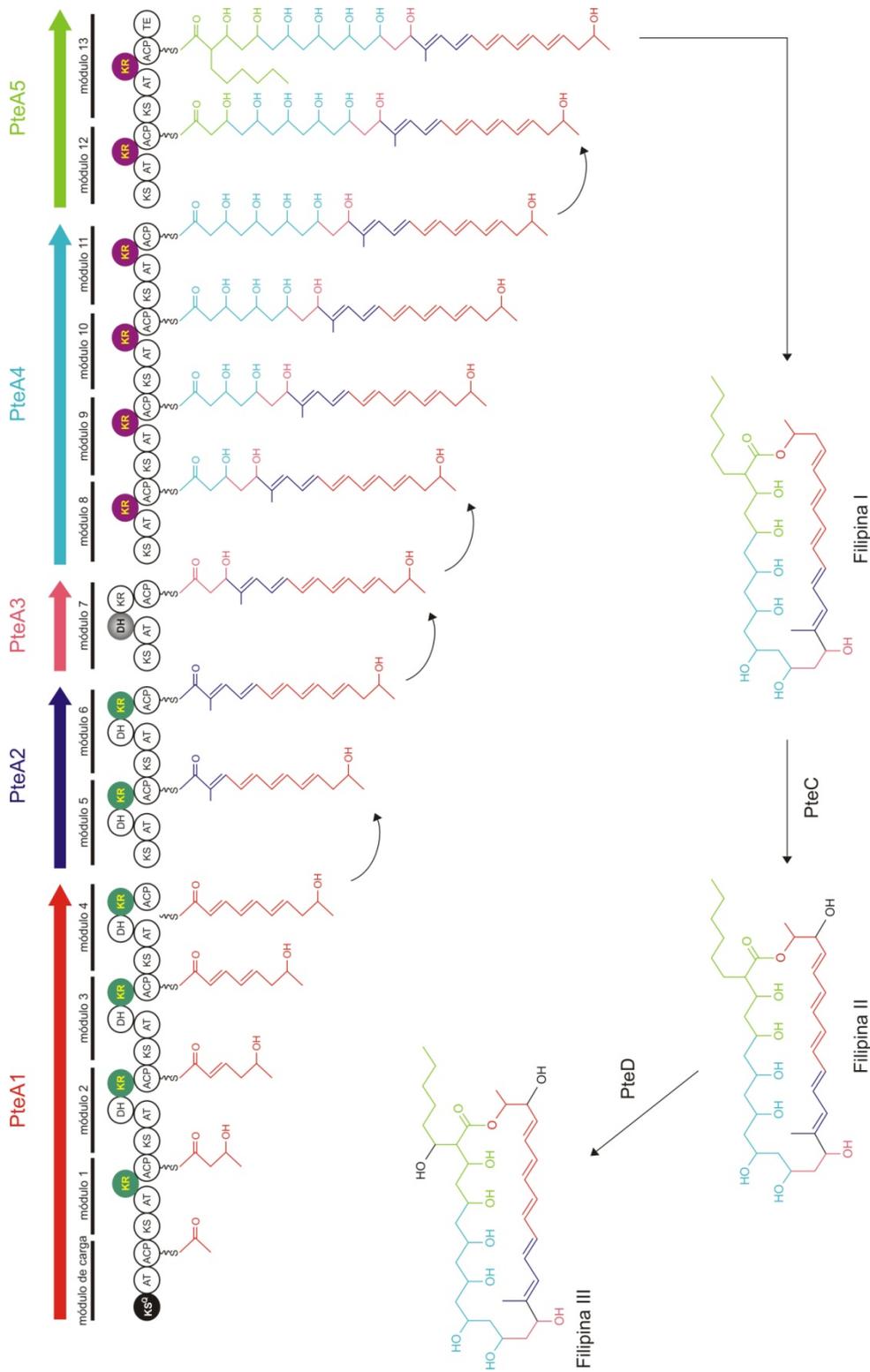


Figura 1.22. Biosíntesis de filipina en *S. avermitilis*. Cada círculo representa un dominio (ver texto). El dominio KS del módulo de carga no es funcional (negro) y el dominio DH del módulo 7 no participa en la extensión de la cadena policétidica (gris). Nótese los dominios KR de tipo-B (verde) y tipo-A (púrpura). Modificado de Ikeda *et al.* 2014.

Por último, las citocromo P450 monooxigenasas PteC y PteD catalizan la hidroxilación de la molécula, la primera en el C26 para obtener filipina II, y la segunda en el C1' dando lugar al producto final, la filipina III (Xu *et al.* 2009, 2010) (Figura 1.22). Sin embargo puede aún existir otra ruta alternativa a ésta, en la que primero actuaría PteD obteniéndose una nueva filipina, la 1'-hidroxifilipina I, y que posteriormente sería modificada por PteC para dar lugar a la filipina III (comunicación personal, Dra. Tamara Díez Payero).

1.6.5.4. Importancia de los polienos como la filipina

El número de infecciones causadas por hongos se ha disparado en las últimas décadas de manera inquietante. Factores como la irrupción de la pandemia del SIDA, la proliferación de los tratamientos quimioterapéuticos antitumorales, el uso de antibióticos de amplio espectro y la utilización clínica sistemática de inmunosupresores en pacientes transplantados o con enfermedades autoinmunes, multiplican el número de pacientes con sistemas inmunes comprometidos y por ello susceptibles de sufrir micosis oportunistas invasivas, contribuyendo diariamente al aumento de las infecciones fúngicas. Las micosis oportunistas, junto con las micosis superficiales, cutáneas, subcutáneas y sistémicas, que mantienen su prevalencia, constituyen los cinco principales grupos de infecciones de origen fúngico (Chapman *et al.* 2008).

También las limitaciones de la terapéutica constituyen un preocupante problema. La naturaleza de los hongos, al tratarse de organismos eucariotas mucho más próximos filogenética y estructuralmente al ser humano que las bacterias, dificulta la búsqueda de fármacos antifúngicos útiles puesto que el número de dianas moleculares específicas es más limitado (Carrillo-Muñoz *et al.* 2006). Se conocen actualmente nueve familias de antifúngicos: los macrólidos polienos, los derivados de azoles, los análogos de nucleósidos, las equinocandinas (y penumocandinas), las nikkomicinas, las alilaminas (y tiocarbamatos), las morfolinas, las pradimicinas (y benanomycininas) y las sordarinas (Aparicio *et al.* 2004), aunque existen otros compuestos que presentan este tipo de actividad (Carrillo-Muñoz *et al.* 2006). No obstante, tan sólo los miembros de las cuatro primeras familias resultan útiles hoy en día frente a las micosis sistémicas, y de éstos los macrólidos polienos son el único grupo de agentes en los que es raro encontrar resistencias, por lo que constituyen uno de los antifúngicos de elección. Como ya se ha mencionado (ver apartado 1.5.3), la base del escaso número de casos de resistencia a polienos resulta del hecho de que actúen sobre una diana bioquímica evolutivamente tan estable como los esteroides de membrana. Esto explica

que, después de más de seis décadas desde su descubrimiento y a pesar de su nefrotoxicidad y escasa solubilidad, la antotéricina B sigue siendo hoy el primer fármaco de elección frente a infecciones graves que constituyen una amenaza para la vida del paciente.

Por todo esto, es urgente encontrar nuevas alternativas terapéuticas. Una línea interesante a explorar, por sus características y aplicaciones, es el desarrollo de nuevos compuestos polienos.

1.7. Objetivos

El propósito de este trabajo se enmarca en el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la biosíntesis de macrólidos polienos, concretamente los protagonizados por reguladores específicos de ruta, y su efecto sobre otros aspectos del metabolismo celular que van más allá del metabolismo secundario. El estudio se centra en el actinomiceto industrial *S. avermitilis* NRRL 8165 productor del polieno filipina, un modelo de polieno no glicosilado.

Los objetivos propuestos para este trabajo fueron los siguientes:

1. Análisis funcional de los reguladores PteF y PteR.
2. Análisis de la organización transcripcional de los genes del *cluster* biosintético de la filipina y de la expresión génica de los mutantes en los genes reguladores *pteF* y *pteR*.
3. Identificación de las dianas moleculares de PteF/PimM en el *cluster* biosintético de la filipina.
4. Búsqueda de otras dianas moleculares de PteF/PimM en el genoma de *S. avermitilis* y validación de su modelo de acción.
5. Estudio del control pleiotrópico que ejercen PteF y PteR mediante estudios de transcriptómica y proteómica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepas de microorganismos utilizadas

2.1.1. Cepas de *Escherichia coli*

***E. coli* DH5 α** (Hanahan, 1983). Cepa con una alta eficiencia de transformación de sus células competentes (hasta 5×10^8 transformantes/mg de DNA plasmídico) y una baja tasa de recombinación. Posee además una delección 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 pUC19 (New England Biolabs), por ejemplo. Esta α -complementación produce una coloración azul en la colonia en presencia de IPTG, originada por la acción de la β -galactosidasa (codificada por *lacZ*) sobre el compuesto X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) previamente añadido al medido de cultivo, permitiendo una rápida selección de las colonias de interés. Estas características hacen que se utilice rutinariamente en experimentos de transformación y amplificación de DNA plasmídico.

Genotipo: *F* (ϕ 80d *lacZ* Δ M15) Δ (*lacZYA-argF*)U169 *thi-1 recA1 relA1 endA1 hsdR17* (r-k, m+k) *gyrA96 supE44* λ -.

***E. coli* BW25113/pIJ790** (Datsenko & Wanner, 2000). Cepa utilizada en el sistema REDIRECT[®]. El plásmido pIJ790 contiene la función λ RED (*gam*, *bet*, *exo*) la cual incrementa la tasa de recombinación con DNA lineal, un gen de resistencia a cloranfenicol que permite la selección en presencia de cósmidos derivados de SuperCos 1 (que contienen genes de resistencia a ampicilina y a kanamicina) y un origen de replicación sensible a la temperatura (requiere 30 °C para la replicación del plásmido).

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

Genotipo del cromosoma: Δ (*araD-araB*)567, Δ *lacZ4787*(::*rrnB-4*), *lacI*p-4000(*lacI*^Q), λ , *rpoS369*(Am), *rpb-1*, Δ (*rhaD-rhaB*)568, *hsdR514*.

***E. coli* ET12567/pUZ8002** (Bierman *et al.* 1992). Utilizada en el proceso de conjugación intergenérica como cepa donadora, resistente al cloranfenicol. Carece de los sistemas de metilación *dam*, *dcm* y *hsd* por lo que el material genético que transfiere no es susceptible de degradación por los sistemas de restricción sensibles a metilación de algunas especies de *Streptomyces*. Contiene el plásmido pUZ8002, que además de portar el gen de resistencia a kanamicina, incluye los genes necesarios para llevar a cabo la conjugación

(genes *tra*), si bien en sí mismo es un plásmido no movilizable al carecer de la función *cis* (el *oriT*).

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

***E. coli* BL21 (DE3)/pJM^{DBD}** (Santos-Aberturas *et al.* 2011b). Cepa empleada para expresión heteróloga de la proteína recombinante GST-PimM^{DBD}.

2.1.1.1. Conservación de cepas de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* se conservaron en placas de medio sólido hasta 4 semanas a 4 °C. Para la conservación a largo plazo se utilizó un cultivo líquido de células densamente crecido a partir del cual se realizó una suspensión en glicerol al 20 % (v/v), manteniéndola a -20 °C o a -80 °C.

2.1.2. **Cepas de *Streptomyces***

***Streptomyces avermitilis* NRRL 8165** (DSM 46492, MA-4680, ATCC 31267). Cepa productora de filipina y oligomicina.

***S. nodosus* DSM 40109** (ATCC 14899). Cepa empleada como productora de anfotericina, cuya agrupación biosintética ha sido secuenciada (Caffrey *et al.* 2001, Carmody *et al.* 2004).

2.1.2.1. Conservación de cepas

La conservación a medio plazo de cepas de *Streptomyces* se hizo en placas de medio sólido a 4 °C hasta un periodo máximo de 8 semanas. Para la conservación a largo plazo se utilizaron sus esporas, almacenando suspensiones en glicerol al 30 % (v/v) y Tritón X-100 al 0,025 % (v/v) a -20 o -80 °C.

2.1.2.2. Obtención de esporas

Para obtener esporas se crecieron las cepas de *Streptomyces* en medio TBO a 30 °C hasta su esporulación, que ocurre en un tiempo variable para cada cepa (entre cinco a quince días). Una vez detectada la presencia de esporas, normalmente por el oscurecimiento de la superficie de las colonias, estas fueron raspadas de la placa con un bastoncillo de algodón previa adición de 2 ml de una solución de Tritón X-100 0,025 % (v/v). Seguidamente la suspensión de esporas fue transferida a un tubo tipo Falcon 50 ml y

centrifugada durante 5 minutos a 6000 rpm y, descartado el sobrenadante, fueron resuspendidas en la solución de conservación ya citada.

2.1.2.3. Cuantificación de esporas

La cuantificación de esporas se hizo a partir de la suspensión obtenida de la forma anteriormente mencionada. El procedimiento consistió en hacer diluciones seriadas de orden diez de dicha suspensión en agua destilada y sembrar las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} por triplicado en medio TSA (se optó por no suplementar el medio con antibióticos para comprobar la ausencia de contaminaciones). Contando el número de colonias obtenidas (siempre que estén dentro de un intervalo de 30 a 300 colonias por placa) después de tres días de crecimiento a 30 °C y se calculó el número de unidades formadoras de colonias (o esporas viables) presentes en dicho tubo. Dado que la viabilidad de las esporas disminuye de manera progresiva a lo largo del tiempo, se realizó este procedimiento previamente a cualquier experimento en el que fue necesario conocer la concentración de esporas.

2.1.3. **Otros microorganismos**

***Candida utilis* CECT 1061.** Cepa empleada para la detección de actividad antifúngica mediante bioensayo.

2.1.3.1. Conservación de *C. utilis*

Su preservación se realizó almacenando a a -20 °C o a -80 °C una suspensión en glicerol al 20 % (v/v), preparada a partir de un cultivo líquido de células densamente crecido.

2.2. **Medios de cultivo**

Todos los medios de cultivo abajo descritos fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Para la obtención de medios sólidos, salvo que se indique lo contrario, se añadió 2 % (p/v) de agar a la composición particular de cada medio.

2.2.1. Medios de cultivo para *E. coli*

LB (Luria-Bertani) (Miller, 1972): triptona 1 % (p/v), extracto de levadura 0,5 % (p/v), NaCl 171 mM. El pH se ajusta a 7,5. Su versión sólida se denomina **LA**. Empleado para el crecimiento rutinario de *E. coli*.

SOB (Hanahan, 1983): bacto-triptona 2 % (p/v), extracto de levadura 0,5 % (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM. El pH se ajusta a 7,0 y antes de utilizar el medio se añaden MgCl₂ y MgSO₄ esterilizados por filtración, ambos a una concentración final de 10 mM. Medio líquido utilizado para la obtención de células competentes.

2.2.2. Medios de cultivo para *Streptomyces*

MM (medio mínimo) (Hopwood, 1967): L-asparagina 0,05 % (p/v), K₂PO₄ 0,05 % (p/v), MgSO₄·7H₂O 0,02 % (p/v), FeSO₄·7H₂O 0,001 % (p/v). Ajustar pH a 7,0-7,2 y la concentración final de agar es de 1,5 % (p/v). Antes de su utilización, se completó en todos los casos con glucosa 1 % (v/v). Empleado para estudios de crecimiento y morfología de colonias de *Streptomyces*.

MS (Hobbs *et al.* 1989): manitol 2 % (p/v), harina de soja 2 % (p/v). Medio sólido utilizado para la conjugación intergenérica entre *Streptomyces* y *E. coli*. Antes de su utilización, se complementó en todos los casos con MgCl₂ 10 mM.

TBO (Higgins *et al.* 1974): concentrado de tomate 2 % (p/v), copos de avena 2 % (p/v). El pH se ajusta a 7,5 y la concentración final de agar es de 2,5 % (p/v). Empleado para la esporulación de *Streptomyces*. Es recomendable almacenar en oscuridad.

TSB (Kieser *et al.* 2000): tripticaseína de soja 30 % (p/v). El pH se ajusta a 7,2. La versión sólida de este medio se denomina **TSA**. Se empleó para el crecimiento rápido de *Streptomyces*.

YEME (Chater *et al.* 1982): extracto de levadura 0,3 % (p/v), peptona 0,5 % (p/v), extracto de malta 0,3 % (p/v), glucosa 1 % (p/v), 34 % (p/v) sacarosa; MgCl₂ 5 mM, glicina 0,5 % (p/v).

YEME sin sacarosa: medio igual al anterior excepto que no contiene sacarosa. Es el medio de fermentación de *Streptomyces* utilizado para la producción de macrólidos.

2.2.3. Otros medios de cultivo

2XTY (Kieser *et al.* 2000): triptona 1,6 % (p/v), extracto de levadura 1 % (p/v), NaCl 86 mM. Aunque originalmente se trata de un medio de cultivo para *E. coli*, en este caso se empleó para la germinación de esporas de *Streptomyces* en la conjugación intergenérica.

YED (Gil *et al.* 1985): extracto de levadura 1 % (p/v), glucosa 1 % (p/v). El pH se ajusta a 7,0. Empleado para el crecimiento de *C. utilis* y, su versión sólida (2 o 1 % (p/v) agar), en los bioensayos para detectar actividad antifúngica frente a *C. utilis*.

2.2.4. Aditivos empleados en los medios de cultivo

Cuando fue necesario los medios de cultivo se suplementaron con diversos componentes. Debido a su termolabilidad, se esterilizaron todos por filtración empleando filtros de 0,22 μm de diámetro de poro, con la excepción de los que se disuelven en solventes orgánicos puesto que no necesitan ser esterilizados.

2.2.4.1. Antibióticos

La adición de uno o varios antibióticos a un medio de cultivo tiene como objetivo la selección de clones resistentes dentro de una población heterogénea, o bien el mantenimiento de la homogeneidad de una población microbiana ya resistente (especialmente en el caso de marcadores de resistencia vinculados a plásmidos replicativos, que de otro modo podrían perderse en ausencia de presión selectiva). Todos los antibióticos, salvo indicación en contrario, se conservaron en solución y a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ácido nalidíxico. Usado en las conjugaciones para evitar la proliferación de la cepa *E. coli* utilizada, ya que no afecta el crecimiento de *Streptomyces*. Se preparó a una concentración de 25 mg/ml en NaOH 0,15 M. La concentración final en el medio de cultivo fue de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Ampicilina (Amp). Fue adquirida en forma de preparado farmacéutico Britapen (Beecham S.A.). Se preparó a una concentración de 200 mg/ml en solución acuosa. La concentración final fue de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Apramicina (Apra). Empleada en forma de sulfato de apramicina. Se preparó a una concentración de 50 mg/ml en solución acuosa. La concentración final en medio sólido fue de 50 µg/ml, y en el caso de medio líquido 20 µg/ml (*E. coli*) o 2,5 µg/ml (*Streptomyces*).

Cloranfenicol (Cm). Se preparó a una concentración de 100 mg/ml en etanol 100 %, y se utilizó a una concentración final de 50 µg/ml.

Kanamicina (Kan). Empleada en forma de sulfato de kanamicina. Se preparó a una concentración de 100 mg/ml en solución acuosa y se conservó a 4 °C. Se empleó a una concentración final de 50 µg/ml, excepto en cultivos líquidos de *Streptomyces* en los que la concentración final fue de 10 µg/ml.

Tioestreptona (Tsr). Se preparó a una concentración de 50 mg/ml en DMSO y se empleó a una concentración final de 50 µg/ml en medio sólido y 5 µg/ml en medio líquido.

2.2.4.2. Otros aditivos

IPTG. Se preparó a una concentración de 1 M en agua mili-Q. Para la selección de transformantes se usó a una concentración final de 100 mM. Se conservó a -20 °C.

X-Gal. Se preparó en solución concentrada a 20 mg/ml en N,N'-dimetilformamida. En los experimentos de selección de transformantes de *E. coli* se utilizó a una concentración final de 30 µg/ml. Se conservó a -20 °C y protegida de la luz.

2.3. Crecimiento de los microorganismos

2.3.1. Crecimiento de *E. coli*

Los cultivos en medio líquido de las diferentes cepas de *E. coli* se iniciaron mediante el método de resiembra, o bien, se emplearon alícuotas de las suspensiones guardadas para su conservación. El crecimiento de *E. coli* se realizó, salvo situaciones excepcionales que serán indicadas cuando corresponda, en medio LB con los aditivos requeridos en cada caso y a 37 °C, con una agitación orbital de 250 rpm.

Para el crecimiento en medio sólido se sembraron placas de LA que se incubaron a 37 °C, salvo en determinados experimentos en los que el crecimiento se llevó a cabo a 30 °C.

2.3.1.1. Estimación del crecimiento en cultivos líquidos

Cuando fue necesario, el crecimiento de los cultivos líquidos de *E. coli* fue estimado basándose en la densidad óptica de los mismos frente a una longitud de onda de 600 nm (DO_{600}), determinada con la ayuda de un espectrofotómetro Hitachi U-2900.

2.3.2. **Crecimiento de *Streptomyces***

Las diferentes cepas de *Streptomyces* se crecieron a 30 °C y, cuando se desarrollaron en medio líquido, a 250 rpm en matraces con indentaciones para facilitar la dispersión y oxigenación del cultivo.

Para la obtención de esporas se utilizó el medio TBO, y para fermentaciones y crecimiento en medio líquido se empleó el medio YEME sin sacarosa. Siempre que el objetivo fue un crecimiento rápido de *Streptomyces*, se emplearon los medios TSB y TSA como medio líquido y sólido, respectivamente.

2.3.2.1. Estimación del crecimiento en cultivos líquidos

Para cuantificar el crecimiento de los cultivos líquidos de *Streptomyces*, se valoró su peso seco por unidad de volumen. Para ello se recogieron dos mililitros de muestra del cultivo, se separó el micelio centrifugando durante 5 minutos a 10000 rpm, y posteriormente se lavó este micelio con un mililitro de agua destilada también mediante centrifugación. Este paso de lavado se repitió dos veces para eliminar completamente las sales del medio. Tras el último lavado, el micelio se resuspendió en un mililitro de agua destilada y se dejó deshidratando a 80 °C durante 72 horas en un cestillo de aluminio previamente pesado. El cestillo con el micelio ya seco se pesó en una balanza de precisión, y el incremento de masa con respecto al cestillo tarado permitió calcular la biomasa existente en los dos mililitros de cultivo originales.

2.4. **Vectores plasmídicos**

A continuación se describen los vectores utilizados en este trabajo.

pIJ773 (Gust *et al.* 2003). Plásmido multicopia derivado del pBlueScript KS (+) con el origen de transferencia *oriT* del plásmido RP4. Su tamaño es de 4,3 kb y posee el gen de resistencia *bla* (ampicilina) como marcador de selección. Además, contiene la casete de

resistencia *aac(3)IV* flanqueada por las secuencias FRT que son reconocidas por la recombinasa FLP (Datsenko & Wanner, 2000). Utilizado en la técnica REDIRECT[®].

pIJ790 (Gust *et al.* 2003). Plásmido de 6,1 kb derivado del plásmido de recombinación λ RED pKD20 (Datsenko & Wanner, 2000), con origen de replicación de *E. coli oriR101* y replicón dependiente de temperatura *repA101ts*. Posee el gen *cat* de resistencia al cloranfenicol como marcador de selección, y los genes *bet*, *exo* y *gam* que favorecen el proceso de recombinación para interrumpir genes de interés que están bajo el control de un promotor inducible por L-arabinosa (P araBAD), y del activador *araC*, también presente en el vector. Se utiliza en la técnica REDIRECT[®].

pSET152neo (Vicente *et al.* 2009). Plásmido integrativo de 7,1 kb que deriva del pSET152. Se utilizó el vector pMB1neo (Rodríguez-García *et al.* 2006) para obtener el gen *neo* de resistencia a kanamicina. En un primer paso se eliminó el sitio de corte único EcoRI existente en pSET152 (mediante digestión y rellenado de extremos seguido de religación) obteniendo así la versión pMB1neo Δ . El gen de resistencia se introdujo en el sitio de corte único EcoRV como un fragmento BamHI de 1379 bp con los extremos rellenados.

pKU402 (Pang *et al.* 1994). Cósmido que deriva del plásmido pUC19. Incluye en su secuencia un gen de resistencia a ampicilina (*bla*) y las regiones promotoras T3 y T7. Este cósmido se usó para la construcción de la genoteca de *S. avermitilis* (Omura *et al.* 2001).

pUC19 (Yanisch-Perron *et al.* 1985). Vector multicopia derivado del plásmido pBR322 y con el origen de replicación *colE1* de *E. coli*. Con un tamaño de 2686 bp., este plásmido contiene dos marcadores de selección: un gen de resistencia a ampicilina (*bla*) y parte del gen *lacZ* (*laZ*) que codifica el fragmento amino terminal (146 aminoácidos) de la β -galactosidasa (que se expresa bajo un promotor inducible por IPTG), lo que posibilita la α -complementación de la delección *lacZ* Δ M15 presente en las cepas de *E. coli* que habitualmente se transforman con este plásmido (como es el caso de la ya mencionada *E. coli* DH5 α). Este vector se empleó de manera sistemática para la clonación de fragmentos de DNA.

pUZ8002 (Paget *et al.* 1999). Plásmido conjugativo no transmisible. Incluye genes *tra* (procedentes del plásmido pRK2) que permiten movilizar material genético de una célula a otra, actuando en *trans*. Además, posee el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección.

2.5. Métodos de manipulación y análisis de DNA

2.5.1. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* (minipreparaciones)

Método empleado para el análisis de un elevado número de muestras de forma rápida (Holmes & Quigley 1981).

Procedimiento:

-
- Tomar una colonia con un palillo estéril e inocular una placa de LA seguida de un microtubo de 1,5 ml con 1 ml de medio LB, ambos suplementados con el (los) antibiótico (s) apropiado(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 10000 rpm, de 3 a 5 minutos.
 - Mientras tanto, mezclar 350 µl de STET³ y 10 µl de lisozima (10 mg/ml) por cada minipreparación.
 - Eliminar el sobrenadante de los microtubos por inversión y capilaridad (con la ayuda de un papel seca manos), y añadir 360 µl de la mezcla a cada microtubo.
 - Resuspender por completo el precipitado con el vortex y hervir durante 45 segundos. Es importante no exceder este tiempo, o nos expondremos a la aparición de numerosos restos de DNA genómico fragmentado en nuestra purificación final de material plasmídico.
 - Centrifugar durante 15 minutos a 10000 rpm y eliminar con un palillo estéril el precipitado de restos celulares y proteínas.
 - Precipitar el DNA añadiendo al sobrenadante 1/10 volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 1 volumen de isopropanol. Mezclar bien por inversión e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
 - Centrifugar a temperatura ambiente durante 15 minutos a 10000 rpm.
 - Eliminar el sobrenadante por inversión y dejar secar el precipitado. Resuspender en 30 µl de TE.
-

³ STET: sacarosa 8 % (p/v); Tritón X-100 0,5 % (v/v); EDTA 50 mM pH 8,0; Tris-HCl 10 mM pH 8,0.

2.5.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* (lisis alcalina)

Método utilizado para la obtención de grandes cantidades de DNA plasmídico (Birnboim & Doly 1979).

Procedimiento:

- Inocular 100 ml de medio LB con la cepa de *E. coli* portadora del plásmido que se pretende aislar. Incubar durante 12-16 horas a 37 °C en agitación a 250 rpm. El medio debe estar suplementado con el (los) antibiótico(s) necesarios(s).
- Recoger las células por centrifugación en tubos de centrifuga tipo Falcon de 50 ml a 6000 rpm durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante.
- Resuspender las células en 5 ml de solución I⁴ y añadir lisozima hasta una concentración final de 5 mg/ml. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 10 ml de solución II⁵, agitar suavemente y mantener en hielo 10 minutos.
- Añadir 7,5 ml de solución III⁶, agitar vigorosamente y mantener en hielo 10 minutos.
- Centrifugar a 4 °C durante 30 minutos y 6000 rpm para precipitar el material floculado (resultante de la precipitación de las proteínas y el DNA cromosómico).
- Filtrar el sobrenadante a un nuevo tubo Falcon a través de una punta de micropipetas P5000 rellena con algodón hidrofílico, para asegurar la eliminación de todo el material precipitado.
- Precipitar el DNA plasmídico con 0,6 volúmenes de isopropanol y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2. Dejar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Centrifugar a temperatura ambiente durante 10 minutos a 6000 rpm. Descartar el sobrenadante y añadir 5 ml etanol absoluto. Mezclar en vortex y centrifugar 5 minutos 6000 rpm.
- Eliminar sobrenadante y dejar secar el precipitado hasta que se evapore el etanol.

⁴ Solución I: Tris-HCl 25 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0; glucosa 50 mM.

⁵ Solución II: NaOH 0,2 N; SDS 1 % (v/v). Esta solución se prepara en el momento, adicionando en último lugar el NaOH.

⁶ Solución III: 60 % (v/v) acetato potásico 5 M y 11,5 % (v/v) ácido acético glacial en una solución acuosa. El pH final es de 4,8 (aproximadamente). Conservar a 4 °C.

- Resuspender el precipitado en 500 µl de tampón TE⁷ y añadir 4 µl de RNasa A⁸ a 10 mg/ml. Incubar durante 30 minutos a 37 °C.
 - Para eliminar restos de proteínas y RNA, transferir la solución de DNA a un microtubo de 2 ml y añadir 1 volumen de fenol neutro. Mezclar bien por agitación y centrifugar 5 minutos a 8000 rpm. Repetir 1 ó 2 veces, hasta obtener una interfase limpia.
 - Recuperar la fase acuosa (superior) en un nuevo microtubo y añadir 1 volumen de fenol-CIA⁹ para eliminar los restos de fenol. Agitar energéticamente y centrifugar durante 5 minutos a 8000 rpm.
 - Transferir la fase acuosa (superior) a un nuevo microtubo. Actuar con cuidado para evitar arrastrar CIA.
 - Para la precipitación, añadir 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Mezclar por inversión.
 - Mantener la solución 1-2 horas a -20 °C ó 30 minutos a -80 °C.
 - Centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Eliminar el sobrenadante. Lavar el precipitado añadiendo 1 ml de etanol 70 % y centrifugando 5 minutos a 10000 rpm. Retirar el sobrenadante y dejar secar el precipitado.
 - Resuspender en tampón TE. Conservar a 4 ó -20 °C.
-

2.5.3. Aislamiento de DNA total de *Streptomyces* (*Salting out*)

El método descrito se denomina “*Salting out*” (Pospiech & Neumann 1995) y se encuentra recogido en el manual *Practical Streptomyces Genetics* (Kieser *et al.* 2000).

Procedimiento:

- Inocular 50 ml de medio TSB o YEME sin sacarosa con esporas o micelio de *Streptomyces*. Suplementar el medio con antibióticos de ser necesario.
- Incubar en agitación orbital (250 rpm), a 30 °C durante 48 horas.

⁷ Tampón TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0.

⁸ RNasa A: preparada a 10 mg/ml en un tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y NaCl 15 mM. Las DNasas presentes se eliminaron por ebullición de la solución durante 15 minutos. Se enfría lentamente y se almacena a -20 °C.

⁹ CIA: solución de 24 partes de cloroformo y una de alcohol isoamílico.

- Recoger el micelio mediante centrifugación a 6000 rpm durante 5 minutos en un tubo tipo Falcon de 50 ml.
 - Resuspender el micelio en 5 ml de tampón SET¹⁰ y añadir 100 µl de solución de lisozima (50 mg/ml). Incubar durante 30-60 minutos a 37 °C.
 - Añadir 140 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y mezclar. Añadir 600 µl de SDS 10 % y mezclar por inversión. Incubar a 55 °C durante 2 horas, mezclando ocasionalmente por inversión.
 - Añadir 2 ml de NaCl 5 M y mezclar vigorosamente por inversión. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
 - Añadir 5 ml de cloroformo y mezclar suavemente por inversión. Mantener durante 30 minutos a temperatura ambiente invirtiendo el tubo cada cierto tiempo.
 - Centrifugar durante 15 minutos a 5000 rpm y 20 °C.
 - Transferir la fase acuosa (superior) a otro tubo y añadir 0,6 volúmenes de isopropanol. Mezclar por inversión. Normalmente se forma un ovillo que se rescata con una punta de micropipeta. Si hay poco DNA para que se forme el ovillo, se puede centrifugar la suspensión a 6000 rpm durante 10 minutos para forzar la precipitación.
 - Lavar el DNA con etanol 70 % y centrifugar. Retirar el sobrenadante y dejar secar el precipitado.
 - Añadir 100-500 µl de tampón TE, en función de la cantidad de DNA obtenido, y dejar en reposo hasta la completa resuspensión del material.
-

2.5.4. Valoración de la concentración y pureza del DNA

Cuando fue necesario, la concentración y pureza del DNA fueron valoradas espectrofotométricamente con la ayuda de un equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). El equipo estima la concentración de la muestra basándose en su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A_{260}), teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia para el DNA de doble cadena equivale a una concentración de 50 µg/ml, mientras que en el caso del DNA de cadena sencilla equivale a un valor de 33 µg/ml.

¹⁰ Tampón SET: NaCl 75 mM; EDTA 25 mM pH 8,0; Tris-HCl 20 mM pH 7,5.

Además, el cociente A_{260}/A_{280} indica la pureza de la muestra. Una muestra de DNA pura presenta una relación A_{260}/A_{280} de 1,8 (Sambrook & Russell 2001). La presencia de proteínas contaminantes en las muestras reduce este coeficiente, ya que algunos de los residuos de aminoácidos en las muestras que típicamente aparecen formando parte de las proteínas presentan picos de absorción a 289 nm.

Otra relación indicada por el equipo es el cociente A_{260}/A_{230} , que se usa como una segunda medida de pureza. Su valor en el caso de ácidos nucleicos puros se encuentra entre 2,0 y 2,2. Valores inferiores indican la presencia de contaminantes no proteicos que absorben a 230 nm, como por ejemplo el EDTA, los hidratos de carbono, y el fenol.

2.5.5. Tratamiento enzimático del DNA

2.5.5.1. Digestión con endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción necesarias para este trabajo se utilizaron siguiendo las recomendaciones de los distintos proveedores (Takara Bio Inc., New England Biolabs Inc. y MBI Fermentas).

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 (que presentan un 50 % volumétrico de este compuesto), evitando que se pueda inhibir la actividad enzimática o inducir actividades inespecíficas de tipo STAR.
- Si el DNA se encuentra suspendido en tampón TE, llevar a cabo la reacción en un volumen que supere al menos 10 veces el volumen del DNA a digerir. De esta manera se previene que el EDTA presente en el tampón interfiera con la actividad enzimática.

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
DNA	(x) µg de DNA a digerir
Enzima de restricción	1-2 U/µg de DNA
Agua mili-Q	hasta completar el volumen final

- Incubar la reacción a la temperatura adecuada para cada enzima, durante un tiempo variable (generalmente entre 1 y 8 horas).
- Analizar mediante electroforesis en geles de agarosa (ver apartado 2.5.7).

2.5.5.2. Modificación enzimática de extremos

Los extremos protuberantes generados por las enzimas de restricción fueron, en ocasiones, modificados para obtener extremos romos y poder ligar así fragmentos de DNA, en principio, no compatibles. En el caso de extremos 5' protuberantes el rellenado de los extremos se llevó a cabo utilizando la actividad polimerasa 5'→3' del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*.

El tratamiento con polimerasa Klenow se realizó según las indicaciones del fabricante (Roche) como se describe a continuación:

- Mezclar en un microtubo:

Tampón (10x)	1/10 del volumen final
Nucleótidos (dNTPs)	1 mM de cada dNTP necesario
DNA	1 µg
Klenow	1 U
Agua mili-Q	completar hasta 20 µl

- Incubar la reacción a 37 °C durante 15 minutos
- Inactivar la enzima incubando a 65 °C durante 10 minutos ó mediante la adición de 2 µl de EDTA 0,2 M (pH 8,0).

2.5.5.3. Ligaciones

La DNA ligasa del fago T4 es una enzima que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato de DNA de doble cadena, requiriendo iones Mg^{2+} y ATP como cofactores. Se empleó en todos los casos siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche).

Las pautas generales para ligar fragmentos de DNA fueron las siguientes:

- Mezclar en un microtubo:

Tampón de ligasa (10x)	1/10 del volumen final
Ligasa del fago T4	2-7 U
DNA del vector	x (ng de DNA)
Fragmento de DNA	cantidad equimolecular o superior al vector
Agua mili-Q	completar hasta 10 μ l

- Incubar la reacción, teniendo en cuenta que la ligasa de fago T4 es enormemente flexible en cuanto a las temperaturas de reacción que admite su actividad. En general, para las ligaciones con extremos cohesivos se incubó la mezcla a 37 °C durante 30 minutos, y para extremos romos, a temperatura ambiente durante 1-4 horas.
- Inactivar la ligasa a 65 °C durante 10 minutos. Dar un pulso en la centrífuga para recoger toda la solución en el fondo del tubo.
- Transformar en una cepa apropiada de *E. coli*.

2.5.6. **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Esta técnica descrita inicialmente por (Mullis & Faloona 1987) permite la obtención de un elevadísimo número de copias de un determinado fragmento de DNA, gracias a la repetición cíclica de tres pasos fundamentales:

- Desnaturalización: consiste en la separación de las dos cadenas del DNA molde (el DNA que contiene la secuencia que se pretende amplificar) mediante la incubación a elevada temperatura (94-98 °C). Las cadenas disociadas permanecerán de esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente como para permitir la unión de los cebadores.

- Hibridación de los cebadores: básicamente consiste en la unión de dos oligonucleótidos o *primers* al DNA molde. Cada uno de los cuales es complementario a una de las dos cadenas del DNA y están diseñados para quedar enfrentados por sus extremos 3' tras el anillamiento, flanqueando la región a amplificar. La temperatura escogida para llevar a cabo este paso constituye un factor crítico en la especificidad y en la eficiencia de la PCR, aunque como orientación puede decirse que suele estar unos 4 °C por debajo de la temperatura de fusión más baja de los dos *primers*.
- Extensión: consiste en la síntesis del DNA desde el extremo 3' de los *primers* por la acción de una DNA polimerasa termoestable que emplea como molde la región flanqueada por los mismos, a una temperatura que puede variar dependiendo de la enzima empleada (68-72 °C), durante un tiempo que depende de la longitud del fragmento a amplificar y de la procesividad de la enzima.

En el mercado existen diversas DNA polimerasas termoestables, teniendo cada una de ellas unas características propias y requiriendo unas condiciones específicas para llevar a cabo la reacción. Para este trabajo, se ha utilizado la DNA polimerasa *GoTaq*[®] (Promega) para las reacciones rutinarias y cuando la introducción de un pequeño número de errores no resultaba crucial para el experimento (esta enzima se caracteriza por dejar una desoxiadenosina en cada extremo 3' del fragmento amplificado), y dos enzimas de alta fidelidad para los casos en los que la fidelidad en la copia se hizo imprescindible, la polimerasa *Phusion Hot Star* (Finnzymes) y la polimerasa *Hybrid* (EURX[®]).

Durante este trabajo se han realizado numerosas reacciones de PCR, cada una de las cuales ha requerido unas condiciones diferentes en cuanto al tipo de polimerasa utilizada, número de ciclos, temperatura de hibridación, tiempo y temperatura de extensión. De manera general y de acuerdo con el catálogo *PCR applications manual* (Roche), se pueden establecer los valores normales de los distintos componentes para la realización de una reacción típica de amplificación por PCR especificados en la Tabla 2.1. Estos valores son orientativos y han de ser ajustados en función de la DNA polimerasa (según las indicaciones de su fabricante), el tipo de región a amplificar y otros factores. De igual forma, en algunas reacciones se hace necesario el uso de aditivos que potencian la eficiencia o especificidad de la reacción (DMSO, seroalbúmina, detergentes, betaína, etc.). En el caso concreto de la realización de reacciones de PCR que tengan como molde DNA de

Streptomyces, dado su elevado contenido G+C, fue necesario emplear como aditivo DMSO (8 % del volumen final) en la mezcla de PCR, con el fin de facilitar la separación de las cadenas del DNA molde y aumentar la eficiencia de la reacción.

Tabla 2.1. Componentes necesarios para una reacción de PCR y sus concentraciones finales.

Tampón de reacción	x µl (1x)
MgCl ₂	1-5 mM (normalmente 3,5 mM)
dNTPs	50-500 µM (normalmente 200 µM)
DNA molde	1-10 ng DNA genómico 0,1-1 ng DNA plasmídico
DNA polimerasa	0,5-2,5 U
DMSO	8 %
Agua mili-Q	hasta completar el volumen de reacción

Los tiempos y temperaturas empleados para llevar a cabo una reacción de PCR dependen también de diversos factores como el contenido en G+C del DNA, la secuencia de los oligonucleótidos (que determina la temperatura de hibridación), la longitud del fragmento a amplificar o la velocidad de procesamiento de la DNA polimerasa, entre otros. De modo genérico estos tiempos y temperaturas aparecen reflejados en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Condiciones de tiempos y temperaturas de una reacción de PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98 °C	2 minutos	1
Desnaturalización	98 °C	40 segundos	35-40
Anillamiento	según el <i>primer</i>	30 segundos	
Extensión	72 °C	1 minuto por kb	
Extensión final	72 °C	5 minutos	1

Al finalizar cualquier reacción de PCR, se debe analizar el resultado de la misma en un gel de agarosa, comprobando el tamaño y la cantidad del fragmento amplificado, así como la presencia o ausencia de bandas de inespecíficas.

Los *primers* sintéticos utilizados fueron adquiridos a Sigma-Aldrich®, a Bonsai Technologies, o a IDT®. Cuando se necesitó añadir secuencias de corte para enzimas de

restricción, se siguieron las recomendaciones presentes en el catálogo comercial de New England Biolabs Inc. Todos los oligonucleótidos empleados, así como sus temperaturas de fusión (T_m) se encuentran incluidos en el Anexo I de este trabajo.

2.5.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa se realizó según lo descrito en Sambrook & Russell 2001. Se utilizó agarosa (Pronadisa) y tampón TAE¹¹ con concentraciones entre 0,8 y 3 % (p/v), dependiendo del rango de tamaños de los fragmentos de DNA a separar. Los geles con mayor concentración de agarosa se utilizaron para separar fragmentos que diferían en pocos bp, o para separar fragmentos pequeños (hasta 500 bp), mientras que los geles de menor concentración se emplearon para separar fragmentos de mayor tamaño, o cuya diferencia entre si era mayor que 500 bp.

Las muestras de DNA se mezclaron con 1/10 del volumen final de tampón de carga 10×10^{12} para posibilitar la carga del material en los pocillos y para servir de referencia de la movilidad de las muestras durante la electroforesis.

Por norma general, la electroforesis se llevó a cabo en cubetas diseñadas a tal efecto (BioRad) y a un voltaje constante entre 70 y 90 V. La duración de la electroforesis dependió de la longitud y concentración del gel empleado, así como del tamaño de los fragmentos de DNA a separar. Para la visualización del resultado se empleó bromuro de etidio (BrEt), que se caracteriza por su capacidad intercalante en la doble cadena y en las estructuras secundarias de los ácidos nucleicos de cadena sencilla, y la emisión de una luz de color naranja cuando se excita con luz ultravioleta. Una vez terminada la electroforesis, el gel fue teñido mediante inmersión en una solución de BrEt, y estas propiedades permitieron la visualización del DNA y fotografiar el resultado.

2.5.8. Recuperación de fragmentos de DNA separados en geles de agarosa

Para recuperar los fragmentos de DNA de interés se utilizó un método comercial, el *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Este kit emplea un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión

¹¹ TAE 50x: un litro se prepara con 242 g Tris base (2 M), 1 ml de ácido acético glacial (5,7 % (v/v)), y 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0 (50 mM).

¹² Tampón de carga 10x: azul de bromofenol 0,25 % (p/v); xilencianol 0,25 % (p/v); glicerol 40 % (v/v); EDTA 0,1 M; SDS 0,1 %; Tris-HCl 10 mM.

del DNA de doble cadena (0,1-48 kb) a la matriz de la columna. Una vez que el DNA es “retenido”, las proteínas y sales contaminantes son eliminadas mediante un lavado. El DNA es posteriormente eluido en un tampón de baja fuerza iónica. Se obtiene un porcentaje de recuperación mayor al 60 %. En todos los casos se siguieron las instrucciones que acompañan al kit.

2.5.9. Hibridación de DNA transferido a una membrana (*Southern blot*)

Esta técnica permite la detección de una secuencia de DNA específica en muestras de DNA, combinando la transferencia a una membrana de fragmentos de DNA separados por electroforesis y la detección mediante la hibridación de una sonda marcada. El autor que lo describió por primera vez también dio el nombre al método (Southern 1975).

2.5.9.1. Transferencia a soportes sólidos

En este paso se transfieren a un soporte sólido los fragmentos de DNA obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción, y que fueron separados por tamaño mediante una electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica se basa en la fragmentación *in situ* del DNA, desnaturalización del mismo y transferencia de los fragmentos en forma monocatenaria a la membrana de nylon, para su posterior fijación a la misma mediante luz UV. La transferencia se realizó con el sistema de vacío *VacuGene XL* (GE Healthcare).

Procedimiento:

-
- Separar los fragmentos de DNA mediante electroforesis (apartado 2.5.7), teñir el gel y fotografiarlo. Utilizar un marcador de peso molecular marcado con digoxigenina (*DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled*, Roche).
 - Cortar una membrana de nailon (*Hybond-N*, GE Healthcare) 1 cm por cada lado mayor que el tamaño del gel y humedecerla con agua destilada durante 1 minuto y después con SSC 20x¹³ durante 5 minutos. Depositarla en la unidad de transferencia, ensamblada junto con el gel (previamente lavado con agua destilada para eliminar al máximo los residuos de BrEt) y ventana de plástico de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
 - Encender la bomba de vacío (transferir a 50 mbares).

¹³ SSC 20x: NaCl 3 M; citrato sódico 0,3 M pH 7,0.

- Cubrir toda la superficies del gel con solución despurinizante¹⁴ y dejar 15-20 minutos (o hasta que el azul de bromofenol del tampón de carga cambie su color de azul a amarillo). Transcurrido este tiempo descartar la solución.
 - Cubrir la superficie de gel con solución desnaturalizante¹⁵ durante 15-20 minutos (el azul de bromofenol debe recuperar su color azul original).
 - Retirar la solución anterior y cubrir la superficie del gel con la solución neutralizante¹⁶ durante 20-25 minutos.
 - Por último, retirar la solución neutralizante y cubrir la superficie del gel con SSC 20x durante 1-2 horas.
 - Retirar todo el líquido y marcar con un bolígrafo la posición de los pocillos del gel sobre la membrana antes de retirarla. Apagar la bomba de vacío.
 - Retirar el gel transferido y verificar la eficiencia del proceso, volviendo a teñirlo con BrEt.
 - Colocar el filtro sobre papel Whatman® 3MM y fijar el DNA mediante la aplicación de luz ultravioleta a la membrana (*UV-Stratalinker 2400 Crosslinker*, Stratagene). Lavar con SSC 6x para eliminar el exceso de sales y dejar secar.
 - Estas membranas se pueden conservar a 4 °C protegidas con papel Whatman® 3MM y papel de aluminio durante varios meses.
-

2.5.9.2. Marcaje de sondas de DNA

El fragmento de ácido nucleico usado como sonda en procesos de hibridación debe ser marcado de tal forma que sea posible su posterior detección. El sistema de marcaje no radioactivo comercializado por la compañía Roche (*DIG-High Prime*) emplea un hapteno esteroide (digoxigenina) para marcar fragmentos de DNA. 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 las membranas ya utilizadas. Las sondas así marcadas son generadas enzimáticamente por el método de *random priming* (Feinberg & Vogelstein 1983).

¹⁴ Solución despurinizante: HCl 0,25 M.

¹⁵ Solución desnaturalizante: NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 N.

¹⁶ Solución neutralizante: NaCl 3 M; Tris-HCl 1 M pH 7,5.

El método se basa en la incorporación al azar en el DNA de un análogo de nucleótidos (digoxigenina-1-dUTP), gracias a la extensión de hexanucleótidos iniciadores por el fragmento Klenow. De este modo se incorporan moléculas de digoxigenina en forma de DIG-11-dUTP en vez de dTTP en una proporción de una cada 20-25 nucleótidos. Esta densidad de haptenos en el DNA 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 fabricante del mencionado kit.

2.5.9.3. Hibridación DNA-DNA

Una vez transferido el DNA y marcada la sonda, se lleva a cabo la hibridación. En el proceso 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 DNA fijado en la membrana. La especificidad de esta unión depende tanto de las condiciones utilizadas durante la incubación (temperatura a la que se desarrolla el proceso y la concentración de sales y detergentes presentes 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 DNA. La disminución de la unión inespecífica durante los lavados se consigue: 1) disminuyendo la concentración de sales del tampón de lavado, 2) aumentando la concentración de detergentes en el tampón de lavado y 3) aumentando la temperatura y la duración del lavado.

La **detección**, por último, permite visualizar los fragmentos de DNA a los que se ha unido la sonda. La detección se realiza mediante métodos inmunológicos que se basan en la unión de un anticuerpo anti-digoxigenina al DNA sonda. Dicho anticuerpo está conjugado con la enzima fosfatasa alcalina. El revelado de la membrana se puede llevar a cabo mediante quimioluminiscencia usando *CDP-Star*TM (Roche), compuesto que emite luz tras su desfosforilación enzimática. La emisión de luz resultante puede ser detectada con

rapidez y facilidad en una película de autoradiografía. Todos los siguientes pasos con la membrana en inmersión incluyen agitación suave.

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 prehibridación¹⁷. Incubar a la temperatura adecuada (generalmente 80 °C debido al elevado contenido en G+C de *Streptomyces*) durante 1-2 horas.
- Hervir la sonda previamente marcada durante 10 minutos para desnaturalizar el DNA y enfriar rápidamente en hielo.
- Añadir la sonda así desnaturalizada a la solución de prehibridación. Esta solución de hibridación¹⁸ puede ser reutilizada varias veces, y 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 este tiempo, recoger la solución de hibridación en un tubo para su reutilización y conservarla a -20 °C.
- Lavar dos veces la membrana con la solución de lavado I¹⁹ a temperatura ambiente, manteniéndola en agitación durante 15 minutos.
- Lavar dos veces la membrana con la solución de lavado II²⁰ durante 25 minutos a 65 °C.
- Tratar la membrana con tampón de lavado²¹ durante 1-2 minutos. Descartar la solución.
- Bloquear la membrana con la solución de bloqueo²² durante 30 minutos.
- Sustituir el tampón de bloqueo por la solución de anticuerpos²³ y dejar al menos 30 minutos.

¹⁷ Solución de prehibridación: SSC 3x; N-laurilsarcosina 0,1 % (p/v); SDS 0,02 %; agente bloqueante 2 % (p/v) (*Blocking Reagent*, Roche).

¹⁸ Solución de hibridación: solución de prehibridación con la sonda marcada.

¹⁹ Solución de lavado I: SSC 2x; SDS 0,1 %.

²⁰ Solución de lavado II: SSC 0,5x; SDS 0,1 %.

²¹ Tampón de lavado: ácido maléico 0,1 M pH 7,5; NaCl 0,15 M; Tween-20 0,3 % (v/v).

²² Solución de bloqueo: tampón de lavado más 1 % (p/v) de agente bloqueante.

²³ Solución de anticuerpos: diluir en una proporción 1:10000 los anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con la fosfatasa alcalina (Roche) en solución de bloqueo.

- Eliminar la solución de anticuerpos y lavar la membrana dos veces con tampón de lavado durante 15 minutos (cada vez).
- Eliminar el tampón de lavado y sustituirlo por tampón III²⁴ durante 5 minutos.
- Tratar la membrana con la solución *CDP-Star*^{TM25} durante 15 minutos en oscuridad y con el lado de la membrana por el que fue transferido el DNA hacia arriba. Guardar la solución de *CDP-Star*TM (permite varios usos).
- Dejar secar y envolver la membrana en plástico (para evitar contaminar el material esponjoso que reviste las cassetes de autoradiografía).
- Exponer la membrana a una película de autoradiografía (*Hyperfilm*, GE Healthcare) en una casete, con el lado que contiene el DNA en contacto con la película, durante un tiempo que puede variar entre 5 y 30 minutos.
- Revelar la película someténdola al siguiente tratamiento: 1-5 minutos en revelador de rayos X²⁶ (Kodak), 1 minuto en solución de paro²⁷, y 5 minutos en fijador²⁸ (Kodak). Lavar con agua y dejar secar.

2.5.10. Secuenciación del DNA

La secuenciación del DNA se realizó siguiendo el método de los didesoxinucleótidos (Sanger *et al.* 1977). Este método se basa en la utilización de moléculas (ddNTPs) análogas a los desoxinucleótidos, pero que carecen del grupo 3' hidroxilo, lo que impide la introducción del nucleótido siguiente por la DNA polimerasa. El DNA a secuenciar es utilizado como molde en la síntesis de DNA *in vitro* utilizando una PCR asimétrica (se utiliza un solo oligonucleótido por lo que se amplifica una de las cadenas; la tasa de acumulación es lineal y no exponencial). Por otro lado, la adición a la reacción de ddNTPs marcados con diferentes fluoróforos da lugar a la formación de productos de diferentes longitudes por parada de la reacción cada vez que se incorpora un ddNTP. De este modo, los productos formados están marcados terminalmente con uno de los 4 didesoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Posteriormente, los fragmentos de

²⁴ Tampón III (10x): Tris-HCl 1 M pH 9,5; NaCl 4 M.

²⁵ Solución CDP-StarTM: se prepara diluyendo 100 veces en el tampón III a 1x, la solución del compuesto disodio 2-cloro-5-(4-metoxiespiro {1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan-4-il)-1-fenilfosfato, quedando a una concentración final de 0,25 mM. Se almacena a 4 °C en oscuridad.

²⁶ Revelador: diluir el preparado comercial en proporción 1:31 en agua mili-Q.

²⁷ Solución de paro: ácido acético 2,5 % (v/v).

²⁸ Fijador: diluir el preparado comercial en proporción 1:9 en agua mili-Q.

DNA son sometidos a una electroforesis capilar, y la excitación de los mismos por un rayo láser da lugar a la emisión de la fluorescencia característica de cada uno de los fluoróforos utilizados. Se utilizó el *ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) y la secuenciación de los productos amplificados se llevó a cabo en el secuenciador *ABI PRISM® 3130* (Applied Biosystems).

2.6. Introducción de DNA en *E. coli*

2.6.1. Transformación

A lo largo de este trabajo, la transformación mediante choque térmico fue el método empleado para la introducción en *E. coli* de las diferentes construcciones plasmídicas. Para ello, primero fue necesario obtener células competentes de la cepa que se pretendía usar en cada caso como receptora del plásmido.

2.6.1.1. Inducción del estado de competencia

Para inducir el estado de competencia de *E. coli* se usó siempre el método del cloruro de rubidio (Hanahan 1983, 1985). Este método permite la obtención de células competentes con una eficiencia de transformación de hasta 10^8 transformantes por μg de DNA. Se utilizaron estas células para experimentos de transformación tanto de plásmidos circularizados como de mezclas de ligación.

Procedimiento:

-
- Inocular 10 ml de medio SOB con varias colonias aisladas de la cepa (para evitar la propagación de mutaciones puntuales), e incubar durante 8-10 horas a 37 °C con agitación constante de 250 rpm.
 - Con 1 ml del cultivo anterior inocular 100 ml de medio SOB, e incubar en las mismas condiciones que en el paso anterior hasta alcanzar la DO_{600} deseada, que depende de la cepa (por ejemplo, DH5 α – 0,48; ET12567/pUZ8002 – 0,4).
 - Cuando el cultivo alcanza la DO_{600} deseada, enfriar rápidamente en hielo. Desde este momento es importante mantener las células a una temperatura constante de 4 °C.

- Centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Resuspender suavemente el precipitado celular en 30 ml de solución RF1²⁹ y mantener en hielo durante 30 minutos.
 - Nuevamente, recoger las células por centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos a 4° C y resuspender en 4 ml de solución RF2³⁰.
 - Repartir en alícuotas de 100-125 µl y congelar inmediatamente en nitrógeno líquido. Se almacenan a -80 °C.
-

2.6.1.2. Transformación de células

Para introducir DNA exógeno en células de *E. coli* se utilizó el método de transformación de células competentes mediante choque térmico (Hanahan 1983). Se trata de un método prácticamente universal para las diversas cepas de *E. coli*.

Procedimiento:

- Descongelar en hielo una alícuota de células competentes.
 - Añadir 5 a 10 ng de DNA o una mezcla de ligación (hasta un volumen máximo de 10 µl). Incubar en hielo durante 20 minutos.
 - Someter las células a un choque térmico de 42° C durante 45 segundos.
 - Enfriar en hielo durante 2 minutos.
 - Añadir 600 µl de LB frío e incubar las células durante 1 hora en agitación (250 rpm) a 37 °C.
 - Sembrar en placas de LA suplementado con los aditivos adecuados.
-

2.6.2. **Electroporación**

La electroporación es un método de transfección mecánico que usa un pulso eléctrico para crear temporalmente poros en la membrana celular a través de los cuales

²⁹ Solución RF1: RbCl 100 mM; MnCl₂ 50 mM; acetato potásico 30 mM; CaCl₂ 10 mM; glicerol 15 % (v/v); ajustar a pH 5,8 con ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtración.

³⁰ Solución RF2: MOPS 10 mM; RbCl 10 mM; CaCl₂ 75 mM; glicerol 15 % (v/v); ajustar a pH 6,8 con NaOH. Esterilizar por filtración.

sustancias como ácidos nucleicos pueden pasar hacia dentro de la célula. Se utilizó esta técnica durante el protocolo REDIRECT[®].

2.6.2.1. Inducción del estado de electro-competencia

El procedimiento utilizado en la preparación de células electro-competentes se desarrolló a partir de las especificaciones del protocolo ya descrito (Gust *et al.* 2003).

Procedimiento:

- Inocular 10 ml de medio LB con una colonia aislada e incubar durante 14-18 horas a 37 °C o 30 °C (dependiendo de la cepa) y a 250 rpm.
 - Inocular 100 ml de medio SOB con 2-3 ml del preinóculo, con los aditivos necesarios (para la electroporación de la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790 con un cósmido de *Streptomyces* son necesarios 200 mM de MgSO₄ y cloranfenicol 50 µg/ml).
 - Dejar crecer en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,4.
 - Recuperar las células por centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
 - Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 10 ml de glicerol 10 % previamente enfriado 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 repartir en alícuotas de 50 µl. Pueden utilizarse en el momento o almacenarse a -80 °C previa congelación en nitrógeno líquido.
-

2.6.2.2. Electroporación de células

Para la introducción de material genético en células de *E. coli*, por lo general se siguieron las especificaciones de protocolo original (Gust *et al.* 2003), introduciendo sin embargo algunas alteraciones para ajustar el protocolo a las condiciones de trabajo y así aumentar su eficiencia.

Procedimiento:

- Descongelar una alícuota de células electro-competentes en hielo y añadir el DNA.

- Poner la mezcla en una cubeta de electroporación de 0,2 cm previamente enfriada en hielo (es importante secar los laterales metálicos de la cubeta).
 - Encajar la cubeta en el electroporador (*BioRad GenePulser II*, BioRad) y aplicar un pulso en las siguientes condiciones: 500 Ω , 10 μ F y 2,5 kV o 200 Ω , 25 μ F y 2,5 kV (dependiendo de la concentración del DNA y de la cantidad de células). El tiempo transcurrido durante el paso de corriente fue de 4,5-5 milisegundos.
 - Añadir 1 ml de LB a 4 °C a la cubeta de electroporación y a continuación transferir todo el contenido a un microtubo de 1,5 ml.
 - Incubar 1-2 horas a 37 o 30 °C (dependiendo de la cepa) y a una agitación constante de 250 rpm.
 - Sembrar en LA suplementado con los antibióticos adecuados e incubar a 30 o 37 °C durante 8-10 horas.
-

2.7. Introducción de DNA en *Streptomyces*

2.7.1. Conjugación intergenérica

La conjugación intergenérica permite la movilización de plásmidos de *E. coli* a *Streptomyces*. La ventaja de esta técnica reside en que las construcciones se pueden obtener más fácilmente en *E. coli* y los protocolos de conjugación son relativamente simples. Para que ocurra conjugación intergenérica los vectores deben incluir el *oriT* de RP4 y la cepa de *E. coli* proporcionar las funciones de transferencia en *trans* (Mazodier *et al.* 1989). Si, como es el caso, la cepa de *Streptomyces* contiene un mecanismo de restricción metil-específico, es necesario utilizar una cepa de *E. coli* no metiladora de DNA como la *E. coli* ET12567 (es deficiente en los sistemas de metilación *dam*, *dcm* y *hsd*). Esta cepa posee además el plásmido pUZ8002, que porta los genes de transferencia *tra*.

Se siguió un procedimiento de conjugación previamente descrito (Enríquez *et al.* 2006, Kieser *et al.* 2000).

Procedimiento:

- Transformar el plásmido a conjugar en células competentes *E. coli* ET12567/pUZ8002. Sembrar en LB con los antibióticos de selección adecuados

(Kan y Cm para la cepa, y los antibióticos a los que confiera resistencia el plásmido transformado).

- Inocular una colonia en 5-7 ml de LB suplementado con los antibióticos adecuados. Incubar *over night* (o/n) a 37 °C y 250 rpm.
 - Inocular 50 ml de LB suplementado con los antibióticos usados en el paso anterior con 2 ml de preinóculo. Dejar crecer a 37 °C y 250 rpm hasta que el cultivo alcance una DO₆₀₀ entre 0,4-0,6 (se puede incluso dejar hasta 0,7-0,8 de DO₆₀₀ para intentar mejorar la eficiencia de conjugación).
 - Recuperar las células por centrifugación a 4000 rpm y 4 °C durante 5 minutos.
 - Eliminar el sobrenadante y resuspender suavemente las células en 50 ml de LB frío. Centrifugar durante 5 minutos a 4000 rpm y 4 °C.
 - Lavar de nuevo las células con 50 ml de LB frío y repetir la centrifugación durante 10 minutos.
 - Resuspender las células en un 10 % del volumen inicial con LB frío.
 - Mientras se lavan las células, mezclar aproximadamente 10⁸ de esporas viables de *Streptomyces* (generalmente son 300-500 µl) con 500 µl de 2xTY en un microtubo de 1,5 ml.
 - A la vez que se hace el último lavado, dar un choque térmico a la suspensión de esporas a 45 °C durante 10 minutos (se puede usar 45 o 50 °C) con el fin de inducir la germinación de las esporas. Una vez dado el choque térmico, repartir en partes iguales en dos microtubos la suspensión de esporas.
 - A cada parte de la suspensión de esporas, añadir 500 µl de la suspensión de células de *E. coli* previamente lavadas. Centrifugar durante 2 minutos a 4000 rpm.
 - Descartar el sobrenadante por decantación. Resuspender el precipitado en el volumen residual (aproximadamente 100 µl) y sembrar en placas de MS suplementado con 10 mM de MgCl₂.
 - Incubar a 30 °C durante 16-20 horas.
 - Aplicar una cobertera de 2 ml de agua destilada estéril con ácido nalidíxico (25 µg/ml) y los antibióticos de selección adecuados.
 - Incubar a 30 °C durante 3-7 días hasta observar colonias exconjugantes.
-

2.8. Obtención de mutantes REDIRECT[®]

El protocolo REDIRECT[®] permite la delección de un gen mediante el reemplazamiento del mismo por un casete de resistencia obtenido por PCR. Este método incluye un primer paso donde se sustituye el gen de interés presente en un cósmido dentro de *E. coli*. El casete en cuestión está formado 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 intergenérica para finalmente seleccionar aquellas colonias en las que se ha producido el evento de doble recombinación que resulta en la sustitución del gen por el marcador de resistencia.

Para llevar a cabo las mutaciones se siguió el protocolo desarrollado en el centro John Innes por Gust *et al.* 2003 (disponible en <http://streptomyces.org.uk/>), con ciertas modificaciones introducidas para adaptar el protocolo a otras especies de *Streptomyces* que no sean la utilizada por los autores y para mejorar la eficiencia del mismo.

2.8.1. Purificación del casete de resistencia

El centro John Innes ha desarrollado diferentes plásmidos (<http://streptomyces.org.uk/redirect/index.html>) que contienen el casete de resistencia. En este trabajo se ha utilizado el plásmido pIJ773 que contiene el casete de resistencia a apramicina (*aac(3)IV*) (ver apartado 2.4).

Procedimiento:

-
- Digerir aproximadamente 10 µg del plásmido molde con las endonucleasas de restricción EcoRI y HindIII, en las condiciones apropiadas, para obtener el casete de resistencia.
 - Analizar el resultado de la digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % (ver apartado 2.5.7) y cortar el fragmento de gel que contiene la banda correspondiente al casete (1,4 bp).
 - Purificar la banda (ver apartado 2.5.8) y determinar su concentración (ver apartado 2.5.4).
-

En este paso se obtiene un fragmento de 1382 bp que contiene el casete de resistencia, zonas reconocidas por la enzima FLP recombinasa (los sitios FRT) y que permiten eliminar si así se desea la resistencia, y el origen de transferencia.

2.8.2. Diseño de los *primers* para la obtención del producto de PCR

En este protocolo el reemplazamiento génico requiere el diseño de oligonucleótidos específicos, de 58 y 59 nucleótidos. Cada uno de ellos posee en el extremo 5' 39 nucleótidos que coinciden exactamente con las regiones que flaquean el gen que se desea eliminar. Estos 39 nucleótidos incluyen el codón de inicio o de paro del gen (dependiendo del *primer*, el directo incluye el codón START y el reverso el STOP). Mientras, el extremo 3' de cada primer presenta una secuencia de 20 ó 19 nucleótidos (dependiendo si es el *primer* directo o reverso, respectivamente) igual en todos los casetes disponibles.

Los *primers* diseñados están reunidos en el Anexo I de este trabajo.

2.8.3. Amplificación por PCR del casete de resistencia

Una vez diseñados los oligonucleótidos y purificado el fragmento HindIII-EcoRI del plásmido pIJ773, se llevó a cabo una PCR siguiendo las especificaciones del protocolo.

El producto de dicha PCR, un fragmento de aproximadamente 1,4 kb, se purificó mediante el sistema comercial ya mencionado (ver apartado 2.5.8)

2.8.4. Introducción del cósmido de *Streptomyces* en la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790

Es necesario introducir un cósmido con el gen que se desea reemplazar en la cepa *E. coli* BW25113 que contiene el plásmido pIJ790, que porta los genes del sistema de recombinación del bacteriófago λ (genes *red*). Éste sistema permite aumentar considerablemente la eficiencia de recombinación homóloga en *E. coli* y así permitir que se produzca la sustitución del gen de interés presente en el cósmido por un fragmento lineal (el producto de PCR). El plásmido pIJ790 tiene un origen de replicación sensible a la temperatura, replica a 30 °C pero se pierde a 37 °C.

Procedimiento.

- Preparar células electro-competentes de la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790 siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.6.2.1.
 - Introducir en dichas células el cósmido que porta el gen a sustituir mediante el método de electroporación descrito en el apartado 2.6.2.2. Una vez dado el choque térmico a las células tener en cuenta que la temperatura de incubación es de 30 °C ya que poseen el plásmido pIJ790.
 - Comprobar la introducción del cósmido en la cepa purificando su DNA plasmídico (apartado 2.5.1) y realizando una PCR (apartado 2.5.6) o mediante un tratamiento con endonucleasas de restricción (apartado 2.5.5.1).
-

2.8.5. Sustitución del gen de interés por el casete de resistencia en el cósmido

El casete de resistencia se introduce en la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790/cósmido para que se produzca la doble recombinación y se reemplace el gen de interés. Para este proceso es necesario disponer de células electro-competentes de esta cepa.

Procedimiento:

- Inocular 10 ml de LB (suplementado con los antibióticos adecuados) con una colonia aislada de la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790/cósmido e incubar o/n a 30 °C y a una agitación constante de 250 rpm.
- Inocular 100 ml de medio SOB conteniendo los antibióticos de selección con 2-3 ml del preinóculo (en el caso del pKU402, usar cloranfenicol y ampicilina).
- Añadir al medio 10 mM de L-arabinosa para inducir la expresión los genes *red* (el suyo es un promotor inducible).
- Incubar en las mismas condiciones que el preinóculo hasta alcanzar una DO_{600} de 0,4-0,5.
- Recuperar las células por centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender en 10 ml de glicerol 10 % frío. Repetir la centrifugación y lavar de nuevo las células con 5 ml de glicerol 10 % frío.

- Descartar el sobrenadante y resuspender en 0,5-0,8 ml de glicerol 10 % frío y repartir la suspensión 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 (ver apartado 2.6.2.2). La eficiencia es más elevada si se realiza el proceso con células frescas.
- Incubar 2-4 horas a 30 °C (para permitir la expresión de los genes *red* en el plásmido pIJ790) y a 250 rpm.
- Sembrar en placas de LA con los antibióticos adecuados, incluyendo esta vez el antibiótico al que la casete confiere resistencia.
- Comprobar la delección en el cósmido mediante PCR o usando un tratamiento con enzimas de restricción.

Nota: en una misma célula pueden coexistir cósmidos recombinantes y cósmidos nativos. Estos últimos se perderán durante la transformación a la siguiente cepa de *E. coli* dado que no son resistentes a apramicina y además, al no contener el *oriT* no podrán llegar a ser transferidos a *Streptomyces*.

2.8.6. Transferencia del cósmido recombinante a *Streptomyces*

La transferencia se produce mediante conjugación intergenérica entre *E. coli* y *Streptomyces*.

Procedimiento:

- Transformar células competentes *E. coli* ET12567/pUZ802 con el cósmido recombinante.
 - Llevar a cabo el proceso de conjugación para transferir el cósmido a *Streptomyces* (ver apartado 2.7.1).
 - Comprobar el genotipo de los exconjugantes obtenidos mediante PCR, usando *primers* externos al gen eliminado (ver Anexo I).
-

2.9. Métodos de manipulación y análisis de RNA

Dada la sensibilidad intrínseca del RNA así como la resistencia característica de las RNasas a procesos degradativos, todo el trabajo y manejo de muestras de RNA se hizo siguiendo las precauciones clásicas. El área de trabajo se trató con el sistema inhibidor de RNasas RNaseZap (Ambion Inc.), así como las micropipetas empleadas y todo el material no esterilizable en autoclave. Se emplearon siempre guantes y no se trabajó fuera del área previamente tratada para evitar la propagación de RNasas. El material que sí se pudo someter a una esterilización con calor húmedo (como microtubos y puntas para las micropipetas) fue esterilizado dos veces consecutivas. Siempre que fue posible se trabajó en hielo para disminuir la actividad de posibles RNasas que no se consiguieran eliminar con las precauciones anteriormente mencionadas.

2.9.1. Purificación de RNA total de *Streptomyces*

Con el objeto de llevar a cabo determinados estudios de expresión génica, se procedió a la purificación de RNA total de varias cepas de *Streptomyces*. Para ello, se creció el microorganismo en medio líquido, inoculándose un total de 10^8 esporas viables en un matraz con 100 ml de medio YEME sin sacarosa. La muestra de cultivo para llevar a cabo la extracción del RNA se tomó a diferentes tiempos dependiendo del objeto de estudio, en general al final de la fase exponencial o inicio de la estacionaria. La purificación se llevó a cabo empleándose el método descrito anteriormente para *Streptomyces* (Vicente *et al.* 2014), utilizándose el kit de purificación RNeasy® Mini Kit (Qiagen) y las enzimas RNase-Free DNase Set (Qiagen) y TURBO DNase™ (Ambion).

Procedimiento:

-
- Recoger 2 ml de cultivo en un tubo de 10 ml.
 - Centrifugar a 4500 rpm durante 5 minutos, descartar el sobrenadante por inversión y eliminar los restos de medio de cultivo por capilaridad (en un papel seca manos).
 - El micelio se congela inmediatamente en nitrógeno líquido. Guardar a -80 °C hasta el momento de su uso.
 - Descongelar rápidamente el micelio y resuspender en 600 µl de tampón RLT-β-mercaptoetanol³¹ del kit.

³¹ Tampón RLT-β-mercaptoetanol: Añadir 10 µl de β-Mercaptoetanol por cada ml de tampón RLT.

- Romper las células mediante sonicación en hielo (*Ultrasonic processor XL*, Misonix Inc.), con 2 pulsos de 10 segundos a 4,5 de potencia (cabezal pequeño), intercalados por un reposo de 15 segundos. Es importante que la punta del sonicador no toque las paredes del microtubo y evitar la formación de espuma.
- Centrifugar 5 minutos a 8000 rpm y transferir el sobrenadante a un tubo PLG (*Phase Lock Gel*, Eppendorf) de 2 ml, previamente compactado con una centrifugación de 30 segundos a 14000 rpm.
- Añadir 0,5 volúmenes de AquaPhenolTM (Q-Biognen) y 0,5 volúmenes de CIA. Agitar por inversión y centrifugar 5 minutos a 8000 rpm.
- Transferir la fase acuosa (superior y separada de la orgánica por la resina del PLG) a un nuevo tubo PLG y repetir el paso anterior.
- Transferir la fase acuosa a un microtubo de 2 ml y mezclar por inversión con 395 μ l de etanol 100 %.
- Transferir la solución a una columna de purificación (pasar hasta 650 μ l de cada vez) y centrifugar durante 30 segundos a 10000 rpm.
- Repetir el paso anterior hasta pasar toda la solución dos veces por a columna.
- Lavar la columna con 350 μ l de tampón RW1 del kit, centrifugando durante 30 segundos a 10000 rpm.
- Transferir la columna a un nuevo tubo colector. Preparar la solución de digestión con 10 μ l de DNasa I de Qiagen y 70 μ l de tampón RDD de la enzima. Añadir los 80 μ l de la solución de digestión sobre la membrana de la columna e incubar a 30 °C durante 30 minutos.
- Transcurrido este tiempo, dar un pulso de centrifugación para eliminar la solución de la membrana y repetir la digestión.
- Añadir 350 μ l de tampón RW1 y dejar 5 minutos a temperatura ambiente para inactivar la enzima y centrifugar durante 30 segundos a 10000 rpm. Descartar el eluido.
- Añadir 500 μ l de tampón RPE y centrifugar 30 segundos a 10000 rpm. Descarta la elución y el tubo colector.
- Colocar la columna en un nuevo tubo colector y repetir el paso anterior, esta vez centrifugando durante 2 minutos.

- Con cuidado para no arrastrar tampón RPE (se puede comprobar que la columna está seca tocando levemente con un papel de manos limpio), colocar la columna sobre un microtubo de 1,5 ml.
 - Añadir directamente a la membrana de la columna 50 µl de agua mili-Q libre de RNAsas proporcionada por el kit. Centrifugar durante 30 segundos a 10000 rpm para eluir el RNA.
 - Añadir 0,1 volúmenes del tampón de la enzima *TURBO-DNaseTM* y 1 µl de enzima. Mezclar suavemente e incubar durante 30 minutos a 37 °C.
 - Transcurrido este tiempo, añadir otro microlitro de enzima e incubar durante 30 minutos a 37 °C.
 - Para inactivar la DNasa, añadir 0,2 volúmenes de *DNase Inactivation Reagent* y mezclar inmediatamente con la micropipeta. Este reactivo es una resina que inactiva y elimina la DNasa, junto con los cationes divalentes (como el magnesio y el calcio) que inducen la rotura de RNA mediada por altas temperaturas, por lo que es importante mantenerla en suspensión. Para ello, pipetear 2 o 3 veces durante los 2 minutos de incubación a temperatura ambiente.
 - Centrifugar 1,5 minutos a 13000 rpm para bajar toda la resina junto con la DNasa y los cationes divalentes.
 - Transferir el sobrenadante a un microtubo nuevo, con el cuidado de no arrastrar parte del precipitado.
 - Preparar una dilución 1:5 en agua mili-Q y usar esta solución para valorar la integridad de la muestra (ver apartado 2.9.10.2) y posteriormente la concentración obtenida (ver apartado 2.9.10.1).
 - Guardar la muestra en dos alícuotas de igual volumen a -80 °C.
-

2.9.2. Evaluación de la concentración, pureza e integridad del RNA

2.9.2.1. Concentración y pureza del RNA

Al igual que en el caso del DNA (ver apartado 2.5.4) la concentración y pureza de las muestras de RNA fueron evaluadas con la ayuda de un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific), teniendo en cuenta en esta ocasión que una unidad de absorbancia para el RNA indica un valor de 40 µg/ml, y que en el caso de la pureza, esta se

considera óptima cuando el valor de cociente A_{260}/A_{280} se encuentra entre 1,9 y 2,1 (Sambrook & Russell 2001), y una relación mayor a 2,1 generalmente indica una gran degradación.

2.9.2.2. Integridad del RNA

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

El resultado se expresa en forma de un electroforetograma, donde se relacionan unidades de fluorescencia con el tiempo. Así, cada pico corresponde a un fragmento de RNA de determinado tamaño, siendo la cantidad de fluorescencia proporcional a la cantidad de RNA. Además, el programa es capaz de transformar este electroforetograma en una imagen similar a la que se obtendría en un gel de electroforesis convencional, pudiendo observarse bandas que se corresponderían con cada pico del electroforetograma y, por tanto, con cada fragmento de RNA presente en la muestra.

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

Para medir la integridad de las muestras en el bioanalizador se siguieron las indicaciones del fabricante.

2.10. Estudio de la expresión génica

2.10.1. Análisis de la transcripción: RT-PCR a tiempo final

Con el objetivo de estudiar la organización transcripcional de la agrupación génica de la filipina en *S. avermitilis*, se utilizó la técnica RT-PCR (del inglés, *reverse transcripticon polymerase chain reaction*) para comprobar la existencia de transcritos policistrónicos. Se

denomina más concretamente RT-PCR a tiempo final, puesto que la detección de señal se hace al final de la reacción, por lo que esta técnica permite detectar la amplificación de un mRNA específico, y aunque muy sensible para detectar pequeñas cantidades de mensajero no tiene una naturaleza cuantitativa al contrario de otras técnicas como la qPCR (ver apartado 2.10.2).

En una reacción de RT-PCR se usa mRNA molde para generar un fragmento de DNA de cadena simple complementario denominado cDNA (del inglés, *complementary DNA*), utilizando una transcriptasa reversa. Este cDNA es entonces utilizado como molde para la amplificación exponencial mediante PCR, produciéndose así fragmentos de cadena doble de DNA. En este trabajo se ha realizado esta técnica en un único paso, en el que se realizan en el mismo tubo y de forma secuencial la síntesis de cDNA y la amplificación por PCR. Para ello se utilizó el sistema *Superscript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq System* (Invitrogen), siguiéndose por lo general las instrucciones del fabricante.

En una reacción de RT-PCR se utilizaron 100-150 ng de RNA total purificado a partir de muestras de la cepa silvestre a 36 horas de fermentación (al final de la fase exponencial, cuando ya se detecta la presencia de filipina) y se emplearon 40 ciclos para asegurar la detección de hasta los transcritos más inestables y por eso en menor cantidad. Se utilizaron las condiciones descritas en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Condiciones de tiempos y temperaturas de una reacción de RT-PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Síntesis de cDNA	45 °C	40 minutos	1
Desnaturalización inicial	94 °C	2 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	40 segundos	45
Anillamiento	según el <i>primer</i>	30 segundos	
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión final	72 °C	5 minutos	1

En todas las reacciones se añadieron **controles** negativos para descartar posibles contaminaciones de las muestras con DNA. Para ello se prepararon reacciones idénticas para cada oligonucleótido empleado, excepto que en este caso no se añadía la mezcla enzimática RT/Taq *Platinum®* proporcionada por kit, sino que solamente la DNA

polimerasa (se puede utilizar Taq *Platinum*[®] o *GoTaq* convencional). De este modo, dado que la DNA polimerasa no puede emplear RNA como molde, si las reacciones resultan en bandas de amplificación queda demostrada la presencia de DNA contaminante en las muestras. Todos los *primers* empleados en reacciones de RT-PCR se reúnen en el Anexo I.

2.10.2. Análisis de la transcripción: RT-PCR a tiempo real

En una reacción de PCR a tiempo real (o cuantitativa), qPCR del inglés *quantitative real-time PCR*, se puede monitorizar el progreso de la reacción mientras ocurre, por lo que los datos se recopilan durante el proceso de PCR en lugar de al final de la reacción como ocurre en una PCR convencional (Higuchi *et al.* 1993). Esta técnica revolucionó por completo la forma de cuantificar ácidos nucleicos.

Una reacción de qPCR se caracteriza por el momento en el tiempo (ciclo) en el cual se detecta por primera vez la amplificación del molde, y no la cantidad de ácido nucleico acumulado después de un cierto número de ciclos. Cuanto mayor sea el número de copias de molde del que se parte, antes se va a observar un aumento significativo de fluorescencia respecto a un nivel basal.

Existen varios sistemas químicos de fluorescencia para la detección de los productos. En este trabajo se utilizó el SYBR[®] Green I, un agente intercalante que se une a moléculas de DNA de cadena doble (dsDNA, del inglés *double stranded DNA*), y que se excita mediante una luz azul clara ($\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$), emitiendo luz verde clara ($\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$). De este modo, con la síntesis de nuevas moléculas de dsDNA se incorporan moléculas de SYBR[®] Green I, por lo que el resultado es un aumento de intensidad de fluorescencia proporcional a la cantidad de productos de PCR producidos. Aunque el uso de este marcador fluorescente puede conducir a falsos positivos por no ser capaz de distinguir entre secuencias de dsDNA específicas de otras no específicas como los dímeros de *primers* (*primer-dimers*), también permite monitorizar la amplificación de cualquiera secuencia de DNA sin necesidad de una sonda, reduciendo así costes y tiempo de preparación. Otro aspecto a tener en consideración cuando se usa este tipo de marcador de unión al DNA es que la cantidad de señal depende de la longitud del dsDNA producido en la reacción. En circunstancias en las que las eficiencias de amplificación son iguales, la amplificación de productos más grandes va a generar más señal que un fragmento más pequeño, por lo tanto es importante trabajar con productos de amplificación de tamaños similares.

En los primeros ciclos de una reacción de qPCR apenas hay cambios en la señal de fluorescencia y esta permite definir una línea base para la gráfica de amplificación. Un aumento de fluorescencia que esté por encima de la línea base indica la detección de fragmentos amplificados. Se define un umbral (*threshold*) por encima de la línea base como la desviación estándar media del **Rn** (del inglés, *normalized reporter*) multiplicada por un factor ajustable. El Rn es la intensidad de la emisión de fluorescencia del marcador *reporter* (en nuestro caso, el SYBR® Green I) dividida por la intensidad de la emisión de fluorescencia del marcador de referencia pasivo (existen varios pero el más común, y utilizado en este trabajo, es el ROX®). El ciclo umbral o **Ct** (del inglés, *threshold cycle*) se define como el número de ciclo fraccional en el cual la fluorescencia sobrepasa el umbral.

En este trabajo el análisis de transcripción mediante RT-qPCR (retrotranscripción-qPCR) se realizó en dos pasos independientes, de manera que la retrotranscripción y la posterior reacción de amplificación del cDNA se llevaron a cabo por separado.

2.10.2.1. Retrotranscripción

La síntesis de cDNA se llevó a cabo empleando la retrotranscriptasa *SuperScript™ III* (Invitrogen), utilizando como molde 3-5 µg de RNA total. Todas las muestras de RNA fueron previamente analizadas en el bioanalizador (ver apartado 2.9.10.2) y sólo se emplearon aquellas con RIN entre 8,0 y 9,0. Se utilizaron hexanucleótidos aleatorios (*Random Primers*, Invitrogen) a una concentración final de 12,5 ng/µl y desoxinucleotidos *dNTP mix PCR Grade* (Invitrogen). Las condiciones empleadas fueron optimizadas en este trabajo.

Procedimiento:

-
- Mezclar en un microtubo de 0,2 ml el RNA molde, los dNTPs (concentración final 0,5 mM) y los *random primers*. Añadir agua hasta un volumen final de 14 µl.
 - Incubar a 65 °C durante 5 minutos en un termociclador (previamente calentado) y enfriar a 4 °C durante 1 minuto en hielo.
 - Añadir 4 µl de tampón First Strand 5x, 1 µl de DTT 0,1 M³² y 200 U de retrotranscriptasa. Mezclar bien.

³² Tampón FS 5x y DTT 0,1 M suministrados junto con la retrotranscriptasa.

- Incubar a 25 °C durante 5 minutos (termociclador ya a la temperatura), seguidos de 5 horas a 55 °C.
- Inactivar la enzima mediante una incubación a 70 °C durante 15 minutos. Enfriar a 4 °C.
- Hacer las diluciones oportunas del cDNA y guardar en alícuotas a -20 °C hasta el momento de su uso.
- Para obtener más cDNA se pueden escalar los volúmenes de reacción de forma proporcional hasta 40 µl de reacción por tubo.

2.10.2.2. PCR cuantitativa

La amplificación y cuantificación del cDNA mediante qPCR se realizó utilizando SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Takara Bio Inc.), en un termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems). Las reacciones se incubaron en las condiciones descritas en la Tabla 2.4, según las recomendaciones del fabricante.

Tabla 2.4. Condiciones de tiempos y temperaturas de una reacción de qPCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	10 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	15 segundos	40
Anillamiento y amplificación	según el <i>primer</i>	34 segundos	
Disociación (<i>Melt Curve</i>)	95 °C	15 segundos	1
	60 °C	1 minuto	
	95 °C	15 segundos	

Los *primers* específicos se diseñaron de manera que amplificasen fragmentos de entre 80 y 150 bp, cercanos al extremo 5' del mRNA de interés utilizando el software Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000). Todos los *primers* empleados, así como sus valores T_m, se encuentran incluidos en el Anexo I de este trabajo. La concentración y temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos se optimizó para cada pareja con DNA genómico, de manera que se obtuviera la mayor amplificación de producto específico en el menor Ct (normalmente de entre 15-25), y sin formación de dímeros de *primers*. Se incluyeron

controles negativos sustituyendo el DNA genómico por agua para comprobar la ausencia de contaminaciones y de la formación de dímeros de *primers*.

Se siguieron las recomendaciones del fabricante y cada reacción fue preparada en un volumen final de 20 μ l, con 10 μ l de SYBR[®], 100-350 nM de cada primer, 0,4 μ l de ROX[®] y 2 μ l de una dilución 1:2 de cDNA molde. Se realizaron premezclas para reducir errores de pipeteo que pueden afectar los resultados aumentando el error. Las reacciones se prepararon por triplicado (**réplicas técnicas**) y con como mínimo dos muestras distintas de RNA total (**réplicas biológicas**). Debido a las ya mencionadas características del SYBR[®], se incluyeron los **controles** apropiados para verificar la ausencia de DNA genómico contaminante y la formación de dímeros de *primers* (reacciones donde se sustituyó el cDNA por 200 ng de RNA de la misma muestra).

2.10.2.3. Análisis de resultados

Existen varias metodologías de análisis de resultados de una qPCR. Se pueden distinguir la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa, y en esta última la cuantificación relativa por curva de calibrado o por método comparativo de Ct. Todos los métodos deben dar resultados equivalentes por lo que la decisión de usar uno de ellos se deberá tomar después de estudiar los diferentes aspectos referentes al tipo de ensayo o prueba que se pretende realizar (número de muestras, eficiencias de amplificación, minimización de errores de pipeteo y dilución, valoración de los recursos y tiempo necesarios para el proceso de optimización, entre otros).

Otro punto a considerar, en especial en el caso de la cuantificación relativa, es la normalización de los datos y la elección de genes a usar como referencia. Varios estudios analizan y comparan los tradicionales *housekeeping genes* con diferentes tipos de genes que hoy en día se emplean como referencia, y analizan desde el punto de vista estadístico lo que se puede esperar al usar uno o más genes referencia (Vandesompele *et al.* 2002, Radonić *et al.* 2004, Quackenbush 2006). Cuando se escoge un gen de referencia, sobre todo es importante comprobar que su expresión es independiente de las diferentes condiciones a estudiar, asegurando así que en el análisis relativo los cambios de expresión se deben solamente a las diferencias entre condiciones.

En este trabajo se realizó una cuantificación relativa con un método comparativo de Ct. La línea base y el umbral fueron determinados para el software StepOnePlus, y los

valores de Ct fueron normalizados con respecto al mRNA *rrnA1* (codifica un RNA ribosomal 16S).

Las diferencias relativas en la expresión génica se cuantificaron utilizando el **método Pfaffl** (Pfaffl 2001) y los resultados obtenidos se comprobaron con el software REST[®] (Pfaffl *et al.* 2002). La ecuación utilizada es la siguiente, donde “diana” es el gen de interés, “ref” el gen de referencia, “control” la condición de referencia y “muestra” la condición en estudio:

$$\text{Ratio} = \frac{E_{\text{diana}}^{\Delta\text{Ct}_{\text{diana}}(\text{control} - \text{muestra})}}{E_{\text{ref}}^{\Delta\text{Ct}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{muestra})}}$$

La **eficiencia** de amplificación (E) se calculó para todas las parejas de *primers*, utilizando diluciones de DNA genómico de 0,013 a 40 ng (diluciones seriadas de orden 10^{-5} partiendo de una concentración de 100 ng/ μl , de las que se utilizaron siempre 2 μl de muestra para la reacción). Para la gráfica del Ct frente al logaritmo de la cantidad de DNA se usaron un mínimo de cinco diluciones o puntos, cada uno con tres réplicas por dilución, y un coeficiente de determinación $R^2 > 0,98$ para el cálculo de la eficiencia. Se utilizó la siguiente ecuación, donde “*slope*” es la pendiente de la recta obtenida:

$$E = 10^{[-1/\text{slope}]}$$

2.10.3. Determinación del inicio de transcripción mediante 5'-RACE

La técnica 5'-RACE (del inglés, *rapid amplification of cDNA ends*) se llevó a cabo empleándose el kit comercial *5'RACE system for rapid amplification of cDNA ends* (Invitrogen). Para ello, y siguiendo siempre las instrucciones del fabricante, fue necesario diseñar tres *primers* específicos secuencialmente cada vez más cercanos al extremo 5' del gen (transcrito), denominados respectivamente GSP1, 2 y 3, siendo el más cercado al extremo 5' el GSP3 (del inglés *gene specific primer*).

El primer paso consiste en la obtención de un cDNA que contenga el inicio de transcripción del gen de interés a partir de una muestra de RNA total y utilizando el *primer* GSP1. Para ello se utilizaron 5 µg de RNA total y la reacción de transcripción reversa se realizó a 50 °C y durante 40 minutos, seguidos de 15 minutos a 70 °C. Tras la eliminación del RNA total molde mediante la digestión con una mezcla de RNasas y purificación de los fragmentos de cDNA utilizando las columnas SNAP del kit, se añade al extremo 3' de los mismos (10 µl del cDNA purificado) una cola de poli (dC) con una transferasa terminal en las siguientes condiciones: 2-3 minutos a 94 °C, 1 minuto a 4 °C, añadir enzima, 15 minutos a 37 °C. Con esta reacción se obtiene un fragmento de cDNA que refleja el mRNA original, excepto que en el primer nucleótido de éste (o sea, el último nucleótido en el extremo 3' del cDNA) van unidos varios dCTPs.

A partir de este momento se hacen una serie de reacciones PCR convencionales utilizando *primers* proporcionados por el kit y los dos restantes *primers* específicos diseñados para el gen en cuestión. En la primera PCR se utilizan 5 µl del cDNA con la “cola” poli (dC), el *primer* GSP2 y el *primer* AAP (*abridged universal amplification primer*) que contiene en su extremo 3' una secuencia poli (dG) que permite su hibridación con la “cola” (dC) del cDNA. De este modo se amplifica el fragmento de interés y se descartan los cDNA inespecíficos que hubiesen podido surgir en la primera fase del proceso. Una alícuota de esta reacción se analiza mediante electroforesis en un gel de agarosa del 2 %; en el caso de que exista más de un inicio de transcripción aparecerá más de una banda de amplificación. Si por lo contrario se visualiza un *smear*, esto significaría la presencia muchos fragmentos de cDNA inespecíficos. En ambos casos es aconsejable continuar con el protocolo. En la segunda PCR se emplean como molde 5 µl del DNA obtenido en la PCR1 diluido 10 veces, el *primer* GSP3 y el *primer* comercial AUAP (*abridged universal amplification primer*). El producto de amplificación de esta reacción se somete a electroforesis en un gel de agarosa 2 %, las bandas resultantes son cortadas y el DNA que contienen es secuenciado. El desoxinucleótido que aparezca inmediatamente antes de la cola poli (dC) se identifica con el desoxinucleótido +1 (o TSP, del inglés *transcription star point*).

En el caso de que existan uno o más nucleótidos de citosina en la secuencia justo después del nucleótido identificado, resulta imposible saber si el primer nucleótido del transcrito es ese o alguna de las citosinas (algunas de las citosinas secuenciadas podrían corresponder al mRNA o pertenecer a la “cola” poli-C). Así, se deberá proceder a un nuevo marcaje del cDNA original con la transferasa terminal, pero empleándose en este

caso desoxinucleótidos de adenina. La “cola” así generada en el extremo 3' del cDNA es de poli-A y se deberán utilizar *primers* comerciales diferentes en las reacciones de PCR subsiguientes, también proporcionados por Invitrogen (3'RACE *adapter primer* y *abridged universal primer*).

Todos los oligonucleótidos empleados en las reacciones de RACE, así como sus temperaturas de fusión (T_m) se encuentran incluidos en el Anexo I de este trabajo.

2.10.4. Micromatrices (*Microarrays*)

2.10.4.1. Chip de micromatrices

Se utilizaron micromatrices *Custom Gene Expression Microarray*, 8x15K fabricadas por Agilent Technologies, con sondas diseñadas por el Dr. Fernando Santos Beneit. El fabricante produjo micromatrices conteniendo aproximadamente 15000 sondas sintetizadas *in situ* sobre un soporte de vidrio del tamaño de un portaobjetos (chip). La Figura 2.1 muestra el aspecto del chip y la disposición de los 8 *microarrays* que contiene.

Figura 2.1. Esquema de un chip. Cada uno de estos chips contienen 8 micromatrices así organizadas, y los números permiten conocer la posición de hibridación de cada muestra.

El diseño del *microarray* fue personalizado para incluir diferentes conjuntos de sondas (oligonucleótidos de 60bp): sondas para todo el genoma de *S. avermitilis* MA-4680 (Ikeda *et al.* 2003), sondas para las secuencias disponibles a Febrero de 2011 de *S. natalensis* ATC27448 y otras sobrepuestas (o teseladas) que abarcan toda la agrupación biosintética de la pimaricina incluyendo las regiones intergénicas (Antón *et al.* 2004, 2007; Aparicio *et al.* 1999, 2000; Mendes *et al.* 2000, Vicente *et al.* 2009), además de sondas para diversas

agrupaciones biosintéticas de polienos (Brautaset *et al.* 2000, Caffrey *et al.* 2001, Chen *et al.* 2003, Seco *et al.* 2004), y sondas para genes de *S. coelicolor* cuya expresión esperada no varía. En la Tabla 2.5 se describe el diseño del *microarray*.

Puesto que el presente trabajo está dirigido a *S. avermitilis* cuyo genoma está completamente secuenciado, se analizaron solamente los resultados de las sondas SAV. En este caso las hibridaciones interespecíficas, que aunque con algunas limitaciones pueden generar información interesante y útil, resultan redundantes y se utilizan sólo en aquellas situaciones en las que no se dispone de la secuencia del genoma del organismo de interés.

Tabla 2.5. Descripción de los grupos de sondas utilizados en la matriz.

Organismo	Grupo de sondas	Descripción	Número de acceso	Nº de sondas
<i>S. avermitilis</i> MA-4680	SAV	CDS cromosómicas + tRNAs	NC_003155.4	7791
<i>S. natalensis</i> ATCC27448	SNA	Agrupación biosintética de la pimaricina	AJ278573.1 AJ585085.1 AM493721.1 FM864219.1	214
		<i>phoRP</i> y <i>phoU</i>	AM176576.1	
		<i>sngR</i> , <i>sngA</i> y <i>sngB</i>	AY919297.1	
		Genes del pSNA1	AJ243257.1	
	Teseladas	Agrupación biosintética de la pimaricina	AJ278573.1 AJ585085.1 AM493721.1 FM864219.1	3236
<i>S. diastaticus</i> var. 108	Polienos	Agrupación biosintética de la rimocidina	AY442225.1	54
<i>S. nodosus</i> ATCC 14899		Agrupación biosintética de la amfotericina	AY636001.1	131
<i>S. noursei</i> ATCC 11455		Agrupación biosintética de la nistatina	AF263912.1	86
<i>Streptomyces</i> sp FR-008		Agrupación biosintética del FR-008	AY310323.2	94
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	Control	Genes de expresión constitutiva	AL645882.2	106

En el experimento se pretende comparar tres cepas (dos mutantes y una silvestre) a dos tiempos diferentes. Para los tiempos de muestreo se escogió el final de la fase

exponencial a las 36h (**T1**) y el inicio de la fase estacionaria a las 48h (**T2**). Se utilizaron **3 réplicas biológicas** de cada condición, excepto para una de las cepas mutantes de la que se utilizaron solamente 2 réplicas, en el intento de hacer coincidir el número de muestras de cada tiempo con el número de micromatrices presentes en el chip. De este modo, se trabajó con 6 condiciones y un total de 16 muestras, que se analizaron en dos chips, uno para cada tiempo a estudiar.

2.10.4.2. Marcaje de ácidos nucleicos

Se empleó un diseño experimental de micromatrices bicolor con una referencia común (Gadgil *et al.* 2005, Talaat *et al.* 2002). Cada micromatriz se hibridó con una mezcla de DNA genómico de *S. avermitilis* marcado con Cy5-dCTP (referencia común) y cDNA de una muestra marcado con Cy3-dCTP. Dada la fotosensibilidad que presentan los fluoróforos (en especial el Cy5, que además es especialmente sensible al ozono y la humedad) todos los procedimientos realizados con ácidos nucleicos así marcados se desarrollaron en condiciones de baja intensidad de luz u oscuridad (Mallick & Ghosh 2012). Además, al trabajar con muestras de RNA se tuvieron las precauciones habituales para este tipo de material para evitar la contaminación y degradación del material.

Se extrajo **DNA genómico** a partir de una muestra de micelio de la cepa silvestre a las 72 h de crecimiento (asegurando que se encuentra en medio de la fase estacionaria) como se ha descrito anteriormente (apartado 2.5.3). Se introdujeron, sin embargo, algunas modificaciones al procedimiento para mejorar el grado de pureza de la muestra: después de la precipitación con isopropanol, lavar con 1 ml de etanol 70 %; secar y resuspender en 1 ml de tampón TE; digerir con la solución de RNasa durante 40 minutos; tratar dos veces con 1 volumen de fenol, tratar con 1 volumen de fenol:CIA (1:1), y finalmente tratar con 1 volumen de CIA; precipitar con 0,6 volúmenes de isopropanol y lavar con 1 ml de etanol 70 %; finalmente resuspender en 1 ml de solución Tris-HCl 10 mM pH 8,0. Se analizó la muestra obtenida mediante electroforesis en gel (apartado 2.5.7) para comprobar su estado.

Una vez purificado el DNA genómico, se procedió a su marcaje mediante la incorporación de nucleótidos dCTP marcados con Cy5 por la acción de la polimerasa de DNA Exo-Klenow. Para ello se utilizó el kit comercial de marcaje *BioPrime Array CGH Genomic Labeling Module* (Invitrogen) que incluye todos los reactivos necesarios, y el kit de purificación *PCR MinEluteTM* (Qiagen) siguiendo un protocolo previamente descrito (Rodríguez-García *et al.* 2007).

Procedimiento:

-
- Por cada reacción de 40 µl de volumen final, mezclar en un microtubo 3 µg de DNA genómico con 20 µl de *Random primers* 2,5x. Añadir agua mili-Q hasta completar el volumen de reacción. Es importante calcular previamente el volumen de Cy5-DNA genómico necesario para todo el experimento.
 - Desnaturalizar durante 5 minutos a 98 °C. Enfriar en hielo durante 5 minutos o más, agitar en vortex y centrifugar. Mantener en hielo.
 - Añadir 5 µl de solución de dCTP 10x y 3,75 µl de solución Cy5-dCTP 1 mM. Mezclar suavemente pipeteando, dar un pulso, y añadir 1,5 µl de Exo-Klenow.
 - Incubar a 37 °C durante *o/n*.
 - Añadir 5 µl de solución de paro (EDTA 0,5 M pH 8,0) y mantener en hielo. Se puede parar aquí y guardar a -20 °C durante unos días hasta su uso.
 - Preparar las minicolumnas de purificación debidamente rotuladas. Si se escaló la reacción de marcaje, escalar también el número de minicolumnas (e.g. utilizar una minicolumna para cada 1,5x reacciones). Comprobar que la solución PE tiene añadido el etanol.
 - Transferir la mezcla de marcaje a un microtubo 1,5 ml y añadir 5 volúmenes de la solución PB (250 µl para el volumen de la escala 1x). Mezclar bien.
 - Cargar las minicolumnas con alícuotas de la mezcla de reacción hasta pasar todo el volumen. Centrifugar durante 1 minuto a 10000 rpm.
 - Comprobar la coloración de la membrana de la minicolumna y del eluido (la membrana deberá estar azulada y el eluido transparente). Descartar eluido.
 - Añadir 500 µl de solución PE a las minicolumnas para el 1^{er} lavado de las membranas. Centrifugar en las mismas condiciones, y descartar eluido.
 - Añadir 250 µl de solución PE para el 2^o lavado. Centrifugar en las mismas condiciones.
 - Descartar el eluido y centrifugar en las mismas condiciones para eliminar los restos de etanol.
 - Transferir las minicolumnas a microtubos de 1,5 ml. Añadir 20 µl de solución EB (Tris-HCl 10 mM pH 8,5) sobre el centro de las membranas.
 - Mantener 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 10000 rpm durante 1 minuto.

- Repetir una vez más la elución con otros 20 μl de solución EB, esta vez calentada a 60 °C, distribuyéndolos en la zona de las membranas que retenga color (habitualmente en la periferia).
 - Mantener a temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar en las mismas condiciones.
 - Repetir una vez más la elución con 10 μl de solución EB calentada a 60 °C.
 - Mantener 1 minuto a temperatura ambiente, y centrifugar en las mismas condiciones.
 - Comprobar los restos de coloración de la membrana y decidir si se repite la elución.
 - Medir el volumen recuperado. Homogeneizar muy bien el eluido pipeteando varias veces.
 - Después de evaluado el marcaje, guardar a -20 °C en oscuridad hasta su uso. Evitar ciclos de congelación-descongelación.
-

Una vez purificada la solución de marcaje, cuantificar por espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop ND-1000 en la función “Microarray” y “DNA-50” (Sample type). Hacer blanco con el tampón EB y asegurar que la línea base está en el cero a todo largo del espectro. Registrar los valores medidos de la concentración de fluoróforo ($\text{pmol}/\mu\text{l}$) y concentración de DNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$). Calcular el **rendimiento** de la síntesis en ng (DNA $\text{ng}/\mu\text{l}$ dividido por el volumen eluido en μl), y la **actividad específica** en $\text{pmol}/\mu\text{g}$ (Cy5 $\text{pmol}/\mu\text{l}$ dividido por la concentración de DNA en $\text{ng}/\mu\text{l}$). Evaluar el marcaje, teniendo en cuenta que para matrices 8x15k idealmente se utilizan valores de rendimiento superiores a 650 ng y de actividad específica superior a 40 $\text{pmol}/\mu\text{g}$. En el caso de no haber sido posible obtener resultados en estos intervalos, se puede bajar los requisitos, dado que valores inferiores también producen buenas hibridaciones (se han obtenido buenos resultados hasta con 20 $\text{pmol}/\mu\text{g}^{-1}$). Sin embargo lo más importante para todos los marcajes, ya sean de DNA genómico o cDNA, es trabajar con un conjunto de muestras lo más homogéneo posible en cuanto al marcaje, de modo que este paso no inflencie las hibridaciones y pueda interferir con los resultados.

Para la síntesis y marcaje de **cDNA** con Cy3, se utilizaron muestras de RNA purificadas como se ha descrito en el apartado 2.9.1 seleccionándose aquellas cuyos valores RIN fueron superiores a 8 y no muy distintos entre sí, y la transcriptasa reversa *SuperScript III* (Invitrogen), *Random Primers* (Invitrogen), Cy3-dCTP 1 mM (GE Healthcare), una

mezcla de nucleótidos aquí denominada dNTP-R³³, soluciones comerciales de NaOH 1 N y HCl 1 N (Sigma) y el kit de purificación *PCR MinElute*TM (Qiagen). La mezcla de reacción para el marcaje cDNA-Cy3 se describe en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6. Componentes de la reacción de marcaje cDNA-Cy3.

RNA	5 µg
<i>Random Primers</i> (0,3 µg/µl)	1,05 µl
<i>First Strand Buffer</i> (5x)	2,10 µl
DTT (0,1 M)	1,05 µl
dNTP-R (dA/G/TTP 25 mM; dCTP 10 mM)	0,21 µl
Cy3-dCTP (1 mM)	0,53 µl
<i>SuperScript III</i>	0,70 µl

Procedimiento:

-
- Empezar mezclando el RNA y los *random primers*, añadiendo agua mili-Q hasta un volumen final de 5,9 µl.
 - Desnaturalizar durante 5 minutos a 65 °C. Enfriar en hielo durante 1 minuto o más.
 - Preparar una mezcla madre con los restantes componentes de la reacción de marcaje. Al escalar los volúmenes requeridos, incluir un 12-20 % de error para asegurar un margen de seguridad.
 - Añadir 4,6 µl de la mezcla madre a cada muestra de RNA-*primers*. Mezclar bien pipeteando y evitar la formación de burbujas.
 - Incubar durante 5 minutos a 25 °C, seguido de 5 horas a 55 °C.
 - Añadir 3,5 µl de NaOH 1 N y mezclar bien.
 - Incubar a 70 °C durante 10 minutos.
 - Añadir 3,5 µl de HCl 1 N y mezclar bien.
 - Preparar las minicolumnas del kit de purificación, debidamente rotuladas. Comprobar que la solución PE tiene añadido el etanol.

³³ Mezcla de nucleótidos dNTP-R: dA/G/TTP 25 mM; dCTP 10 mM.

- Añadir 5 volúmenes de solución PB a cada marcaje (90 μ l), mezclar bien y cargar en la minicolumna.
- Centrifugar 1 minuto a 10000 rpm.
- Comprobar la coloración de la membrana de la minicolumna y del eluido (la membrana deberá tener un color rosáceo). Descartar el eluido.
- Añadir 500 μ l de solución PE a las minicolumnas para el 1^{er} lavado de las membranas.
- Centrifugar en las mismas condiciones.
- Añadir 250 μ l de solución PE para el 2^o lavado de las membranas. Centrifugar en las mismas condiciones.
- Descartar el eluido del tubo recolector.
- Centrifugar otra vez a 10000 rpm durante 1 minuto para eliminar los restos de etanol.
- Transferir las minicolumnas a microtubos de 1,5 ml. Añadir 10 μ l de solución EB (Tris-HCl 10 mM pH 8,0) sobre el centro de las membranas.
- Mantener 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 10000 rpm durante 1 minuto.
- Añadir otros 10 μ l de solución EB distribuyéndolos en la zona de las membranas que retenga color.
- Mantener 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 10000 rpm durante 1 minuto.
- Repetir la elución con los 20 μ l recogidos en los microtubos, volviendo a aplicarlos sobre las membranas.
- Mantener 1 minuto a temperatura ambiente. Centrifugar a 10000 rpm durante 1 minuto.
- Comprobar los restos de coloración de la membrana y decidir si se repite la elución.
- Homogeneizar muy bien y medir el volumen recuperado.
- Guardar a -20 °C en oscuridad hasta su uso. Evitar los ciclos de congelación-descongelación.

Una vez terminada la purificación del marcaje, cuantificar espectrofotométricamente con el Nanodrop ND-1000. Utilizar la función “Microarray” y

“ssDNA-33” (Sample type). Hacer blanco con el tampón EB y asegurar que la línea base está en el cero a todo lo largo del espectro. Registrar los valores medidos de concentración de fluoróforo ($\rho\text{mol}/\mu\text{l}$) y la concentración de cDNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$). Calcular el **rendimiento de la síntesis** en ng (cDNA $\text{ng}/\mu\text{l}$ multiplicado por 37, dividido por el eluido en μl , multiplicado por 33) y la **actividad específica** en $\rho\text{mol}/\mu\text{g}$ (Cy3 $\rho\text{mol}/\mu\text{l}$ dividido por cDNA $\text{ng}/\mu\text{l}$, multiplicado por 37/33, multiplicado por 1000). Evaluar el marcaje, teniendo en cuenta que para matrices 8x15k se considera válido si se cumplen las condiciones de rendimiento de la síntesis mayor que 650 ng, y actividad específica mayor que $40 \rho\text{mol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Como ya se ha mencionado, se pueden bajar estos requisitos, pero es muy importante escoger un conjunto de muestras homogéneo para minimizar las interferencias en las hibridaciones y los resultados. También se puede calcular la **FIC**, frecuencia de incorporación de nucleótidos marcados, indicada en porcentaje (Cy3 ρmol multiplicado por $300 \rho\text{g}/\rho\text{mol}$ y multiplicado por $10^{-3} \text{ ng}/\rho\text{g}$, dividido por cDNA ng). Según los resultados y experiencia comunicada por el Dr. Antonio Rodríguez García, debería estar entre 1,5 y 2,5. Enfatizar una vez más que lo importante es que todas las muestras presenten valores dentro de los mismos intervalos.

2.10.4.3. Hibridación de los ácidos nucleicos marcados con los *microarrays*

Una vez obtenidas las muestras de ácidos nucleicos marcados con las características dentro de las especificaciones establecidas, se realizaron las hibridaciones con los *microarrays*. Idealmente el mismo marcaje de Cy5-DNA genómico ha de usarse para todas las hibridaciones de un experimento o de experimentos que se pretenden comparar entre si. Se empleó el material de hibridación que distribuye el fabricante de micromatrices Agilent Technologies, y como guía el manual *Protocol For use with Agilent Gene Expression oligo microarray* del mismo fabricante. Se usaron en todo momento guantes sin polvo para evitar el depósito de cualquier partícula sobre las micromatrices que pudiera interferir en la hibridación, así como condiciones de baja luz u oscuridad durante el manejo de muestras marcadas con fluoróforos.

Se utilizaron 16 muestras de Cy3-cDNA para las diferentes condiciones y tiempos, que se hibridaron con la misma muestra de Cy5-DNA genómico. Por cada *microarray* presente en el chip se preparó una mezcla de 300 ng de Cy3-cDNA y 10 ρmol de Cy5-DNA genómico (hasta un volumen máximo de $18,8 \mu\text{l}$), que se desnaturalizó incubando durante 3 minutos a $94 \text{ }^\circ\text{C}$. Inmediatamente a continuación, se añadió la solución de hibridación (Tabla 2.7) recientemente preparada hasta un volumen final de $50 \mu\text{l}$. Una vez

preparadas las 8 muestras por cada chip, se registró la posición de cada muestra en el chip y el número de código de barras que lo identifica. Para la incubación en los *microarrays* se pipetearon 40 μl de la mezcla final en el centro de cada *microarray* (sin llegar a tocar la superficie). El chip se selló con un cubreobjetos con 8 cámaras delimitadas por gomas aislantes, y una cámara de hibridación sujetó todo el conjunto en posición (para el montaje se siguieron las instrucciones del mencionado manual). La hibridación transcurrió durante 67 horas a 55 °C, en condiciones de oscuridad y agitación suave (4 rpm). Antes de la hibridación es importante asegurar que tanto el chip como el cubreobjetos no posean defectos visibles ni partículas de polvo, para que en caso afirmativo se puedan eliminar cuidadosamente con aire comprimido. Se tuvo además especial cuidado para evitar la formación de burbujas, tanto en la preparación de las mezclas como durante la hibridación dado que pueden interferir con el proceso. Para ello se monitorizó periódicamente la cámara, y cuando se detectaron burbujas (en especial las que permanecían inmóviles durante la rotación), se procedió a su eliminación mediante pequeños golpes en vertical de la cámara o sobre el cubreobjetos.

Tabla 2.7. Componentes de la solución de hibridación para un chip 8x15k.

MES (12x) ³⁴	46,7 μl
NaCl (5 M)	112 μl
Formamida	112 μl
EDTA (0,5 M)	22,4 μl
Tritón X-100 (10 % v/v)	56 μl

Después de la hibridación se realizaron una serie de lavados a los chips (siempre en condiciones de oscuridad), empleando para ello 50 ml de tres soluciones diferentes³⁵ en tubos tipo Falcon de 50 ml. La solución de lavado I se utiliza dos veces seguidas, primero para desprender el cubreobjetos del chip, y después para el lavado, suplementada con 25 μl de Tritón X-102³³ (este detergente permite reducir la formación de artefactos que puedan interferir con la lectura de la fluorescencia), que se realiza a temperatura ambiente y 85 rpm durante 5 minutos. En el segundo lavado se utiliza la solución de lavado II también suplementada con 25 μl de Tritón X-102 (y previamente calentada a 37 °C), durante 1

³⁴ MES 12x (1 L): 70,4 g de MES monohidratado (ácido libre) (Sigma) y 193,2 g de MES en sal sódica (Sigma). Ajustar pH a 6,5 con HCl 1 M y filtrar.

³⁵ Soluciones de lavado I y II, de estabilización y secado, Tritón X-102: reactivos comerciales incluidos en el *Agilent Gene Expression Wash Buffer Kit* (Agilent Technologies). Conservar a temperatura ambiente en oscuridad.

minuto a temperatura ambiente y manteniendo el chip en agitación. El tercer y último lavado se hace con solución de estabilización y secado, y consiste en sumergir el chip en la solución solamente durante unos segundos. A continuación, retirar lentamente el chip de la solución comprobando la ausencia de burbujas o manchas, y guardarlo en un recipiente adecuado y en oscuridad. Durante el manejo del chip es importante cogerlo con pinzas por el lado de código de barras y evitar en todo momento tocar la superficie de las micromatrices.

2.10.4.4. Lectura y cuantificación de la fluorescencia de los *microarrays*

Por último, se procedió al escaneado de los chips de *microarrays* para obtener una imagen digital de la señal emitida por los fluoróforos del cDNA y DNA genómico. Se utilizó el equipo *Agilent G2565BA Microarray Scanner* y el programa *ScanControl* (ambos de Agilent Technologies)

2.10.4.5. Análisis estadístico

Los resultados fueron tratados con el software *Feature Extraction v8.1* (Agilent Technologies), que permite procesar los datos obtenidos durante el escaneado asignando valores numéricos a la intensidad de las señales registradas en los canales verde (Cy3) y rojo (Cy5). El Dr. Antonio Rodríguez García llevó a cabo el procesamiento de los datos de cuantificación, normalización y el análisis estadístico.

Por cada chip el software produjo un archivo final ‘.txt’, que contiene todos los valores netos (mediciones directas obtenidas durante el escaneado) y procesados (algoritmos aplicados a los valores netos) correspondientes a cada sonda. El análisis estadístico se realizó en “R” versión 2.15.1., utilizando un paquete específico para el análisis estadístico de *microarrays* desarrollado por Bioconductor 2.11, denominado *limma* (del inglés, *linear models for microarray data analysis*) versión 3.14.1 (Smyth 2004, Smyth *et al.* 2005, Smyth & Speed 2003).

Los archivos del programa *Feature Extraction* se cargaron en el área de trabajo en “R” y se analizaron con *limma*. Después de creados los archivos con las sondas y sus respectivos nombres sistemáticos, se hizo un control de calidad de las hibridaciones por medio de imágenes de fondo y nubes MA (ninguna de las hibridaciones era claramente desechable). A continuación se corrigió el fondo usando un método de substracción, que lo que hace es sustraer la intensidad de fondo a la intensidad de primer plano, recuperándose

las señales procesadas. Después se eliminaron todas las sondas que no fueran de *S. avermitilis* (sondas SAV), y se calcularon los valores Mg para cada sonda siendo Mg el logaritmo de base 2 del cociente entre las señales procesadas de los canales verde y rojo ($\log_2 \text{Cy3/Cy5}$). Los valores Mg se utilizaron en el siguiente paso de normalización y se consideraron aproximadamente proporcionales a los niveles de transcrito de un determinado gen (Mehra *et al.* 2006). Los algoritmos de análisis de datos de *microarrays* asumen que la mayoría de los genes de un determinado transcriptoma no se expresan diferencialmente. Así, se atribuyeron diferentes pesos durante el proceso de normalización, y a las sondas con menor varianza se les asignó un peso de 1. La normalización de los datos combinó normalización intramatriz (método por “mediana”) e intermatriz (método “loess cíclico”) y los pesos previamente definidos. Para calcular la expresión diferencial normalizada, se indicó como referencia común el Cy5-DNA genómico, se introdujo el modelo lineal en los datos y se calculó la estadística empírica Bayes. Después se establecieron los contrastes a estudiar, i.e. qué muestras comparar y para las que calcular la expresión diferencial normalizada. Se analizaron los 9 contrastes posibles entre todas las condiciones para sacar el máximo partido del experimento. Aunque finalmente el estudio se centre en la comparación de cada una de las cepas mutantes con la silvestre a dos tiempos del desarrollo, ocasionalmente se podrán mencionar otros contrastes. Para aquellos genes con más de una sonda, se calculó el promedio de los valores obtenidos. Por último, se realizó una corrección de los valores p para pruebas múltiples por el método FDR (del inglés *false discovery rate*). Los resultados finales de los 9 contrastes son exportados e incorporados en un archivo Excel bajo forma de una matriz en la que las líneas corresponden a las sondas y las columnas corresponden a los valores numéricos calculados para cada sonda. Estos valores numéricos incluyen los valores Mc (resta del Mg de la condición problema menos el valor Mg de la condición referencia), valores p que dan significación estadística a los contrastes sin FDR, y valores p ajustados que indican la significación estadística después de la corrección FDR. Además de estas columnas, se incluyen otras con información sobre la secuencia e identificación de la sonda, y nombre del gen. En el Anexo IV se proporciona el código en “R” completo empleado en el análisis estadístico.

2.11. Métodos de manipulación de proteínas

2.11.1. Expresión heteróloga de proteínas

Las proteínas reguladoras PimM^{DBD} y PimR^{SARP} se expresaron en forma de proteínas de fusión con la enzima glutatión-S-transferasa (GST), de manera heteróloga en *E. coli* BL21 (DE3). Las cepas de expresión fueron cedidos por el Dr. Santos Aberturas y se siguieron las instrucciones descritas anteriormente para la expresión y purificación de estas proteínas (Santos-Aberturas *et al.* 2011b, 2012).

2.11.1.1. Inducción de la expresión de proteínas de fusión

Procedimiento:

-
- Inocular 10 ml de LB suplementado con ampicilina con la cepa de *E. coli* (DE3) portadora de la construcción plasmídica adecuada para la expresión de la proteína de fusión deseada. Incubar o/n a 37 °C.
 - Inocular 100 ml de LB (suplementado con ampicilina) con 2-3 ml del preinóculo. Dejar crecer a 30 °C y 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6 y 0,7.
 - Inducir la expresión de la proteína de fusión en el cultivo adicionando IPTG hasta una concentración final de 0,1 mM.
 - A partir de este momento, mantener el cultivo durante 14 horas a 18° C y 220 rpm.
 - Recoger las células mediante centrifugación a 6500 rpm durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante por decantación y conservar el precipitado celular hasta el momento de la purificación de la proteína de fusión a -80 °C.

Dado que se pueden conservar las células por un largo periodo de tiempo, se pueden inocular varios matraces a la vez para obtener la mayor cantidad de proteína posible y tener material para futuras purificaciones.

2.11.1.2. Lísis celular

Para obtener un extracto celular se utilizaron normalmente 5 cultivos previamente inducidos y conservados a -80 °C, de 100 ml cada uno. Cada uno de estos precipitados

celulares se resuspendieron en 7 ml de tampón PBS³⁶ y fueron sometidos a sonicación, en todo momento en un baño de hielo. Se emplearon 20-30 pulsos de sonicación de 10 segundos de duración cada uno y a nivel de potencia 4,5, con intervalos de 10 segundos de descanso entre cada pulso energizado. El extracto homogeneizado, así obtenido, se centrifugó varias veces durante 10 minutos a 6500 rpm y a 4 °C, con el fin de separar las fracciones insoluble y soluble. El sobrenadante (fracción soluble) que contiene las proteínas solubles presentes en las células inducidas, se limpió aún más haciéndolo pasar por un filtro de 0,22 µm de diámetro. De este modo se eliminan posibles restos de material insoluble que pudiesen afectar a la integridad de la columna de purificación.

2.11.2. Purificación de proteínas de fusión

2.11.2.1. Cromatografía de afinidad

La presencia de la GST en el extremo N-terminal de la proteína de fusión es lo que permite la purificación de la misma en un único paso mediante cromatografía de afinidad, utilizando para ello una columna de glutatión inmovilizado. Se utilizó un cromatógrafo FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ÄKTA (GE Healthcare), al que se acopló la columna de glutatión inmovilizado en sefarosa *GST-Trap* (GE Healthcare). Se inyectó el volumen completo del extracto celular preparado para permitir la interacción entre la GTS y el glutatión de la columna, utilizando un flujo constante de PBS a 1ml/min. A continuación se lavó bien la columna con PBS hasta que se eliminase toda la proteína no inmovilizada. En ese momento, se eluyó la proteína de fusión haciendo pasar por la columna el tampón de elución³⁷, que se recogió en fracciones de 400 µl.

2.11.2.2. Concentración y conservación de las proteínas purificadas

Para incrementar la concentración, se juntan todas las fracciones que contienen la proteína eluida y se hacen pasar mediante centrifugación por un tubo Amicon (Milipore) de 2 ml de capacidad y un tamaño de poro de membrana que permite la exclusión de moléculas inferiores a 30 kDa de masa molecular. En general, se emplearon 3-5 ciclos de centrifugación para obtener una concentración óptima de trabajo, dejando el concentrado en un volumen final de 150-250 µl. A continuación, y para su preservación, se añadió

³⁶ Tampón PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM. Ajustar pH a 7,4.

³⁷ Tampón de elución: Tris-HCl 50 mM pH 8,0 y glutatión reducido 10 mM.

glicerol hasta alcanzar una concentración final del 20 % (v/v), tras lo cual se repartió en alícuotas que se guardaron a -80 °C hasta el momento de su utilización.

Una fracción de esta solución proteica se utilizó para cuantificar la proteína obtenida inmediatamente después de su purificación y concentración. Para ello se empleó el método de Bradford (apartado 2.11.4.1).

2.11.3. Extracción de proteínas totales de *Streptomyces*

Las proteínas totales de *Streptomyces* fueron utilizadas en los estudios de proteómica. Dada la naturaleza y características de los extractos proteicos de *S. avermitilis* fue necesario optimizar un protocolo para tal efecto. Se emplearon diversas metodologías previamente descritas (Fernández-Acero *et al.* 2006, Jami *et al.* 2010) y se llevaron a cabo múltiples modificaciones hasta encontrar el protocolo que mejor resultados proporcionó. A continuación se describe el método desarrollado.

Procedimiento:

-
- Inocular 100 ml de medio YEME sin sacarosa con 1×10^6 cfu/ml (cfu del inglés, *colony-forming unit*) de *S. avermitilis*. Incubar a 30 °C y 250 rpm.
 - A las 36 horas de crecimiento recoger muestra de 5 ml (por duplicado) en tubos de 10 ml.
 - Paralelamente, recoger también 2 ml de muestra para la monitorización del crecimiento y 8 ml para el estudio de producción de macrólidos. Procesar y analizar dichas muestras como se describe en los apartados 2.3.2.1, 2.14.3.1 y 2.14.3.2.
 - Centrifugar las muestras de 5 ml (para el estudio de proteómica) a 6500 rpm y descartar el sobrenadante.
 - Lavar el micelio con 1 volumen de solución NaCl 0,9 % previamente enfriada a 4 °C.
 - Congelar inmediatamente las muestras a -80 °C y guardar hasta el momento de su uso.
 - Descongelar lentamente las muestras y resuspender el precipitado en 1 ml de tampón RB2³⁸ con Tris-HCl³⁹ 30 mM.

³⁸ Tampon RB2: urea 8 M; CHAPS ((3-[3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfato)) 4 % (p/v). Se filtra y se conserva a -20 °C.

- Lisar las células por medio de sonicación en hielo con 4 pulsos de 10 segundos a 4,5 de potencia (cabezal pequeño), intercalados con tiempo de reposo de 10 segundos.
 - Centrifugar 20 minutos a 10000 rpm y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
 - Repetir la centrifugación y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de material para proteómica.
 - Cuantificar las proteínas totales como se describe en el apartado 2.11.4. Preparar una alícuota de 150 μ l o más (mínimo 150 μ g por muestra).
-

Después de purificadas las proteínas totales es importante conocer el estado y pureza proteica de las muestras recién purificadas. Para ello es habitual realizar un gel SDS-PAGE de 12,5 % con 20 μ g de muestra (ver apartado 2.11.5).

También se debe realizar un gel 2D pequeño antes de avanzar con los estudios de proteómica con marcaje DIGE (ver apartado 2.13.1). Si todavía se están optimizando las condiciones, se debe empezar por tiras con rango de pH amplio hasta encontrar el mejor intervalo para las muestras en cuestión.

2.11.4. Cuantificación de proteínas

2.11.4.1. Método de Bradford

La cuantificación de proteínas totales presentes en una solución con este método (Bradford 1976) se hizo utilizando el sistema *Protein Assay* (Bio-Rad), según las instrucciones del fabricante. La concentración de proteínas se calculó comparando los valores de absorbancia de las muestras a 595 nm con los de una recta patrón de seroalbúmina bovina (Takara Bio Inc.) preparada con concentraciones conocidas. Se realizó una nueva recta patrón cada vez que se quisieron cuantificar proteínas, y en cada ensayo se empleó siempre la misma solución de reactivo para todos los puntos de la recta y todas las muestras. De este modo se reduce el margen de error del experimento, puesto que existe una gran variabilidad en la intensidad de color obtenida con el mismo reactivo de Bradford a medida que transcurren los meses.

³⁹ Solución stock preparada a 3 M. Se almacena a -20 °C.

2.11.4.2. Otros métodos de cuantificación

Cuando la cuantificación de proteínas por el método de Bradford resultó ineficiente y con concentraciones sobreestimadas, se recurrió al kit comercial *2-D Quant Kit*, de GE Healthcare. Este sistema funciona precipitando las proteínas, basándose en la unión específica que presentan los iones de cobre a este tipo de moléculas. Las proteínas precipitadas se resuspenden en una solución que contiene cobre y un agente colorimétrico permite medir el cobre libre, por lo que una absorbancia elevada se traduce en una baja concentración de proteína. Se siguieron en todo el momento las instrucciones que acompañan el kit.

2.11.5. **Electroforesis en condiciones desnaturalizantes**

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes o SDS-PAGE (del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) se llevó a cabo de la manera habitual (Shapiro *et al.* 1967), empleándose el sistema *MiniProtean Tetra Cell* (Bio-Rad). Debido a las condiciones desnaturalizantes en que se desarrolla, esta técnica permite la separación de las proteínas presentes en una mezcla atendiendo exclusivamente a su tamaño, sin que la carga eléctrica de la proteína o su estructura espacial constituyan factores que influyan en la movilidad electroforética de cada polipéptido.

El gel desnaturalizante de poliacrilamida está formado por dos fases, cada una de las cuales con una densidad de poliacrilamida diferente: el gel concentrador o *stacking*, en la zona superior y que permite concentrar las muestras, y el gel de resolución, en la zona inferior y que se encarga de separar las proteínas según su tamaño. El efecto desnaturalizante de estos geles se debe a la presencia en su composición de SDS, un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas confiriéndoles además una carga neta negativa, estableciéndose así una relación entre masa y carga idéntica para todas ellas.

Procedimiento:

-
- Montar los cristales (previamente bien lavados) que servirán de molde al gel, según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad). Comprobar con agua mili-Q la ausencia de fugas y que están estancos.

- Preparar en un tubo de 10 ml la mezcla para el gel de resolución⁴⁰. En general se usó este gel a concentración final de acrilamida del 12,5 %. Para geles de 0,75 mm de espesor, será necesario preparar 5 ml de mezcla por cada gel.
- Decantar el agua que se puso entre los cristales y rellenar ese espacio con 4 ml aproximadamente de la mezcla del gel de resolución. Cubrir con etanol 100 %, con el fin de lograr una superficie lo más plana y horizontal posible.
- Utilizar el gel sobrante para comprobar el estado de la polimerización. Una vez polimerizado el gel, decantar el etanol.
- Preparar en un nuevo tubo de 10 ml la mezcla que dará lugar al gel *stacking*⁴¹. Preparar como mínimo 5 ml, que permiten polimerizar dos geles.
- Añadir la mezcla sobre el gel de resolución. Colocar inmediatamente el peine que dará lugar a los pocillos.
- Una vez polimerizado el gel *stacking*, retirar el peine. Limpiar bien los pocillos con agua mili-Q.
- Introducir el gel en la cubeta de electroforesis y llenar la misma con el tampón de electroforesis SDS-PAGE⁴² 1x.
- A las muestras de proteína que se vayan a someter a electroforesis, añadir tampón de carga⁴³ a la concentración final de 1x. Hervir las muestras durante 5 minutos para asegurar una desnaturalización completa.
- Cargar las muestras en el gel junto con un marcador de peso molecular para proteínas (Bio-Rad). Someter a electroforesis a 150 V durante el tiempo adecuado para el tamaño de la proteína que se pretende visualizar. Se puede utilizar un marcador de peso molecular pre-teñido para controlar la movilidad.
- Parar la electroforesis y desmontar los cristales para la extracción del gel.
- Colocar el gel dentro de una placa de petri de 150 mm de diámetro (o recipiente de características similares). Añadir la solución de fijación⁴⁴, y dejar en agitación suave durante 15 minutos. Esta solución estabiliza las proteínas en la matriz del gel.

⁴⁰ Gel resolución 12,5 % (5 ml): 2,1 ml poliacrilamida 30 % (p/v) (mezcla 29:1 de acrilamida y bisacrilamida); 1,3 ml agua mili-Q; 650 µl Tris 3 M pH 8,9; 850 µl sacarosa 50 % (p/v); 50 µl SDS 10 % (p/v); 50 µl APS (persulfato amónico) 10 % (p/v); 5 µl TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamina)

⁴¹ Gel *stacking* 5 % (5 ml): 833 µl acrilamida 30 % (p/v) (mezcla 29:1); 2,2 ml agua mili-Q; 500 µl Tris 1,25 M pH 6,8; 1,37 ml sacarosa 50 % (p/v); 50 µl SDS 10 % (p/v); 50 µl APS 10 %; 5 µl TEMED.

⁴² Tampón electroforesis SDS-PAGE 10x: 75,75 g Tris-base (250 mM); 360 g glicina (1,9 M); 25 g SDS (10 %). Completar con agua mili-Q hasta 2,5 litros. Comprobar que el pH sea de 8,3 (±0,2).

⁴³ Tampón de carga SDS-PAGE: 1,2 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 1 ml de SDS 20 %; 1 ml de glicerol 87 %; 5 % DTT; 500 µl de azul de bromofenol 0,5 %; 5,85 ml de agua mili-Q.

- Eliminar la solución de fijación y lavar el gel con agua mili-Q durante 10 minutos en agitación suave. Repetir este paso una vez.
 - Cubrir el gel con la solución de *Coomassie* coloidal⁴⁵ y mantener en agitación suave *o/n*.
 - Recuperar la solución de *Coomassie* para usos posteriores y lavar varias veces el gel con agua mili-Q para eliminar la tinción de fondo.
-

2.12. Estudio de la interacción del DNA con proteínas

Para el estudio de la interacción de las proteínas reguladoras PimM con el DNA se emplearon esencialmente dos técnicas: ensayos de retraso en gel y ensayos de protección frente a DNasa I. En este trabajo se emplearon las proteínas de fusión GST-PimM^{DBD} (Santos-Aberturas *et al.* 2011b)

2.12.1. Ensayos de retraso en gel (EMSA)

Los ensayos de retraso en gel, o EMSA (del inglés *electrophoretic mobility shift assay*) se fundamentan en la disminución de la movilidad electroforética de un fragmento de DNA cuando se le une una proteína (Fried & Crothers 1981, Garner & Revzin 1981). De este modo, esta técnica permite determinar si una proteína es capaz de unirse a un determinado fragmento de DNA, así como intuir el número de unidades de proteína que participan en la unión. Se siguió un método anteriormente descrito (Santos-Aberturas *et al.* 2011b, 2012).

El primer paso de esta técnica consiste en el **marcaje de las sondas** de DNA empleadas en el ensayo. La gran mayoría de las sondas se marcaron con el fluoróforo 6-FAM. Este marcaje se llevó a cabo mediante una reacción PCR (ver apartado 2.5.6), empleándose en ella los cebadores universales Fw y Rev, uno de ellos marcado con el fluoróforo 6FAM (6-carboxifluoresceína) en su extremo 5', y como molde el fragmento de DNA a estudiar clonado en el plásmido pUC19. En todos los casos se procedió a la secuenciación de la construcción con la sonda para asegurar la ausencia de errores en la misma. Tras la reacción de PCR los productos de amplificación se sometieron a una

⁴⁴ Solución de fijación: ácido acético glacial 7 % (v/v) y metanol 7 % (v/v).

⁴⁵ Solución de coomasie coloidal: 10 % (v/v) ácido fosfórico; 10 % (p/v) sulfato de amonio; 0,12 % (p/v) *Coomassie* Blue G-250; 20 % del volumen final de agua mili-Q. Antes de usar agitar *o/n*. Justo antes de usar, añadir 20 % (v/v) metanol. Se puede guardar hasta 6 meses protegida de la luz.

electroforesis convencional en un gel de agarosa (apartado 2.5.7) y el DNA del tamaño esperado fue purificado (apartado 2.5.8) para su posterior utilización en el EMSA. Excepcionalmente, se marcó una sonda con el sistema comercial *DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit, 2nd Generation* (Roche), siguiéndose las instrucciones del fabricante. Este sistema se sirve de una enzima transferasa terminal para añadir una molécula de ddUTP marcada con digoxigenina a los extremos 3' de una molécula de DNA. La detección de la sonda así marcada se lleva a cabo mediante la inmunodetección de la digoxigenina (ver apartado 2.5.9.2).

La **electroforesis** en geles de acrilamida se realizó en condiciones nativas (no desnaturalizantes) con la idea de respetar la conformación nativa y funcionalidad de las proteínas. Se utilizó el sistema *MiniProtean Tetra Cell* (Bio-Rad), los geles⁴⁶ cambiaron su composición esencialmente en la sustitución del SDS por glicerol, así como en el tampón empleado para su preparación y el tampón de electroforesis⁴⁷, que fue el TBE a 0,5x. Además, los geles empleados para los EMSA fueron sin excepción preparados al 5 % de acrilamida y en una sola fase.

La **reacción de unión** entre la proteína y el DNA se hizo siguiendo las condiciones óptimas para la interacción determinadas anteriormente (Santos-Aberturas *et al.* 2011b, 2012), y se describen a continuación. En todos los casos, se incubaron las reacciones de unión a 30 °C durante 10 minutos:

Interacción entre GST-PimM^{DBD} y sus dianas (volumen final de 25 µl por reacción): 10 ng de sonda de DNA marcada con 6FAM; Tris-HCl 40 mM pH 8,0; MgCl₂ 0,4 mM; KCl 5 mM; ditioneitol (DTT) 0,1 mM; glutatión 7,8 mM; Nonidet P40 0,005 % (p/v); poli d(I-C) 40 µg/ml; glicerol 20,6 % (v/v); GST-PimM^{DBD} 15-800 nM.

Controles: para todas las reacciones de unión se realizó una réplica en la que la proteína era sustituida por el mismo volumen del tampón en el que está conservada (Tris-HCl 50 mM, glutatión 10 mM, glicerol 20 %). La presencia de poli d(I-C) en todas las reacciones tiene como objetivo dificultar que sucedan las uniones de tipo inespecífico entre la proteína y la sonda.

⁴⁶ Gel EMSA 5 % (10 ml): 1,68 ml acrilamida 30 % (p/v) (29:1); 7,53 ml agua mili-Q; 0,5 ml TBE 10x; 0,25 ml glicerol; 50 µl APS 10 % (p/v); 5 µl TEMED.

⁴⁷ TBE 10x (1 litro): ácido bórico 0,89 M; 20 ml EDTA 0,5 M pH 8,0; Tris 0,89 M.

Una vez terminado el tiempo de unión, se añadió tampón de carga para DNA (concentración final 1×48) y a continuación se analizaron los complejos de unión mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida nativo. Es conveniente precorrer el gel durante 30 minutos antes de cargar las muestras. La electroforesis se prolongó de manera general durante 3-4 horas a un voltaje constante de 80 V.

Para la **visualización** del DNA marcado (y de los complejos proteína-DNA) se empleó un escáner de fluorescencia (*Ettan DIGE Imager*, Amersham Biosciences) y el software *DeCyder 2-D Differential Analysis* (Amersham Biosciences). En el caso de la sonda marcada con digoxigenina, fue necesario transferir el DNA a un soporte sólido (membrana *Hybond-N*, GE Healthcare) con un sistema de transferencia húmedo diseñado para el efecto de *MiniProtean III* (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante, y el revelado mediante inmunodetección como se ha descrito en el apartado 2.5.9.3.

2.12.2. Ensayos de protección frente a DNasa I (*footprinting*)

El ensayo de protección frente a DNasa I es una técnica utilizada para identificar con exactitud los sitios de unión en el DNA de una proteína, es decir, la secuencia de nucleótidos que reconoce una proteína para unirse al DNA. Esta información puede ayudar a comprender cómo se regula la expresión génica, y consecuentemente los ensayos de protección frente a DNasa I forman muchas veces parte del amplio estudio del control génico.

Esta técnica se basa en la observación de que cuando una proteína se une al DNA, la zona a la que se une se encuentra protegida en una posible digestión por una nucleasa con baja especificidad de secuencia. En un ensayo de protección frente a DNasa I, un fragmento de DNA o sonda con un posible sitio de unión se marca en uno de sus extremos 5' y se incuba secuencialmente con la proteína de unión y la DNasa I. En paralelo, el mismo fragmento marcado se incuba únicamente con la DNasa I. La digestión enzimática suave genera una población de fragmentos de DNA de diferentes tamaños marcados en un extremo, que después se ordenan por tamaño mediante electroforesis. Si la sonda contiene sitios de unión reconocidos por la proteína, entonces esta los habrá protegido durante la digestión y cuando se comparan los fragmentos obtenidos de ambas reacciones se podrá observar una huella dactilar o *footprinting* como el “hundimiento” de los

⁴⁸ Tampón de carga 10x: azul bromofenol 0,25 % (p/v), sacarosa 40 % (p/v) en agua mili-Q. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos y guardar a 4 °C.

picos del electroforetograma en esa zona concreta a causa de la ausencia de los fragmentos que se corresponderían con esos tamaños. Comparar el electroforetograma con la secuenciación de la sonda hace posible la identificación de la secuencia de nucleótidos protegida en el ensayo.

En este trabajo se empleó un método no radioactivo descrito anteriormente (Rodríguez-García *et al.* 1997).

2.12.2.1. Marcaje de la sonda de DNA con el fluoróforo 6FAM

El marcaje de las sondas se llevó a cabo como se describe en el apartado 2.12.1, en este caso realizándose dos reacciones de PCR por separado, cada una con sólo uno de los *primers* situados a ambos lados del MCS marcados con 6FAM. De esta manera se obtienen dos versiones de la misma sonda, cada una marcada en un extremo diferente. Cada una de estas sondas nos dará información sobre cómo es la protección del DNA frente la digestión enzimática en las dos cadenas de la molécula.

2.12.2.2. Digestión con DNasa I

Las reacciones de unión entre DNA y proteína se llevaron a cabo casi exactamente en las mismas condiciones que en el caso de los EMSA (apartado 2.12.1), con la única diferencia de que en el caso de los *footprintings* su volumen final se escaló hasta los 56 μ l, empleándose para cada reacción 0,28 μ mol de la sonda de DNA marcada con 6FAM. Las concentraciones de proteína de unión a DNA variaron entre 10 y 30 μ M.

Procedimiento:

-
- Preparar las soluciones de unión proteína-DNA que se quieren someter al *footprinting*.
 - Incubar las mezclas a 30 °C durante 10 minutos.
 - Añadir 0,01 U de DNasa I⁴⁹, en un volumen de 4 μ l.
 - Dejar actuar la DNasa a 30 °C durante 1 minuto.
 - Añadir 120 μ l de tampón de paro⁵⁰ para detener la reacción.

⁴⁹ Solución de DNasa I: la DNasa empleada (*Lyophilized bovine pancreas DNase I*, Roche) debe ser reconstituida en un tampón de la siguiente composición, que también sirve para su conservación—Tris-HCl 20 mM pH 7,0; NaCl 50 mM; BSA 100 μ g/ml; DTT 1 mM; glicerol 50 % (v/v). Antes de usar, diluir la DNasa I en el mismo tampón con un 10 % de glicerol hasta una concentración final de enzima de 0,0025 U/ μ l.

⁵⁰ Tampón de paro: Tris-HCl 9 mM pH 8,0 y EDTA 40 mM.

- Purificar los fragmentos de DNA generados mediante extracción con fenol y CIA como se describe en el apartado 2.5.2, excepto que después del CIA se utiliza una solución de acetato sódico 3 M pH 5,2 no tamponada. Tras la adición de etanol y la precipitación del DNA por centrifugación, eliminar toda la solución con una micropipeta, con cuidado de no tocar el precipitado, y dejar secar el DNA en oscuridad. Una vez seco se puede guardar a -20 °C hasta 2 semanas.
 - Resuspender las muestras en formamida y cargarlas en un secuenciador de DNA (ABI 3130, Applied Biosystems).
 - Analizar los resultados con el programa Peak ScannerTM (Applied Biosystems).
-

2.13. Estudios de proteómica mediante 2-D DIGE

El método 2-D DIGE (*2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis*) es una variante de la electroforesis bidimensional convencional que ofrece la posibilidad de incluir un estándar interno de modo que todas las muestras, incluso aquellas de geles diferentes, pueden ser fácilmente comparadas y cuantificadas con exactitud, ofreciendo una mayor confianza estadística en las diferencias de expresión identificadas. Así, se pueden marcar hasta tres muestras diferentes con marcadores fluorescentes y la tercera, el control interno, permite conectar todos los geles eliminando variaciones entre ellos por lo que hace dispensables las réplicas técnicas. El mayor inconveniente de este método es el aspecto económico, debido al material necesario para su utilización.

En una primera fase se debe diseñar el experimento, determinando las condiciones que se pretenden estudiar, y el control con el que hacer las comparaciones, así como estipular el número de réplicas biológicas necesarias. En este trabajo se utilizaron cuatro réplicas biológicas de cada condición. Una vez identificadas las muestras control y problema, se deben establecer las combinaciones que se analizarán en cada gel. El estándar interno hace prescindible la presencia de una muestra control en todos los geles, por lo que si es necesario se pueden juntar en el mismo gel dos muestras problema que se pretenden estudiar con respecto al control común.

2.13.1. Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional (2-DE del inglés, *two-dimensional gel electrophoresis*) es un método de dos pasos que permite el análisis de mezclas proteicas complejas basándose en dos propiedades distintas de las proteínas. Esta técnica fue introducida por primera vez en 1975 y por dos autores de forma independiente (Klose 1975, O'Farrell 1975)

La **primera dimensión** o **isoelectroenfoque** (IEF) separa las proteínas por su punto isoelectrico (pI). Las proteínas, que son moléculas anfóteras, pueden presentar una carga neta positiva, negativa o cero, y estarán cargadas en todos los valores de pH excepto en su punto isoelectrico. El punto isoelectrico es pues el pH específico al cual la carga neta de la proteína es cero. La carga neta de una proteína es la suma de todas las cargas negativas y positivas de las cadenas laterales de sus aminoácidos y de sus grupos amino y carboxilo terminales. Si están cargadas positivamente, las proteínas migrarán hacia el extremo más negativo del gel; si por lo contrario tienen carga negativa, estas migrarán hacia el extremo positivo. Así, en la primera dimensión las proteínas se desplazarán a lo largo del gel (horizontal) y se acumularán en su punto isoelectrico.

En la **segunda dimensión** (SDS-PAGE) las proteínas son desnaturizadas con SDS y un cierto número de estas moléculas se unen a las proteínas ahora en cadena simples. En este estado, el tamaño de una proteína es aproximadamente proporcional a su masa y las moléculas de SDS confieren carga negativa, de tal manera que habrá una relación directa entre masa y carga (proteínas de cadena más larga tendrán más moléculas de SDS acopladas que proteínas más pequeñas). Es esta carga negativa lo que permite la migración electroforética de las proteínas. Además, previamente a la segunda dimensión las tiras con las proteínas inmovilizadas durante la 1D son tratadas con DTT (que es un agente reductor que rompe los puentes disulfuro en las proteínas) y iodoacetamida (que previene la reoxidación durante la electroforesis evitando la formación de artefactos). De este modo, cuando se aplica el potencial eléctrico (gel vertical), las proteínas más negativas serán atraídas por el lado positivo del gel de una forma proporcional a su coeficiente masa-carga, y como se ha dicho anteriormente este es casi igual para todas las proteínas, de modo que la migración de las proteínas depende casi exclusivamente de su peso molecular.

2.13.1.1. Primera dimensión (IEF)

En este trabajo se utilizó el sistema de separación de proteínas *IPGphor Isoelectric Focusing System* (GE Healthcare) y tiras de poliacrilamida comerciales *Immobiline DryStrip Gels*

(GE Healthcare) de 7 cm con gradiente de pH 3-10 y 4-7, y de 18 cm con gradiente pH 4-7 (las tiras se conservan a -20 °C).

Procedimiento:

-
- Para tiras de 7 cm, mezclar en un microtubo 80-120 µg de proteínas totales y completar hasta los 125 µl con tampón RB⁵¹ o RB2 (según el tampón en que están resuspendidas las proteínas) suplementado con DTT⁵² 60 mM y IPG-buffer⁵³ 1 % pH 3-11 NL. Para tiras de 18 cm, usar 350-400 µg de proteínas totales y completar de igual forma hasta los 350 µl.
 - Mezclar bien y dar un pulso de centrifuga.
 - Depositar todo el volumen preparado en un sarcófago (*holder*) del equipo de separación, de tamaño apropiado para las tiras a usar, previamente posicionado de manera que los electrodos positivo y negativo estén en contacto con los campos positivo y negativo, respectivamente. Dispensar la solución con cuidado de modo que quede entre los dos electrodos del sarcófago. Evitar la formación de burbujas.
 - Retirar el plástico protector de la tira, colocarla dentro y a lo largo de todo el sarcófago, con el gel desecado de poliacrilamida en contacto con la solución. Evitar la formación de burbujas.
 - Cubrir la tira con 2-2,5 ml de *DryStrips Cover Fluid* (GE Healthcare) y la ayuda de una micropipeta. Evitar desplazar la solución de proteínas hacia uno de los lados.
 - Confirmar la posición de los sarcófagos relativamente a los electrodos y campos eléctricos, y procurar que queden lo más perpendiculares posible con respecto a los campos.
 - Iniciar el programa de IEF (con un máximo de 50-75 µA/tira y 20 °C), que consiste en: 1 h a 0 V (rehidratación); 12 h a 30 V; 2 h a 60 V; 1 h a 500 V; 1 h a 1000 V, subir en gradiente durante media hora hasta 8000 V y aproximadamente 7 h a 8000 V hasta llegar a los 50000 Vh.
 - Terminado el programa registrar para comparaciones futuras los Vh totales y las horas totales de electroforesis.

⁵¹ Tampón RB: urea 8 M, CHAPS 2 % (p/v) y azul de bromofenol 0,01 % (p/v). Se filtra y se conserva a -20 °C.

⁵² Solución stock de DTT a 2,5 M. Se conserva a -20 °C.

⁵³ IPG-buffer (GE Healthcare): mezcla comercial de anfolitos que potencian la migración de las proteínas y producen una conductividad uniforme a través del gradiente de pH. Conservar a 4 °C.

- Retirar las tiras, colocarlas en tubos debidamente rotulados y sellar con tapa o parafilm. Continuar con la fase de equilibrado y segunda dimensión, o congelar hasta el momento de su uso a -80 °C.
-

2.13.1.2. Segunda dimensión

Para las tiras de 7 cm se empleó un gel convencional de SDS-PAGE de 1,5 mm de grosor (ver apartado 2.11.5). Para las tiras de 18 cm se utilizó el sistema *Ettan DALT Six* (GE Healthcare). Este sistema permite la preparación y electroforesis simultánea de 6 geles de 25,5 × 20,5 cm, con 1 mm o 1,5 mm de espesor. En este caso, se prepararon geles de 1 mm y 12,5 % poliacrilamida⁵⁴. Se utilizó el marcador de peso molecular preteñido con bandas entre 10 y 250 kDa *Precision Plus Protein Standards* (BioRad).

Procedimiento:

- Asegurarse de que todo el material de montaje de los geles está limpio, bien aclarado con agua mili-Q, seco y libre de restos de poliacrilamida.
- Preparar la mezcla para los geles según lo previamente indicado, pero sin añadir el persulfato amónico.
- Desgasificar la mezcla con agitación y durante 1 hora en un Kitasato (previamente mantenido a 4 °C durante uno o más días) conectado a una bomba de vacío.
- Montar los cristales del sistema para la polimerización de los geles según las indicaciones del fabricante.
- Añadir el persulfato amónico a la mezcla y agitar unos segundos. Dispensar la mezcla entre los cristales hasta la altura deseada (aproximadamente 1 cm por debajo del cristal más pequeño). Cubrir inmediatamente con 2-propanol y tapar con película adherente. Dejar polimerizar durante toda la noche.
- Eliminar el 2-propanol y lavar el frente de los geles con agua mili-Q. Comprobar la ausencia de burbujas (se pueden permitir pequeñas burbujas si no están directamente en la zona por donde pasarán las proteínas durante la electroforesis). Si existen burbujas, descartar los geles y repetir el procedimiento.

⁵⁴ Mezcla para 6 geles (400 ml): 166,8 ml poliacrilamida 30 %; 100 ml Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (tampón 4x RB); 2 ml SDS 20 % (p/v) previamente filtrado; 2 ml persulfato amónico 10 % (p/v); 132 µl TEME; 129,2 ml agua mili-Q. Se utiliza una solución de SDS a 20 % (p/v) previamente preparada en agua mili-Q, filtrada con filtros de 0,45 µm y almacenada a temperatura ambiente.

- Rellenar el frente de los geles con tampón de electroforesis a 1x⁵⁵. Se pueden conservar así hasta 2 días a 4 °C.
- Equilibrar las tiras en dos pasos de 15 minutos con tampón de equilibrado⁵⁶ (este tampón se prepara con tampón 4x RB⁵⁷): el primer paso con tampón de equilibrado (4,870 ml) suplementado con 120 µl de DTT 2,5 M; en el segundo paso se utilizan 5 ml de tampón de equilibrado suplementado con 200 mg de iodoacetamida (para las tiras de 7 cm se usan 2,5 ml de solución por cada tira en tubos de 10 ml; para las tiras de 18 cm se usan 5 ml por tira en tubos de cristal grandes). Mantener las tiras en agitación suave constante durante el equilibrado.
- Lavar las tiras pasándolas por un tubo con agua mili-Q (sumergiéndolas un par de veces) y depositarlas sobre papel Whatman[®] 3MM para secar (apoyadas sobre la parte lateral, de modo que la poliacrilamida no toque el papel).
- Introducir los geles en la cámara de electroforesis y añadir 1,5 litros de tampón de electroforesis 2x en la cámara superior del sistema. En la cámara inferior se utilizan 5 litros de tampón de electroforesis 1x. Preparar tampones nuevos para cada carrera.
- Eliminar aproximadamente 1 cm de gel de cada uno de los extremos de las tiras y colocarlas entre los cristales (con el lado positivo para la izquierda). Si se desea utilizar marcador de peso molecular, dispensar 5 µl de marcador en un trozo de papel Whatman[®] 3MM 10-15 x 2 mm y colocarlo en el lado positivo de la banda inmediatamente antes de iniciar la carrera (con el cuidado de doblar el extremo superior de forma que el papel permanezca en vertical).
- Realizar la separación de las proteínas en las siguientes condiciones: 25 °C, 3 W por gel durante 30 minutos, 15-20 W por gel (180 W máximo) durante 12-12,5 horas (controlar el tiempo con la ayuda del frente del marcador preteñido; no dejar que salga del gel).

⁵⁵ Tampón electroforesis 10x: Tris-HCl 250 mM pH 8,3; glicina 1,92 M; SDS 1 % (p/v); completar con agua mili-Q hasta 1 litro. Almacenar a temperatura ambiente.

⁵⁶ Tampón de equilibrado: Tris-HCl 50 mM pH 8,8 (8,35 ml de tampón 4x RB para un total de 250 ml); urea 6 M; glicerol 30 % (v/v); SDS 2 %. Filtrar y conservar a temperatura ambiente.

⁵⁷ Tampón 4x RB: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8. Disolver en agua mili-Q y filtrar la disolución con filtros 0,45 µm. Almacenar 4 °C.

2.13.2. Detección de proteínas

El marcaje DIGE (del inglés *Difference Gel Electrophoresis*) es el más sensible de los métodos no reactivos de tinción de proteínas, con detección por debajo de los 125 µg y una respuesta lineal de hasta cinco órdenes de magnitud (e.g., la tinción con plata detecta entre 1 a 60 ng de proteína con un rango dinámico menor de dos órdenes de magnitud).

El marcaje de las proteínas se hace previamente a la primera dimensión y usa un estándar interno constituido por la mezcla equimolar de todas las muestras a analizar, que se incluye en cada uno de los geles del experimento junto con las muestras a comparar (un total de tres muestras por gel). Las muestras se marcan con tres marcadores fluorescentes diferentes, en función de sus espectros de excitación y emisión: Cy2 (488/520 nm), Cy3 (532/580 nm) y Cy5 (633/670 nm). Estos fluoróforos estructuralmente semejantes, cuando se mezclan con proteínas sufren una reacción de sustitución endofílica con los grupos γ -amino de los residuos de lisinas para formar una amida. Estos marcadores son muy semejantes en masa y están cargados positivamente como la lisina. Esta similitud de cargas y masas debe garantizar que sólo ocurran pequeños cambios en el eje del pI y desplazamientos en el gel con respecto a las proteínas no marcadas. Las condiciones de la reacción de marcaje son limitantes en cuanto a cantidad de fluoróforos, por lo que sólo una lisina por proteína es marcada, lo que se traduce en 1-2 % de los residuos de lisina marcados (Alban *et al.* 2003). Se dice entonces que se trata de un marcaje mínimo porque sólo se marca una pequeña parte de las proteínas totales de la muestra.

Se utilizó el kit comercial de marcaje *CyDye™ DIGE Dyes* (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Procedimiento:

-
- Determinar el pH de las muestras utilizando papel indicador de pH y una gota de aproximadamente 2 µl de muestra. Ajustar a pH 8,5 con NaOH (100-250 mM) cuando sea necesario. Tamponar el volumen necesario para el marcaje (depende de la concentración de la muestra).
 - Repasar las combinaciones de marcaje y calcular la cantidad necesaria de cada muestra para los marcajes. Para los marcajes con Cy3 o Cy5 son necesarios 50 µg, y 25µg para el Cy2 (control interno). Para cada gel DIGE se necesitan 400 µg de proteína, de los cuales 50 µg son de la muestra marcada con Cy3, otros 50 µg de la

muestra marcada con Cy5, y 300 μg del conjunto de todas las muestras marcadas con Cy2 (que en este caso son 12 muestras, 25 μg de cada).

- Equilibrar los fluoróforos a temperatura ambiente durante al menos 5 minutos para evitar su hidratación al abrir el tubo.
 - Alicuotear una pequeña cantidad de dimetilformamida (DMF) a 5 nM a un microtubo. Preparar una solución maestra añadiendo 5 μl de DMF a cada fluoróforo quedando a una concentración de final de 1 nM. Mezclar bien con vortex y dar un pulso. Esta solución se puede almacenar hasta 3 meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - Preparar la solución de trabajo a 400 pmol/ μl mezclando 2 partes de la solución maestra y 3 partes de DMF. En el caso de que se vaya a usar todo el marcador en el momento, añadir directamente 12,5 μl de DMF al fluoróforo en el paso anterior para crear la solución de trabajo en un solo paso.
 - Pipetear 50 μg (muestras de 5-10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de muestra en un microtubo de 1,5 ml. Añadir 1 μl del marcador (solución de trabajo). Mezclar en vortex y dar un pulso. Incubar en oscuridad durante 30 minutos y en hielo.
 - Parar el proceso de marcaje añadiendo 1 μl de lisina 10 mM. Incubar 10 minutos en hielo y en ausencia de luz.
 - Combinar las muestras que se correrán en un mismo gel. Completar hasta 350 μl con tampón RB suplementado con IPG buffer 1,2 % y DTT 70 mM.
 - Utilizar las muestras así preparadas para los pasos de electroforesis bidimensional.
-

2.13.3. Escaneado y análisis de los geles

Con las 4 réplicas biológicas para cada una de las 3 condiciones a estudiar (dos mutantes, un control) se generaron 12 imágenes de geles bidimensionales de las condiciones, y del estándar interno se obtuvieron otras 6 imágenes. En total se analizaron 18 imágenes únicas de mapas proteicos correspondientes a los tres fluoróforos Cy5, Cy3 y Cy2.

Las imágenes fueron obtenidas usando el equipo *Ettan DIGE Imager* (GE Healthcare) con filtros CyDye y tamaño de píxel 100 μm . Se utilizó el programa *DeCyder 2D Differential Analysis Software* v7.0 (GE Healthcare) para analizar las imágenes. Este permite su preparación después del escaneado, análisis estadístico e interpretación de datos.

Un algoritmo de codetección en el módulo DIA (*Differential In-gel Analysis*) permite detectar todos los *spots* en un gel, generando patrones idénticos de detección de *spots* en las 3 imágenes derivadas de un gel. La cuantificación de un *spot* se realiza automáticamente después de la eliminación del ruido de fondo y la normalización de los volúmenes de *spots* con respecto al estándar interno.

Después de asignar el tipo de muestra que se encuentra presente en cada gel, y el fluoróforo que corresponde a cada muestra (control o problema), el análisis del módulo de variación biológica (BVA del inglés, *Biological Variation Analysis*) permite emparejar las 4 imágenes provenientes de las cuatro réplicas biológicas para comparar y analizar estadísticamente los cambios en la cantidad de proteína para una misma condición (varianza), normalizado con respecto al estándar interno. Los análisis estadísticos realizados con BVA llevaron a la selección de los puntos de proteínas cuya identificación sería interesante. Para ello se emplearon las siguientes pruebas estadísticas: 1) promedio de proporciones, 2) distribución *t-student*, 3) ANOVA. Los criterios empleados para identificar proteínas de interés fueron: 1) cambio lineal de la abundancia de la proteína en cada una de las condiciones problema respecto a la condición control $\geq 1,5$ veces (positivo o negativo), 2) con una significación estadística de valor $p \leq 0,05$, y 3) presencia de la proteína en el 70 % de los geles.

Por último, se empleó el módulo EDA (*Extended Data Analysis*) para realizar un análisis estadístico multivariante con la información generada por el módulo BVA. De este modo se llevó a cabo un análisis de componentes principales o PCA (*Principal Component Analysis*) y se definieron perfiles de abundancias de proteínas en las condiciones comparadas.

2.13.4. Digestión trípica de proteínas separadas mediante electroforesis 2-D PAGE

La digestión de proteínas inmovilizadas en gel (*in-gel*), previamente separadas por electroforesis, es un proceso en el cual la proteína es cortada enzimáticamente en un número limitado de péptidos mientras está en el gel. Estos permiten la identificación de la proteína debido a sus masas y patrones de fragmentación característicos. La tripsina, una serín proteasa, es la enzima más frecuentemente empleada en proteómica. Normalmente obtenida a partir de páncreas bovino, la tripsina corta el enlace peptídico en el extremo carboxilo después de los aminoácidos arginina y lisina. Un efecto indeseado de las

digestiones enzimáticas es la autodigestión de la proteasa, que generaría péptidos que no pertenecen a la proteína en estudio.

Se utilizaron los mismos geles de la marcación DIGE, que después de escaneados fueron teñidos con *Coomassie* para facilitar la visualización de los *spots*. También se utilizó un gel máster que incluye todas las muestras representadas equitativamente hasta 400 µg de muestra. Se siguió un protocolo descrito anteriormente (Havlis *et al.* 2003).

Procedimiento:

- Cortar los *spots* de proteínas con una punta de micropipeta recortada y depositar cada *spot* por separado en un microtubo de 1,5 ml con aproximadamente 250 µl de agua mili-Q.
- Realizar dos lavados con agua mili-Q durante 10 minutos a 25 °C y agitación (1400 rpm).
- Deshidratar los *spots* añadiendo 30 µl de acetonitrilo (AcN) después de eliminado el agua. Esperar 5 minutos para que el gel se deshidrate y libere el colorante. Repetir esta operación dos veces con el fin de eliminar el *Coomassie* (hasta que el gel quede blanco y opaco). Entre cada deshidratación hacer un lavado con agua mili-Q de 10 minutos. En este paso se puede parar y conservar la muestra a 4 °C al menos un día.
- Secar los *spots* en centrifuga de vacío (*SpeedVac*, de Savant).
- Cubrir los puntos (10 µl) con una solución DTT 10 mM (solución stock a 1 M) en bicarbonato amónico (NH_4HCO_3) 25 mM (habitualmente denominada AMBI). Incubar 30 minutos a 56 °C con agitación de 300 rpm.
- Eliminar la solución de DTT con una micropipeta
- Añadir 30 µl de AcN, que se retira rápidamente para incubar con iodoacetamida 55 mM (solución stock 10 mg/ml) en AMBI, durante 15 minutos y en oscuridad.
- Eliminar la iodoacetamida y añadir 20 µl de AcN. Incubar durante 5 minutos y eliminar sobrenadante.
- Añadir 20 µl de solución AMBI e incubar 5 minutos. Transcurrido este tiempo, sin retirar el sobrenadante, se añade igual volumen de AcN y se incuba 15 minutos más.
- Eliminar el sobrenadante y secar al vacío (entre 15 a 20 minutos).

- Añadir 10 μl de solución de tripsina preparada a 12,5 ng/ μl en AMBI. Incubar en hielo durante 45 minutos para que los *spots* absorban la tripsina pero sin que esta llegue a actuar.
 - Retirar el sobrenadante y añadir NH_4HCO_3 25 mM hasta cubrir completamente el *spot*.
 - Incubar durante al menos 6 horas a 37 °C (preferiblemente toda la noche).
 - Tras la digestión, agitar con vortex y dar un pulso. Recoger el sobrenadante en un nuevo microtubo.
 - Cubrir los *spots* con una solución de AcN 50 % y ácido trifluoroacético (TFA) 0,5 %. Sonicar 10 minutos en un baño de ultrasonidos. Pasar el sobrenadante al microtubo en el que se había recogido el sobrenadante en el paso anterior
 - Realizar otra extracción de 10 minutos pero sólo con AcN y depositar los sobrenadantes junto con la extracción anterior.
 - Llevar a sequedad usando la centrífuga de vacío y resuspender en 5 μl de una solución de AcN 50 % y TFA 0,1 %. Sonicar en baño de ultrasonidos durante 5 minutos
-

2.13.5. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

La espectrometría de masas **MALDI-TOF** (del inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) se ha tornado en una de las herramientas más importantes para la identificación de proteínas y péptidos, y es particularmente importante en estudios de proteómica. La ionización MALDI, acoplada a un detector de iones ToF (del inglés, *Time of Flight*), es una técnica de ionización suave que permite el análisis de la composición de biomoléculas (biopolímeros como proteínas, péptidos y azúcares) y moléculas orgánicas grandes (como polímeros dendrímeros y otras macromoléculas).

La muestra a analizar se mezcla con una matriz. Esta asegura la ionización de las moléculas cuando se someten a un pulso de luz intensa de un láser. A la vez que la matriz se cristaliza en la superficie de la placa de muestras (*slide*), las proteínas y péptidos se incorporan a esos cristales. La placa de muestras permite transportar las muestras hasta el espectrofotómetro. A medida que pulsos de luz láser de corta duración (nanosegundos) atingen los cristales, la energía absorbida hace que una parte de la superficie de los cristales se volatilice y ionice, creando una nube de iones. La presencia de un campo electrostático

promueve el desplazamiento de los iones a través del vacío del tubo de vuelo hacia el detector. Si la nube de iones contiene moléculas proteicas o peptídicas, estas también se desplazarán. Estos iones son acelerados hasta una energía fija y, después de atravesar el tubo de vuelo, impactan con el detector. Midiendo el tiempo de vuelo entre la aplicación del campo electrostático de aceleración y la llegada del ión al detector, la masa del ión puede ser fácilmente calculada.

De este modo, cuando todos los iones están igualmente cargados, una masa más ligera viajará más rápidamente que una masa más pesada. A medida que cada ión alcanza el detector, se genera un pico creando un espectro de masas, i.e. una gráfica de intensidad de señal generada contra el tiempo. El cociente masa-carga (m/z) que corresponde a un pico en particular se calcula utilizando ecuaciones simples y la gráfica tiempo-intensidad se convierte en un histograma de m/z -e intensidad. Ahora a cada pico en el espectro de masas se le asigna una masa específica. La información registrada de espectros de tiempo de vuelo bajo forma de tablas de intensidad versus tiempo de vuelo, permite calcular los datos m/z con una simple ecuación en la que las constantes se determinan con la ayuda de dos picos de masa y carga conocidas (las constantes se derivan de su tiempo de vuelo medido).

En este trabajo se realizó un análisis de la huella peptídica y *MS/MS* con el espectrómetro de masas *4800 Plus MALDI-TOF/TOF™ Analyzer* (AB-Sciex). La calibración externa se usó con el *4800 Proteomics Analyzer Calibration Mixture* (AB Sciex) y todos los espectros de masas se calibraron internamente con péptidos de autodigestión de la tripsina. El análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF produjo inicialmente una huella dactilar de masas (PMF, del inglés *peptide mass fingerprint*) única para cada *spot* de proteína digerido. Usando el software *4000 Series Explorer v3.5.3* (AB Sciex), se generó una lista de pesos moleculares monoisotópicos con un ratio de señal-ruido $S/N > 20$ (*signal/noise*), a partir de hasta 65 péptidos observados por *spot* digerido. En base a esta lista de péptidos del PMF generado para cada proteína en estudio, se seleccionaron los 10 péptidos que tuvieran, primero mayor intensidad de señal y segundo $S/N > 20$. Para el subsiguiente análisis de *MS/MS* se excluyeron aquellas masas de contaminaciones conocidas (como queratinas, tripsinas, etc).

Para determinar la identidad de la proteína, se usaron los archivos que combinan la información de los espectros *MS* y *MS/MS* procesados por el software *Global Protein Server v3.6* (AB Sciex) para búsquedas en la base de datos de proteínas del NCBI, usando la

licencia local del motor de búsqueda *Mascot v2.2.04* (Matrix Science, UK). Se establecieron los siguientes criterios de búsqueda:

- Base de datos de secuencias no redundantes del NCBI (2014/05/15 y 2014/06/06)
- Taxonomía: Bacteria
- Se consideraron modificaciones fijas y variables (cisteína como derivado de s-carbamidometilación, y metionina como metionina oxidada)
- Se permitió la pérdida de un sitio de corte por péptido
- Para precursor se permitió una tolerancia de 100 ppm
- Para los fragmentos generados por MS/MS se permitió una tolerancia de 0,3 Da
- Se consideró que la carga de los péptidos es +1
- Se especificó en el algoritmo que la enzima de restricción empleada fue la tripsina.

Las proteínas encontradas con el motor de búsqueda *Mascot* empleando estos datos y parámetros, se consideraron válidas cuando la puntuación global (*score*) de *Mascot* fue mayor que 99 con un nivel de significación $p < 0,05$. Además, tenían más de un 20 % de cobertura o al menos 2 péptidos por MS/MS.

2.14. Métodos de producción, detección y cuantificación de metabolitos secundarios

Para detectar la producción de distintos macrólidos en las fermentaciones de las diferentes cepas utilizadas a lo largo de este trabajo, se emplearon tres métodos, dos cualitativos y otro cuantitativo, en función de las exigencias de cada situación.

2.14.1. Producción de metabolitos secundarios mediante fermentación en medio líquido

Para la producción de los varios macrólidos se siguió siempre el mismo procedimiento: se inocularon 50-100 ml de medio YEME sin sacarosa en un matraz con indentaciones (suplementado con los antibióticos adecuados en cada caso) con esporas

viabiles de la cepa a estudiar a una concentración final de 1×10^6 cfu/ml, y se mantuvo el cultivo a 30 °C y 250 rpm durante un tiempo variable en función del tipo de estudio a realizar. También los tiempos de recogida de muestras variaron según la cepa y el tipo de estudio.

Normalmente, para cada cepa estudiada en una fermentación se utilizaron tres réplicas biológicas y se recogieron muestras tanto para el seguimiento del crecimiento (ver apartado 2.3.2.1) como para la estimación de la producción de metabolitos secundarios.

2.14.2. Valoración cualitativa de la producción de macrólidos

2.14.2.1. Bioensayo con *C. utilis*

Cuando el objeto fue determinar si una cepa era capaz de producir filipina, se realizaron bioensayos frente a *C. utilis*, una levadura que presenta una elevada sensibilidad a la actividad antifúngica de los polienos.

Procedimiento:

-
- El día antes de la realización del bioensayo, se inocula *C. utilis* en un matraz liso con 30 ml de medio YED y se mantiene creciendo a 30 °C y 250 rpm durante 12-16 horas.
 - Mezclar 100 ml de medio YED líquido con el mismo volumen de YED sólido al 2 % de agar fundido y poner el medio resultante (200 ml de YED al 1 % de agar) en un baño a 50 °C.
 - Una vez se haya estabilizado la temperatura del medio, se inocula con 2 ml del cultivo de *C. utilis* a una DO_{600} de 3,0 (aproximadamente) y se reparte en las placas de Petri que se consideren oportunas.
 - Una vez que las placas de medio con *C. utilis* hayan solidificado, realizar en ellas pocillos de 0,55 cm de diámetro con la ayuda de un sacabocados previamente esterilizado.
 - Cargar hasta 50 μ l de las muestras de fermentación (se utilizaron muestras extraídas y concentradas, ver apartado 2.14.3.1) a estudiar en cada uno de los pocillos.
 - Dejar que las muestras difundan en el medio durante 2 horas a 4 °C.
 - Incubar las placas entre 12 y 14 horas a 30 °C.
-

2.14.3. Cuantificación de la producción de metabolitos secundarios

Cuando se pretendió cuantificar la producción de los compuestos, se procedió a la extracción de los macrólidos presentes en el cultivo con solventes orgánicos, su cuantificación mediante HPLC y su puesta en relación con el crecimiento del cultivo en cada momento analizado.

2.14.3.1. Extracción con solventes orgánicos

Para poder cuantificar la producción de metabolitos secundarios fue necesario primero optimizar el método de extracción. En un principio las extracciones se realizaron con metanol 100 % como se ha descrito para *S. natalensis* (Recio *et al.* 2004). Al no obtener resultados satisfactorios, se siguió una estrategia diferente utilizando acetato de etilo. Este solvente orgánico presenta ciertas ventajas frente al metanol, ya que al no ser miscible con soluciones acuosas permite seleccionar exclusivamente los metabolitos solubles en solventes orgánicos, además de facilitar la posterior concentración. Por lo tanto, la extracción de los macrólidos de interés en *S. avermitilis* se hizo añadiendo a la muestra de cultivo (normalmente 8 ml) dos volúmenes de acetato de etilo, seguido de una agitación en vortex durante 30 segundos (en el caso de los bioensayos, donde se emplearon volúmenes de muestra de hasta 100 ml, se agitó una embudo de decantación durante 5 minutos), y una centrifugación suave a 2000 rpm durante 3 minutos para separar las dos fases. Se repitió una segunda vez la extracción de la muestra de cultivo con otros dos volúmenes de acetato de etilo. El total de la fase orgánica obtenida se llevó a sequedad en un sistema de centrifugación en vacío (*SpeedVac*, de Savant) y el precipitado obtenido se resuspendió en una determinada cantidad de metanol 100 % (normalmente, 200 μ l). Para el análisis de la producción se tuvieron en cuenta el volumen de muestra inicial así como el volumen final en que se resuspendió el precipitado, trabajándose la mayoría de las veces con una muestra 40 veces más concentrada que la original.

2.14.3.2. Cuantificación mediante HPLC

La cuantificación de **filipina** así como de otros **macrólidos** se realizó por cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC (del inglés, *High Performance Liquid Chromatography*).

Se utilizó una columna de fase reversa, *Mediterranea*TM *Sea18* (3 μ m; 4,6 x 150 mm) de Teknokroma, en un equipo de cromatografía de *Waters 600* con un detector *Waters 996*

Photodiode Array. La elución se llevó a cabo utilizando el gradiente de metanol en ácido fórmico 0,1 % (flujo de 0,8 ml/min) indicado en la Tabla 2.9.

Tabla 2.9. Gradiente cromatográfico para el análisis de metabolitos secundarios.

Tiempo (min)	% Metanol
0	50
3	50
12	90
20	90
21	100
23	100
24	0
26	0
27	50
32	50

Para la detección de filipina se hizo con referencia al componente mayoritario del complejo, la **filipina III**, y se fijó el detector a 339 nm y el tiempo de retención del compuesto fue de 18,2 minutos. La detección de oligomicina llevó a cabo analizando la producción de **oligomicina A**, se realizó a 225 nm y a los 26,7 minutos de tiempo de retención.

2.15. Recursos Bioinformáticos

Durante el desarrollo de este trabajo se emplearon diversas herramientas informáticas específicamente diseñadas para la interpretación de información biológica.

Para el manejo general de secuencias de DNA y proteínas se empleó el programa **Vector NTI Advance™ 11** (Invitrogen), además de las herramientas disponibles en www.expasy.org para el estudio de las secuencias peptídicas. Las comparaciones de secuencias de DNA y proteínas con las bases de datos disponibles en Internet se llevaron a cabo con la herramienta **BLAST** (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los alineamientos de estas mismas secuencias se realizaron con el programa **AlignX**

(Invitrogen). El análisis de electroforetogramas se realizó con los programas **Chromas LITE 2.01** (Technelysium), y **Peak ScannerTM v1.0** (Applied Biosystems).

A través de Internet se han utilizado diferentes programas, como el simulador *in silico* de experimentos de biología molecular (<http://insilico.ehu.es/>), **ClustalW2** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), programa para el diseño de *primers* y sondas **Primer3 Plus** (<http://primer3plus.com/>), la herramienta de búsqueda de secuencias y operadores **Cluster Buster** (<http://zlab.bu.edu/cluster-buster/index.html>), la herramienta de búsqueda y análisis de promotores bacterianos **BPROM** (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfnfdb>), el servidor **BiPad** para el cálculo del valor R_i de los operadores (<http://bipad.cmh.edu/>), además de varias bases de datos como la de publicaciones **PubMed** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), la base de datos del genoma de *Streptomyces avermitilis* (<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>), la base de datos de genes y genomas **KEGG** (<http://www.genome.jp/kegg/>), la base de datos **NCBI** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), el servidor de anotaciones de *Streptomyces* **StrepDB** (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>) y la base de datos de enzimas **BRENDA** (<http://www.brenda-enzymes.org/>). Para análisis más globales se han empleado las herramientas **BioCyc**, para el análisis de rutas metabólicas (<http://biocyc.org/>), y **antiSMASH**, para la predicción de metabolitos secundarios a partir de rutas biosintéticas (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“Experimence: the most brutal of teachers.
But you learn, my God do you learn”.

C. S. Lewis

3.1. Estudio de la cepa *S. avermitilis* NRRL 8165

Este trabajo se centra en *S. avermitilis*, un actinomiceto bien estudiado en cuanto a la producción de avermectina pero muy poco con respecto a la producción de filipina. Se trata además de una cepa nueva en nuestro laboratorio, por lo que se pidió la cepa silvestre *S. avermitilis* NRRL 8165 a la colección alemana de cultivos tipo (= DSM 46492) y en primer lugar se procedió a la optimización de procedimientos básicos de trabajo.

3.1.1. Crecimiento

La cepa fue capaz de crecer en muchos medios de cultivo típicamente empleados en *Streptomyces*, tanto en versión líquida como sólida. Para el crecimiento en placa, se estipuló el uso del medio TSA para el crecimiento rápido de la cepa, y el medio TBO para su esporulación (Figura 3.1). Las esporas de *S. avermitilis* son de color gris/marrón intenso y se producen en gran cantidad (aproximadamente $2,5 \times 10^7$ cfu/cm²). Al cabo de 6 días de crecimiento en TSA, así como en otros medios como el MS, se pudo observar la producción y difusión hacia el medio de cultivo de un pigmento marrón similar a la melanina. Al contrario que algunas especies de actinomicetos como *S. coelicolor*, *S. avermitilis* no presenta propiedades agarolíticas (ver Figura 3.1).

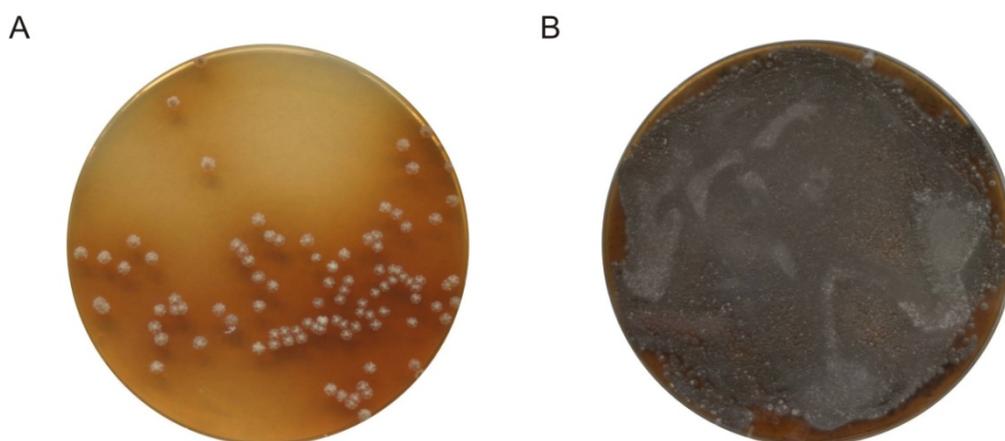


Figura 3.1. Crecimiento de *S. avermitilis* en medio sólido. (A) medio TSA, donde se pueden observar colonias aisladas y la acumulación de un pigmento de color marrón alrededor de las mismas. (B) medio TBO, mostrando la esporulación del microorganismo.

Para el crecimiento rutinario en medio líquido, se estipuló el uso de TSB por la rapidez de crecimiento que demostró la cepa (en apenas 36h se obtiene un cultivo celular denso).

3.1.2. Producción de filipina

Uno de los principales objetivos de este trabajo es el estudio a nivel molecular de la regulación de la producción de filipina y por ello fue necesario optimizar una metodología para la extracción de filipina a partir de cultivos de *S. avermitilis* (ver apartado 2.14.3.1).

Se ensayaron diferentes medios de cultivo (como NBG, YEME, MEA y R5), registrándose niveles de producción por lo general muy bajos en todos. Aun así, en medio YEME fue donde se observó mayor producción (50-150 ng/ml, frente a los 30-60 ng/ml en los otros medios).

Debido a que la baja producción imposibilitaba la detección de filipina directamente a partir de los caldos de los cultivos, se procedió a su extracción con solventes orgánicos. En un principio, las extracciones se realizaron con metanol al 100 % sin obtener resultados satisfactorios. A pesar de que se detectó la presencia de filipina mediante HPLC, los resultados eran poco repetitivos y el proceso demasiado laborioso para el rendimiento obtenido.

Así, se optó por una estrategia diferente utilizando acetato de etilo. Este solvente, al no ser miscible con soluciones acuosas, permite seleccionar sólo aquellos metabolitos solubles en solventes orgánicos, y además su rápida evaporación facilita enormemente la posterior concentración. Aunque para los bioensayos con *C. utilis* fue necesario concentrar las muestras hasta 300 veces, gracias a estas extracciones fue posible probar la actividad antifúngica de la filipina. Con una optimización del método de HPLC, basado en el método descrito para *S. natalensis* (Mendes *et al.* 2001) pero utilizando una columna con un poro más pequeño para mejorar la resolución y un gradiente al que se introdujeron pasos de lavado y equilibrado para mejorar la reproducibilidad entre muestras (apartado 2.14.3.2), se consiguió cuantificar la producción de filipina en muestras poco concentradas (40 veces concentradas) (Figura 3.2).

S. avermitilis, así como las especies *S. filipinensis* (Ammann *et al.* 1955, Whitfield *et al.* 1955) y *S. miharaensis* (Kim *et al.* 2012), está descrito como productor de filipina. En el caso de *S. avermitilis*, se ha identificado esta característica gracias a la secuenciación de su genoma (Omura *et al.* 2001, Ikeda *et al.* 2003), y es precisamente eso lo que llevó a elegir esta especie para realizar este trabajo: la disponibilidad del genoma completamente secuenciado y analizado. Sin embargo, al iniciar los estudios no fue posible encontrar ninguna publicación en la que se detallara el potencial de producción de esta cepa. Nuestros estudios

preliminares, en los que se probaron numerosos medios de cultivo, condiciones de fermentación y diferentes métodos de extracción, mostraron que los títulos de producción de filipina en esta cepa eran muy bajos, en torno a los 50-150 ng/ml en las mejores condiciones estudiadas. Además, se observaron resultados poco repetitivos, lo que dificultaba la comparación y visión global de los efectos de las mutaciones génicas.

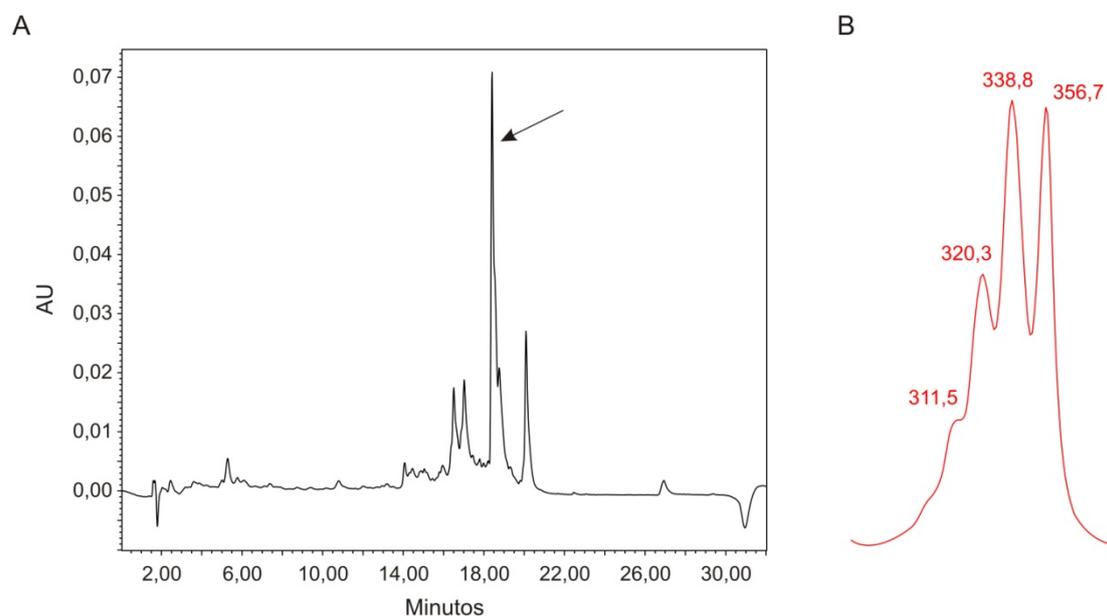


Figura 3.2. Producción de filipina en *S. avermitilis*. (A) análisis cromatográfico mediante HPLC de una muestra de la cepa silvestre crecida hasta las 48h en medio YEME (40 veces concentrada); la flecha indica el pico de filipina III, con tiempo de retención de 18,3 minutos. (B) espectro de absorción del pico de filipina III, con los máximos característicos en nm.

En algunas de las fermentaciones realizadas se observaron además situaciones de pérdida total de la capacidad de producción de filipina por la cepa silvestre. El género *Streptomyces* es conocido por su inestabilidad genética y esta característica podría explicar estos resultados. El cromosoma de *S. avermitilis*, en particular, es especialmente inestable y se han descrito diferentes casos de variabilidad fenotípica en la especie. Por ejemplo, la pérdida de la capacidad de producción de avermectina y de esporulación como resultado de pases sucesivos de un cultivo (Novák *et al.* 1993), o el estudio de la inestabilidad genética en *S. avermitilis* que demuestra que ésta se debe a reorganizaciones del cromosoma, con reemplazamientos en los extremos del mismo, deleciones y aparición de formas circulares espontáneas (Chen *et al.* 2010a). Esta característica inherente a la especie, y el hecho de que el *cluster* biosintético de la filipina (*pte*) esté localizado en la región lateral izquierda del cromosoma a sólo 487 kb del extremo (los extremos del cromosoma son conocidos por su

inestabilidad), hacen pensar que la variabilidad observada en la producción de filipina y la facilidad con la que ésta se puede perder son un resultado directo de la inestabilidad genética.

Igualmente significativo es el hecho de que, entre colonias con abundante formación de esporas de color marrón/gris, surjan ocasionalmente algunas colonias blancas con esporulación deficiente (Figura 3.1B). Este fenómeno se acentúa considerablemente cuando se realizan siembras sucesivas, observándose claramente dos morfologías distintas. Aunque no se trata de algo novedoso en *Streptomyces*, puesto que es habitual que existan ciertas diferencias entre cepas de la misma especie en laboratorios diferentes, como se ha descrito con la morfología de colonias azul/blancas de *S. coelicolor*, lo que sí resulta sorprendente es la facilidad y rapidez con que dichas alteraciones surgen en *S. avermitilis*.

La inestabilidad genética de *Streptomyces*, aunque es una característica que permite cierta ventaja evolutiva al género (Chen *et al.* 2002), también dificulta su estudio a nivel molecular. En el caso de este trabajo con *S. avermitilis*, constituye un importante problema para el uso de esta cepa en estudios comparativos de metabolismo secundario, puesto que el principal metabolito que permite reflejar los efectos moleculares en la biosíntesis de polienos, la filipina, es producido en poca cantidad y los resultados obtenidos son muy variables.

3.1.3. Manipulación genética

La manipulación genética de cualquier microorganismo requiere disponer de un sistema eficiente de introducción de DNA en la célula.

Se han obtenido resultados bastante satisfactorios utilizando la conjugación intergenérica con la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 (ver apartado 2.7.1), en un procedimiento similar al llevado a cabo en *S. natalensis*. La eficiencia de conjugación resultó ser elevada, obteniéndose valores similares a los observados en *S. natalensis* (Enríquez *et al.* 2006).

3.2. Análisis funcional de los reguladores del *cluster* biosintético de la filipina: PteF

La secuenciación del genoma de *S. avermitilis* puso en evidencia la presencia de un *cluster* biosintético responsable de la producción de un pentaeno, la filipina (Omura *et al.*

2001, Ikeda *et al.* 2003). De entre los genes de la agrupación *pte* (Figura 1.21), se han identificado dos reguladores específicos de ruta: *pteF* y *pteR*.

3.2.1. Análisis de la secuencia

El gen *pteF* (SAV409) tiene un total de 699 nucleótidos y codifica un regulador transcripcional de tipo PAS-LuxR con 232 aa y una masa molecular aproximada de 25 kDa. Como todos los reguladores de este tipo, PteF combina un dominio sensor PAS N-terminal con un dominio de unión al DNA, con motivo HTH de tipo LuxR, en el extremo C-terminal.

La comparación de la secuencia aminoacídica de PteF con la de otras proteínas ortólogas estudiadas pone de manifiesto el alto nivel de conservación que existe entre los reguladores PAS-LuxR. Así, se observa un elevado grado de identidad entre PteF y estos reguladores, especialmente en la región correspondiente a su dominio de unión al DNA (Figura 3.3). Se comparó PteF con los reguladores PimM de *S. natalensis* (Antón *et al.* 2007), AmphRIV de *S. nodosus* (Carmody *et al.* 2004), FscNRI de *S. griseus* (Chen *et al.* 2003), NysRIV de *S. noursei* (Sekurova *et al.* 2004), SalRII de *S. albus* (Knirschová *et al.* 2007) y ScnRI de *S. chattanoogensis* (Du *et al.* 2009).

Cabe destacar que de acuerdo con la secuencia depositada en la base de datos, PteF, como algunos de los otros genes utilizados en la comparación, es mayor en tamaño que el regulador modelo para los PAS-LuxR, PimM. Según los datos del análisis del genoma secuenciado de *S. avermitilis*, PteF tiene más 40 aa más que PimM (Ikeda *et al.* 2003). Sin embargo, al analizar detalladamente la secuencia de PteF y compararla con PimM, se identificó otro codón ATG en el mismo marco de lectura que podría constituir el codón de inicio de la traducción. De serlo, las dos proteínas (PteF y PimM) tendrían exactamente el mismo tamaño, 192 aa. Se trata de una hipótesis sobre la que ya se había especulado en nuestro grupo (Antón *et al.* 2007), y que ha quedado demostrada en este trabajo (ver más abajo; (ver más abajo; Vicente *et al.* 2014).

Resulta sumamente interesante que todos estos reguladores se encuentren localizados en *clusters* biosintéticos de polienos. Los reguladores PAS-LuxR son además exclusivos de estos *clusters* biosintéticos (Santos-Aberturas *et al.* 2011a). La alta similitud observada entre otros reguladores de tipo PAS-LuxR y PteF, junto con la disponibilidad del genoma completo de *S. avermitilis*, convierte a PteF en un objeto de estudio muy interesante

para la comprensión y comparación de los mecanismos moleculares que regulan la biosíntesis de macrólidos polienos.

PteF	-----MTPLLTAFTAHRPPNLF FRPSFLTGGTLLLI PAPATPG-LCM	(1)
PimM	-----M	(1)
AmphRIV	MPQVINSGREKGSVASTPTDREKSRARDLVLEDGKAPGTELLGRSSSISL	(1)
FscRI	-----MDPAPAADPAGSPERA AVLADG -----FDRAGAYV	(1)
ScnRII	-----M	(1)
NysRIV	-----MISAQTAPAGESVGPGLM	(1)
SalRIII	-----MISDHHTGESAAKRRAAASRRQSAETRPHPVAPRRAYT	(1)
PteF	ASLDKTLTIQQANQEFFRQFN GSSE DI CGRNFRD VVHPSVQQPLVRQFSN	(42)
PimM	ASLDRTLTIQQANQEFFRQFN GSSE DI CGRNFRD VVHPSVQQPLVRQFSN	(2)
AmphRIV	ARLDQALTIQQASEGFFWFQFGSSAELCGRTFSDLVHPSVQQPLMRQFSG	(51)
FscRI	ACLDPSLTIQQVNQEFERRFGGSSSEL CGSRFCDLVHPSVQQPLMHQ FAR	(31)
ScnRII	ASLDKTLTIQQANQEFFRQFN GSSE DL CGRNFRD VVHPSVQQPLVRQFSN	(2)
NysRIV	ASLD RD LTIKHANQEFFRRFDD SAGDV CGRSFRDLMHPSVQQPLMRQFSR	(19)
SalRIII	AHMDPAMHILAAEPDFARQFGRTSAET CGRSLYDLLHPS SPTVLGRHFSR	(39)
PteF	LLEGKNHRE V TPVIAVGPGEESAF TVPLTAVAVRGG -LPD TTAILVM MPT	(92)
PimM	LLEGKHQRE V TPVIAVGPGEESAF TVPLTAVAVRGG -LPD TTAILVM MPS	(52)
AmphRIV	LIEGRRDRFATDVIAVG-RDDA FTVPLTALMVRGG -LPDESSILVMMPG	(101)
FscRI	MLDGKRHRFATEVIAVD-QERTASTLPLNALAVRGGRTPDVAAILVMNA	(81)
ScnRII	LLEGKHQRE V TPVIAVGPGEESAF TVPLTAVAVRGG -LPD TTAILVM MPS	(52)
NysRIV	LIEGKRHRFASHVAVG-AQDA AFAGTLTASAV TGK-TPDIAGILVLMDS	(69)
SalRIII	LSEGR CNRFA ERVVGLG-GAGRAFSGELTGI AVQNT -SGNLVGI VQVR P	(89)
PteF	AGDAEQTRVVP---KRKKILSTMDARILEGIAAGVSTVPLAASLYLSRQG	(141)
PimM	AGDAEGTRVVT---KRKKILSAMDARILEGIAAGVSTVPLAARLYLSRQG	(101)
AmphRIV	AEAESADSEVVSG-RSKKLLSPIDARILEGIAAGVSTVPLAARLYLSRQG	(149)
FscRI	AEEEAGDADVMAP---RKKLLSEIDARILEGIAAGVSTIPLASRLYLSRQG	(130)
ScnRII	AGDAEGAHVVT---KRKKILSAMDARILEGIAAGVSTVPLAARLYLSRQG	(101)
NysRIV	SGADAADAGVVT-SQKKFLTEIDARILEGIAAGVSTIPLASRLYLSRQG	(117)
SalRIII	DEAAPAAEDA AVKPK ELLSSLD AQV LEGV ASG ASTVQLAARLYLSRQG	(137)
PteF	VEYHVTCLLRKLVNRAALVSRA YSLGVFKVGTWPPEV VDDFVK--	(188)
PimM	VEYHVTCLLRKLVNRAALVSRA YSLGVFKVGTWPPEV VDDFVK--	(148)
AmphRIV	IEYHVTCLLRKLVNRAALVSRA YSLGVFKVGTWPPEV VDDFVK--	(198)
FscRI	VEYHVTGLLRKLVNRAALVSRA YSLGVFKVGTWPPEV VDDFVK--	(178)
ScnRII	VEYHVTCLLRKLVNRAALVSRA YSLGVFKVGTWPPEV VDDFVK--	(148)
NysRIV	VEYHVTGLLRKLVNRAALVSRA YSLGVFKVGTWPPEV VDDFVK--	(166)
SalRIII	VEYHVGLMLRKLRA PNRAALVARAH SMGMLTVGQWPPRVLPEFIK--	(187)

Figura 3.3. Comparación de PteF con sus proteínas ortólogas. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de PteF con las de otros reguladores de los *clusters* biosintéticos de la pimarcina en *S. natalensis* (PimM), anfotericina en *S. nodosus* (NysRIV), candicidina en *S. griseus* (FscRI), pimarcina en *S. chattanoogensis*, nistatina en *S. noursei* (NysRIV) y salinomicina en *S. albus* (SalRIII).

3.2.2. Construcción del mutante $\Delta pteF$

La delección del gen *pteF* es un paso crucial para el estudio funcional del mismo y se llevó a cabo utilizando la técnica REDIRECT[®] (Gust *et al.* 2003). Este sistema basado en la PCR se ha descrito inicialmente para *S. coelicolor* pero se puede aplicar a virtualmente a cualquier especie del género si se dispone de una genoteca de cósmidos (apartado 2.8).

De este modo, se empezó por reemplazar el gen *pteF* en el cósmido CL_240_D05 (que contiene la región izquierda la agrupación *pte* y fue facilitado por el Instituto Kitasato, Japón) por una casete de resistencia a apramicina acoplada a un origen de transferencia (*aac(3)IV-oriT*), amplificada mediante PCR a partir del plásmido pIJ773 (se obtiene un fragmento de 1,37 kB). Se utilizaron dos *primers* (59 y 58 nucleótidos), de manera que tras la delección sólo quedase el codón de paro: 5'-ccgcgcgagcggggcggggaggcccgatgccgctcaTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3' y 5'-gttcaacatctggcgataccgctggtcccagggccgatATTCCGGGGATCCGTCGACC-3' como “*pteF* fw” y “*pteF* rev”, respectivamente (la secuencia idéntica al segmento de DNA localizado corriente arriba del codón de inicio de *pteF* está en letras minúsculas y cursiva, y la secuencia idéntica al segmento corriente abajo del codón de paro está en letras minúsculas y subrayada; las letras mayúsculas coinciden con cada uno de los extremos de la casete).

El fragmento así obtenido fue introducido en la cepa *E. coli* BW25113/pIJ790/CL_240_D05 mediante electroporación. Se utilizaron *primers* externos al gen *pteF* para identificar tanto las colonias positivas obtenidas en el paso de la introducción del cósmido en la cepa *E. coli* BW2513/pIJ790, como para confirmar eventos de doble recombinación y la sustitución de *pteF* por la casete. Dichas reacciones de PCR se realizaron con DNA cosmídico extraído de las colonias obtenidas, usando los *primers* “*pteF* 2.1 fw” y “*pteF* 2.1 rev” (Anexo I), de tal modo que con cósmidos nativos se observó una banda de aproximadamente 1,1 kb, mientras que con cósmidos en los que el reemplazamiento fue exitoso se observó una banda de aproximadamente 1,8 kb. Se obtuvieron varios clones positivos en este paso.

El cósmido mutado CL_240_D05:: Δ *pteF* fue posteriormente purificado y transformado en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002. Esta cepa, característicamente no metiladora, permite evitar los potentes sistemas de restricción que reconocen específicamente secuencias en cadena simple o metiladas, actuando como cepa donadora en un proceso de conjugación intergenérica con la cepa silvestre de *S. avermitilis*. El plásmido pUZ8002, presente en la cepa donadora, contiene las funciones de transferencia (*tra*) necesarias para que el material genético pueda ser transferido de una célula a otra.

Tras la conjugación entre *E. coli* ET12567/pUZ8002/CL_240_D05:: Δ *pteF* y *S. avermitilis* se obtuvieron varios exconjugantes. Aquellos en los que se produjeron dos eventos de recombinación homóloga, con el reemplazamiento de la región del cósmido mutante que contiene la casete por la misma región nativa del cromosoma, fueron los

exconjugantes positivos. Dado que es más probable y fácil que ocurra una única recombinación, que generaría un cromosoma con el gen nativo y la casete de resistencia, este paso de comprobación fue especialmente importante. La genoteca de cósmidos a la que pertenece el CL_240_D05 está hecha a partir del cósmido pKU402, y éste sólo tiene como marcador de selección el gen de resistencia a la ampicilina (*bla*). Así, la selección de exconjugantes positivos no se pudo realizar mediante un patrón de resistencia/sensibilidad como sugiere el protocolo REDIRECT[®] con el cósmido SuperCos1 (Redenbach *et al.* 1996), que además del gen *bla* contiene un gen de resistencia a kanamicina. El problema reside en que todas las especies de *Streptomyces* son naturalmente resistentes a ampicilina. En consecuencia, la comprobación de los exconjugantes se llevó a cabo directamente mediante PCR y Southern blot (Figura 3.4).

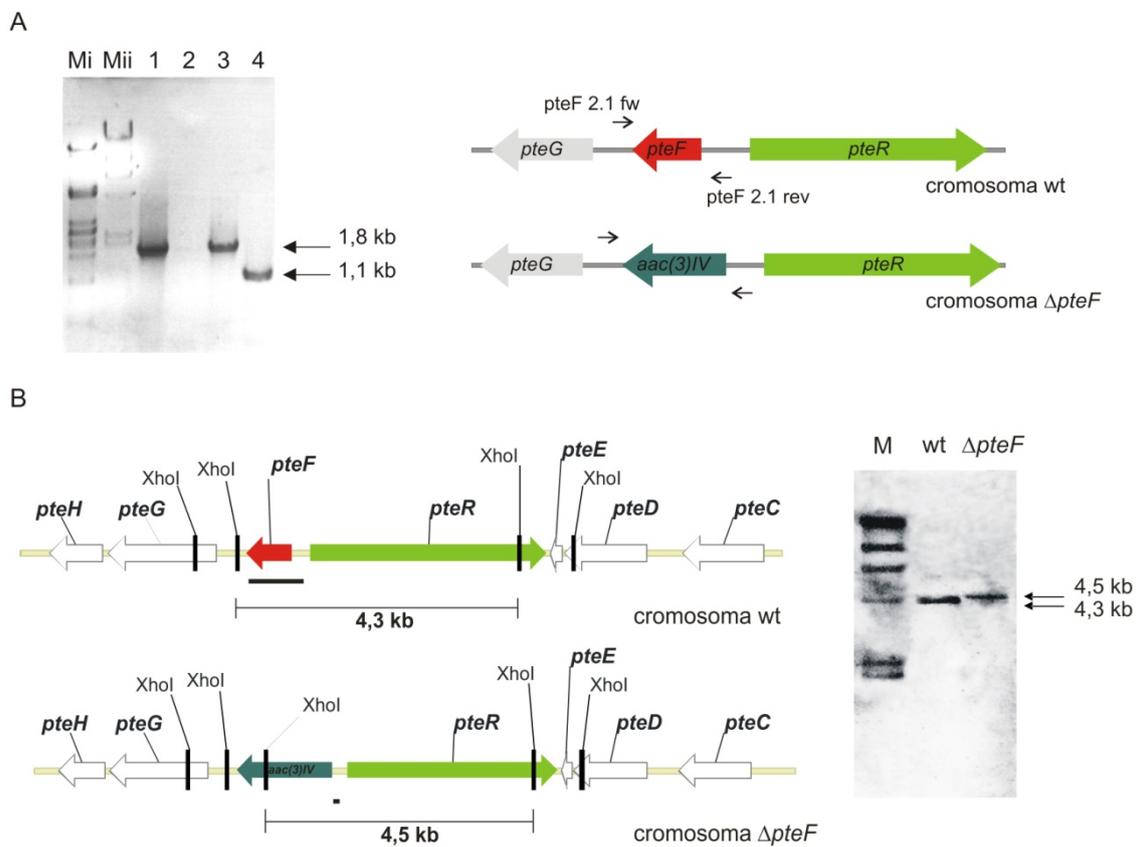


Figura 3.4. Comprobación del mutante $\Delta pteF$. (A) PCR con los *primers* externos y esquema de la posición relativa de los mismos: carril Mi, marcador peso molecular λ /PstI; Mii, λ /HindIII; carriles 1 a 3, DNA de los exconjugantes #1 a 3, respectivamente; carril 4, DNA cepa silvestre. (B) Mapa del cromosoma mutante y silvestre, e hibridación Southern blot con fragmentos XhoI.

Se analizaron tres exconjugantes seleccionados al azar, utilizando una vez más los *primers* “*pteF* 2.1 fw/rev”. En los exconjugantes #1 y #3 se obtuvo una banda de 1,8 kb,

mientras que en el control la banda fue de 1,1 kb, confirmando así que ambos tenían el gen deletado. El exconjugante #2, por el contrario, resultó ser negativo (Figura 3.4A).

Posteriormente, se confirmó la delección del gen *pteF* del genoma de *S. avermitilis* en el exconjugante #1 seleccionado al azar, esta vez mediante Southern blot (Figura 3.4B). Se empleó una sonda de 1,1 kb obtenida mediante amplificación por PCR usando DNAg de la cepa silvestre y los *primers* “*pteF* 2.1 fw” y “*pteF* 2.1 rev”. La sonda, que incluye *pteF* completo y parte de su región promotora, se hibridó con fragmentos XhoI de DNAg de la cepa *S. avermitilis* y de la cepa *S. avermitilis* Δ *pteF*. La digestión con XhoI de esas muestras de DNAg originó una única banda de 4,3 kb capaz de hibridar con la sonda en la cepa silvestre mientras que en la cepa mutante, donde existe un sitio de corte en el casete de resistencia, se detectó una banda de 4,5 kb. Por consiguiente, el patrón de hibridación que se observó fue el esperado para una doble recombinación y confirmó la delección del gen *pteF*.

3.2.3. La delección de *pteF* resulta en la disminución de la producción de filipina

Para determinar si *pteF* ejerce una función reguladora sobre la biosíntesis de filipina, se analizó la producción de este metabolito en la cepa mutante Δ *pteF*. Se realizaron fermentaciones de hasta 72h junto con la cepa silvestre (control), empleando tres réplicas biológicas para cada condición (o cepa), y se monitorizó el crecimiento y la producción de filipina mediante HPLC (apartado 2.14). En un primer momento se fermentaron los mutantes 1 y 3 pero al comprobar que presentaban comportamientos idénticos, finalmente se seleccionó el #1.

Se observó una importante disminución en los niveles de producción de filipina III en la cepa mutada con respecto a la cepa silvestre (Figura 3.5). El mutante Δ *pteF* sólo produjo un 37 % aproximadamente del título registrado en la cepa silvestre a las 48h (51,1 ng/ml). Estos resultados sugieren que PteF es un regulador positivo de la biosíntesis de filipina.

A lo largo de las fermentaciones realizadas, se observó que ambas cepas tienen una tasa de crecimiento similar aunque en el caso del mutante es ligeramente más alta, alcanzándose la fase estacionaria cerca de las 40h y el máximo de producción de filipina III a las 48h. A partir de este punto, la producción empieza a disminuir, a la vez que la masa

celular del cultivo entra en declive, debido al agotamiento continuo de los nutrientes disponibles y a procesos de muerte celular (Figura 3.5).

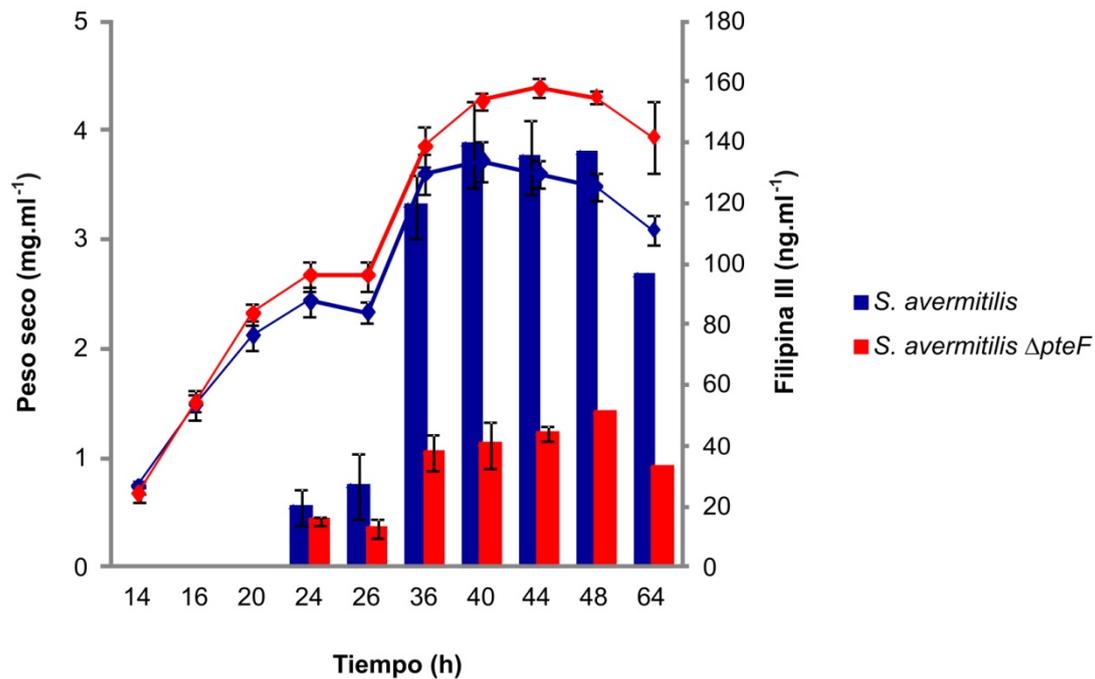


Figura 3.5. Efecto de la delección de *pteF* sobre la producción de filipina. Gráfica del crecimiento y producción volumétrica de filipina III de las cepas silvestre y mutante. Las barras verticales representan la desviación estándar entre tres réplicas biológicas. Se realizaron fermentaciones para los dos mutantes, obteniéndose resultados similares para ambos.

Cabe destacar que las cepas mutantes con las que se trabajó a lo largo de este trabajo, en especial las delecionadas en los reguladores del *cluster* de la filipina, mostraron ser bastante más estables en cuanto a la producción de filipina que la cepa silvestre. Esta observación apunta a que la hipótesis sobre la relación entre la inestabilidad genética y la variabilidad en la producción de filipina es muy probable. La presión selectiva ejercida en base a los marcadores de resistencia que todas las cepas obtenidas a partir de manipulación genética del cromosoma poseen, podría evitar que los eventos de delección de grandes regiones del cromosoma asociados a la inestabilidad genética, propia de los extremos del mismo y donde se encuentra la agrupación génica *pte*, se propaguen en la población. De este modo, el manejo habitual de las cepas mutantes en laboratorio, con sucesivas rondas de crecimiento, no llevaría a la pérdida de secciones del cromosoma naturalmente inestables, por lo menos en la región donde se localizan los marcadores de resistencia.

3.2.4. Complementación del mutante *S. avermitilis* $\Delta pteF$

La complementación de la deleción del gen *pteF* y sus efectos sobre la producción de filipina, fue un paso importante en el estudio funcional del regulador y permitió validar los resultados observados en la cepa mutante.

3.2.4.1. Obtención de la cepa complementada *S. avermitilis* $\Delta pteF$ /pSETneo::*pteF*

Para confirmar que la deleción de *pteF* es directamente responsable del efecto observado en la producción de filipina, se procedió a la complementación de la mutación. Para ello se introdujo el gen *pteF* junto con su región promotora en el plásmido pSET152neo, dando lugar a la construcción pSETneo::*pteF* (Figura 3.6).

Se utilizó el plásmido pSET152neo por tener un marcador de resistencia a la kanamicina además del de resistencia a apramicina (Vicente *et al.* 2009).

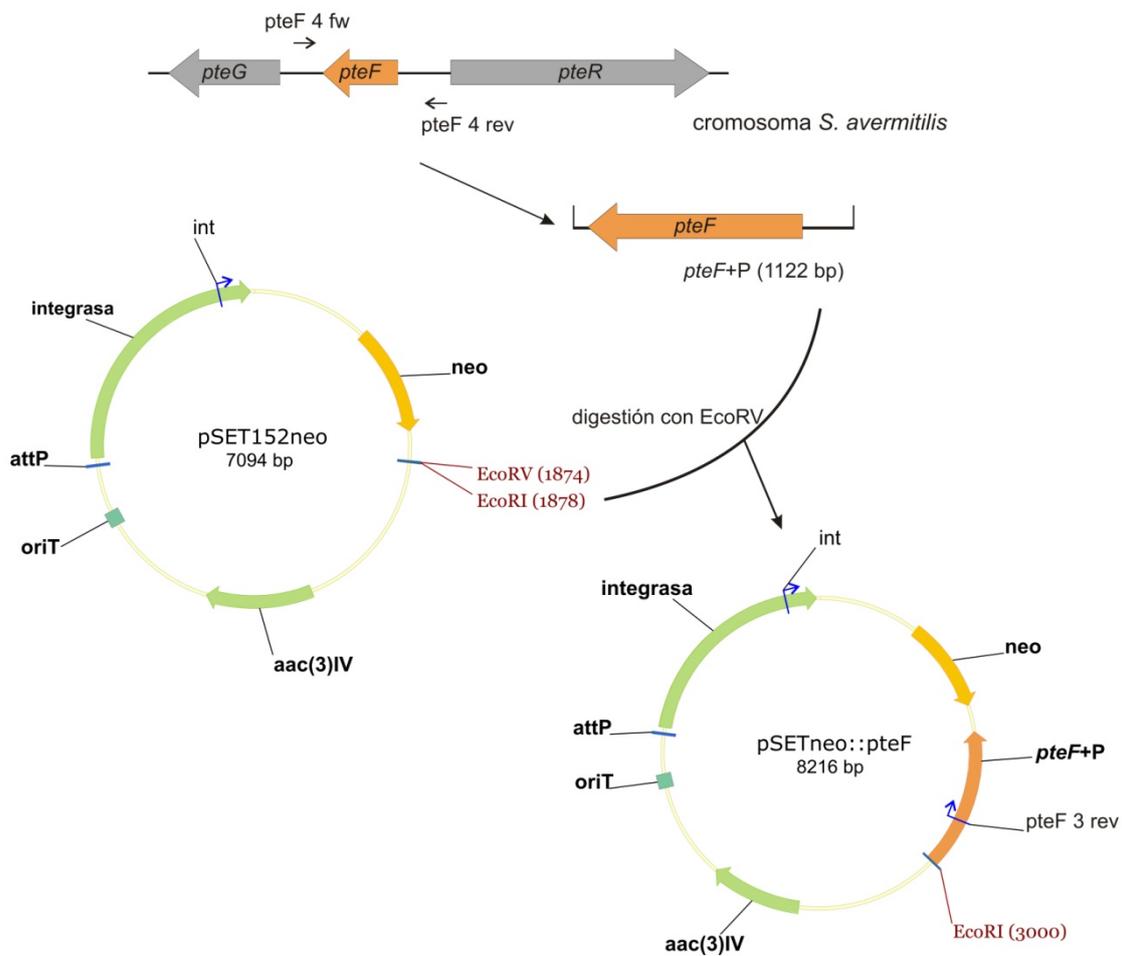


Figura 3.6. Esquema de los pasos seguidos para obtener la construcción pSETneo::*pteF*.

La clonación del gen *pteF* se realizó amplificando el gen mediante PCR utilizando los *primers* “pteF 4 fw” y pteF 4 rev” y DNAg de la cepa silvestre. El fragmento amplificado de 1122 bp incluye todo el gen *pteF*, su posible región promotora (270 bp) y el posible terminador (153 bp). Este fragmento se clonó en el plásmido previamente digerido con EcoRV para obtener la construcción pSETneo::*pteF* (Figura 3.6). Los transformantes positivos de *E. coli* se identificaron mediante digestión enzimática y se seleccionaron dos clones al azar para secuenciar la construcción y comprobar la ausencia de mutaciones en la secuencia. Al no encontrar errores en ninguna de las construcciones secuenciadas, se seleccionó al azar una para introducirla en la cepa *S. avermitilis* Δ *pteF* mediante conjugación.

Se obtuvieron varias colonias con el patrón de resistencia correcto, a apramicina y a kanamicina. De ellas, se comprobaron 3 clones mediante PCR con los *primers* “int” y “pteF 3 rev” y todas resultaron ser positivas. La cepa complementada se denominó *S. avermitilis* Δ *pteF*/pSETneo::*pteF*.

3.2.4.2. La complementación génica restaura la producción de filipina

Para estudiar el efecto de la complementación de la mutación sobre la producción de filipina, se construyó la cepa control *S. avermitilis*/pSETneo introduciendo el plásmido vacío en la cepa silvestre por conjugación. Los plásmidos con sistemas de integración basados en el fago ϕ C31, como es el caso del plásmido pSET152 del que deriva el plásmido utilizado, a veces pueden afectar negativamente a la producción de metabolitos secundarios producidos por diversas cepas de *Streptomyces* (Baltz 1998, Voeykova *et al.* 1998, Vicente *et al.* 2009). Muy probablemente esto sea debido a la presencia de sitios de integración secundarios presentes en el genoma de *Streptomyces* (sitios pseudo-*attB*) (Combes *et al.* 2002). La cepa control es una estrategia utilizada para descartar cualquier efecto sobre la producción asociada a la integración del plásmido.

Los resultados de las fermentaciones se pueden observar en la Figuras 3.7 y revelan que la cepa *S. avermitilis* Δ *pteF*/pSETneo::*pteF* fue capaz de restablecer la producción de filipina III a los niveles de la cepa control. Así, la complementación confirmó que el fenotipo mutante observado se debía a la delección del gen *pteF*, y no a posibles efectos polares.

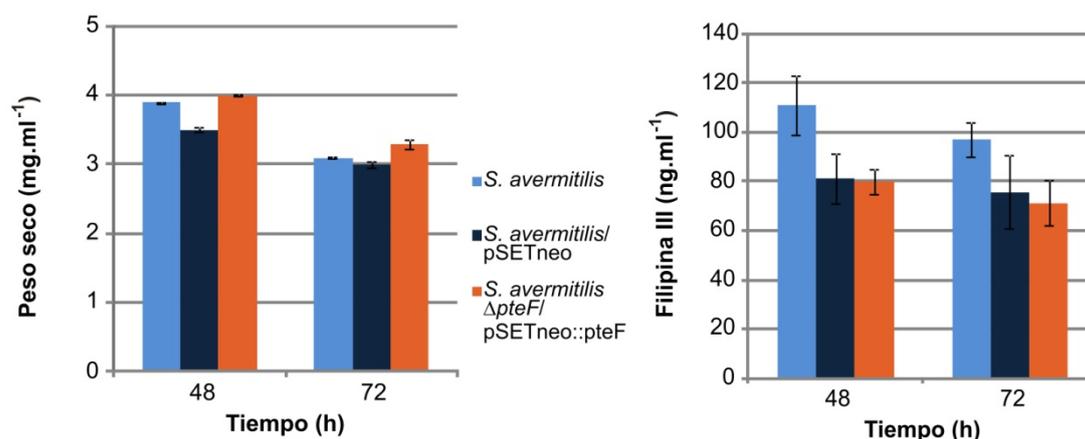


Figura 3.7. Efecto de la complementación de la mutación sobre la producción de filipina. Se comparan las cepas silvestre y silvestre con el plásmido vacío (controles) con la cepa complementada. Gráfica del crecimiento (izda.) y de la producción volumétrica de filipina III (dcha.). Las barras verticales representan la desviación estándar entre tres réplicas biológicas. Se probaron dos clones diferentes y los resultados obtenidos fueron similares para ambos.

Estos resultados demuestran el papel del regulador PteF como regulador positivo de la biosíntesis de filipina. Sin embargo, el efecto sobre la producción es diferente al observado con su homólogo PimM. Mientras que la mutación $\Delta pimM$ resulta en la abolición total de la producción de pimaricina en *S. natalensis* (Antón *et al.* 2007), en el mutante $\Delta pteF$ la producción baja considerablemente pero se sigue detectando la presencia de filipina III en los caldos de cultivo.

No está claro por qué el control ejercido por PteF sobre la biosíntesis de filipina es más relajado. Desde el punto de vista de la producción, también hay que tener en cuenta que los títulos observados en la cepa silvestre son especialmente bajos cuando son comparados con los de pimaricina en *S. natalensis* (ca. 1mg/ml en su punto máximo), por lo que en cepas de alta producción de filipina el efecto de la mutación esperado sería mayor. Sin embargo, es evidente que en el mutante $\Delta pteF$ existe un nivel basal de producción de filipina. Al tratarse PteF de un regulador transcripcional, resultó interesante estudiar los niveles de transcripción del *cluster* (ver apartado 3.5.3).

3.2.5. Efecto de la introducción de una copia adicional del gen *pteF*

Para aumentar la carga genética del gen *pteF* en la cepa silvestre se utilizó la misma construcción que en el caso de la complementación y se la introdujo en la cepa silvestre mediante conjugación para obtener la cepa *S. avermitilis/pSETneo::pteF*.

Se obtuvieron varios exconjugantes resistentes a apramicina y kanamicina, y en el caso de tres clones, la integración del vector en el cromosoma se comprobó mediante PCR utilizando los mismos *primers* que para la comprobación de la complementación, “*int*” y “*pteF* 3 rev” (ver Figura 3.6). Como control se utilizó DNAg de la cepa silvestre y los *primers* “*pteF* 3 fw/rev”, y “*pteF* 2.1 fw/rev”. El *primer* “*int*” es específico del plásmido, e hibrida con el gen que codifica la integrasa, de modo que va a permitir confirmar que la amplificación del gen *pteF* viene de la construcción pSETneo::*pteF* y no del gen nativo. Junto con “*pteF* 3 rev”, se obtuvo una banda de 2792 bp que confirma la presencia de la construcción. En las reacciones control, los *primers* internos amplifican una banda de 415 bp, mientras que los externos una banda de 1,1 kb (Figura 3.8). Los tres clones mostraron ser similares en cuanto la producción de filipina, por lo que se seleccionó uno al azar.

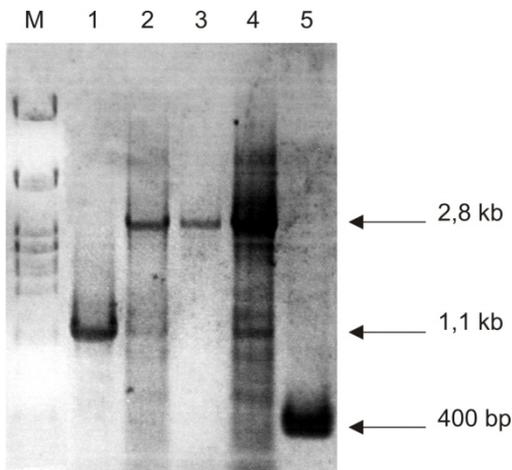


Figura 3.8. Comprobación de la cepa *S. avermitilis*/pSETneo::*pteF*. Reacción de PCR para confirmar la duplicación génica: carril M, marcador de peso molecular λ /PstI; carril 1, control con DNAg silvestre y *primers* “*pteF* 2.1 fw/rev”; carril 5, control con DNA genómico y *primers* “*pteF* 3 fw/rev”; carriles 2 a 5, clones #1 a 3, respectivamente, y los *primers* “*int*” y “*pteF* 3 rev”.

Una copia extra del gen *pteF* en *S. avermitilis* incrementa la producción de filipina

Con el fin de comparar los niveles de producción de la cepa control con los de la cepa suplementada se realizaron varias fermentaciones. Los resultados mostraron que la introducción de la segunda copia del gen *pteF* conduce a un aumento de la producción de filipina III (Figura 3.9). Este aumento es considerable y sorprende que el cambio genético sea suficiente para neutralizar el efecto negativo del plásmido, llegándose a superar la producción media de la cepa silvestre.

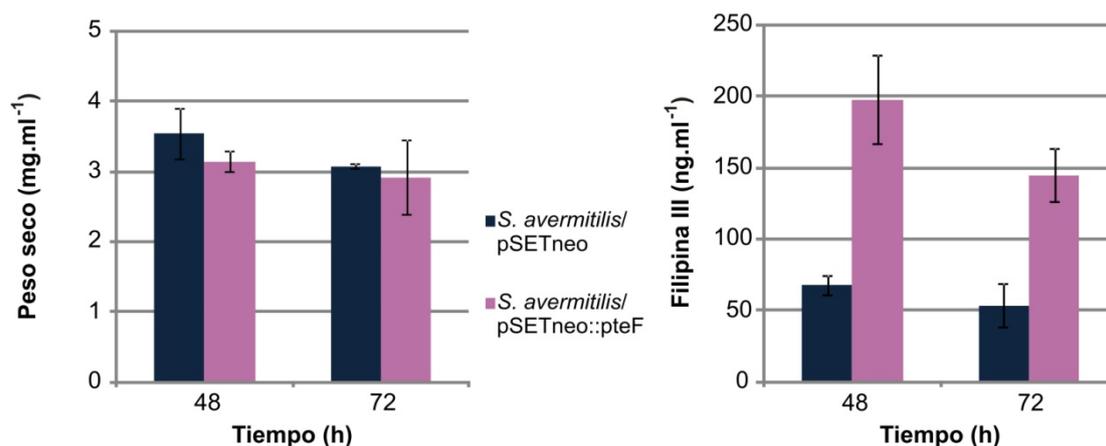


Figura 3.9. Efecto de la suplementación de la cepa silvestre con una copia de *pteF*. Gráfica del crecimiento (izda.) de las cepas control y suplementada, y de la producción volumétrica de filipina III (dcha.). Las barras verticales representan la desviación estándar obtenida a partir de tres réplicas biológicas.

En las fermentaciones realizadas se pudo observar que las dos cepas muestran un crecimiento similar y el punto máximo de producción se alcanza a las 48h. La cepa control con el plásmido pSETneo presentó una disminución de aproximadamente un 30 % en la producción de filipina III con respecto en la cepa silvestre a las 48h. Por otro lado, en la cepa suplementada *S. avermitilis*/pSETneo::pteF se observó un considerable aumento de la producción (aproximadamente 3 veces más que la cepa control). Cabe destacar igualmente, que la copia extra del gen *pteF* permitió títulos de producción mayores que los de la cepa silvestre, lográndose incluso a obtener casi un 50 % más de filipina.

Estos resultados coinciden con los observados previamente con *pimM* de *S. natalensis* (Antón *et al.* 2007) y con *scnR11* de *S. chattanoogaensis* (Du *et al.* 2009), donde una carga genética mayor de estos reguladores lleva al aumento de la producción de pimaricina. Una de las estrategias más intuitivas para aumentar la producción de metabolitos secundarios es la sobreexpresión de reguladores específicos de ruta positivos, y estos resultados confirman que los reguladores PAS-LuxR son una buena diana para alcanzarlo. Su expresión parece pues constituir un cuello de botella para la producción de polienos como aquí queda patente, así como se ha demostrado en trabajos anteriores obtenidos en *S. noursei* con *nysR1V* y la nistatina (Sekurova *et al.* 2004), y en *S. aureofuscus* con *aurj3M* y la aureofuscina (Wei *et al.* 2011), además de los arriba mencionados.

3.2.6. Efecto de la complementación heteróloga del mutante *S. avermitilis* Δ *pteF* con el gen *pimM*

3.2.6.1. Obtención de la construcción pSETneo::*pimM*

La construcción que se utilizó se hizo en el plásmido pSET152neo, insertando un fragmento que incluye el gen *pimM* y su región promotora en el sitio de corte EcoRV. Este fragmento de 1445 bp se amplificó con los *primers* “*pimM*+P directo” y “*pimM*+P reverso”, a partir de DNAg de la cepa silvestre de *S. natalensis*. (Figura 3.10).

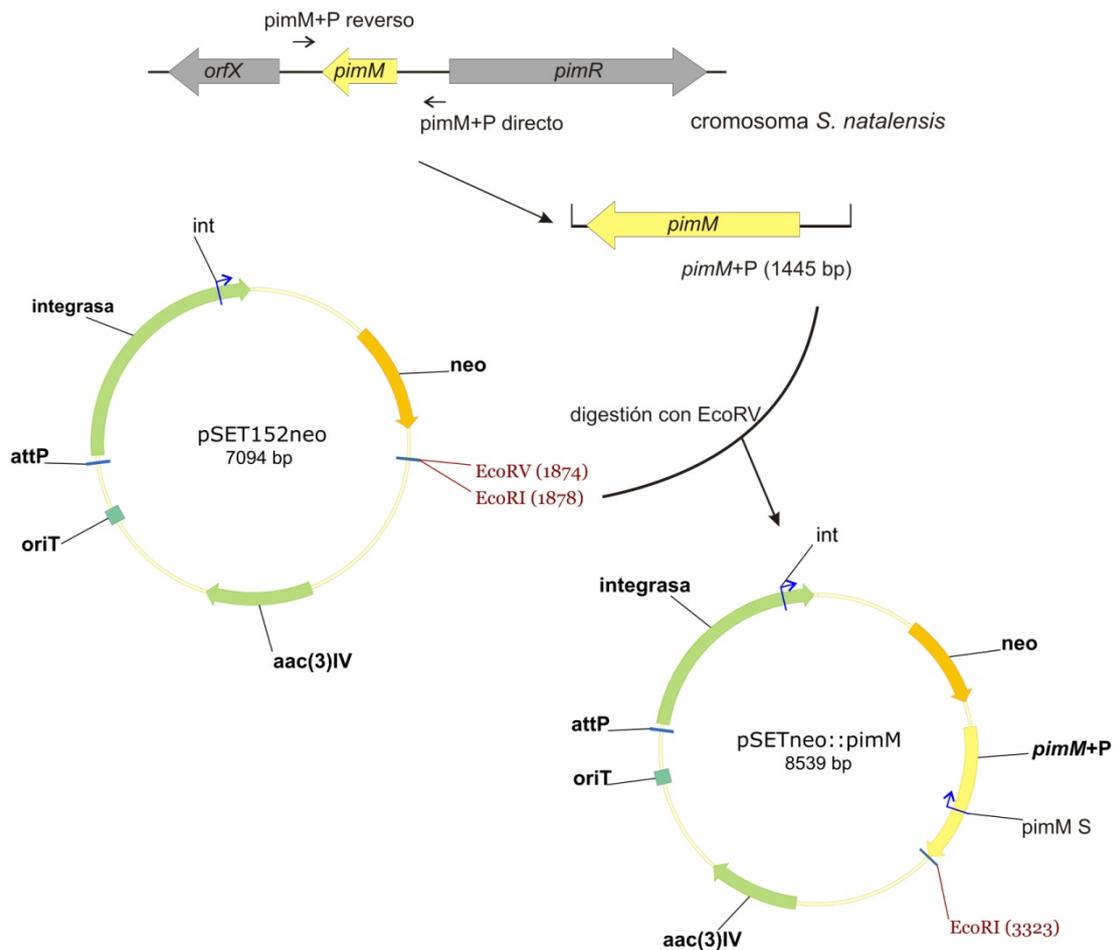


Figura 3.10. Esquema de la estrategia seguida para obtener la construcción pSETneo::*pimM*.

La construcción pSETneo::*pimM* se introdujo en la cepa mutante por conjugación, y los exconjugantes *S. avermitilis* Δ *pteF*/pSETneo::*pimM* se comprobaron mediante PCR. Se utilizaron los *primers* “*pimM* S” e “*int*”, que amplificaron una banda de 3,1 kb confirmándose así que la complementación heteróloga se había realizado con éxito. Como

control se emplearon los *primers* “*pteF* 2.1 fw/rev” (en la cepa silvestre amplificaron una banda de 1083 bp, mientras que en las cepas con el gen deletado amplificaron una banda de 1,8 kb) (Figura 3.11).

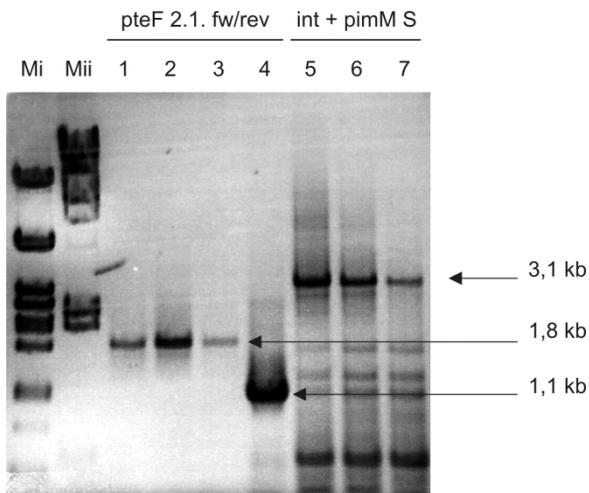


Figura 3.11. Comprobación de la cepa *S. avermitilis*/pSETneo::pimM. PCR de tres exconjugantes obtenidos a partir de la introducción de la construcción pSETneo::pimM en *S. avermitilis*: Mi, marcador de peso molecular λ /PstI; Mii, marcador λ /HindIII; carriles 1 a 4, reacciones control con los clones #1 a 3 en los carriles 1 a 3, respectivamente, y carril 4 con la cepa silvestre; carriles 5 a 7, comprobación de los #1 a 3, respectivamente.

3.2.6.2. La complementación heteróloga con PimM recupera la función de PteF

La introducción de una copia de *pimM* en el genoma de la cepa *S. avermitilis* Δ *pteF* restauró la producción de filipina (Figura 3.12). Las fermentaciones realizadas mostraron títulos de producción similares entre las cepas control, complementada y la cepa *S. avermitilis* Δ *pteF*/pSETneo::pimM.

Figura 3.12. Efecto de la complementación heteróloga de la mutación Δ *pteF*. Gráficas de crecimiento (izda.) y producción volumétrica de filipina III (dcha.). La desviación estándar entre tres réplicas biológicas se indica con las barras verticales.

El alto nivel de identidad entre los ortólogos PteF y PimM apunta a que estos reguladores comparten la misma función, y estos resultados lo corroboran. Trabajos anteriores ya habían demostrado la situación inversa, que *pteF* era capaz de complementar la cepa *S. natalensis* Δ *pimM*. Es más, se demostró que otros reguladores de la misma familia como *nysRIV* y *amphRIV* también eran capaces de sustituir a *pimM* (Santos-Aberturas *et al.* 2011a).

La complementación heteróloga del mutante Δ *pteF* con *pimM* aquí demostrada aporta una evidencia más de que existe una conservación funcional entre estos reguladores, de modo que estos son intercambiables, una importante característica de los reguladores

PAS-LuxR. Igualmente, parece que su capacidad de aumentar la producción de polienos cuando aumenta su expresión génica también está conservada entre los reguladores, como ha sido demostrado para la filipina, la anfotericina y la rimocidina cuando se introduce una copia de *pimM* en cada una de las especies productoras (Santos-Aberturas *et al.* 2011a). Así, el estudio del regulador PteF puede constituir una herramienta importante en la mejora de los títulos de producción de los polienos.

3.3. Análisis funcional de los reguladores del *cluster* biosintético de la filipina: PteR

3.3.1. Análisis de la secuencia

El gen *pteR* (SAV410) tiene un total de 3594 nucleótidos y codifica un regulador transcripcional de la familia SARP, con 1197 aa y una masa molecular aproximada de 130 kDa. Como es característico en reguladores de esta familia, PteR muestra en su región N-terminal un dominio de unión al DNA de tipo SARP y un dominio AAA en la región central.

Se conocen varios reguladores con una arquitectura similar a PteR, como el activador de la nikkomicina SanG de *S. ansochromogenes* (Liu *et al.* 2005), el regulador de la polioxina PolR de *S. cacaoi* (Li *et al.* 2009b), el regulador de la pimacirina ScnRI en *S. chattanoogensis* (Du *et al.* 2009) o el regulador positivo de la pimaricina y modelo de esta familia de reguladores, PimR de *S. natalensis* (Antón *et al.* 2004). La comparación de las secuencias de aminoácidos de estos reguladores muestra que existe un elevado grado de identidad entre ellos, particularmente entre los ortólogos PteR, PimR y ScnRI, con un 79,3 % de identidad. PteR tiene además un tamaño casi idéntico al de PimR, este último con 1198 aa.

3.3.2. Construcción del mutante Δ *pteR*

Para estudiar la función del gen *pteR* se llevó a cabo su delección del cromosoma de *S. avermitilis*. Como se indicó anteriormente para *pteF*, se utilizó la técnica REDIRECT[®] (Gust *et al.* 2003) (apartado 2.8).

Se utilizó de nuevo el cósmido CL_240_D05 para reemplazar el gen *pteR* por una casete de resistencia a apramicina acoplada a un origen de transferencia (*aac(3)IV-oriT*),

amplificada mediante PCR a partir del plásmido pIJ773 (un fragmento de 1,37 kB). Se utilizaron dos *primers* (59 y 58 nucleótidos) diseñados para el efecto, de manera que tras la delección sólo quedase el codón de paro: 5'-
ggtcagccatatccgcaagcagcatggggaccgttcagATTCCGGGGATCCGTCGACC -3' y 5'-
gtgggtccgcaactgacgaggcagagcacggatccatcaTGTAGGCTGGAGCTGCTTC -3'
denominados “pteR fw” y “pteR rev”, respectivamente (la secuencia idéntica al segmento de DNA localizado corriente arriba del codón de inicio de *pteR* está en letras minúsculas y en cursiva, y la secuencia idéntica al segmento corriente abajo del codón de paro está en letras minúsculas y subrayada; la secuencia 3' de cada *primer* y en mayúsculas coincide con cada uno de los extremos de la casete).

Este fragmento se utilizó para delecionar el gen *pteR* del cósmido, obteniéndose el cósmido mutado CL_240_D05:: Δ *pteR*, siguiendo el mismo procedimiento que para el mutante descrito anteriormente. Para comprobar la construcción, se utilizaron los *primers* externos al gen *pteR*, “pteR 2 fw/ rev” (Anexo I), de modo que en cósmidos que contuviesen el gen intacto se observó una banda de 3960 b, mientras que las reacciones con cósmidos en los que el reemplazamiento fue exitoso se observó una banda de 1,7 kb.

A continuación se conjugó la cepa silvestre *S. avermitilis* con la cepa no metiladora *E. coli* ET12567/pUZ8002/CL_240_D05:: Δ *pteR*. En el primer intento de conseguir la cepa mutante se obtuvo un único exconjugante, que se analizó mediante PCR y resultó ser positivo para la delección (Figura 3.13A). Utilizando los *primers* “pteR 2 fw/rev” se obtuvo una banda de 1,7 kb, mientras que en el control la banda fue de aproximadamente 4 kb, confirmándose así que el cromosoma tenía el gen delecionado.

Posteriormente, se realizó un Southern blot para confirmar la mutación (Figura 3.13B). Se empleó una sonda de 3,6 kb obtenida mediante amplificación por PCR usando DNAg de la cepa silvestre y los *primers* “pteF 3 fw” y “pteR 3 rev”, que incluye la región intergénica pteF-pteR y parte de la secuencia 5' de cada gen. Los DNAg utilizados en la hibridación se digirieron con XhoI. En la cepa silvestre se observó una única banda de 4,3 kb, mientras que en la cepa mutante, donde existe un sitio de corte en el casete de resistencia, se detectó una banda de 2,2 kb. Así, estos resultados confirmaron la delección del gen *pteR*.

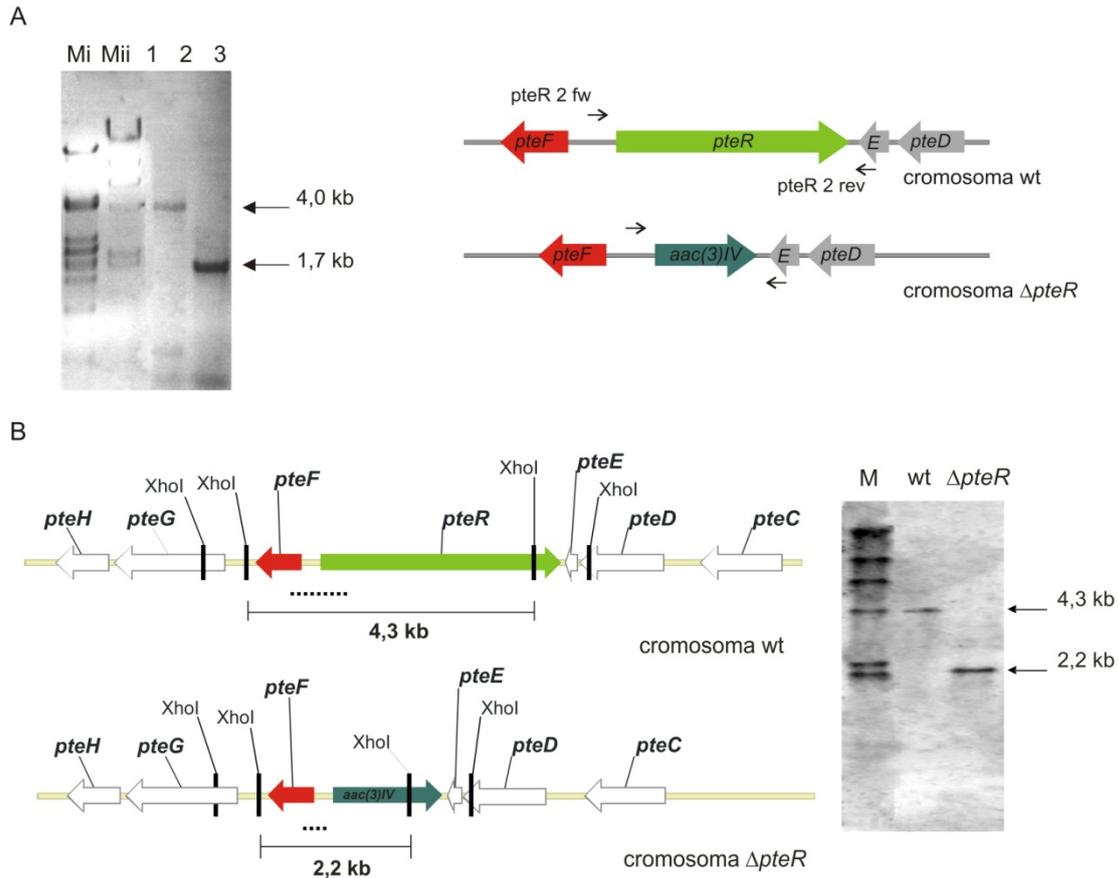


Figura 3.13. Comprobación del mutante $\Delta pteR$. (A) PCR con los *primers* externos y esquema de la posición relativa de los mismos: carril Mi, marcador peso molecular λ /PstI; Mii, marcador λ /HindIII; carril 1, DNA del clon #1; carril 2, DNA de la cepa silvestre. (B) Mapa del cromosoma mutante y silvestre, e hibridación Southern con fragmentos XhoI.

3.3.3. La delección de *pteR* afecta a la producción de filipina

Para determinar si la función de *pteR* está relacionada con la biosíntesis de filipina, se analizaron los caldos de fermentación de la cepa mutante $\Delta pteR$ para la presencia de filipina III. Las fermentaciones fueron de 72h y se compararon las cepas mutante y silvestre (control), empleando tres réplicas biológicas para cada condición. A lo largo de la fermentación se monitorizó, además de la filipina III mediante HPLC, el crecimiento de ambas cepas (apartado 2.14).

La cepa mutante mostró una disminución de la producción de filipina III de un 54 % (63,4 ng/ml) cuando se comparó con la cepa silvestre a las 48h de crecimiento (Figura 3.14). Estos resultados apuntan a que PteR es un regulador positivo de la biosíntesis de filipina.

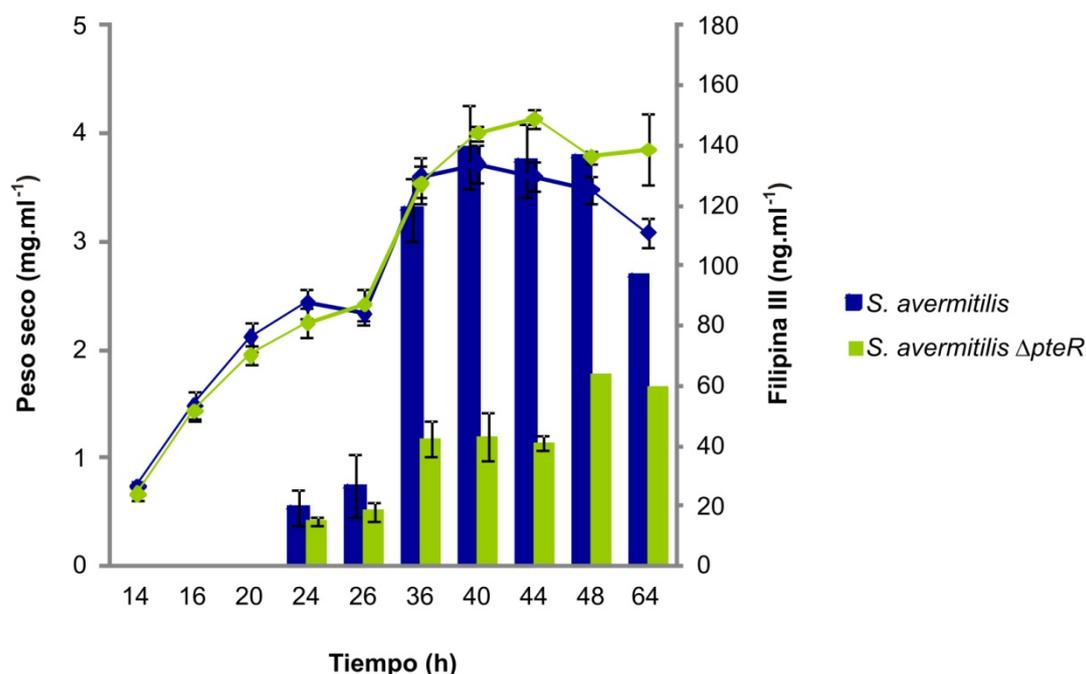


Figura 3.14. Efecto de la delección de *pteR* sobre la producción de filipina. Gráfica del crecimiento y producción volumétrica de filipina III de las cepas silvestre y mutante. La desviación estándar entre tres réplicas biológicas está representada por las barras verticales.

En todas las fermentaciones realizadas, ambas cepas mostraron una tasa de crecimiento idéntica, alcanzándose la fase estacionaria cerca de las 40h y el máximo de producción de filipina III a las 48h. De ahí en adelante, los niveles de producción disminuyeron y el cultivo perdió masa celular (Figura 3.14).

3.3.4. Complementación del mutante *S. avermitilis* Δ*pteR*

3.3.4.1. Obtención de la construcción pSETneo::pteR

Una vez analizado el mutante Δ*pteR*, se procedió a la complementación de la mutación para confirmar que el fenotipo observado se debía a la delección del regulador y no a un efecto polar. Para ello se clonó un fragmento de DNA que incluía el gen *pteR* y su posible región promotora en el plásmido pSET152neo, obteniéndose la construcción pSETneo::pteR (Figura 3.15).

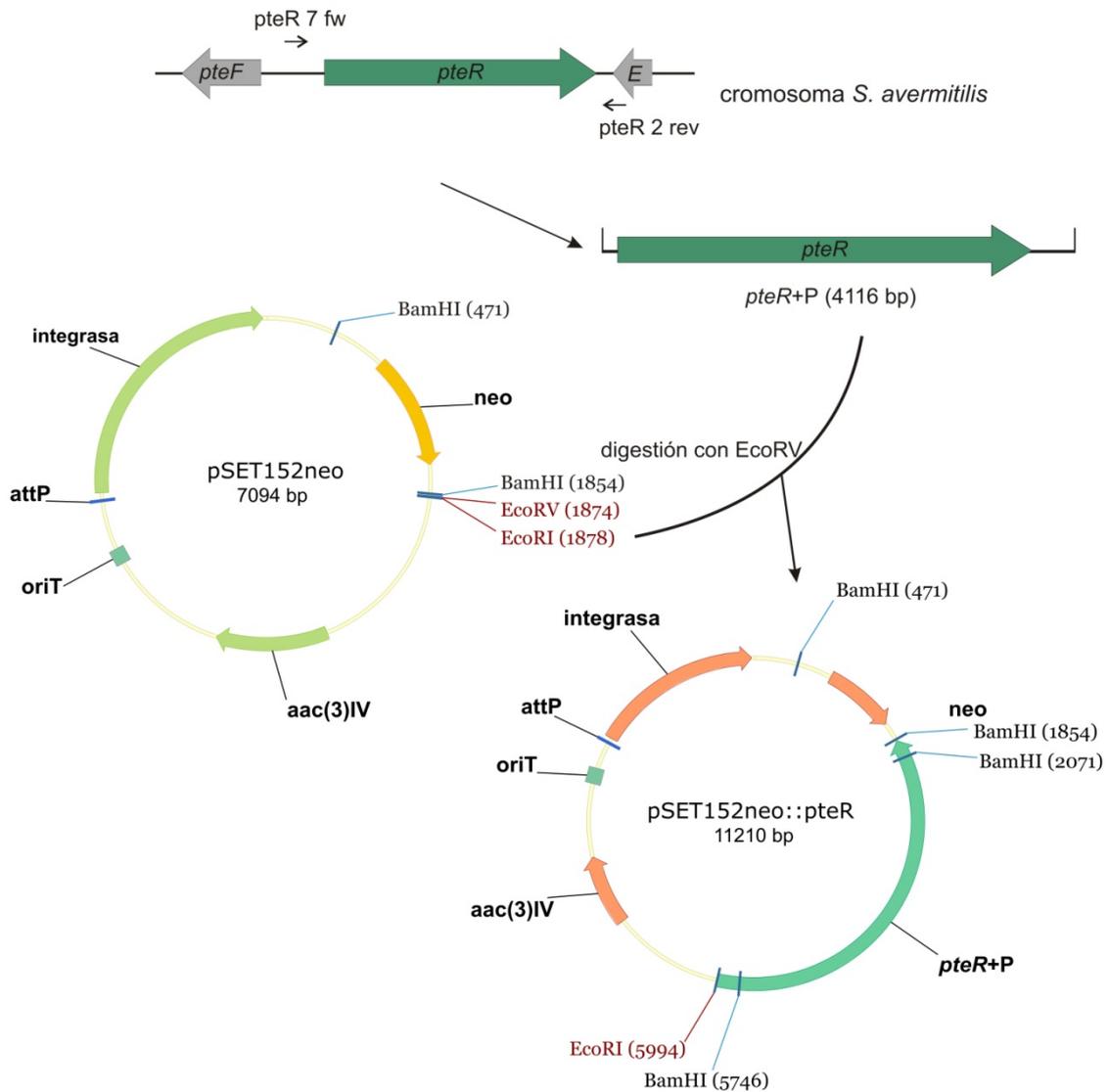


Figura 3.15. Esquema de la estrategia seguida para conseguir la construcción pSETneo::pteR.

Para obtener el fragmento de interés se utilizaron los *primers* “*pteR 7 fw*” y “*pteR 2 rev*” y se realizó una PCR a partir de DNAG de la cepa silvestre. El fragmento amplificado tenía 4,1 kb, incluyendo una región promotora de 276 bp y un posible terminador en una región de 246 bp. Se utilizó el plásmido previamente digerido con *EcoRV* para clonar el fragmento y obtener la construcción pSETneo::pteR. Los transformantes positivos de *E. coli* se identificaron por patrón de restricción. Para la digestión con *BamHI* del control (plásmido) se esperaban dos bandas de 5,7 y 1,4 kb, mientras que los clones positivos tendrían cuatro bandas de 5,9 kb, 3,7 kb, 1,4 kb, 217 bp (los tamaños de los fragmentos dependían de la orientación del inserto pero éstos son los que corresponden al clon seleccionado al final). Con *EcoRI*, que sólo tiene un sitio de corte en el plásmido, las

bandas esperadas fueron de 7,1 kb en el control y 11,2 kb en la construcción positiva. Como se puede observar en la Figura 3.16, se analizaron varios clones y dos de ellos resultaron ser positivos. A continuación, se comprobó mediante secuenciación de esos dos clones la ausencia de mutaciones en la secuencia del gen clonado. Al no encontrar errores, se seleccionó una construcción al azar para introducirla en la cepa *S. avermitilis* Δ pteR mediante conjugación.

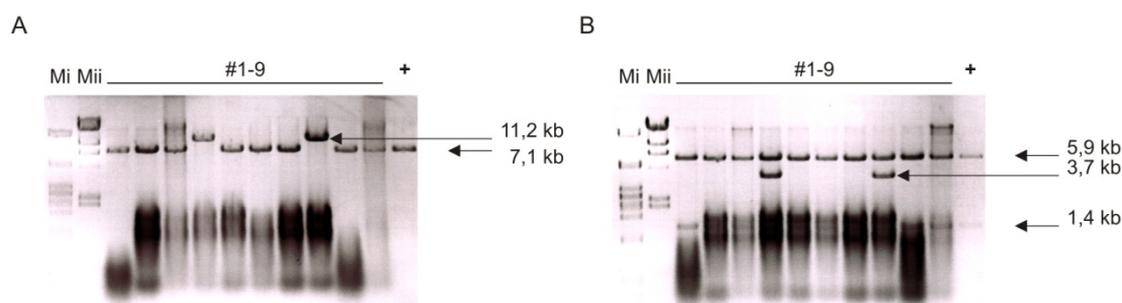


Figura 3.16. Comprobación de la construcción pSETneo::pteR. Digestiones de DNA plasmídico de diferentes clones #1-9 con endonucleasas (A) EcoRI y (B) BamHI. Los carriles Mi y Mii contienen marcadores de peso molecular λ /PstI y λ /HindII, respectivamente; + representa el control (pSET152neo). Se indican con flechas las bandas utilizadas para identificar la construcción y sus respectivos tamaños. La visualización de bandas de menor tamaño está dificultada por la presencia de RNA, como suele ser habitual en este tipo de muestras con un grado de pureza bajo. Los clones #4 y #8 se identificaron como positivos para la construcción.

Tras la conjugación, todos los exconjugantes obtenidos resistentes a apramicina y kanamicina, se analizaron tres con reacciones de PCR utilizando los *primers* externos al gen “pteR 2 fw/rev” para confirmar que poseían la construcción integrada en el cromosoma. En el control (cepa silvestre) la reacción permitió amplificar una banda de 4 kb, mientras que en la cepa complementada *S. avermitilis* Δ pteR/pSETneo::pteR se observaron dos bandas, una de 4 kb amplificada a partir del gen nativo y otra de 1,7 kb a partir de la casete de apramicina, confirmándose así que el genotipo de todos los clones era el deseado.

3.3.4.2. La complementación génica restaura la producción de filipina

Los resultados de las fermentaciones de la cepa complementada y la cepa control con el plásmido mostraron una recuperación casi total de los niveles de producción de filipina III en la cepa complementada *S. avermitilis* Δ pteR/pSETneo::pteR (Figura 3.17), confirmando así que PteR era un regulador positivo de la biosíntesis de filipina.

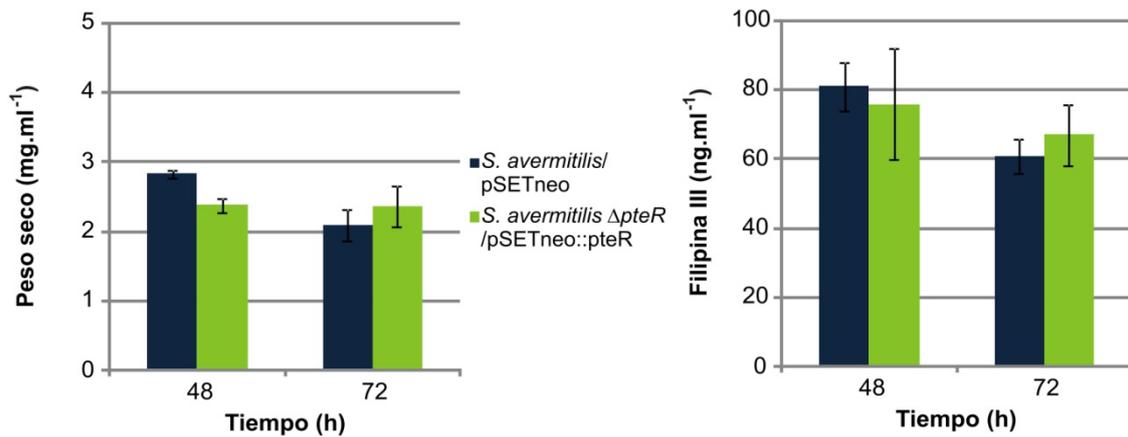


Figura 3.17. Efecto de la complementación de la mutación sobre la producción de filipina. Comparación de las cepas control y complementada, con gráficas de crecimiento (izda.) y producción volumétrica de filipina III (dcha.). Las barras verticales representan la desviación estándar entre tres réplicas biológicas.

Ambos mutantes $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$ tiene afectada la producción de filipina, produciendo títulos inferiores a los observados en la cepa silvestre (Figuras 3.18 y 3.19). Esto, conjuntamente con los resultados de las complementaciones, confirma que los reguladores situados en el *cluster pte*, PteF y PteR, son reguladores positivos de la biosíntesis de filipina.

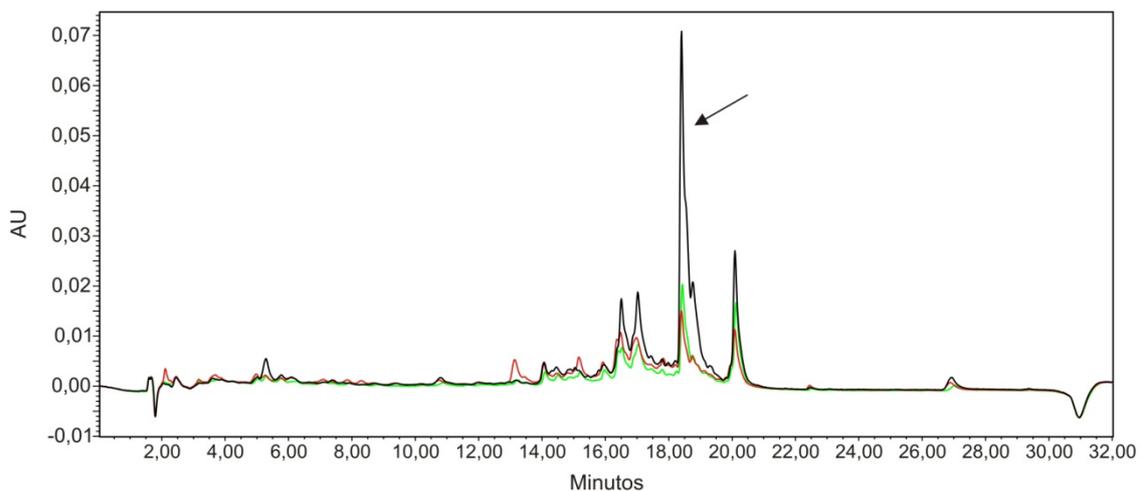


Figura 3.18. Comparación de la producción de filipina de la cepa silvestre con las cepas mutantes. Cromatogramas a 339 nm del análisis por HPLC de extractos de los caldos de cultivo de la cepa silvestre (negro), la cepa $\Delta pteF$ (rojo) y la cepa $\Delta pteR$ (verde). El pico correspondiente a la filipina III se indica con una flecha.



Figura 3.19. Bioensayo frente a *C. utilis*. Se utilizaron extractos 300 veces concentrados, obtenidos a partir de muestras de fermentaciones de las tres cepas con 48h de crecimiento.

De nuevo, estos resultados no coinciden completamente con el comportamiento del regulador modelo homólogo a PteR, PimR de *S. natalensis*. Al contrario de lo que sucede en *S. natalensis* (Antón *et al.* 2004), la inactivación del regulador no bloqueó por completo la producción de filipina. A pesar de su alto grado de identidad, está claro que existen diferencias entre el modo de acción de estos reguladores. No se trata, sin embargo, de algo novedoso que dos reguladores tan conservados en dos especies diferentes tengan funciones diferentes. Véase el caso de AfsR, un regulador presente en *S. coelicolor* y *S. griseus* con un 77, 4 % de identidad, pero que en la primera especie está involucrado en el metabolismo secundario, mientras que en la segunda es necesario para la diferenciación morfológica (Umeyama *et al.* 1999).

3.4. Efecto de la mutación $\Delta pteF$ sobre la diferenciación morfológica

Durante las fermentaciones realizadas en medio líquido, las cepas mutantes $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$ mostraron un crecimiento similar al de la cepa silvestre. No obstante, nos propusimos estudiar si ocurría lo mismo en medio sólido. De este modo, se diseñó una serie de experimentos para analizar su crecimiento.

Se probaron diferentes medios de cultivo, todos ellos en versión sólida: medio mínimo (MM), TBO, TSA y YEME. En las siembras se utilizaron suspensiones de esporas cuya concentración de esporas viables (o cfu) se determinó previamente a realizar cada uno de los ensayos como se ha descrito en el apartado 2.1.2.3. Para el **análisis morfológico** de las colonias, se sembraron 100 cfu/placa y se utilizaron tres réplicas técnicas por cada medio probado. En esta prueba se monitorizó el desarrollo del crecimiento a los 5, 7 y 10

días. La evaluación de la **producción de esporas** de cada cepa se llevó a cabo para los medios MM; TBO y YEME. Se sembraron $2,5 \times 10^6$ esporas viables por placa, y se realizaron tres réplicas técnicas para cada medio de cultivo. Se dejaron crecer dichas placas durante 7 y 10 días, y se determinó el número de esporas viables producidas en cada uno de esos tiempos para cada una de las tres placas de cada medio. Para ello, se recogieron las esporas de cada placa (apartado 2.1.2.2) y la concentración de esporas viables de cada una de las suspensiones, por cm^2 de superficie de placa, se determinó en tres ensayos independientes. En ambos tipos de experimento, los resultados obtenidos derivan del análisis de al menos tres ensayos independientes.

La mutación ΔpteF afecta la esporulación

Los primeros ensayos realizados fueron los de análisis morfológico. Éstos demostraron que, mientras el mutante ΔpteR era idéntico en aspecto a la cepa silvestre, el mutante ΔpteF presentaba alteraciones en la morfología de sus colonias (Figura 3.20).

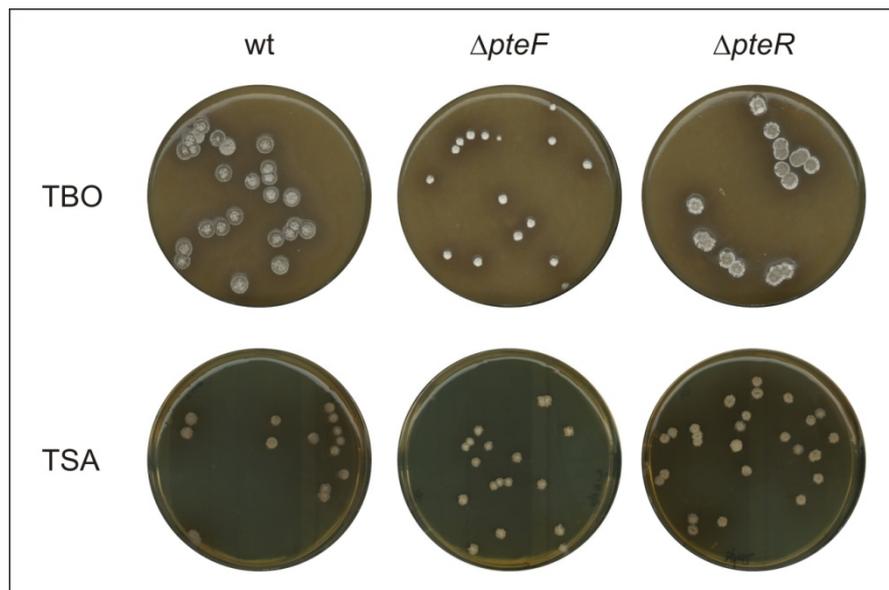


Figura 3.20. Estudio del efecto de las mutaciones en la morfología de las colonias. Se compara el crecimiento en placa de las dos cepas mutantes con la cepa silvestre, en TBO (medio de esporulación) y TSA (medio de crecimiento rápido) después de 5 días de incubación a 30 °C. Solamente la mutación ΔpteF parece afectar a la morfología, y además las alteraciones sólo se observan en YEME, TBO y MM.

Pese a ello, estos cambios sólo se observaron en algunos de los medios probados, concretamente en los medios MM, TBO y YEME. Particularmente en TBO y a los 5 días, un medio específico de esporulación de *Streptomyces*, las colonias mutantes eran visiblemente

blancas, un aspecto característico del micelio aéreo, mientras que las colonias silvestres eran grises lo que indicaba la presencia de esporas. Además, en todos los medios las diferencias fueron más evidentes a los 5 días de monitorización que a los 7 y 10 días (Figura 3.21). El único medio de entre todos los probados en el que no se apreciaron alteraciones (TSA), era un medio donde no ocurre esporulación. En los demás, en mayor o menor medida, sí se detectó formación de esporas. Estas observaciones sugerían que el fenómeno encontrado no se debía a una morfología diferente en la cepa mutante, sino que se trataba de un retraso en el desarrollo normal de la colonia y/o en la esporulación.

Para probar esta hipótesis, se llevaron a cabo experimentos de evaluación de la producción de esporas en ambas cepas. Los resultados mostraron que, a los 7 días, existía una disminución de un 20 % en la concentración de esporas viables producidas por la cepa $\Delta pteF$ con respecto a la cepa silvestre, que producía una media de $2,5 \times 10^7$ cfu/cm². Sin embargo, a los 10 días los valores de concentración fueron prácticamente idénticos, confirmándose así que se trataba de un fenómeno en el que la cepa mutante presentaba un ritmo de formación de esporas más lento de lo normal.

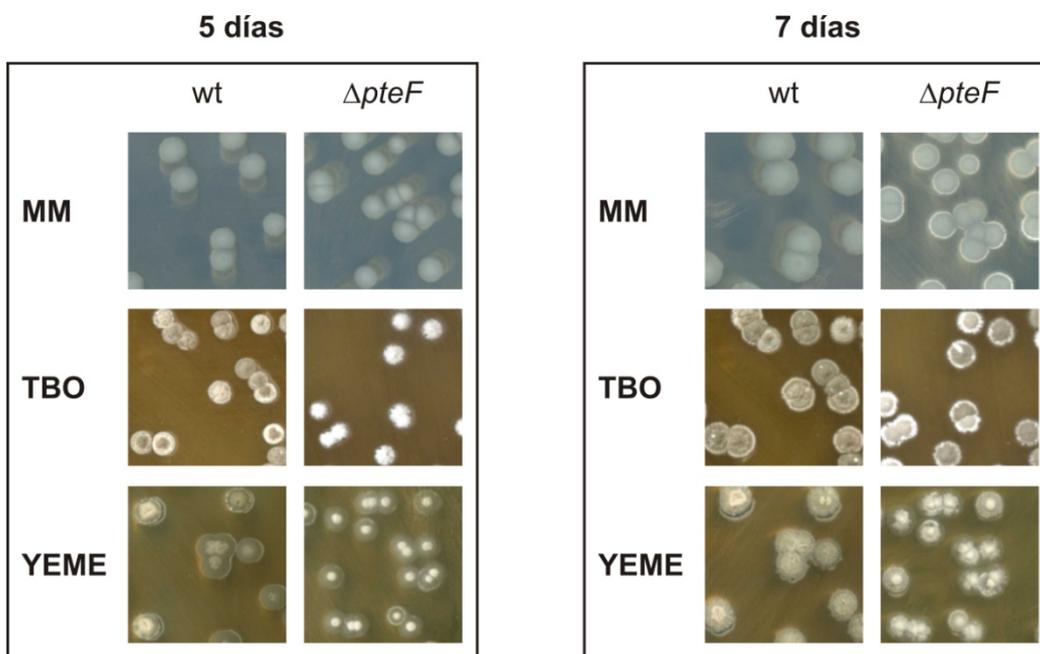


Figura 3.21. Efecto de la mutación $\Delta pteF$ en la esporulación. Se inocularon placas de MM, TBO y YEME con esporas de las cepas silvestre y mutante, y se compararon después de 5 y 7 días de incubación a 30 °C.

Teniendo en cuenta que la cepa mutante $\Delta pteF$ es deficiente en la producción de filipina, cabría la posibilidad de que este fenotipo fuese una consecuencia del ritmo de

esporulación más lento. Sin embargo, esta teoría parece poco probable puesto que la cepa mutante y la silvestre mostraron perfiles de crecimiento idénticos en medio líquido y que la concentración de esporas producidas tras de 10 días de incubación fue idéntica para ambas cepas. También se podría argumentar que este polieno es necesario para un perfil de esporulación normal, pero el hecho de que el mutante $\Delta pteR$, que también tiene afectada la producción de filipina como el $\Delta pteF$, no presente cambios en la esporulación permite descartar esta posibilidad.

3.5. Análisis de la expresión génica del *cluster* biosintético de la filipina

Una vez demostrado el papel modulador de los reguladores localizados en el *cluster* biosintético de la filipina *pteF* y *pteR*, conocer el patrón transcripcional de los genes de la agrupación es un paso importante para intentar explicar el modo de acción de estos reguladores transcripcionales.

3.5.1. Organización transcripcional

Para tener una visión global de la organización transcripcional de los genes *pte* en *S. avermitilis*, fue necesario identificar los posibles operones. Así, se analizó mediante RT-PCR si existía transcripción acoplada de los genes del *cluster*. Estos ensayos consistieron en la detección de transcritos de la región intergénica entre dos genes adyacentes y con la misma orientación, que sólo estarían presentes cuando la pareja de genes analizada se expresase en un mismo mRNA y por lo tanto formasen un operón.

Para llevar a cabo este análisis, se emplearon *primers* diseñados para amplificar las regiones intergénicas de interés, junto con parte de la secuencia codificante de los genes flanqueantes. Como molde se empleó RNA total obtenido a partir de cultivos de *S. avermitilis* crecidos durante 36h en medio YEME (condiciones idénticas a las de fermentación y cuando ya existe producción de filipina) (apartado 2.9.1). Las reacciones de PCR se hicieron con 40 ciclos de amplificación para asegurar que incluso los transcritos menos abundantes se pudiesen detectar. Se realizaron al menos tres ensayos para cada región intergénica y se incluyeron controles negativos para verificar la ausencia de contaminaciones con DNAg. Previamente, todas las parejas de *primers* se comprobaron mediante reacciones de PCR con DNAg. Los fragmentos obtenidos se identificaron mediante secuenciación del producto de PCR.

El análisis previo de los genes *pte* y su orientación en el *cluster* permite indicar que la agrupación está dividida en tres regiones (Figura 3.23). Así, en el lado izquierdo existen tres genes (*pteH*, *pteG* y *pteF*) con la misma orientación. Inmediatamente seguido está situado *pteR*, el único gen de la agrupación en la orientación contraria. Los restantes 9 genes están dispuestos de manera continua y en sentido divergente a *pteR*.

Estas observaciones permiten deducir la localización de determinadas zonas promotoras. Por su disposición en sentidos divergentes, los genes *pteF* y *pteR* deben tener su propio promotor, y lo mismo ocurre con *pteA1*, que está localizado de manera divergente al gene inmediatamente corriente arriba, el SAV420.

Las secuencias de los *primers* utilizados en las reacciones de retrotranscripción, así como sus valores de T_m , se indican en el Anexo I de esta memoria, y los tamaños de los fragmentos amplificados por esos *primers* y de las regiones intergénicas se reúnen en la Tabla 3.1. Los resultados del análisis de transcritos se encuentran compilados en la Figura 3.22.

Para comprobar si los genes *pteH*, *pteG* y *pteF* constituyen un operón cuya transcripción se inicia en el promotor de *pteF*, se diseñaron dos parejas de *primers* para detectar posibles transcritos de esas dos regiones intergénicas. Los *primers* “*pteH* 2 fw” y “*interHG* rev” se utilizaron para estudiar la presencia de transcrito entre los genes *pteH* y *pteG*. Esta región intergénica es pequeña (96 bp) y el tamaño de la posible región amplificada es de 403 bp. No se detectó ninguna banda de amplificación, lo que sugiere que *pteH* tiene su propio promotor y se transcribe en un mRNA monocistrónico, puesto que el gen anterior (SAV7575) está dispuesto de forma divergente. Por otro lado, los genes *pteG* y *pteF* sí mostraron co-transcripción. Los *primers* “*interGF* fw/rev”, situados uno en cada gen, amplificaron un fragmento de 523 bp, lo que sugiere que ambos genes se expresan en un transcrito bicistrónico a partir del promotor de *pteF*. Sin embargo, el tamaño de la región intergénica (465 bp) hace pensar que podría existir un promotor alternativo para *pteG*.

Tabla 3.1. Lista de regiones intergénicas analizadas, sus tamaños, y los respectivos *primers* empleados en la reacciones de RT-PCR.

	Región intergénica	Tamaño (bp)	<i>Primers</i>	Amplificación (bp)
i1	<i>pteH-pteG</i>	96	pteH 2 fw intergHG rev	403
i2	<i>pteG-pteF</i>	465	interGF fw interGF rev	523
i5	<i>pteE-pteD</i>	44	pteE fw intergED rev	319
i6	<i>pteD-pteC</i>	581	intergDC fw intergDC rev	630
i7	<i>pteC-pteB</i>	46	pteC 2 fw intergCB rev	605
i8	<i>pteB-pteA5</i>	60	pteB 2 fw intergBA5 rev	554
i9	<i>pteA5-pteA4</i>	46	pteA5 2 fw intergA5A4 rev	556
i10	<i>pteA4-pteA3</i>	79	pteA4 2 fw intergA4A3 rev	768
i11	<i>pteA3-pteA2</i>	35	pteA3 2 fw intergA3A2 2 rev	811
i12	<i>pteA2-pteA1</i>	71	pteA2 2 fw intergA2A1 rev	669

El análisis de los restantes genes del lado derecho del *cluster*, todos con la misma orientación, mostró la presencia de dos unidades transcripcionales. Una de ellas, la co-transcripción de *pteA1* y *pteA2* que están separados por sólo 71 bp, se estudió con los *primers* “pteA2 2 fw” y “intergA2A1 rev” que amplificaron un fragmento de 669 bp (Figura 3.22). Esto sugería que ambos genes se cotranscribían, sin embargo, en estudios posteriores de este trabajo se detectó la presencia del promotor de *pteA2* en la zona 3' del gen *pteA1* (ver apartado 3.6.3) y, por lo tanto, localizado dentro del fragmento amplificado por los *primers* empleados. Consecuentemente, la cotranscripción observada podría deberse a la existencia de una secuencia líder y no a una verdadera cotranscripción de ambos genes. Así, para comprobar si *pteA1-pteA2* realmente formaban un transcrito bicistrónico, se repitieron las reacciones de RT-PCR utilizando un nuevo *primer* “E-pteA2 rev”, junto con el “pteA2 2 fw”. Los resultados mostraron un fragmento de 804 bp, lo que sugirió que realmente ambos genes se co-transcribían. Entre los genes *pteA2* y *pteA3* no se detectó ningún transcrito. De haberlo, los *primers* “pteA3 2 fw” y “intergA3A2 2 rev” deberían amplificar un fragmento de 811 bp (Figura 3.22). Sorprendentemente, la región intergénica entre estos

dos genes es de sólo 35 bp, lo que apunta a que el promotor de *pteA3* podría estar situado dentro de la región codificante de *pteA2*.

De la misma manera, los genes *pteA3*, *pteA4*, *pteA5*, *pteB*, *pteC*, *pteD* y *pteE* se podrían co-transcribir y formar un mRNA policistrónico de gran tamaño (38,7 kb), puesto que se detectaron transcritos de todas regiones intergénicas.

Los *primers* “*pteA4* 2 fw” y “*intergA4A3* rev” amplificaron la región intergénica entre *pteA3* y *pteA4* (79 bp) en un fragmento de 768 bp. La transcripción acoplada de *pteA4* y *pteA5* se comprobó con los *primers* “*pteA5* 2 fw” y “*intergA5A4* rev”, que amplificaron una región de 556 bp que cubre los 46 bp que separan ambos genes.

En el caso de *pteA5* y *pteB*, existen 60 bp que los separan y la región amplificada por los *primers* “*pteB* 2 fw” y “*intergBA5* rev” fue de 554 bp.

La co-transcripción de *pteB* y *pteC* se detectó por el producto de la reacción de RT-PCR con los *primers* “*pteC* 2 fw” y “*intergCB* rev” (605 bp), y los genes se encuentran separados por tan sólo 46 bp.

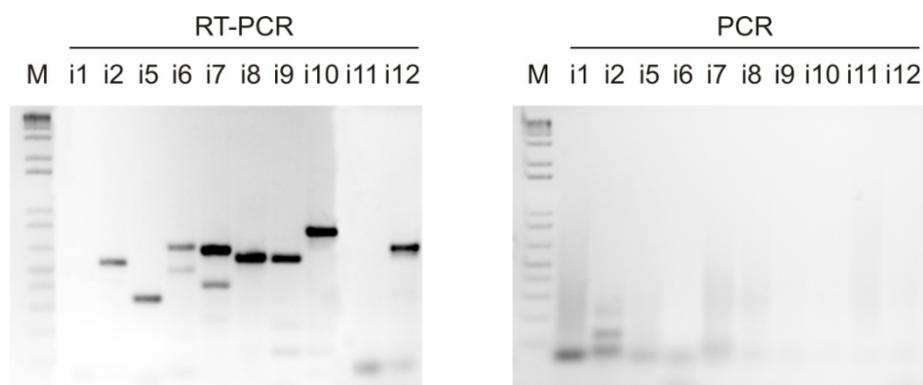


Figura 3.22. Amplificación de las regiones intergénicas del *cluster pte* mediante RT-PCR. En el panel izquierdo se analiza la transcripción acoplada, y en el derecho se muestran los controles negativos de reacción sólo con polimerasa de DNA, ambos con 40 ciclos de amplificación. Los carriles están identificados como en la Tabla 3.1. En este experimento se utilizaron muestras de RNA total obtenidas a partir de cultivos de *S. avermitilis* con 36h de crecimiento. En todos los casos se aseguró que la integridad de las muestras fuese superior a 8,0 de RIN.

La región intergénica entre *pteC* y *pteD* de 581 bp fue detectada por la amplificación de un fragmento de 630 bp con los *primers* “*intergDC* fw/rev”. En este último caso, nos deparamos una vez más con una región intergénica lo suficientemente grande como para contener un promotor para *pteD*, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que exista también aquí un promotor secundario.

Por último, la co-transcripción de *pteD* y *pteE* fue evaluada con los *primers* “*pteE* fw” y “*intergED* rev”, que originaron un fragmento de 319 bp que incluía la región intergénica de 44 bp (Figura 3.22). El hecho de que estos dos genes se expresen de manera acoplada resulta particularmente lógico, puesto que PteD y PteE constituyen una pareja funcional de citocromo P450 y ferredoxina. Es frecuente encontrar estas dos enzimas con esta misma disposición en *clusters* de *Streptomyces*, la ferredoxina inmediatamente corriente abajo de la citocromo P450 monooxigenasa. Además, su co-expresión se ha descrito en varios casos, e.g. *pimG-pimF* en *S. natalensis* (Santos-Aberturas *et al.* 2011b), o *cyp-fd* en *S. clavurigerus* (Li *et al.* 2000).

La Figura 3.23 muestra la organización transcripcional deducida a partir de la combinación de éstos y otros resultados.

3.5.2. Caracterización de los promotores

El análisis de transcritos de las regiones intergénicas de la agrupación *pte* da una idea de la organización transcripcional del *cluster*, pero es insuficiente. No es inusual que en *Streptomyces* existan promotores secundarios que permitan la expresión acoplada de un menor número de genes. Así, se llevaron a cabo experimentos de 5'-RACE para todos los genes del *cluster* para determinar la existencia de promotores. Se utilizaron muestras de RNA total obtenidas en las mismas condiciones que las utilizadas para los experimentos de RT-PCR, y que también se analizaron para comprobar la integridad del RNA (sólo se aceptaron valores RIN superiores a 8,0). En los casos positivos, dichos promotores se caracterizaron utilizando matrices para buscar las cajas -10 y -35, derivadas de los alineamientos de promotores de clase C y clase A de *Streptomyces* (Bourn & Babb 1995), tal y como se ha descrito anteriormente (Santos-Aberturas *et al.* 2011b). Estas matrices permiten otorgar puntuaciones a las secuencias de las cajas, donde valores de puntuación más positivos indican un aumento de la similitud con las secuencias consenso. Todos los *primers* empleados, sus secuencias y valores de T_m están indicados en el Anexo II.

De este modo, de entre las 13 posibles regiones promotoras 8 dieron positivo en los experimentos 5'-RACE. Algunos de estos promotores se habían pronosticado anteriormente, como el de *pteA3*, pero otros resultaron completamente inesperados, como por ejemplo el de *pteA2* (Figura 3.23). A continuación, se describen los promotores identificados.

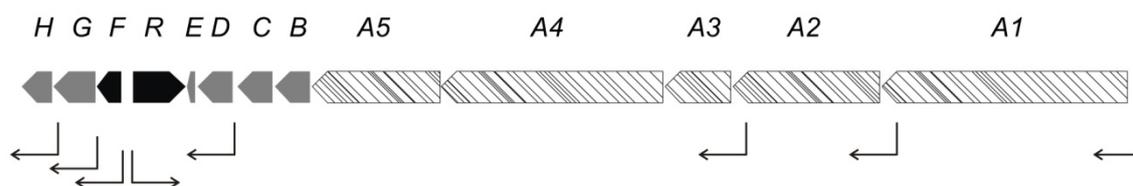


Figura 3.23. Organización transcripcional del *cluster* biosintético de la filipina. Las flechas grandes representan los genes y su orientación en el *cluster*: los reguladores (negro), PKSs (rayado) y los restantes genes post-PKSs (gris). Las flechas indican las unidades transcripcionales deducidas. Estos resultados están basados en los experimentos de co-transcripción y 5'-RACE.

El inicio de la transcripción (TSP) de *pteH* está localizado en una timina 212 bp corriente arriba del codón de inicio GTG. El análisis de la región promotora mostró que la caja -10 es GAACCT, centrada a 8 nucleótidos del TSP, separada por 19 nucleótidos de la caja -35, de secuencia ACTACG.

El TSP de *pteG* es una guanina situada a 295 bp corriente arriba del codón de inicio de la traducción GTG. El análisis de la región corriente arriba del TSP reveló la presencia de una caja -10 CAGCGC, centrada a 12 nucleótidos del inicio de transcripción, y una caja -35 CGCACG, ambas cajas separadas por 15 nucleótidos.

Un único fragmento de amplificación de aproximadamente 300 bp fue observado para *pteF*. El TSP corresponde a una guanina localizada a 30 bp corriente abajo del codón de inicio ATG anotado en las bases de datos, i.e. interno a la secuencia codificante de *pteF* anotada. Estos resultados son notables pero quizás no muy sorprendentes, dado que ya habíamos postulado la posibilidad de que *pteF* tuviera otro inicio de traducción (ver apartado 3.2.1). Así, se demostró que la actual anotación de este gen es incorrecta. La secuencia GGCCTT coincide con la caja -10, y la caja -35 es AGGGCC, localizada a 18 nucleótidos de distancia. Dada esta información, hemos asignado el codón de inicio de *pteF* al siguiente codón ATG que codifica una metionina, localizado a 120 bp corriente abajo. Es de resaltar que este nuevo codón de inicio coincide con el que existe en la secuencia codificante de *pimM* (ver Figura 3.3). De esta manera, el TSP de *pteF* aquí identificado se encuentra a 90 bp corriente arriba del nuevo codón ATG.

El gen *pteR* presenta su TSP (una guanina) localizado a 69 bp corriente arriba del codón ATG. La secuencia corriente arriba del TSP reveló que las cajas -10 y -35 (CAGGAT y TTGGAA, respectivamente) están centradas a 10 y a 33 nucleótidos del TSP, y separadas por 17 nucleótidos.

En el caso del gen *pteD* el TSP es una guanina localizada a 51 bp corriente arriba del codón ATG. Las cajas -10 (AAACCT) y -35 (CGCACG) están separadas por 17 nucleótidos, y la primera está centrada a 10 nucleótidos del TSP.

El TSP del gen *pteA3* corresponde a una citosina situada a 196 bp del ATG, y se encontraron las cajas -10 (CAACAT) y -35 (ACGGTG) separadas por 19 nucleótidos. Notablemente, y como habíamos previsto por los resultados de las RT-PCR de la región intergénica, el TSP de este gen está localizado a 161 nucleótidos del codón de paro de *pteA2*.

Sorprendentemente, *pteA2* tiene un inicio de transcripción propio, una guanina localizada a 255 bp corriente arriba del codón de inicio GTG. Asimismo, el TSP está en la región codificante del gen inmediatamente corriente arriba *pteA1*, a 184 bp de su codón de paro. Se identificó la secuencia AAGAAT como la caja -10, centrada a 10 nucleótidos del TSP, y la secuencia TTGCCG como caja -35, con 18 nucleótidos separando ambas cajas.

Por último, el TSP de *pteA1* es una guanina situada a 88 bp del codón de inicio ATG, la caja -10 CACACT está centrada a 10 nucleótidos del TSP, y la caja -35 CTGCCG está a 18 nucleótidos de distancia.

Los promotores de la agrupación así identificados están representados en la Figura 3.24.

El *cluster pte* posee 8 promotores responsables de la expresión de todos los genes necesarios para la producción de filipina. Algunos de ellos se puede decir que son secundarios o alternativos, puesto que de no existir los genes bajo su control se seguirían expresando. Es el caso de los promotores de *pteG* y *pteA2*, que permiten la formación de transcritos menores alternativos a los transcritos iniciados en los promotores de *pteF* y *pteA1*, respectivamente. Se han descrito varios casos de *clusters* génicos en *Streptomyces* que poseen promotores alternativos, como por ejemplo en los *clusters* biosintéticos de la cefamicina C y de la holomicina de *S. clavurigerus* (Santamarta *et al.* 2011, Robles-Reglero *et al.* 2013).

También resulta notable que varios de los promotores identificados estén situados en las regiones codificantes de otros genes. Sin embargo, ésta no es una situación sin precedentes y recientemente se han descrito promotores internos para varios genes involucrados en la biosíntesis de holomicina en *S. clavurigerus* (Robles-Reglero *et al.* 2013).

También se ha descrito un promotor interno esencial para la esporulación dentro del gen *spoIII_{AF}* en *Bacillus subtilis* (Guillot & Moran 2007), y otro necesario para la expresión de MSDGC-1, una proteína bifuncional responsable por la concentración celular de c-di-GMP en *Mycobacterium smegmatis* (Bharati *et al.* 2013).

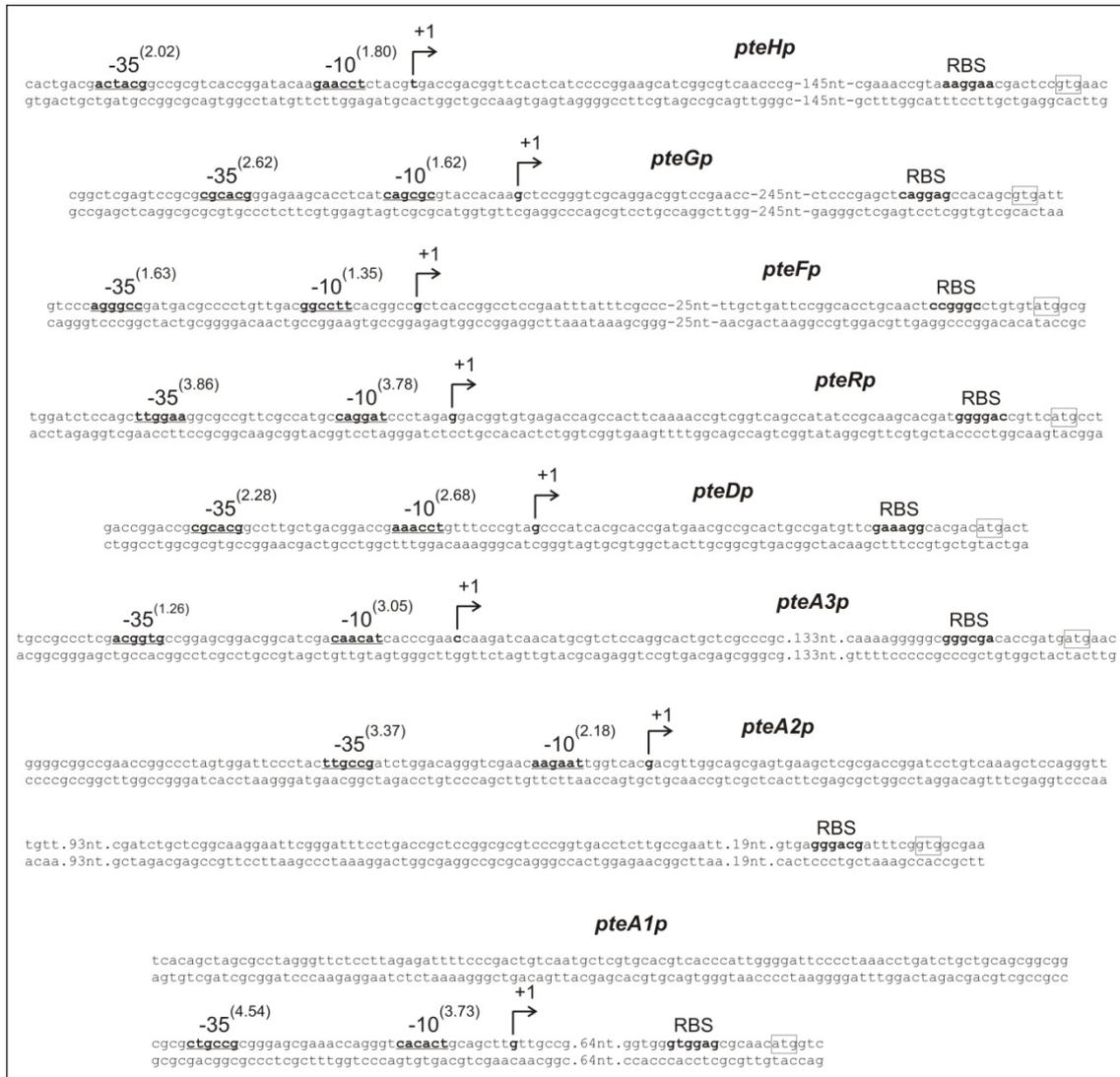


Figura 3.24. Promotores de la agrupación génica de la filipina. Los sitios de inicio de la transcripción se determinaron mediante 5'-RACE. Las secuencias hexanucleotídicas -10 y -35 están señaladas en negrita y subrayadas. Las puntuaciones resultantes del análisis con las matrices para *Streptomyces* (Bourn & Babb 1995) se indican entre paréntesis. El TSP (+1) se indica con una flecha en ángulo recto y a negrita. Las secuencias que mostraron homología con el RNA 16S, que podrían constituir un sitio de unión a ribosomas, se indican a negrita y están señaladas con "RBS". Los codones de inicio están enmarcados.

3.5.3. Análisis cuantitativo de la expresión de los genes *pte* en los mutantes

La expresión de los genes del *cluster* de la filipina se analizó mediante RT-qPCR (apartado 2.10.2). Para cada cepa mutante, $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$, los niveles transcripcionales de todos los genes a las 36h se compararon con los de la cepa silvestre, a la que se asignó el valor de expresión relativa 1. Como referencia, se utilizó la expresión del gen *rrnA1*, que codifica un RNA ribosomal. Los resultados y sus desviaciones estándar, derivan del análisis de tres réplicas técnicas por gen y por ensayo y, al menos, dos réplicas biológicas independientes. Todos los *primers* empleados se encuentran indicados en el Anexo I de esta memoria. Las eficiencias de reacción se calcularon como se ha descrito en el apartado 2.10.2.3 y se describen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Eficiencia de las reacciones qPCR.

	Pendiente	R^2	Eficiencia
Q-rrnA1 4.0 7fw/rev	-3,6512	0,992	0,88
Q-pteH 4.2 9fw/rev	-3,9200	0,995	0,80
Q-pteG 4.1 6fw/rev	-2,9279	0,991	1,20
Q-pteF 4.1 9fw/rev	-2,9435	0,999	1,19
Q-pteR 4.1 2fw/rev	-3,0556	0,989	1,12
Q-pteD 4.1 1fw/rev	-3,3067	0,997	0,69
Q-pteC 4.1 12fw/rev	-4,3989	0,998	0,69
Q-pteB 4.2 9fw/rev	-3,0027	0,997	1,15
Q-pteA5 4.1 6fw/rev	-3,9725	0,995	0,79
Q-pteA4 4.2 4fw/rev	-3,4593	0,997	0,95
Q-pteA3 4.0 1fw/rev	-3,0070	0,998	1,15
Q-pteA2 4.1 3fw/rev	-3,4542	0,997	0,95
Q-pteA1 4.0 1fw/rev	-3,2840	0,994	1,02

3.5.3.1. Expresión en el mutante $\Delta pteF$

El análisis de la expresión génica del *cluster* en la cepa $\Delta pteF$ (Figura 3.25) mostró que todos los genes biosintéticos estructurales (*pteA1* a *pteA5*) se expresaban menos que en la cepa silvestre. Esto sugiere que los promotores que controlan la expresión de estos genes son objeto de modulación directa o indirecta por parte de PteF. De acuerdo con estos resultados, los promotores sujetos a este control transcripcional son pteA1p, pteA2p y pteA3p. La regulación de la transcripción de cualquiera de estos promotores, que son responsables en última instancia de la producción de las policétido sintetas que sintetizan el

esqueleto policetíidico de la filipina (Ikeda *et al.* 2003), es suficiente para explicar la menor producción de este polieno en el mutante. Curiosamente, los valores de expresión entre *pteA3*, *pteA4* y *pteA5* varían bastante. Puesto que pertenecen al mismo operón, cabe la posibilidad de que el transcrito policistrónico sea procesado y esté sujeto a diferentes tasas de degradación.

Asimismo, las expresiones de *pteB* que codifica una 2-octenoil-CoA carboxilasa/reductasa (Yoo *et al.* 2011), y *pteC* y *pteD* que codifican citocromos P450 monooxigenasas (Xu *et al.* 2010), también se ven afectadas negativamente. La disminución de la expresión de *pteB* y *pteC* está en conformidad con la de *pteA3*, *pteA4* y *pteA5*, puesto que todos estos genes forman un único transcrito. Sin embargo, el cambio observado en la expresión de *pteD* no se podía predecir al tener este gen su propio promotor, lo que sugiere que *pteD* también está bajo el control regulador.

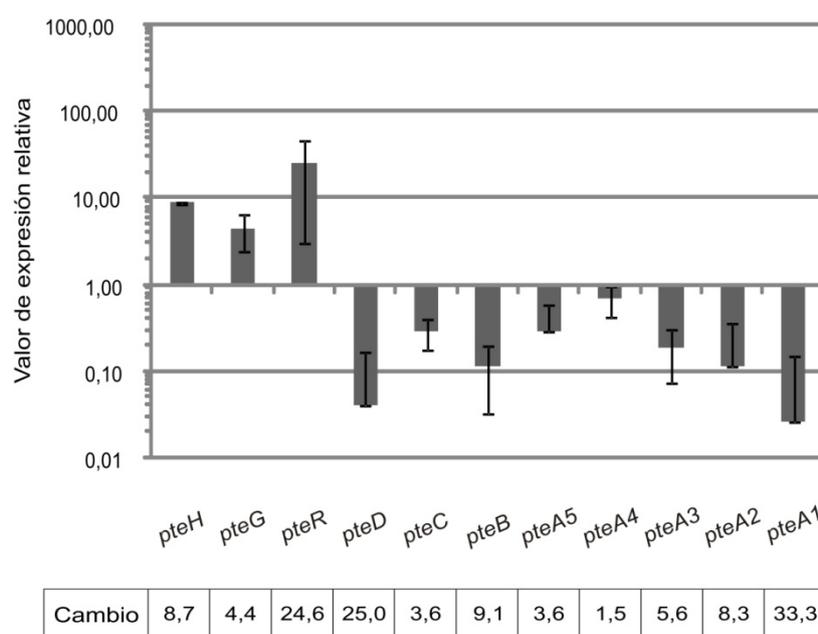


Figura 3.25. Análisis de la expresión génica del *cluster pte* en el mutante $\Delta pteF$ mediante RT-qPCR. Los valores relativos se refieren a 1, el valor asignado para la expresión de cada gen en la cepa silvestre. Se utilizó en gen *rrnA1* (rRNA 16S) como referencia. Las barras verticales representan la desviación estándar obtenida entre dos réplicas biológicas para cada muestra, cada una con tres réplicas técnicas. Abajo se indican los valores relativos medios de cambio en la expresión (indicado en número de veces). Las muestras de RNA utilizadas fueron obtenidas a partir de cultivos de 36h de crecimiento en las condiciones de fermentación estándar.

Sorprendentemente, la expresión de *pteR* se dispara en el mutante $\Delta pteF$, llegando a ser 25 veces (en media) superior a la de la cepa silvestre. Esto indica claramente que *pteR* está controlado por PteF. El modo en como PteF regula la expresión de *pteR* puede ser directo, como regulador negativo sobre el promotor del gen, o indirecto, activando otro regulador negativo que a su vez controla la expresión de *pteR*. Este resultado contrasta con lo que ocurre en *S. natalensis*, donde la expresión de *pimR* no se ve afectada por la mutación $\Delta pimM$ (Santos-Aberturas *et al.* 2012).

Los dos últimos genes del *cluster*, *pteH* y *pteG* también muestran un aumento en su expresión en la cepa mutante. La razón por la que el regulador PteF activaría la expresión de la tioesterasa y colesterol oxidasa del *cluster* no está clara.

La mutación $\Delta pteF$ resulta en la disminución de la expresión de casi todos los genes de la agrupación *pte*. En especial, la menor expresión de los genes biosintéticos es en sí suficiente para explicar los títulos de producción de filipina observados en la cepa mutante, que son bastante inferiores a los de la cepa silvestre. Por otro lado, la expresión de los genes nunca llega a ser nula, como se observó para algunos genes *pim* en el mutante $\Delta pimM$ (Antón *et al.* 2007). Esto explicaría por qué se sigue produciendo filipina en el mutante $\Delta pteF$.

3.5.3.2. Expresión en el mutante $\Delta pteR$

El perfil de expresión de los genes del *cluster pte* en el mutante $\Delta pteR$ es bastante similar al del mutante $\Delta pteF$, aunque con alteraciones poco significativas (Figura 3.26). Los genes biosintéticos *pteA1-pteA5* presentan niveles de expresión entre 1 y 2 veces inferiores a los de la cepa silvestre. En el caso particular de *pteA2*, parece que el cambio no es estadísticamente significativo, debido a que la desviación estándar obtenida sobrepasa el valor medio. Los genes *pteB*, *pteC* y *pteD* siguen la misma tendencia y también disminuye su expresión.

El regulador *pteF* presenta un ligero aumento en los niveles de su expresión en la cepa mutante, casi dos veces más. El gen *pteH* es aquel que presenta una variación más relevante, con un aumento de más de 10 veces en los niveles de expresión en comparación con la cepa silvestre. Por otro lado, los cambios observados en *pteG* parecen no ser estadísticamente significativos.

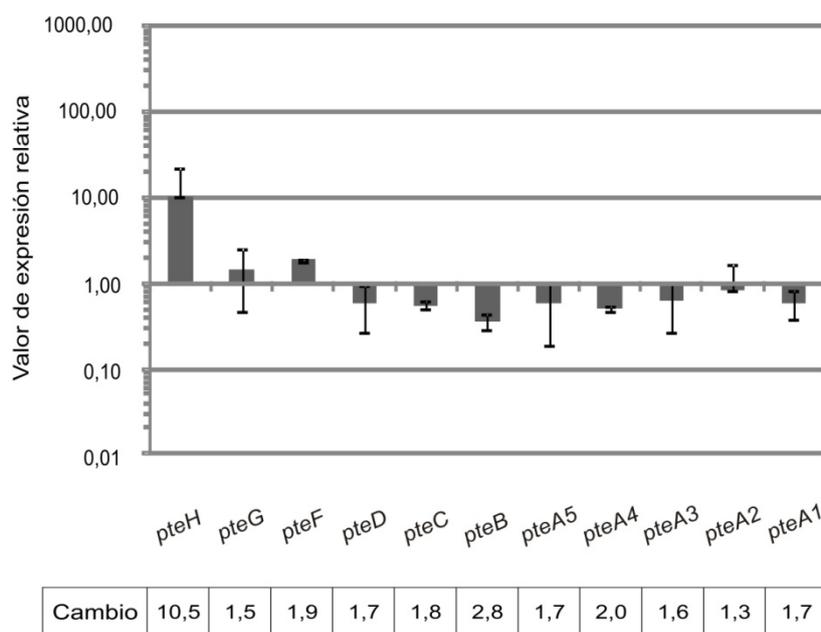


Figura 3.26. Análisis de la expresión génica del *cluster pte* en el mutante $\Delta pteR$ mediante RT-qPCR. Los valores relativos se refieren a 1, el valor relativo asignado para la expresión de cada gen en la cepa silvestre. Se utilizó en gen *rrnA1* (rRNA 16S) como referencia. Las barras verticales representan la desviación estándar obtenida entre dos réplicas biológicas para cada muestra, cada una con tres réplicas técnicas. Abajo se indican los valores relativos medios de cambio en la expresión. Las muestras de RNA utilizadas fueron obtenidas a partir de cultivos de 36h de crecimiento en las condiciones de fermentación estándar.

Existe co-regulación entre *pteF* y *pteR*

Aunque la expresión génica observada sigue la misma tendencia en las dos cepas mutantes $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$, las variaciones observadas en el mutante $\Delta pteR$ son menos significativas. Resulta llamativo el hecho de que en cada una de las cepas mutantes, se dispare la expresión del otro regulador, lo que sugiere que el mismo está negativamente regulado. Esta observación va en contra del mecanismo regulador descrito en *S. natalensis*, en el que PimR controla positivamente la expresión de *pimM*, y *pimM* no tiene efecto sobre la expresión de *pimR* (Santos-Aberturas *et al.* 2012).

3.6. Identificación de las dianas moleculares de PteF/PimM en el *cluster pte*

Dado el alto grado de identidad que comparten los reguladores PimM y PteF (94 %), y que la conservación funcional es una característica bien establecida, nos

propusimos buscar secuencias similares al sitio de unión reconocido por PimM en el *cluster* de la filipina en *S. avermitilis*. Para ello, nos basamos en el logotipo de la secuencia de unión consenso de PimM (Figura 1.16), establecido no sólo en base a las secuencias de unión situadas en el cluster de la pimaricina en *S. natalensis*, pero también con secuencias identificadas en *clusters* para diferentes polienos en otras especies de *Streptomyces* (Santos-Aberturas *et al.* 2011a).

El análisis *in silico* del *cluster* de la filipina revela los sitios de unión de PteF

Se encontraron cuatro secuencias compatibles con la secuencia consenso de PimM, dos en la región intergénica entre *pteA1* y el gen inmediatamente corriente arriba SAV420, y otras dos corriente arriba de la región intergénica entre *pteA2* y *pteA1*, i.e. en la secuencia codificante de *pteA1*. De acuerdo con el modo de acción de PimM, estos dos operadores deberían estar situados en promotores regulados, por lo que los primeros dos operadores estarían en el promotor *pteA1p* y los otros dos en el promotor *pteA2p*.

Las secuencias encontradas se analizaron con una matriz de pesos elaborada para el estudio de secuencias de unión de PimM y amablemente cedida por el Dr. Javier Santos Aberturas. Esta matriz, de una manera similar al proceso desarrollado por el servidor BiPad (Bi & Rogan 2006), permite valorar la secuencia en cuestión y atribuirle un valor R_i (Schneider & Stephens 1990), que hace referencia al contenido en información de cada una de las bases de la misma y es calculado como el sumatorio de los valores de las bases individuales que la componen. Así, valores de R_i más elevados reflejan un mayor ajuste a la secuencia consenso. La Tabla 3.3 contiene las secuencias encontradas y los respectivos valores R_i calculados.

Las secuencias encontradas en *pteA1p* están situadas en el promotor y coinciden con los sitios de unión anteriormente descritos por Santos-Aberturas *et al.* 2011a. Sin embargo, las secuencias en *pteA2p* no están situadas donde sería de esperar. Estas secuencias están localizadas dentro de la secuencia codificante de *pteA1*, una posición inesperada por lo que la primera vez que se analizó la región no se encontraron operadores. En este trabajo, no obstante, se confirman estos resultados con los experimentos 5'-RACE que muestran que el TSP de *pteA2* está situado a unos 180 nucleótidos corriente arriba del su codón de paro de *pteA1*, y que por lo tanto el *pteA2p* está en la secuencia codificante de *pteA1*.

Tabla 3.3. Sitios de unión del regulador.

Promotor	Hebra	Secuencia	valor <i>Ri</i>
secuencia consenso		CTVGGGAWWTCCCBAG	
pteA1p (1)	-	ttaggggaatccccaa	12.19
pteA1p (1)	+	ctaggggttctccttag	10.77
pteA1p (2)	-	ctaaggagaaccctag	11.36
pteA1p (2)	+	ttggggattcccctaa	12.91
pteA2p (1)	-	gtcaggaaatccccgaa	11.69
pteA2p(1)	+	ttcgggatttcctgac	13.23
pteA2p (2)	-	gtaggggaatccactag	10.62
pteA2p (2)	+	ctagtggattccctac	11.08

Resulta también destacable el hecho de que no se encontró ningún operador en pteA3p, lo que sugiere que el control ejercido por PteF sobre la transcripción del policistrón *pteA3A4A5BC* debe ser indirecto. Asimismo, no se identificaron operadores en los promotores de *pteD*, *pteG*, *pteH*, ni en la región promotora bidireccional *pteFR*, lo que indica un control indirecto de PteF sobre la expresión de estos genes.

3.6.1. Ensayos de retraso en gel con PimM^{DBD}

Para corroborar que los operadores identificados son reconocidos por PteF en la regulación del *cluster*, se utilizaron dichos operadores para realizar experimentos EMSA y demostrar la unión directa del regulador a los promotores. El dominio de unión al DNA (DBD del inglés *DNA binding domain*) de PimM y de PteF consiste en los últimos 93 aminoácidos de las proteínas, y está muy conservado, observándose una identidad del 90 %. Así, y por estar demostrada la conservación funcional entre estos reguladores, los EMSA se llevaron a cabo con la proteína PimM^{DBD} (Santos-Aberturas *et al.* 2011b). Se escogió esta versión de la proteína no sólo porque es la parte funcional del regulador, sino también por la mayor afinidad que presenta por sus dianas en comparación con la proteína completa, lo que permite una mayor sensibilidad en los ensayos.

La proteína PimM^{DBD} está en forma de una proteína de fusión con la GST y se purificó como se ha descrito en los apartados 2.11.1 y 2.11.2. Se monitorizó su expresión heteróloga y la purificación llevada a cabo con una columna de afinidad para la GST mediante FPLC (Figuras 3.27 y 3.28).

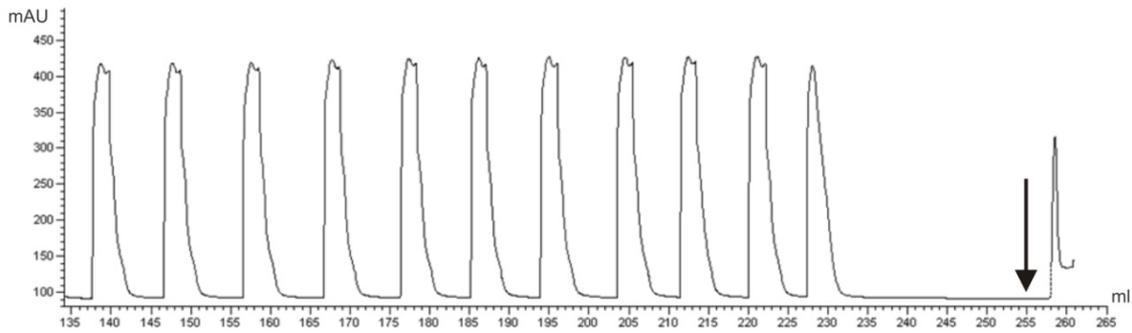


Figura 3.27. Cromatograma de FPLC de la purificación de GST-PimM^{DBD}. Se utilizaron extractos crudos obtenidos a partir de la sonicación de las células de un cultivo de la cepa *E. coli* BL21 (DE3)/pJM^{DBD} con la expresión inducida. La absorbancia a 280 nm se representa en el eje vertical (miliunidades de absorbancia), mientras que el volumen que ha pasado por la columna se representa en el eje horizontal (mililitros). Los picos de absorbancia consecutivos derivan de la inyección de sucesivas muestras del extracto proteico en el sistema. La flecha indica el instante en que se inició la elución, y el pico siguiente resulta de la salida de la columna de la proteína de fusión. Para confirmar su identidad, dicha banda fue analizada mediante MALDI-TOF identificándose simultáneamente su patrón peptídico con las proteínas PimM y GST.

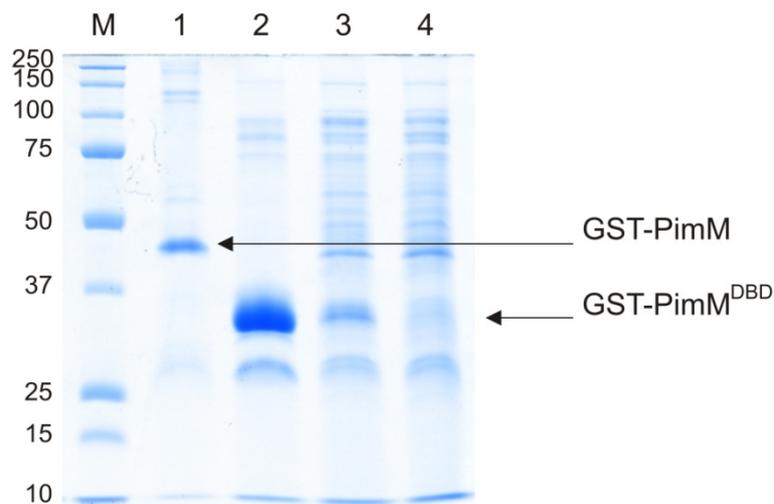


Figura 3.28. Análisis mediante SDS-PAGE del proceso de purificación de GST-PimM^{DBD}. El carril M, marcador de peso molecular con el tamaño de cada banda indicado en kDa; carril 1, muestra de GST-PimM completa purificada (tamaño aproximado 47 kDa, de los cuales 26 kDa corresponden a la GST); carril 2, muestra de GST-PimM^{DBD} purificada obtenida a partir de las fracciones recogidas durante la elución y su posterior concentración (tamaño aproximado, 36 kDa); carriles 3 y 4, diferentes volúmenes (5 y 2,5 μ l, respectivamente) de una muestra correspondiente al extracto crudo inyectado en la columna cromatográfica, en el que se puede observar la sobreexpresión de una banda de un tamaño aproximado de 36 kDa. Nótese como la proteína que aparece sobreexpresada en el carril 3 corresponde con la finalmente purificada en el carril 2.

Los experimentos EMSA se llevaron a cabo en las condiciones de reacción previamente descritas (Santos-Aberturas *et al.* 2011b). Por cada EMSA se realizaron dos

controles negativos, la ausencia de proteína y el uso de GST (purificado separadamente). Las sondas de DNA a estudiar se marcaron con 6FAM como se ha descrito en el apartado 2.12.1 y se describen en la Tabla 3.4. Se utilizaron sondas de regiones promotoras identificadas, e.g. los genes *pteA1* y *pteG*, y otras regiones intergénicas sin promotor conocido, e.g. *pteA4*. Las secuencias de los *primers* utilizados, así como sus valores T_m , se indican en el Anexo I.

Tabla 3.4. Lista de las sondas utilizadas en los EMSA.

Promotor	Primers	Tamaño (bp)
pteHp	intergHG fw / intergHG rev	428
pteGp	Seq3-F / Seq4-R	629
pteFp	pteF-Rp F / pteF-Rp R	279
pteRp	pteR 7 fw / interFR rev	383
pteA4p	pteA4p F / pteA4p R	457
pteA3p	pteA3p F / pteA3p R	542
pteA2p	E-pteA2 fw / E-pteA2 rev	416
pteA1p	pteA1p F / pteA1p R	724

Los resultados de los EMSA mostraron bandas de retraso para todas las sondas con regiones promotoras que contenían las secuencias identificadas, mientras que las sondas para las restantes regiones intergénicas del *cluster*, y que no contienen secuencias que adaptasen a la secuencia consenso, dieron negativo para la unión con la proteína.

Las regiones promotoras pteA1p y pteA2p fueron las únicas reconocidas por PimM^{DBD}. Para cada una de estas sondas se observaron dos bandas de retraso, lo que indica que la proteína se une a más de un sitio en la sonda (Figura 3.29A). Esta observación está de acuerdo con los dos operadores identificados en cada uno de estos promotores (Tabla 3.3). Otras regiones promotoras de genes como *pteH*, *pteG*, *pteR* y *pteA3* no originaron bandas de retraso, lo que indica que PimM no interacciona con las secuencias presentes en las mismas (Figura 3.29A). Como control negativo, se utilizó la sonda pteA4p que contiene la región intergénica pteA4-pteA3, y carece de una secuencia similar a la consenso. Como era de esperar, no se observó banda de retraso, lo que apunta a que el análisis *in silico* de las dianas de PteF/PimM se había realizado correctamente. Todos los controles llevados a

cabo con GST fueron negativos, excluyéndose así la participación de esta proteína en la unión a los promotores.

Se realizaron, además, ensayos de competencia específica, añadiendo a las reacciones la misma sonda pero sin marcar, y de competencia inespecífica, con una sonda conocida no marcada que no es retrasada por la proteína. Al añadir sonda pteA2p no marcada a la reacción, las bandas de retraso van disminuyendo de intensidad. Sin embargo, si en su lugar se usa la sonda pteA3p (que previamente se demostró ser inespecífica para PimM) no se observan diferencias, quedando así demostrada la especificidad de la unión (Figura 3.29B). Asimismo, empleando concentraciones crecientes de proteína en las reacciones con pteA2p, se pudo observar cómo la sonda libre desaparece y simultáneamente la intensidad de las bandas de retraso aumenta. Lo mismo pasa con la sonda pteA1p, llegando la sonda libre a desaparecer por completo (Figura 3.29B).

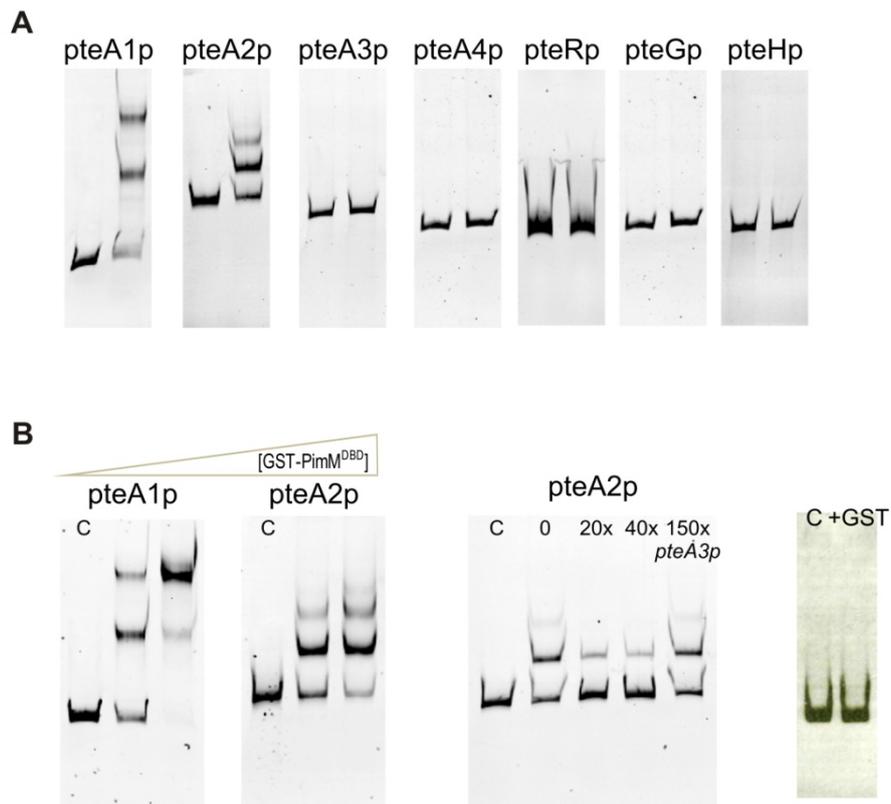


Figura 3.29. Análisis de las interacciones DNA-proteína mediante EMSA. (A) EMSAs con GST-PimM^{DBD} y diferentes regiones promotoras. Los nombres de las regiones promotoras se indican sobre cada imagen. Todos los ensayos se llevaron a cabo con 10 ng de sonda marcada y 20 nM de proteína GST-PimM^{DBD}. (B) Ensayo de unión de pteA1p y pteA2p con concentraciones crecientes de proteína (izda.); ensayo de competencia de la sonda pteA2p con la misma sonda sin marcar y la sonda inespecífica pteA3p sin marcar (centro); ejemplo de una reacción control con 60 μM de GST pura (dcha.). En todas las imágenes, el carril C contiene reacciones control sin proteína. Nótese como hasta 150 veces más de sonda pteA3p fueron incapaces de afectar la intensidad de la banda retrasada de pteA2p (centro).

Estos resultados confirman la unión directa de PimM/PteF a los promotores que contienen operadores identificados con la secuencia consenso de PimM (Tabla 3.3). Éstos son el promotor de *pteA1* y el promotor de *pteA2*, lo que sugiere que el regulador controla directamente la transcripción de ambos genes. Trabajos anteriores ya habían mostrado la unión de PimM al promotor de *pteA1*, mientras que la inesperada localización del promotor de *pteA2* había prevenido que intentos anteriores fuesen exitosos (Santos-Aberturas *et al.* 2011a). La ausencia de unión de PimM a las regiones promotores de *pteA3*, a partir de la cual se expresa el operón multicistrónico *pteA3A4A5BCDE*, de *pteD*, que permite la expresión del bicistrón *pteDE*, de *pteR*, o *pteG*, sugiere que la expresión diferencial observada para estos genes en el mutante $\Delta pteF$ es de tipo indirecto y mediada por uno o más reguladores que podrían ser activados por PteF. Esta observación constituye el primer indicio que se conoce para tal hipótesis relativa al regulador PteF, pero es posible puesto que casos de modulación cruzada entre reguladores ya se han descrito en otras ocasiones (Huang *et al.* 2005, Santos-Beneit *et al.* 2009, Santos-Aberturas *et al.* 2012).

Comparativamente, resulta también interesante que PteF tiene un menor número de dianas en su *cluster* biosintético que PimM en el suyo. De los 12 promotores existentes en la agrupación de la pimaricina, PimM reconoce 8 (Santos-Aberturas *et al.* 2011b). Por otro lado, PteF únicamente reconoce 2 de los 8 promotores que se han identificado en este trabajo en su *cluster*, estando prácticamente todos los demás genes controlados de manera indirecta. Esto hace pensar que el efecto regulador de PteF es mucho más complejo y puede abarcar diferentes niveles de regulación no sólo en la biosíntesis de filipina sino también en otras funciones. Este comportamiento pleiotrópico también está reflejado en el efecto que el regulador tiene sobre la esporulación.

3.6.2. *Footprintings*

Una vez que la unión de PimM al promotor de *pteA1* ya se había caracterizado en profundidad anteriormente (Santos-Aberturas *et al.* 2011a), procedimos al análisis mediante ensayos de protección frente a DNasa I o *footprintings* del otro promotor reconocido por PimM/PteF, el promotor de *pteA2*. Para ello se utilizaron dos versiones de la misma sonda empleada en los EMSAs, cada una marcada en un solo extremo con 6FAM. Las digestiones se llevaron a cabo con 35 μ M de GST-PimM^{DBD}, como se ha descrito en el apartado 2.12.2.

Los resultados obtenidos mostraron dos regiones protegidas en cada una de las hebras, separadas por 173 nucleótidos (Figura 3.30). Esta observación concuerda con las dos bandas de retraso obtenidas en los EMSAs con este promotor.

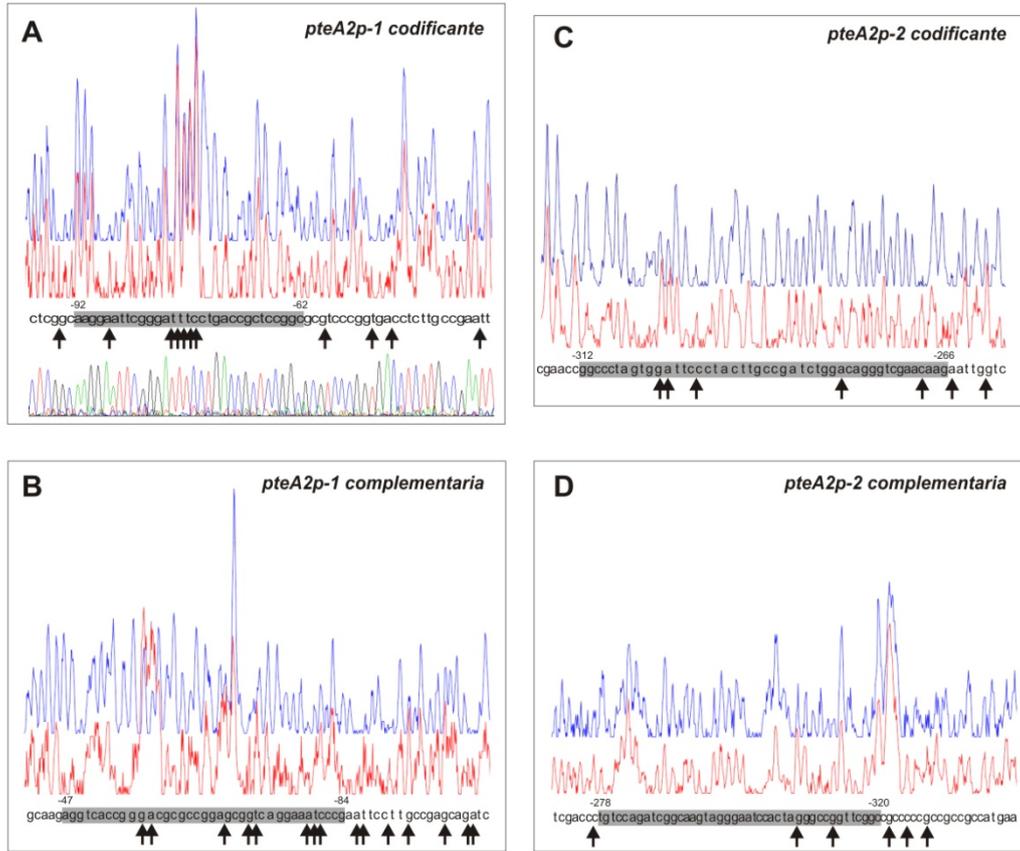


Figura 3.30. Ensayos de protección frente a DNasa I con GST-PimM^{DBD} para la sonda pteA2p. Los electroforetogramas superiores (línea azul) representan un patrón de digestión control, en ausencia de proteína, y los inferiores (línea roja) el patrón en presencia de una concentración de 35 μ M de GST-PimM^{DBD}. La secuencia nucleotídica protegida está sombreada y los picos hipersensibles están señalados con flechas. Los números sobre la caja sombreada indican la distancia al codón de inicio del gen. Se incluye solamente una de las reacciones de secuenciación realizadas (A).

La región que está más próxima a la secuencia codificante de *pteA2* tiene 31 nucleótidos de longitud (correspondiente a las posiciones -92 y -62, con respecto al GTG). En la hebra complementaria la región protegida tiene 38 bp (posiciones -84 a -47), y se observa cómo ambas regiones están desplazadas. La segunda área protegida tiene 47 bp en la hebra codificante (posiciones -312 a -266, con respecto al codón de inicio). La secuencia en la hebra complementaria tiene 43 bp (de la posición -320 a la -278) y, una vez más, ambas regiones están desplazadas unos 8-12 nucleótidos. Como era de esperar, se detectaron sitios hipersensibles para la digestión que flaquean la secuencia protegida, lo que

indica una alteración en la topología del DNA tras incubación con la proteína GST-PimM^{DBD}. También se observaron posiciones hipersensibles dentro de la secuencia, lo que sugiere que PimM dobla el DNA, haciendo que esas posiciones estén más accesibles a la DNasa I. Como se esperaba, las regiones protegidas incluyen los operadores antes identificados mediante análisis *in silico*, las secuencias T⁺TCGGGATTTCCTGAC y CTAGTGGATTCCCTAC.

La presencia de regiones protegidas en ambas hebras del DNA concuerda con la unión de un monómero de GST-PimM^{DBD} a cada una de las hebras del operador. Los sitios hipersensibles detectados indican cambios en la forma de la molécula de DNA diana, del mismo modo que se había observado en la unión del regulador a sus operadores naturales en *S. natalensis* (Santos-Aberturas *et al.* 2011b).

La identificación del TSP de *pteA2* reveló que uno de los sitios de unión del regulador coincide con la región -35 predicha, del mismo modo que ocurre en *S. natalensis*, mientras que en *pteA1* el TSP mostró que ambas regiones protegidas están lejos de la secuencia -35 de este gen (Figura 3.31). Esta conclusión fue en cierto modo sorprendente, puesto que en todos los promotores de *S. natalensis* analizados, el operador de PimM coincide con la caja -35. A pesar de que esta interacción aún corresponde a un mecanismo de clase II, donde PteF entraría en contacto con el dominio 4 de la subunidad σ de la polimerasa de RNA, y de esta forma reclutaría la polimerasa de RNA hacia el promotor, el significado de esta observación no está claro.

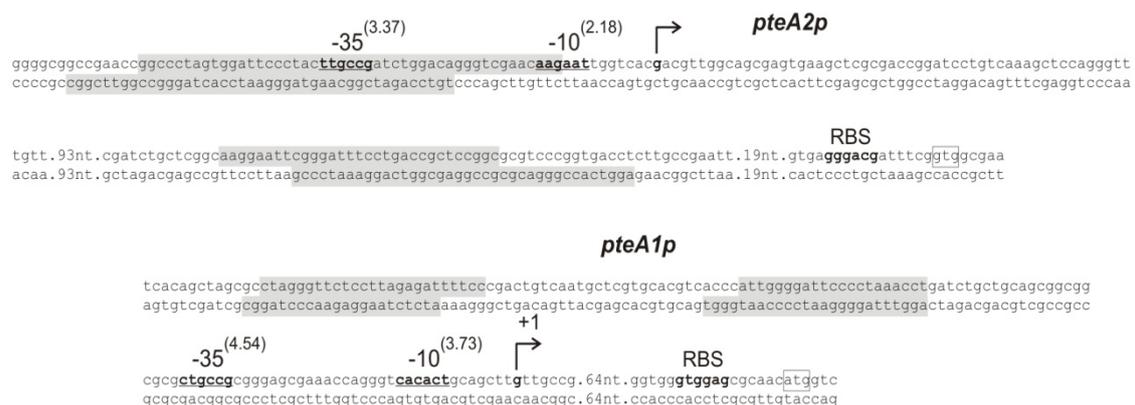


Figura 3.31. Localización de los operadores de PteF en los promotores de *pteA1* y *pteA2*. Los sitios de inicio de la transcripción se indican con flechas en ángulo recto y en negrita. Las posibles cajas -10 y -35 están en negrita y subrayadas. Los valores resultantes de la comparación con las matrices para promotores de *Streptomyces* (Bourn & Babb 1995) están entre paréntesis. Los sitios de unión a ribosomas están indicados con "RBS". El codón de inicio está enmarcado. Las secuencias nucleotídicas protegidas (operadores de PteF) están sombreadas.

En un intento de esclarecer este fenómeno, se procedió a terminar de caracterizar el promotor de *amphA* del *cluster* de la anfotericina en *S. noursei*. Al igual que *pteA2*, *amphA* codifica una PKS que también está regulada por el regulador transcripcional PAS-LuxR situado en el *cluster*, AmphRIV. En nuestro laboratorio se habían realizado anteriormente experimentos de EMSA y *footprinting* con el promotor de este gen (Santos-Aberturas *et al.* 2011a), aunque quedaba por identificar el inicio de la transcripción para posicionar relativamente la región protegida ya identificada. Los experimentos 5'-RACE ahora realizados mostraron que el TSP de *amphA* es una guanina situada a 46 bp del codón de inicio ATG, la caja -10 (TACGAT) está centrada a 9 nucleótidos del TSP, y la caja -35 CTTAGG está a 23 bp de distancia (cajas con valores de puntuación, 5,96 y 1,59, respectivamente). Así, se pudo verificar que la secuencia de unión de PimM en *amphA* coincide con la caja -35 de su promotor, en un modelo de unión similar al observado en los operadores de este regulador en *S. natalensis*. Este estudio resultó ser insuficiente para ayudar a averiguar si el caso de *pteA1p* es específico de este promotor, o si bien es común a los promotores de otras especies diferentes de *S. natalensis*. Hará falta analizar otros promotores de genes reconocidos por PimM para intentar llegar a una conclusión.

3.7. Efecto global de PteF: análisis de las dianas moleculares existentes en el genoma de *S. avermitilis*

De un modo similar a lo que se hizo para el *cluster pte*, se procedió a realizar una búsqueda bioinformática en el genoma completo de *S. avermitilis* de secuencias que se ajustasen al operador consenso de PimM. Puesto que en este caso se iba a manejar mucho más información que anteriormente, se hizo uso de algoritmos para realizar la búsqueda. Tras varias pruebas, finalmente decidimos utilizar el algoritmo Cluster-Buster, una herramienta diseñada específicamente para buscar patrones de secuencia utilizando una matriz de posiciones y puntuaciones (Frith *et al.* 2003). Nos basamos en el logotipo de la secuencia consenso para diseñar la matriz. Puesto que el método se basa únicamente en la matriz, se diseñaron varias versiones de la misma hasta encontrar una con la que se obtenían buenos resultados. Para testarla, se usó el *cluster* de la pimaricina en *S. natalensis* y los operadores naturales para PimM ya identificados. Los resultados obtenidos confirmaron que nuestra matriz era capaz de encontrar todos los operadores, aunque quedó patente que es más eficaz en aquellas secuencias que más se parecen a la secuencia consenso, i.e. cuando el valor R_i es más elevado. A continuación, se procedió a la búsqueda de

operadores de PteF/PimM en el genoma de *S. avermitilis*, utilizando la matriz descrita en el Anexo II de esta memoria.

3.7.1. Búsqueda y análisis bioinformática

La búsqueda *in silico* en genoma de *S. avermitilis* de secuencias de DNA similares al operador de PimM, reveló 101 posibles sitios de unión de los cuales 97 se encontraban fuera del *cluster* biosintético de la filipina. El listado de estos operadores, su localización, secuencia, valor de información (Ri) y el proceso o gen presuntamente afectado por el regulador PteF/PimM, está en el Anexo III de esta memoria. Cuando el objeto de la regulación no se pudo deducir por la localización del sitio de unión al DNA, se indican ambos genes.

De entre los 97 nuevos posibles operadores encontrados, un 44 % (43) están localizados en regiones intergénicas corriente arriba de genes. Así, y de acuerdo con el modo de acción de PimM (Santos-Aberturas *et al.* 2011a,b), hemos considerado estas regiones como posibles regiones promotoras de genes bajo control del regulador. Sin embargo, un 56 % de estos operadores (54) fueron sorprendentemente identificados en regiones codificantes de genes. De entre estos últimos, 8 están situados en el extremo 3' de los genes, por lo que podrían corresponder a promotores de los genes situados corriente abajo, algo que ya hemos descrito en los promotores de *pteA2* y *pteA3* del *cluster* de la filipina. Se encontraron otros 17 operadores en el extremo 5' de determinados genes, y también podrían formar parte de promotores si se considera que estos genes podrían estar mal anotados, como es el caso de *pteF* descrito en este trabajo. Un ejemplo de gen encontrado durante el análisis que podría estar mal anotado es el gen SAV4235, de mayor tamaño que todos sus ortólogos. La anotación errónea de genes es algo que ocurre con cierta frecuencia, la mayoría de las veces debido a que las anotaciones en proyectos de secuenciación de genomas se realizan de manera automática por comparación con otros genomas presentes en bases de datos, por lo que un error en un proyecto se puede propagar a los demás. Los restantes operadores en regiones codificantes, por su localización, se consideraron que no estaban en regiones promotoras: 11 están situados en la región 5' de determinados genes (definida como más de 300 nucleótidos hacia dentro del gen), 4 en la región 3', y 14 considerablemente más hacia el centro del gen. La búsqueda detectó otros 4 operadores que, por su localización en regiones intergénicas entre genes convergentes, se descartaron en el primer análisis.

La localización de los posibles operadores sugiere que PteF puede afectar procesos del metabolismo primario y secundario

Los operadores encontrados están distribuidos por todo el genoma, tanto en las regiones laterales como en la región central del cromosoma (Figura 3.32A). Su localización permitió deducir qué procesos podrían ser objeto de control por parte del regulador (Figura 3.32B).

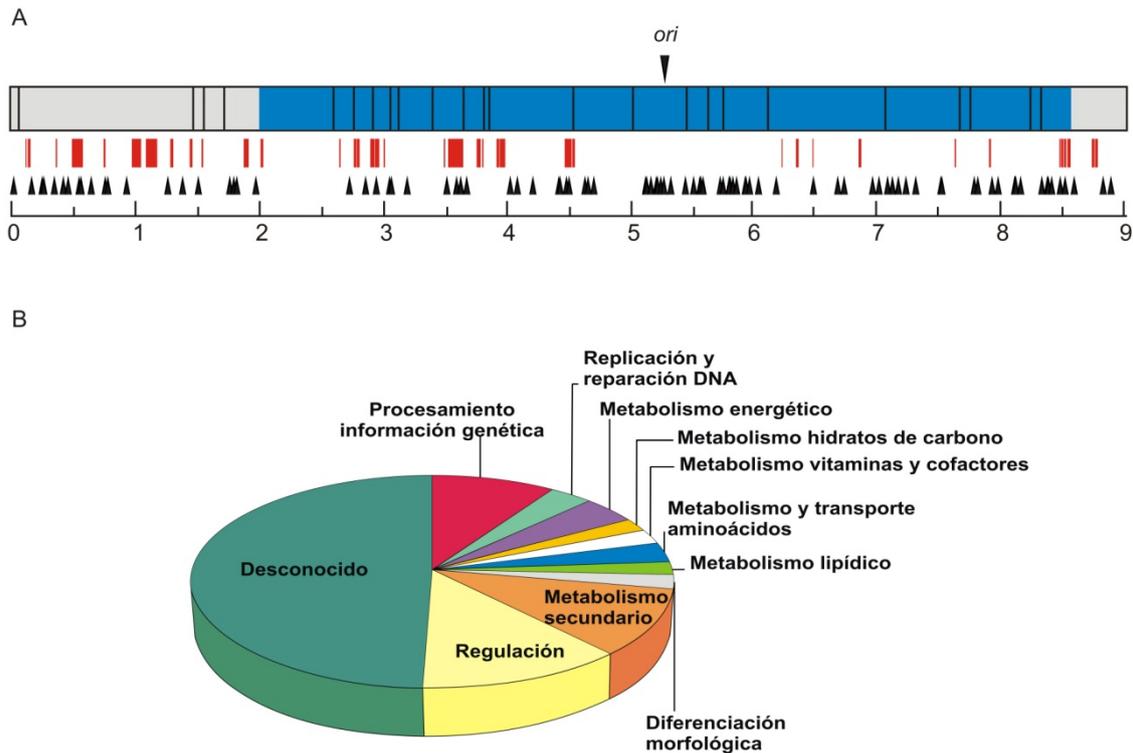


Figura 3.32. Localización de operadores de PteF/PimM en el genoma de *S. avermitilis* y los procesos metabólicos controlados por el regulador. (A) Esquema del cromosoma, con el mapa de restricción AseI. La región cromosómica central está delimitada (azul) y se marca el origen de replicación. Los operadores se indican con flechas negras y las agrupaciones génicas de metabolitos secundarios presentes en el genoma se indican a rojo. Se muestra una escala en megabases. (B) Procesos metabólicos controlados por PteF/PimM.

Respecto al **metabolismo secundario**, se encontraron operadores en 5 *clusters* biosintéticos, concretamente en el de la filipina (*pte*), oligomicina (*olm*), dos péptidos no ribosomales (*nrps5* y *nrps6*) y en el *cluster* para la melanina (*melC-2*). Además de los genes *pteA1* y *pteA2* en el *cluster* de la filipina, las posibles dianas del regulador incluyen los genes de la oligomicina *olmA1* y *olmA2* (SAV2899 y SAV2898, respectivamente), los genes del *nrps6* SAV602 y SAV610, los genes para la melanina SAV5361 y SAV5362, y los genes del *nrps5* SAV6631 y SAV6632.

Otras dianas del regulador incluyen genes involucrados en procesos del **metabolismo primario**, como por ejemplo (Figura 3.32B):

- Procesamiento de la información genética: RNAs no codificantes como los tRNAs SAVt65 y SAVt32, y el componente de RNA de la RNasa P RnpB (SAVm3), la 2'fosfotransferasa de tRNA dependiente de NAD⁺ SAV4235, la metilasa de rRNA TsnR1 (SAV4357), la proteína S10 del ribosoma 30S RpsJ (SAV4925), el factor de elongación Tu SAV7028 (*tufA2*), y los presuntos factores sigma sig 40 (SAV4561) y sig45 (5123).
- Replicación y reparación del DNA: la helicasa SAV4155, subunidad B de la nucleasa ABC de excisión UvrB (SAV6273), y la proteína de recombinación y reparación del DNA RecN (SAV6499).
- Metabolismo energético: la monooxigenasa alkanosulfanato SAV1208, la subunidad I de la citocromo oxidasa de ubiquinol SAV4260 (*cydA1*), y dos genes del sistema *nuo* de NADH-deshidrogenasa SAV4881 (*nuoA2*) y SAV4890 (*nuoN2*).
- Metabolismo de hidratos de carbono: los genes del metabolismo del mio-inositol SAV7150-SAV7147 y/o SAV7151-SAV7154, y la epimerasa de UDP-glucosa SAV1662 (*galE6*).
- Metabolismo de vitaminas y cofactores: la glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutasa SAV4795 (*hemL*) y la proteína de la competencia inducible por daños SAV2506 (*cinA*).

Se identificaron, además, otros procesos como la biosíntesis de ácidos grasos (beta-ketoacil sintasa II FabB2 (SAV2944)), la biosíntesis de fosfolípidos (O-aciltransferasa de 1-acilglicerol-3-fosfato PlsC1 (SAV1485)), el transporte y metabolismo de aminoácidos (sintasa de antranilato SAV6803, aminotransferasa de D-alanina SAV6804, y el transportador ABC de aminoácidos GltI3 (SAV7210)), y la diferenciación morfológica (proteasas Clp dependientes de ATP, ClpC1 (SAV2600) y ClpC2 (SAV4697)).

También aparecen como afectados 11 reguladores transcripcionales, incluyendo SAV1209 y SAV4773 (de la familia LysR), SAV1619 y SAV4231 (familia GntR), SAV2845, SAV3619 y SAV4782 (familia TetR), SAV6982 (familia MerR), SAV7057 (familia AsnC), y el regulador pleiotrópico AfsR SAV3804 (familia SARP). Curiosamente, la quinasa de serina/treonina AfsK SAV4717 que fosforila AfsR, también aparece afectada.

Este análisis de la posición de los operadores encontrados reveló además otros detalles interesantes. Por ejemplo, que existen ciertas zonas del genoma donde se concentran operadores: en los genes SAV4231 y SAV4235, los genes SAV4561, SAV4562 y SAV4562, en la región intergénica SAV4880-1 y en el SAV4890, en los genes SAV6272 y SAV6273, y a la vez en el SAV6802, la región intergénica SAVt32-SAV6803 y en el SAV6805. En este último caso, la presencia de todos estos operadores podría significar una modulación negativa de la transcripción de los cinco tRNAs presentes entre SAV6802 y SAV6803 (*trn32* a *trn36*), con la formación de un *loop* por la unión de cuatro moléculas del regulador. De ser éste el caso, las repercusiones serían formidables, puesto que los tRNAs *trn34*, *trn35* y *trn36* son los únicos capaces de leer el codón GAC para la valina.

El caso de los genes SAV4881 (*nuoA2*) y SAV489 (*nuoN2*), resulta aún más interesante porque los dos operadores aquí encontrados podrían, por la organización transcripcional que presentan los genes adyacentes (casos de co-transcripción por la superposición de las secuencias de genes), afectar a todo el sistema respiratorio *nuo* (Ingledeew & Poole 1984). Existen otros 15 casos como éste entre las posibles dianas del regulador identificadas (ver Anexo III). Pero además, la diana SAV4881 presenta otra peculiaridad que es el hecho de que la secuencia del operador ahí encontrado es exactamente igual a la encontrada en la región intergénica SAV6498-SAV6499. Otro ejemplo de secuencias de operadores repetidas se encontró en los genes SAV2600 (ClpC1) y SAV4697 (ClpC2), ambas proteasas dependientes de ATP y, como ya se ha mencionado anteriormente, ambas relacionadas con la diferenciación morfológica. Esto sugiere que el regulador reconoce una secuencia única para controlar todo un sistema, posiblemente de manera a optimizar las señales. Curiosamente, también se observó que aparecen afectadas diferentes dianas relacionadas con una misma función o sistema, e.g. los genes para la reparación de DNA *recN* (SAV6499) y *uvrB* (SAV6273). Otro ejemplo de un proceso que podría estar severamente afectado por la localización de un operador es el metabolismo del mio-inositol, dado que el operador se sitúa en la región intergénica entre SAV7150-SAV7151 (*iolC2* y *iolTA*, respectivamente) y la transcripción de todos los demás genes relacionados con este proceso posiblemente tenga lugar a partir de un promotor bidireccional situado en esta zona.

3.7.2. Validación de la búsqueda bioinformática

Para validar nuestras predicciones, se seleccionaron 17 posibles sitios de unión para manera a cubrir un amplio abanico de situaciones. Así, se escogieron operadores con valores R_i altos y bajos, posiblemente involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios o en el metabolismo primario, y que estuviesen distribuidos uniformemente por todo el genoma, independientemente de su localización en regiones promotoras o dentro de genes. Estos operadores seleccionados se encuentran indicados en la Tabla 3.5, donde se muestra además su secuencia, valores R_i y el nombre del gen diana cuando es conocido. La Figura 3.33 muestra la posición relativa de dichos operadores en el cromosoma. Las sondas utilizadas en los EMSA, así como los primers empleados para su síntesis, se indican en la Tabla 3.6.

De entre los sitios de unión seleccionados, dos se encuentran en el *cluster* para la oligomicina, uno localizado corriente arriba de *olmA1* (PKS de tipo I) en la región intergénica entre este gen y el pseudogen SAV2900, y el otro en la región codificante de *olmA2* (PKS tipo I) (Figura 3.33). Esto sugiere que la expresión de estos genes puede estar controlada por PteF o un ortólogo PAS-LuxR.

Otros dos operadores flanquean el *cluster* de un sideróforo no ribosomal (*nmps6*), concretamente en el gen SAV602 (codifica una posible proteína de unión a sideróforos) y corriente arriba de SAV610 (un posible transportador de la superfamilia MFS). El SAV602 podría formar un sistema de transporte ABC con los genes localizados corriente abajo SAV601 y SAV600, y todos juntos podrían formar un operón dado que están dispuestos consecutivamente en el cromosoma y sus productos muestran homología con el sistema de transporte de dicitrato férrico FecBCD (Staudenmaier *et al.* 1989).

Tabla 3.5. Lista de operadores seleccionados.

Posible diana	Hebra	Secuencia	valor <i>Ri</i>	Nombre gen
SAV602	+	ctcggacattccgtag	8.85	<i>fecB</i>
	-	ctacggaatgtccgag	8.25	
SAV610	+	tttggaatttccacag	4.99	-
	-	ctgtggaaattccaaa	3.61	
SAV1485	+	ctgggaaaactccgag	8.18	<i>plsC1</i>
	-	ctcggagttttcccgag	8.36	
SAV1619	+	tcagggaaatcctcggg	8.55	-
	-	cccgaggattccctga	6.25	
SAV2600	+	ctcgggatttcgctcg	8.01	<i>clpC1</i>
	-	cgagcgaatcccgag	8.08	
SAV2898	+	ccaggaaatccgccag	6.62	<i>olmA2</i>
	-	ctggcggatttcctgg	4.83	
SAV2899	+	ctaggaaaatgcgaag	4.58	<i>olmA1</i>
	-	cttcgcattttcctag	3.88	
SAV2943 o SAV2944	+	ctcggagattccctac	13.39	-
	-	gtagggaaatctccgag	12.39	
SAV3804	+	ctcgggcatccctca	6.40	-
	-	tgagggaaatgcccgag	6.85	
SAV4155	+	ctcgggaaattccttga	13.22	-
	-	tcaaggaattcccgag	13.36	
SAV41654 o SAV4165	+	atcgggaaattcatag	9.34	-
	-	ctatgaatttcccgat	11.29	
SAV4561 y SAV4562	+	ctggggatatacgctgg	8.58	-
	-	ccagcgatatccccag	9.20	
SAV4717	+	gccgggaaataaccgaa	9.67	<i>pkn16</i>
	-	ttcggatatttcccggc	10.13	
SAV4772 o SAV4773	+	ccatagaaatccgcat	2.42	-
	-	atgcggaatttctatgg	3.94	
	+	ccatgagattcctgat	7.56	
	-	atcaggaatctcatgg	4.87	
SAV4924 o SAV4925	+	gtagggaaatccatat	12.08	-
	-	atatggatttccctac	12.76	
SAV5123	+	ctgggggaacccccgg	7.51	<i>sig45</i>
	-	ccgggggttccccag	8.52	
SAV7210	+	ccagggatttcctgag	16.02	<i>glt3</i>
	-	ctcaggaatccctgg	13.81	

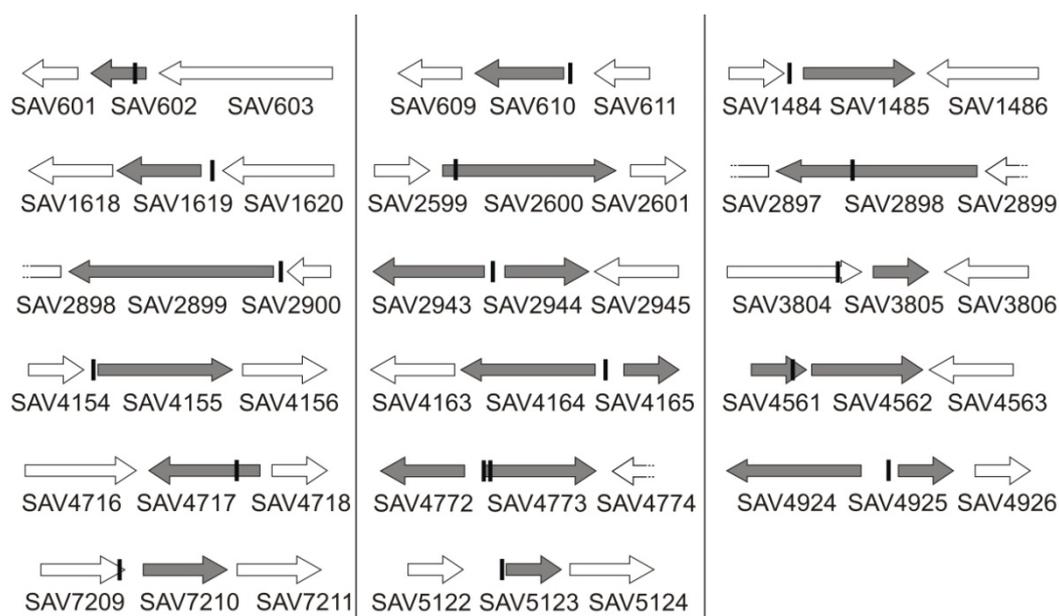


Figura 3.33. Localización relativa de los operadores seleccionados de PteF/PimM en el cromosoma de *S. avermitilis*. Las flechas indican la orientación de la transcripción génica (el tamaño de las flechas no es proporcional al tamaño de los genes). La localización relativa de cada operador se indica con una barra vertical negra. Los genes posiblemente afectados se indican en gris, y en los casos en los que no se pudo determinar el gen afectado (genes divergentes) se indican ambos genes en gris.

Además de los anteriores, otros seis operadores seleccionados están presuntamente relacionados con el metabolismo secundario. El primero está localizado dentro del gen SAV2600 (*clpC1*), que codifica una proteasa Clp dependiente de ATP que se ha relacionado con la diferenciación en *S. lividans* (Bellier *et al.* 2006). Dos están posicionados afectando al SAV4773 (*abaB2*) (uno en la región intergénica entre SAV4772-SAV4773 y otro dentro del gen), un regulador transcripcional que se ha relacionado con la biosíntesis de actinorrodina y undecilprodigiosina (Scheu *et al.* 1997). Otro está situado corriente arriba del SAV5123 (*sig45*), cuyo producto muestra una alta similitud (94,5 % identidad) con SigU de *S. coelicolor*, un factor sigma de una RNA polimerasa con función extracitoplasmática que se ha descrito como involucrado en la diferenciación morfológica (Gehring *et al.* 2001, Gordon *et al.* 2008). Por último, dos operadores seleccionados afectan al gen SAV3804 (dentro del gen), cuyo producto es un ortólogo de AfsR, y al gen SAV4717 (*pkn16*) (un sitio de unión al DNA en la secuencia codificante del gen), que codifica un ortólogo de AfsK. El sistema AfsK-AfsR en el estreptomiceto *S. coelicolor* A3(2), como ya se ha mencionado anteriormente, ejerce un control global sobre el metabolismo secundario (Horinouchi 2003).

Tabla 3.6. Lista de las sondas utilizadas en los EMSA de los operadores seleccionados.

Sonda	Primers	Tamaño (bp)
SAV602	E-sav602 fw / E-sav602 rev	485
SAV610	E-sav610 fw / E-sav610 rev	305
SAV1485	E-sav1485 fw / E-sav1485 rev	271
SAV1619	E-sav1619 fw / E-sav1619 rev	214
SAV2600	E-sav2600 fw / E-sav2600 rev	428
SAV2898	E-sav2898 fw / E-sav2898 rev	183
SAV2899	E-sav2899 fw / E-sav2899 fw	275
SAV2943/4	E-sav2943/4 fw / E-sav2943/4 rev	759
SAV3805	E-sav3804/5 fw / E-sav3804/5 rev	211
SAV4155	E-sav4155 fw / E-sav4155 rev	479
SAV4164/5	E-sav4164/5 fw / E-sav4164/5 rev	1058
SAV4561/2	E-sav4561/2 fw / E-sav4561 /2rev	392
SAV4717	E-sav4717/8 fw / E-sav4717/8 rev	810
SAV4772/3	E-sav4772/3 fw / E-sav4772/3 rev	387
SAV4924/5	E-sav4924/5 fw / E-sav4924/5 rev	645
SAV5123	E-sav5123 fw / E-sav5123 rev	374
SAV7210	E-sav7210 fw / E-sav7210 rev	219

De entre las posibles dianas del regulador también se seleccionaron tres operadores que posiblemente afectarían al metabolismo primario. Uno de ellos está localizado corriente arriba del gen SAV1485 (*p_{lsC1}*), una acetiltransferasa presuntamente involucrada en la biosíntesis de fosfolípidos (Yao & Rock 2013). El segundo está corriente arriba del gen SAV4155, que codifica una helicasa de RNA DEAD-box dependiente de ATP. Las helicasas de RNA de esta familia se pueden encontrar en casi todos los organismos y tienen funciones importantes en el metabolismo del RNA (Rocak & Linder 2004). El tercer operador está situado corriente arriba del gen SAV7210 (dentro del SAV7209), que codifica una presunta proteína periplásmica de unión a sustrato de un transportador de aminoácidos polares de tipo ABC (Linton & Higgins 1998).

Los demás operadores seleccionados consistieron en uno situado en el gen SAV4561 (*sig40*) que es un factor sigma 40 de la RNA polimerasa de la familia ECF, uno corriente arriba del gen SAV1619 que codifica un presunto regulador transcripcional de la familia GntR, y tres situados en regiones intergénicas entre genes con transcripción divergente: la intergénica SAV2943-SAV2944 (el SAV2944 codifica una presunta 3-oxoacil-ACP sintasa II), SAV4164-SAV4165 (el SAV4164 codifica una posible proteína de membrana), y SAV4924-SAV4925 (el SAV4925 codifica una posible proteína ribosomal S10 de la subunidad ribosomal 30S). Debido a su localización corriente arriba de dos genes divergentes, no se pudo deducir la diana del regulador para estos últimos operadores.

Los EMSA de los operadores seleccionados corroboran las predicciones *in silico*

Los operadores seleccionados arriba descritos se utilizaron para corroborar las predicciones bioinformáticas mediante ensayos EMSA con GST-PimM^{DBD} (Santos-Aberturas *et al.* 2011b) y sondas de DNA marcadas que contenían dichos operadores. Para cada sonda se realizaron dos reacciones de control negativo, en ausencia de proteína y empleando únicamente la GST purificada aparte.

La proteína fue capaz de retrasar todas las sondas seleccionadas, validando así nuestras predicciones (Figura 3.34).

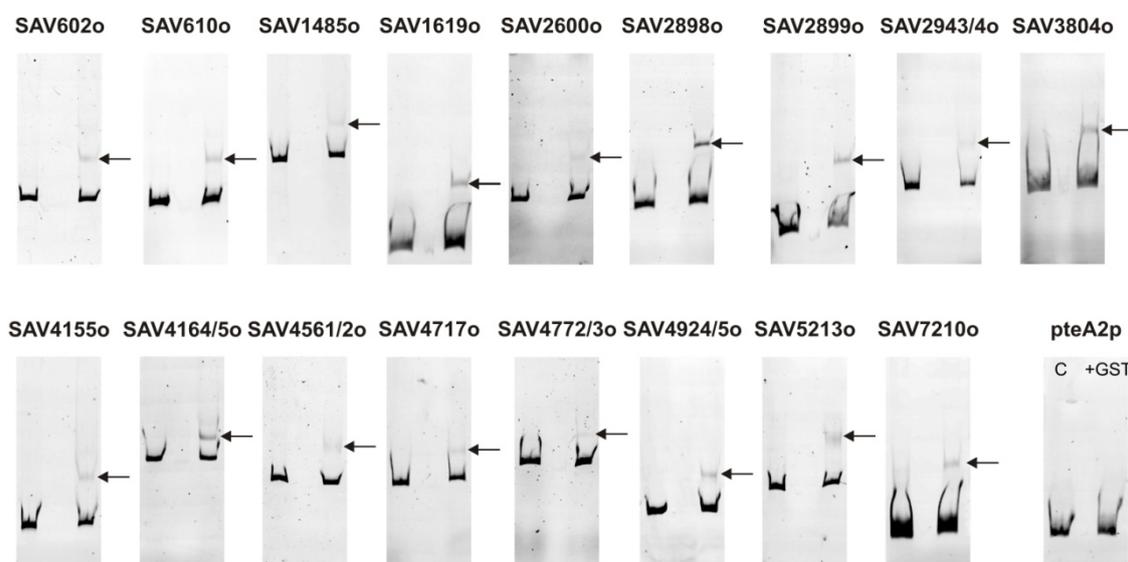


Figura 3.34. Ensayos EMSA. Análisis de la unión de la proteína GST-PimM^{DBD} a diferentes sondas que contienen los operadores seleccionados. Se utilizaron 10 ng de sonda marcada por ensayo que incluye: un control sin proteína (panel izda.) y la reacción con 20-160 nM de GST-PimM^{DBD} (panel dcha.). Las sondas utilizadas se identifican sobre cada imagen, y las flechas indican los complejos DNA-proteína detectados. Se incluye una reacción control con la región promotora pteA2p (que contiene dos operadores) y 60 μ M de GST pura.

Se realizaron además ensayos empleando concentraciones crecientes de proteína y ensayos de competencia directa e indirecta (Figura 3.35). En todos los casos la intensidad de las bandas retrasadas disminuyó cuando se adicionó la misma sonda sin marcar, y aumentó utilizando concentraciones más altas de proteína. Por otro lado, la adición de una sonda inespecífica (sin sitio de unión) no marcada no produjo ningún efecto.

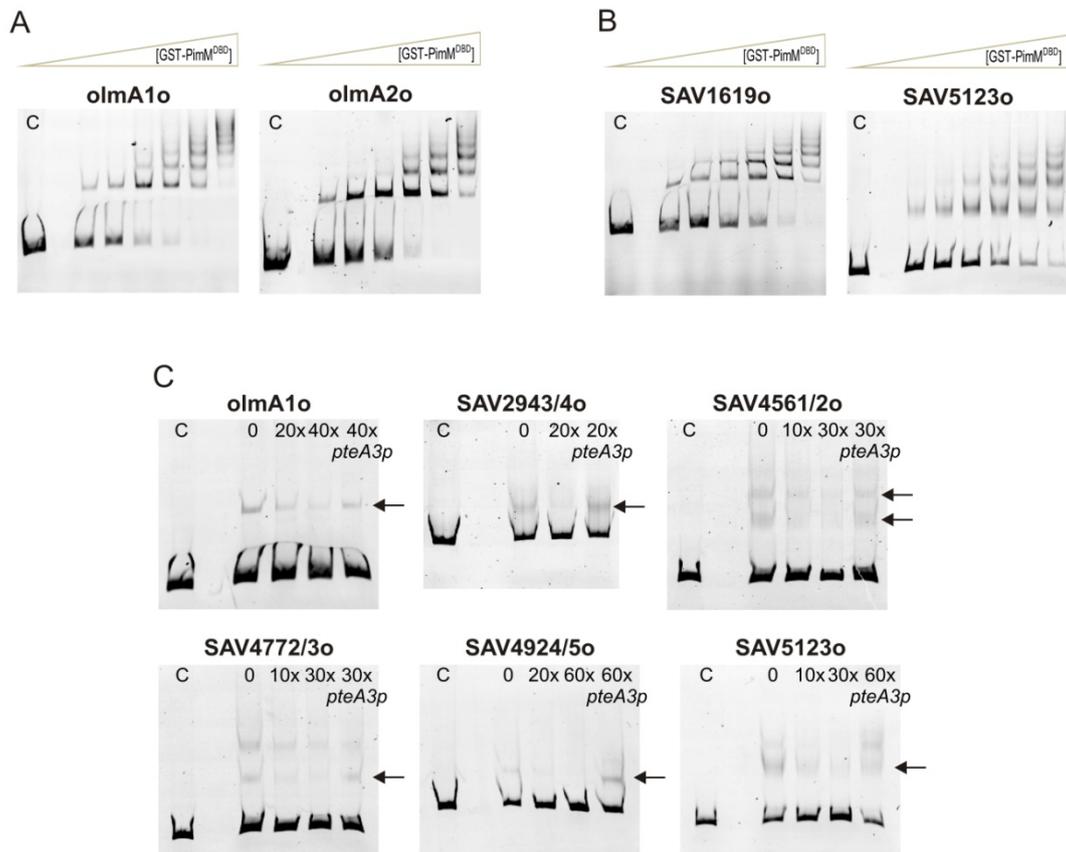


Figura 3.35. EMSA de competencia para varios operadores. (A) Uso de concentraciones crecientes de GST-PimM^{DBD} con sondas que contienen los sitios de unión de *olmA1* y *olmA2*, y (B) con sondas conteniendo los operadores de SAV1619 y SAV5123. (C) Competencia entre las mismas sondas marcadas y sin marcar, y competencia entre sondas marcadas y la sonda inespecífica *pteA3p* sin marcar. Nótese como concentraciones 30 a 60 veces superiores de sonda inespecífica no son capaces de disminuir la intensidad de las bandas retrasadas. Todos los ensayos se llevaron a cabo con 10 ng de sonda marcada y 50-200 nM de GST-PimM^{DBD}. Los carriles marcados con “C” contienen las reacciones control sin proteína.

Los fragmentos de DNA que contenían los operadores localizados en el *cluster* de la oligomicina fueron retrasados por la GST-PimM^{DBD}, lo que sugiere que ambos genes *olmA1* y *olmA2* están sujetos a un control regulador por parte de PteF (Figura 3.35A). Mientras que utilizando la concentración mínima de proteína necesaria para retrasar la sonda sólo se observó una banda, concentraciones crecientes de proteína resultaron en múltiples bandas

de retraso para ambas sondas. Esta observación es consistente con la formación de multímeros resultantes de interacciones proteína-proteína (Cann 1998). De hecho, el dominio HTH LuxR de reguladores PAS-LuxR presentan una interfaz de dimerización muy similar a la de otros reguladores transcripcionales de tipo LuxR como TraR de *Agrobacterium tumefaciens* (Vannini *et al.* 2002), DosR de *Mycobacterium tuberculosis* (Wisedchaisri *et al.* 2005), o NarL de *E. coli* (Maris *et al.* 2002). También se observaron múltiples bandas de retraso para todas las sondas probadas, como se ejemplifica para las sondas SAV1619 y SAV5123 Figura 3.35B.

En la Figura 3.35C se pueden observar algunos de los ensayos de competencia realizados. En todos ellos, la adición de la misma sonda fría produjo la disminución de la intensidad de la banda, mientras que la adición de otras sondas sin sitio de unión, como la sonda pteA3p no interfirió en la unión. Esto indica que la unión de GST-PimM^{DBD} a las sondas que contenían los operadores seleccionados era en todos los casos de tipo específico.

El análisis bioinformático del genoma de *S. avermitilis* en busca de sitios de unión para el regulador PteF en base a la secuencia del operador de PimM, se asienta en el alto grado de identidad que estos reguladores comparten y en la conservación funcional demostrada en este trabajo, además de en otros anteriores (Santos-Aberturas *et al.* 2011a). Este análisis reveló 101 posibles operadores (97 fuera del *cluster* de la filipina) que, sorprendentemente, están distribuidos por todo el genoma y más de la mitad está situado en secuencias codificantes de genes. Aunque en algunos casos el proceso potencialmente afectado no se pudo deducir a partir de la localización del operador, es interesante constatar que las posiciones de otros operadores apuntan hacia procesos no sólo del metabolismo secundario si no también del metabolismo primario. Algunos de los procesos posiblemente afectados son tan esenciales como el procesamiento de la información genética, la replicación y reparación del DNA, el metabolismo energético, o el metabolismo de hidratos de carbono.

En la parte anterior de este trabajo ya se había evidenciado que PteF era capaz de regular indirectamente algunos genes del cluster de la filipina. Lo cual, unido al diferente ritmo en la formación de esporas que presenta el $\Delta pteF$ cuando se compara con la cepa silvestre, nos permitió especular que el regulador podría tener la capacidad de unirse a operadores fuera de su cluster y de este modo afectar otros procesos a parte de la biosíntesis del polieno. Los resultados ahora obtenidos confirman esta posibilidad y

demuestran que PteF actúa de manera promíscua, uniéndose al genoma en diferentes regiones y posiblemente afectando a diferentes procesos del metabolismo tanto secundario como primario. Aunque harán falta más verificaciones para comprobar e identificar los efectos directos de PteF, parece claro que los reguladores PAS-LuxR no se pueden seguir considerando como específicos de ruta, si no que deben ser incluidos en el grupo de reguladores cuyo rango de actuación es más amplio. Para comprobar este extremo, decidimos estudiar el efecto que *pteF* tenía sobre la biosíntesis de oligomicina, cuyo *cluster* presenta dos operadores.

3.7.3. Prueba de concepto: análisis del efecto sobre la producción de oligomicina

De entre los operadores identificados bioinformáticamente, llamó la atención la presencia de varios situados en *clusters* biosintéticos de metabolitos secundarios. Éstos se podrían utilizar para validar las predicciones hechas. Sin embargo, la mayoría de estas agrupaciones codifican compuestos poco estudiados, de difícil caracterización, y para los que no existían muestras puras comerciales para su comparación. La excepción fue la oligomicina, un macrólido de 26 átomos de carbono con propiedades antibióticas cuyos genes biosintéticos están agrupados en el *cluster olm*, y del cual se comercializan el complejo más o menos puro, y también su componente mayoritario altamente purificado, la oligomicina A.

3.7.3.1. Producción de oligomicina

El primer paso fue estudiar si el mutante $\Delta pteF$ tenía afectada la capacidad de producir oligomicina. Para ello se analizaron caldos de fermentaciones de la cepa mutante y de la cepa silvestre, y se compararon los niveles de oligomicina A (el proceso de preparación y análisis de las muestras fue idéntico al realizado para la filipina, y se describe en el apartado 2.14.3).

Los resultados del análisis mediante HPLC mostraron una disminución considerable en los títulos de producción de la cepa $\Delta pteF$. El mutante sólo produjo en torno a un 32 % de oligomicina A cuando se comparaba con la cepa silvestre a las 48h de fermentación (ca. 1 $\mu\text{g/ml}$). Esto indicaba que PteF, regulador específico de ruta de la filipina, también se comportaba como un modulador positivo de la biosíntesis de oligomicina (Figura 3.36A).

Para confirmar que la delección del regulador era directamente responsable del déficit de producción de oligomicina observado, se estudió la producción en la cepa complementada *S. avermitilis* $\Delta pteF$ /pSETneo::pteF, comparándola con la cepa control *S. avermitilis*/pSETneo (ver apartado 3.2.4.1). La cepa control mostró una producción ligeramente más baja que la cepa silvestre (0,91 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a las 48h, mientras que la cepa complementada mostraba una recuperación de los niveles de producción (0,86 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Figura 3.36B). En conjunto, estos resultados confirmaban que PteF estaba involucrado en la biosíntesis de oligomicina, actuando como un regulador positivo.

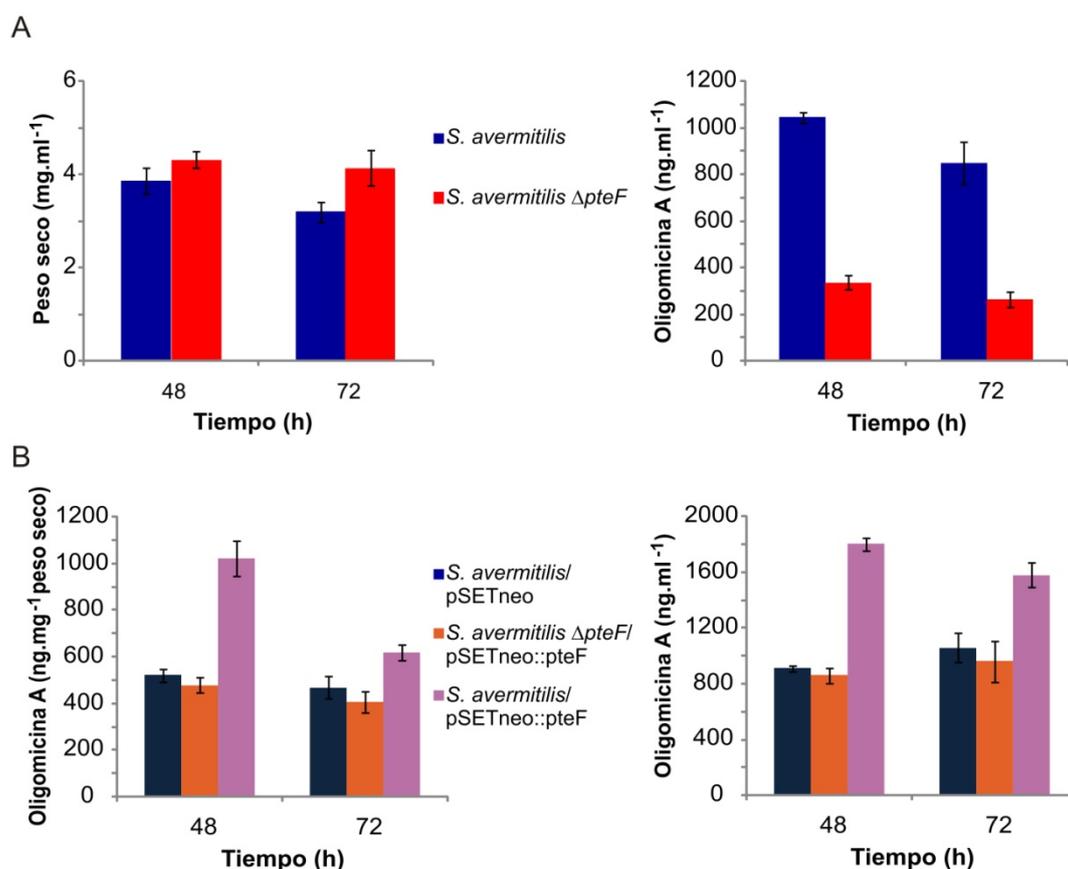


Figura 3.36. Efecto de PteF en la producción de oligomicina. (A) Gráficas de crecimiento (izda.) y producción volumétrica de oligomicina A (dcha.) en las cepas silvestre y mutante. (B) Gráficas de producción específica (izda.) y volumétrica (dcha.) de oligomicina A en las cepas control, complementada y suplementada. Las tres cepas tienen perfiles de crecimiento similares. Las barras verticales representan la desviación estándar entre tres réplicas biológicas.

Se analizó además la producción de oligomicina en la cepa suplementada *S. avermitilis*/pSETneo::pteF, y los resultados mostraron que una copia extra de *pteF* producía un aumento sustancial de la producción específica de oligomicina A (Figura 3.36B). Se registró un aumento de 2 veces a las 48h, y de 1,5 veces a las 72h con respecto a la cepa control, hasta un máximo de 1,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de oligomicina A alcanzado a las 48h.

3.7.3.2. Caracterización de los promotores de *olmA1* y *olmA2*

De acuerdo con el modo de acción descrito para los reguladores PAS-LuxR (Santos-Aberturas *et al.* 2011a,b), éstos se unen a operadores situados en los promotores de determinados genes biosintéticos. Y éste podría ser el caso para el operador identificado corriente arriba de *olmA1* en la región intergénica con el gen SAV2900, pero resultaba poco probable que el segundo operador identificado en el centro de la secuencia codificante de *olmA2* se localizase en un promotor debido a su situación a 5513 nucleótidos del codón ATG de *olmA3*. Sorprendentemente, un análisis más detallado de la posición de este operador mostró que estaba localizado inmediatamente antes de la secuencia de DNA que codifica el dominio KS del módulo 6 de *OlmA2*. Esta intrigante observación hizo que nos planteásemos la posibilidad de que existiese un promotor interno (secundario) en dicha región.

Para caracterizar ambos promotores y responder a esta cuestión, se procedió a determinar los inicios de la transcripción de *olmA1* y *olmA2* mediante 5'-RACE. Se diseñaron los ensayos de manera que permitieran detectar promotores en las regiones corriente arriba de ambos genes, y también un posible promotor interno en *olmA2*. Los *primers* utilizados, así como sus secuencias y valores de T_m, se pueden encontrar en el Anexo I.

Sólo se obtuvieron resultados positivos para el promotor de *olmA1*, y su TSP se identificó en una guanina localizada 135 bp corriente arriba del codón de inicio de la traducción ATG. El análisis de esa región por comparación con las matrices para promotores de *Streptomyces* (Bourn & Babb 1995) reveló la presencia de una caja -10 TCGGAT (puntuación 3,07), centrada a 12 nucleótidos del sitio +1, y una caja -35 TAGTGG (puntuación 1,44) separada por 21 nucleótidos (Figura 3.37).

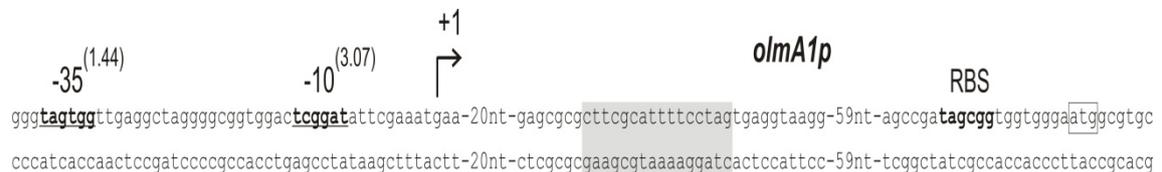


Figura 3.37. Inicio de la transcripción de *olmA1*. El TSP se indica con una flecha en ángulo recto y "+1". Las secuencias -10 y -35 están en negrita y subrayadas, y sus valores de puntuación están indicados entre paréntesis. Los nucleótidos que mostraron homología con el RNA 16S, que podrían constituir el sitio de unión a ribosomas, se marcan con "RBS". El codón de inicio ATG está enmarcado. El operador de PteF está sombreado.

Estos resultados indican que *olmA1* y *olmA2* se co-transcriben a partir del mismo promotor, y que PteF podría controlar su transcripción uniéndose al promotor de *olmA1*. Asimismo, estos resultados están de acuerdo con el efecto que el regulador tiene sobre la producción de oligomicina.

3.7.3.3. Análisis transcripcional del *cluster* biosintético de la oligomicina

Dado que PteF reconoce los operadores de *olmA1* y *olmA2*, y visto el efecto que tiene sobre la producción de oligomicina, se procedió a realizar un análisis cuantitativo de la expresión de los genes *olm* en el mutante $\Delta pteF$.

El *cluster* biosintético de la oligomicina está formado por 18 genes (Ikeda *et al.* 2003). Existen 7 genes que codifican PKSs responsables de la biosíntesis del esqueleto policetídeo de la oligomicina, SAV2892, SAV2893, SAV2895, SAV2896, SAV2897, SAV2898 y SAV2899 (*olmA1* a *olmA7*), y 2 genes que codifican reguladores transcripcionales, SAV2901 y SAV2902 (*olmRI* y *olmRII*) (Figura 3.38). Los restantes genes están relacionados con las modificaciones que sufre la molécula post-PKS: el gen SAV2889 (*fadCA*) que codifica una 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, el gen SAV2890 (*ccrA1*) que codifica una crotonil-CoA reductasa, el gen SAV2891 que codifica una proteína hipotética, SAV2894 (*olmB*) que codifica una citocromo P450 monooxigenasa, el gen SAV2900 que constituye un pseudogen, el gen SAV2903 (*olmC*) que codifica una tioesterasa discreta, el gen SAV2904 que codifica una presunta fosfoesterasa, el gen SAV2905 (*pptA1*) que codifica una fosfopanteteínil transferasa, y el gen SAV2906 (*mcmA1*) que codifica la subunidad α de una metilmalonil-CoA mutasa (Figura 3.38). Para el análisis de la expresión del *clusters*, se seleccionaron 5 genes estructurales (*ccrA1*, *olmA1*, *olmA2*, *olmA4* y *olmB*) y los 2 reguladores (*olmRI* y *olmRII*).

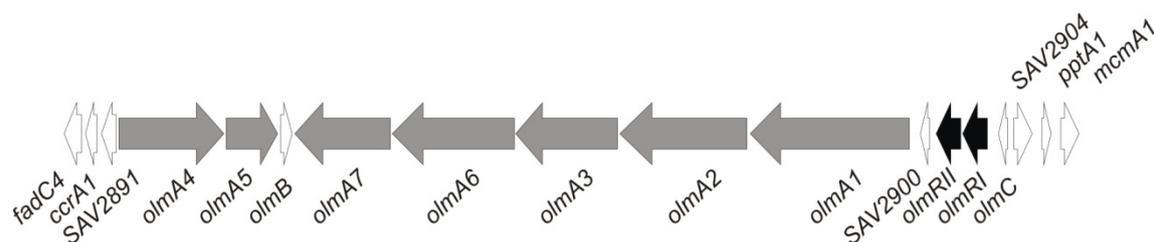


Figura 3.38. Esquema de la agrupación biosintética de la oligomicina en *S. avermitilis*. Las flechas representan los genes del *cluster* y la dirección de su transcripción. PKSs (gris), genes reguladores (negro) y genes involucrados en modificaciones post-PKS (blanco).

Se realizaron RT-qPCRs (apartado 2.10.2) y se analizaron los niveles de transcritos de todos los genes a las 36h para la cepa mutante en comparación con los de la cepa silvestre, a la que se asignó el valor de expresión relativa 1. Como referencia, se utilizó la expresión del gen *rrnA1*, que codifica un RNA ribosomal 16S. Los resultados y sus desviaciones estándar, derivan del análisis de tres réplicas técnicas y gen por ensayo, y al menos dos réplicas biológicas independientes. Todos los *primers* empleados se encuentran indicados en el Anexo I de esta memoria. Las eficiencias de reacción se calcularon como se ha descrito en el apartado 2.10.2.3 y se describen en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Eficiencia de las reacciones qPCR.

	Pendiente	R²	Eficiencia
Q-rrnA1 4.0 7fw/rev	-3,6512	0,992	0,88
Q-sav2890 3.0 8fw/rev	-3,2278	0,998	1,04
Q-sav2892 4.0 6fw/rev	-3,2221	0,996	1,04
Q-sav2894 3.0 1fw/rev	-3,2394	0,996	1,04
Q-sav2898 3.0 4fw/rev	-3,1094	0,995	1,10
Q-sav2899 3.1 2fw/rev	-4,1821	0,986	0,73
Q-sav2901 3.0 4fw/rev	-3,5183	0,996	0,92
Q-sav2902 3.0 10fw/rev	-3,3578	0,996	0,99

Todos los genes analizados mostraron niveles de expresión más bajos en el mutante que en la cepa silvestre (Figura 3.39), lo que estaba de acuerdo con la disminución en la producción de oligomicina observada en la cepa mutante, y sugería que PteF era capaz de controlar su expresión directa o indirectamente. En el caso de los genes *olmA1* y *olmA2*, se ha demostrado una interacción directa entre la proteína GST-PimM^{DBD} y los operadores identificados en los mismos (Figuras 3.34 y 3.35), y ambos tienen niveles más bajos de expresión en el mutante (1,2 veces menos que en la cepa silvestre). Los valores de expresión idénticos observados para estos dos genes no resultan inesperados si se tiene en cuenta que ambos se expresan a partir del mismo promotor. Sin embargo, en los restantes genes el control debe ser de tipo indirecto, puesto que no se han identificado operadores en sus regiones promotoras.

Resulta interesante que la expresión de los genes reguladores *olmRI* y *olmRII* también esté afectada en la cepa $\Delta pteF$, y que estos se expresan menos, con 2,4 veces y 1,6 veces menor expresión que en la cepa silvestre, respectivamente. Estos reguladores se han descrito como reguladores específicos de ruta de la familia LAL, y controlan positivamente

la producción de oligomicina a través de la modulación de la expresión de los genes del *cluster* (Guo *et al.* 2010, Yu *et al.* 2012). Es, por lo tanto, posible que el efecto observado sobre la transcripción de los demás genes *olm* seleccionados en la cepa mutante se deba a la menor expresión de los reguladores *olmRI* y *olmRII*. Alternativamente, PteF también podría activar un regulador positivo diferente que controlase la expresión de los genes del *cluster*.

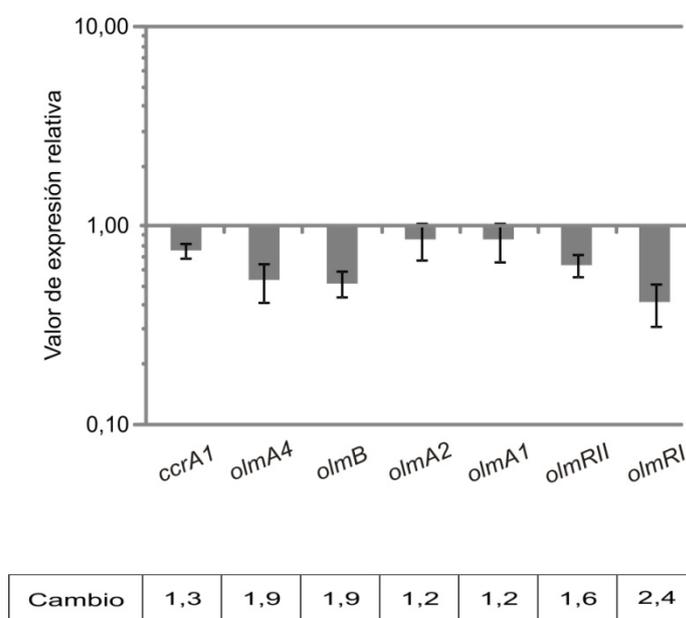


Figura 3.39. Análisis cuantitativo de la expresión génica de algunos genes del *cluster olm* en el mutante $\Delta pteF$ mediante RT-qPCR. Los valores relativos se refieren a 1, el valor asignado para la expresión de cada gen en la cepa silvestre. Se utilizó en gen *rrnA1* (rRNA 16S) como referencia. Las barras verticales representan la desviación estándar obtenida entre dos réplicas biológicas para cada muestra, cada una con tres réplicas técnicas. Abajo se indican los valores relativos medios de cambio de la expresión (en número de veces). Las muestras de RNA utilizadas fueron obtenidas a partir de cultivos de 36h de crecimiento en las condiciones de fermentación estándar.

PteF es un regulador promiscuo con implicaciones de dominio amplio en el metabolismo

Los resultados obtenidos a partir del análisis *in silico* del genoma de *S. avermitilis* revelan un gran número de posibles operadores de PteF, distribuidos por todo el cromosoma. Resulta muy interesante el hecho de que el 56 % de los sitios de unión encontrados estén localizados dentro de genes, en el interior de secuencias codificantes (e.g. el operador situado dentro de *olmA2*). Puesto que es poco probable que en dichas localizaciones existan operadores, esto sugiere que el modo de acción de PteF en dichos operadores debe ser diferente. Una posibilidad es que el regulador bloquee la transcripción

génica en dichos puntos, como ocurre en la represión bacteriana por *looping* del DNA (Becker *et al.* 2013, Cournac & Plumbridge 2013). Otra alternativa es que el operador constituya una región silenciadora corriente abajo del promotor, y la unión del regulador podría resultar en una disminución de la expresión (Dole *et al.* 2004). Sin embargo, también es posible que el operador funcione como un elemento de tipo potenciador que promueva la transcripción muy lejos corriente abajo del promotor del gen, como se ha descrito en *Bacillus subtilis* (Belitsky & Sonenshein 1999). Además, no se puede descartar la posibilidad de que el regulador actúe sobre promotores internos secundarios. Recientemente se ha descrito un caso en el que la proteína receptora de AMP cíclico (Crp) de *S. coelicolor* se une a varias dianas, que también pertenecen al metabolismo primario y secundario, y que más del 50 % son intragénicas (Gao *et al.* 2012). Curiosamente, este regulador funciona predominantemente como activador, pero en algunos casos actúa como un represor, y lo mismo podría pasar con PteF y los reguladores PAS-LuxR en general.

Los EMSAs realizados validaron nuestro método de análisis. Los ensayos mostraron que todas las 17 sondas probadas, que contenían operadores identificados, eran reconocidas por el regulador y que este se unía a las mismas. Dos de estas sondas contenían operadores localizados en el *cluster* biosintético de la oligomicina, un inhibidor de la sintasa de ATP. La presencia de estos dos operadores en el *cluster* nos llevó a considerar un posible papel regulador de PteF en la biosíntesis de otro policétido aparte de la filipina. De este modo, se analizó la producción de oligomicina A en el mutante $\Delta pteF$, y en cepas complementadas y con dosis génica extra, lo que ha permitido demostrar que PteF actúa como un regulador positivo de la producción de este macrólido. A su vez, el análisis transcripcional de mutante ha permitido revelar que este regulador actúa como activador de la expresión génica de los genes *olm*, en algunos casos de forma directa, y en otros de forma indirecta, demostrando de esta manera que PteF es un regulador promíscuo, y no se circunscribe a regular la expresión de un *cluster* de genes concreto (*pte*) como se creía.

En conjunto, los resultados de los EMSA y la correlación entre la unión del regulador a un operador determinado y las consecuencias sobre la producción de un metabolito secundario (la oligomicina), han permitido validar nuestro modelo de análisis. De este modo, podemos proponer que PteF participa en la modulación de todos los procesos indicados anteriormente, y que incluyen aspectos tan vitales para la célula como el procesamiento de la información genética, el metabolismo de carbohidratos, lípidos y

energía, la replicación y reparación del DNA, la diferenciación morfológica, el metabolismo secundario, y la regulación transcripcional, entre otros.

El hecho de que PteF sea regulador positivo de la biosíntesis de oligomicina resultó algo inesperado. Inicialmente pensábamos que la delección de *pteF* llevaría a un aumento en la producción de oligomicina, puesto que debería existir competencia entre las dos rutas biosintéticas por los metabolitos precursores que son comunes a ambas PKSs, y el uso de menos cantidad de estos precursores para la biosíntesis de filipina en el mutante permitiría que un mayor número de estas moléculas estuviesen disponibles para la biosíntesis de oligomicina. En este sentido, un mutante interrumpido en el gen regulador *aveI* de *S. avermitilis* es incapaz de producir avermectina y simultáneamente presenta un aumento en la expresión de los genes biosintéticos de la filipina (Chen *et al.* 2009). Sin embargo, los resultados presentados en esta memoria demuestran que PteF es capaz de co-regular la biosíntesis de dos metabolitos secundarios relacionados (la filipina y la oligomicina son ambos policétidos con propiedades antifúngicas). Cabe destacar que otros autores ya habían especulado sobre la posibilidad de una co-regulación de la producción de filipina y oligomicina en *S. avermitilis*, puesto que estos compuestos antifúngicos podrían actuar sinérgicamente contra competidores fúngicos, uno de ellos uniéndose al ergosterol, y el otro inhibiendo la sintasa de ATP mitocondrial (Challis & Hopwood 2003).

La capacidad de reguladores que están situados en *clusters* biosintéticos para alterar la expresión de reguladores de otros *clusters*, además de su propia agrupación, y también para modular los efectos de reguladores más globales, ya se ha descrito anteriormente (Huang *et al.* 2005). Nuestros resultados no sólo refuerzan esa idea, si no que también indican que los reguladores PAS-LuxR situados en *clusters* biosintéticos pueden interactuar directamente con múltiples genes estructurales pertenecientes a otros *clusters*, afectando así a una variedad de procesos que antes no se podían prever. La red de interacciones que conducen a la regulación de un determinado gen es, por lo tanto, de tal complejidad que los efectos de la manipulación un regulador determinado son impredecibles. Por ello, los estudios de caracterización de reguladores son esenciales para comprender la regulación del metabolismo secundario y de esta forma optimizar los niveles de producción.

3.8. Análisis transcripcional de los mutantes $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$ mediante *microarrays*

3.8.1. Diseño experimental

Como se ha descrito en los apartados 3.2, 3.3, 3.4 y 3.7, las cepas mutantes de *S. avermitilis* presentan una fuerte disminución en la producción de filipina y, en el caso del mutante $\Delta pteF$, también en la producción de oligomicina, así como un retraso en la esporulación. Para comprender mejor los mecanismos a través de los cuales se producen estas alteraciones, se analizaron los transcriptomas de las cepas silvestre, $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$ mediante *microarrays* de cDNA bicolor.

Los chips empleados contienen micromatrices con sondas para todo el genoma de *S. avermitilis* (Omura *et al.* 2001, Ikeda *et al.* 2003) (Número acceso GenBank: NC_003155). Las micromatrices también incluyen sondas para genes de otras especies de *Streptomyces*, pero estas no se utilizaron en el análisis por ser interespecíficas.

En un diseño directo de *microarrays* bicolor, la fluorescencia de dos muestras marcadas con diferentes fluoróforos se compara directamente después de la hibridación. Sin embargo, para el análisis de los mutantes $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$ se utilizó un método diferente, el diseño de *microarrays* bicolor con referencia común (Yang & Speed 2002). En este diseño cada micromatriz se hibrida simultáneamente con una muestra de cDNA y con la referencia común, que en este caso es el DNAg de *S. avermitilis* NRRL 8165, marcados con fluoróforos diferentes. La ventaja de este diseño es la posibilidad de comparar datos obtenidos de chips diferentes, así como incluir resultados de hibridaciones realizadas posteriormente. Por el contrario, las comparaciones indirectas confieren variabilidad añadida, lo que constituye la principal desventaja de este diseño. También se han descrito casos de hibridación entre las muestras de DNAg y cDNA, que de ocurrir pueden influenciar los resultados (Gadgil *et al.* 2005). Sin embargo, el diseño con referencia se ha utilizado con éxito en varios estudios de transcriptómica en actinobacterias (Talaat *et al.* 2002, Rodríguez-García *et al.* 2007, Guerra *et al.* 2012, Beites *et al.* 2014).

El modelo lineal utilizado en este experimento incluye la comparación entre la cepa silvestre (WT) y cada una de las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR), (Smyth 2004, Smyth *et al.* 2005) (Figura 3.40).

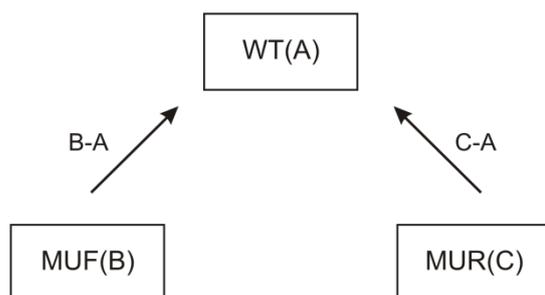


Figura 3.40. Modelo lineal utilizado en el análisis estadístico de los datos de los *microarrays*. Las flechas representan los contrastes seleccionados: MUF (B) *vs* WT (A) B-A, MUR (C) *vs* WT (A) C-A, y MUR (C) *vs* MUF (B) C-B. Se empleó el mismo modelo lineal para ambos tiempos t1 y t2.

Las cepas de *S. avermitilis* se crecieron en el medio complejo YEME sin sacarosa, en condiciones idénticas a las de fermentación para la producción de metabolitos secundarios. Se recogieron muestras de micelio para la extracción de RNA al final de la fase exponencial (t1) y en la mitad de la fase estacionaria (t2). Se escogieron estos dos puntos de la curva de crecimiento para evaluar los cambios transcriptómicos que ocurren en los mutantes durante el periodo de producción de filipina y en dos fases distintas del crecimiento. El DNAg de la cepa WT, purificado a partir de cultivos crecidos hasta bien entrada la fase estacionaria, se utilizó como referencia. El diseño experimental de los *microarrays* incluyó tres réplicas biológicas WT y MUF para cada tiempo, y dos para MUR también para cada tiempo.

La calidad de las muestras de RNA es especialmente importante para este tipo de experimentos de transcriptómica. Al principio de este trabajo, se establecieron las condiciones óptimas y reproducibles para la obtención de muestras de RNA de *S. avermitilis* con buenos valores de integridad (RIN). El protocolo estándar utilizado en los primeros intentos de purificación de RNA (Guerra *et al.* 2012) reveló ser poco eficaz para *S. avermitilis*, y se obtuvieron muestras de RNA con altos niveles de degradación que se tradujeron en valores RIN muy bajos (Figura 3.41A). La optimización del protocolo de extracción pasó por probar diferentes técnicas y la combinación de varias etapas, especialmente en lo que se refiere al muestreo y la lisis celular (e.g. se probaron diferentes condiciones de lisis enzimática o métodos de lisis física con bajas temperaturas, esferas de sílica y sonicador), hasta conseguir un procedimiento que permitió obtener repetidamente muestras de RNA de buena calidad y con valores RIN entre 7 y 9. (Figura 3.41B). Este procedimiento se empleó para todos los experimentos de análisis transcripcional (apartado 2.9.1).

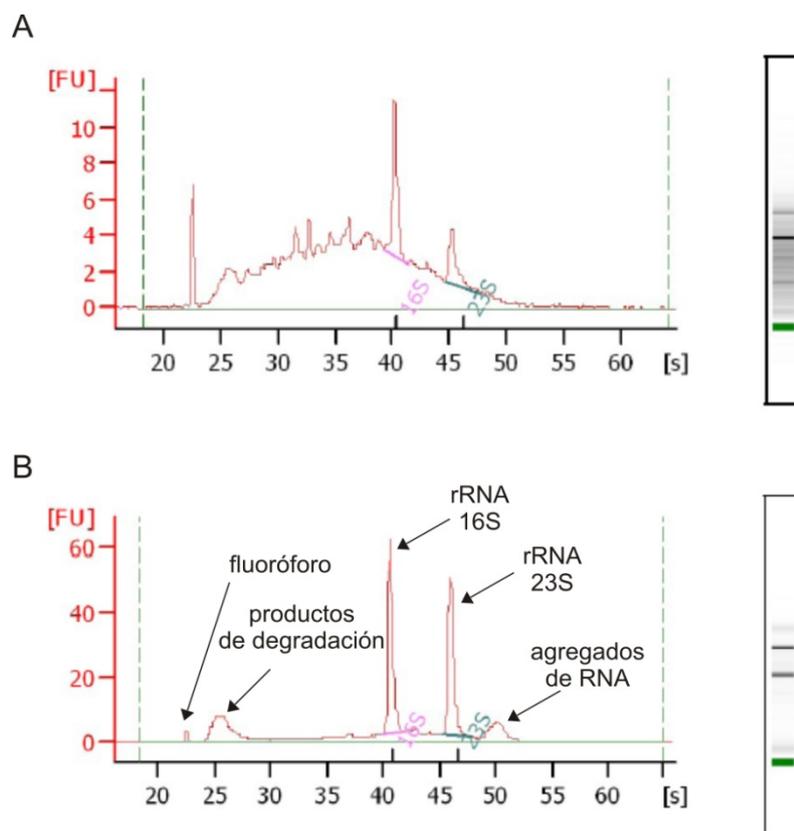


Figura 3.41. Optimización de la purificación de RNA de *S. avermitilis*. Electroforetogramas de dos muestras de RNA purificadas con el método estándar (A), y con el procedimiento optimizado (B), obtenidos con el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Los valores RIN obtenidos fueron 4,9 (A) y 8,6 (B). El electroforetograma (izda.) relaciona las unidades de fluorescencia (eje vertical, FU) detectadas durante 60 segundos (eje horizontal, s), con el paso de la muestra por el capilar. El software permite la identificación automática de los rRNA 16S y 23S bacterianos. Las flechas indican además los artefactos que se pueden encontrar habitualmente en este tipo de análisis. Junto a cada electroforetograma se incluye una representación gráfica del aspecto esperado tras electroforesis en un gel de agarosa con dicha muestra, realizado en base al electroforetograma obtenido (dcha.).

3.8.2. Análisis estadístico de los resultados

Se utilizó en paquete LIMMA de software en ‘R’ para realizar el análisis estadístico, e identificar los Genes Estadísticamente Significativos (GES) presentes en las comparaciones establecidas en el modelo lineal (Smyth 2004, Smyth *et al.* 2005). De aquí en adelante, y de acuerdo con la terminología utilizada en LIMMA, nos referiremos a las comparaciones entre transcriptomas como contrastes.

El paquete LIMMA devuelve una matriz por cada contraste, en la que las filas contienen la identificación de las sondas y las columnas un conjunto de valores numéricos, concretamente: el valor M_c que representa el \log_2 del cambio de la intensidad de una dada

sonda para un determinado contraste, el valor A que está relacionado con la intensidad total de una sonda dada, el valor p que muestra el significado estadístico, y el valor p corregido que corresponde al ajuste para pruebas múltiples (FDR).

En un primer momento se estableció un subconjunto de GES de interés, que presentaron diferencias estadísticamente significativas, con base a ciertos parámetros. Así, se consideraron GES aquellos que mostraron cambios en el nivel de expresión, superando un umbral de aumento o disminución de 2 (1 o -1 en la escala logarítmica), y un valor p corregido por FDR $p < 0,05$.

Siguiendo en criterio anterior, en la fase exponencial (t1) el contraste MUF vs WT (B-A) presentó 208 GES, de las cuales 150 fueron exclusivas del contraste y 58 comunes con el contraste C-A. En el contraste MUR vs WT (C-A) se obtuvieron 108 GES, (50 exclusivos de este contraste, y 58 comunes con el B-A). En el t2 (en la fase estacionaria), se observaron 99 GES en el contraste MUF vs WT (B-A) (74 exclusivos y 25 comunes con el contraste C-A), y 42 GES en el contraste MUR vs WT (C-A) (17 exclusivos y 25 compartidos con B-A) (Figura 3.42).

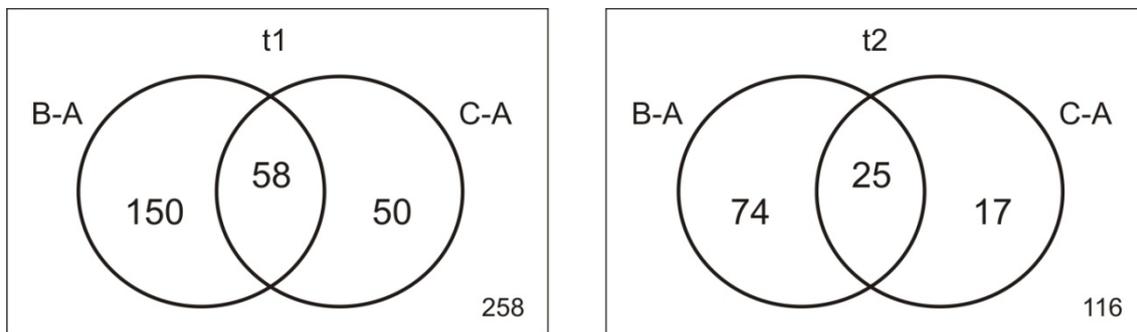


Figura 3.42. Genes con expresión estadísticamente diferente. Se distinguen los dos tiempos analizados, t1 en la fase exponencial, y t2 en la fase estacionaria. Los contrastes representados son MUF ($\Delta pteF$) vs WT (B-A), MUR ($\Delta pteR$) vs WT (C-A).

La Tabla 3.8 muestra la distribución de GES de acuerdo a su patrón de transcripción. Así, en la fase exponencial (t1) se detectaron 63 GES subexpresados y 145 GES sobreexpresados en el contraste B-A, y 22 GES subexpresados y 86 sobreexpresados en el contraste C-A. Por otro lado, en la fase estacionaria (t2), en el contraste B-A, de los 99 GES, 35 estaban subexpresados y 64 sobreexpresados, mientras que en el contraste C-A, de los 42 GES, 19 estaban subexpresados y 23 sobreexpresados.

Tabla 3.8. Perfil de transcripción de los GES en los diferentes contrastes.

	Contrastes	Subexpresados	Sobreexpresados	Total
t1	B-A	63	145	208
	C-A	22	86	108
t2	B-A	35	64	99
	C-A	19	23	42

Sorprendentemente, este análisis mostró que el regulador PteF, un regulador positivo de la biosíntesis de la filipina, actuaba como modulador negativo para más de la mitad de los GES en ambos tiempos estudiados. Lo mismo ocurría con PteR, que a pesar de ser un activador de la biosíntesis de filipina, también mostraba un efecto negativo sobre la mayoría de los GES en la fase exponencial, mientras que en la fase estacionaria la diferencia fue menor. Los resultados también evidenciaron que los efectos de las mutaciones son eran evidentes en la fase exponencial que en la fase estacionaria, con aproximadamente el doble de GES con diferencias estadísticamente significativas en el t1 que en el t2.

Para tener una visión más estructurada de los efectos de los reguladores, los resultados obtenidos se dividieron en categorías funcionales y se organizaron en tablas, primero según su perfil transcripcional (sub o sobreexpresados), y después por su posición en el cromosoma. Algunos GES se incluyeron en más de una categoría, puesto que algunos genes pueden estar relacionados con más de una función celular. Además de la información de los GES seleccionados (nombre, definición, su valor Mc y valor p corregido), en algunos casos en los que se pretende mostrar un perfil común o comparar con resultados anteriores se incluyeron genes con cambios inferiores a 1 (valor absoluto y en la escala logarítmica) y valores p corregidos inferiores a 0,05 (pero cuyo valor p era menor que 0,05). Las Tablas con los listados de los GES analizados a continuación se encuentran en el Anexo V de esta memoria, y la Tabla 3.9 resume los resultados obtenidos.

Tabla 3.9. Clasificación funcional de los genes identificados en los mutantes Δ *pteF* y Δ *pteR*. Se indica el grupo funcional correspondiente a los listados completos de genes, por el mismo orden. Las flechas indican el cambio observado: ↓, subexpresión; ↑, sobreexpresión.

Función	Genes identificados			
	MUF		MUR	
	t1	t2	t1	t2
Procesamiento de la información genética	16 (6 ↓; 10 ↑)	6 (4 ↓; 2 ↑)	5 (5 ↑)	6 (3 ↓; 3 ↑)
Metabolismo del DNA	8 (8 ↑)	4 (1 ↓; 3 ↑)	3 (3 ↑)	1 (1 ↑)
Metabolismo de carbohidratos	13 (3 ↓; 10 ↑)	2 (1 ↓; 1 ↑)	7 (2 ↓; 5 ↑)	2 (1 ↓; 1 ↑)
Metabolismo de lípidos	7 (1 ↓; 6 ↑)	3 (3 ↑)	1 (1 ↑)	2 (1 ↓; 1 ↑)
Metabolismo de nucleótidos, vitaminas y cofactores	8 (4 ↓; 4 ↑)	1 (1 ↑)	4 (4 ↑)	1 (1 ↓)
Metabolismo energético	2 (2 ↓)	1 (1 ↓)	1 (1 ↓)	1 (1 ↓)
Transporte y procesamiento de señales externas	11 (6 ↓; 5 ↑)	4 (1 ↓; 3 ↑)	4 (2 ↓; 2 ↑)	4 (1 ↓; 3 ↑)
Regulación	26 (10 ↓; 16 ↑)	10 (2 ↓; 8 ↑)	5 (3 ↓; 2 ↑)	1 (1 ↓)
Biosíntesis de la envuelta celular y diferenciación morfológica	7 (2 ↓; 5 ↑)	5 (4 ↓; 1 ↑)	5 (1 ↓; 4 ↑)	4 (2 ↓; 2 ↑)
Metabolismo secundario	48 (29 ↓; 19 ↑)	7 (1 ↓; 6 ↑)	14 (4 ↓; 10 ↑)	7 (2 ↓; 5 ↑)

3.8.2.1. Procesamiento de la información genética, metabolismo de aminoácidos y procesamiento de proteínas

Los GES relacionados con la información genética, con el metabolismo de aminoácidos y con el procesamiento de proteínas, que fueron identificados durante el análisis de *microarrays*, están en la Tabla S1. Respecto al procesamiento de la información genética, donde se incluye la transcripción y la traducción, cabe destacar la presencia en todos los contrastes de al menos dos factores sigma cuya expresión cambia significativamente. Además, mientras en los contrastes en la fase exponencial (t1) se observó una sobreexpresión de todos los factores sigma encontrados (*sig40*-SAV4561, *sig60*-SAV213, *sig13*-SAV997, *sig8*-SAV741 y *sig10*-SAV898), en los contrastes en la fase estacionaria (t2) se registraron otros factores sigma cuya expresión disminuía (*sig32*-SAV3888, *sig40*-SAV4561 y *sig10*-SAV898). De todos los GES identificados, cabe destacar el gen *rpmB1* (SAV2675), que codifica una proteína ribosomal L28, y el factor transcripcional tipo-WhiB *wlbE* (SAV3016) (Homerová *et al.* 2003), ambos subexpresados en el mutante Δ *pteF*. La familia Wbl de factores transcripcionales es exclusiva de las actinobacterias y sus miembros están habitualmente implicados en el desarrollo

(Jakimowicz *et al.* 2005). En el mutante $\Delta pteR$ se observó un aumento significativo en la expresión del factor sigma *sig8* (SAV741), un regulador global que controla la expresión de otros factores sigma y en última instancia la diferenciación morfológica (Cho *et al.* 2001, Lee *et al.* 2005a). Por otro lado, se observó en el mismo mutante la subexpresión del gen *tufA1* (SAV4920), que codifica un factor de elongación, y del *rbpA* (SAV6925), una proteína de unión a RNA polimerasas. Curiosamente, se detectó una aminotransferasa (SAV1061) sobreexpresada en todos los contrastes de los dos tiempos de crecimiento.

También se han identificado GES relacionados con la biosíntesis de aminoácidos, concretamente en los contrastes en la fase exponencial del crecimiento (t1). Así, en MUF se identificaron los genes *rocA* (SAV2723), *putA* (SAV2724) y *rocD2* (SAV7112) relacionados con la biosíntesis de arginina y prolina, y cuya expresión disminuye en el mutante respecto a la cepa silvestre, y el gen *leuB* (SAV2718), implicado en la biosíntesis de valina, leucina e isoleucina, que está sobreexpresado. Por otro lado, en MUR sólo se identificó un gen relacionado con la biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano, el *trpB* (SAV6177) que está sobreexpresado en el mutante.

3.8.2.2. Replicación, recombinación y reparación del DNA

La Tabla S2 contiene los GES relacionados con la replicación, recombinación y reparación de DNA seleccionados durante el análisis. Sorprende el elevado número de transposasas cuya expresión cambia significativamente en ambos mutantes, cuando se compara con la cepa silvestre. El MUF presentó dos GES sobreexpresados relacionados con la reparación de DNA: el *ku2* (SAV879) (Zhang *et al.* 2012), que realiza la unión de extremos no homólogos, y el *uvrD1* (SAV3463), que codifica una helicasa que participa en procesos de reparación del DNA por excisión de nucleótidos. Aunque fueron varios los genes relacionados con el metabolismo del DNA que presentaron cambios, el significado biológico para el mutante no está claro.

3.8.2.3. Metabolismo de carbohidratos

El metabolismo central de carbono se puede definir como la red de rutas metabólicas que permiten la utilización de distintas fuentes de carbono. Sus principales rutas metabólicas en *Streptomyces* son la glicólisis, la ruta de las pentosas fosfato (PPP, del inglés *pentose phosphate pathway*), la gluconeogénesis y el ciclo de ácidos tricarbóxicos o ciclo TCA (del inglés *tricarboxylic acid*), incluyendo la vía del glioxilato.

Sorprendentemente, el análisis de los *microarrays* mostró un elevado número de GES relacionados con este metabolismo, especialmente en el t1 y la mayoría sobreexpresados (Tabla S3). Además, varios de estos genes se repiten en todos los contrastes, como por ejemplo la α -galactosidasa SAV1082 (*agaB1*).

Cuando comparó con WT, en MUF se observó un aumento de expresión de varios genes localizados en la misma región, la glicosil transferasa SAV1009, la UDP-glucosa 4-epimerasa SAV1011 (*galE5*), la manosa-1-guaniltransferasa SAV1013 (*mpg2*) (Muñoz-Centeno *et al.* 2012) y la NDP-hexosa 4-cetoreductasa SAV1014. Relacionados con el metabolismo de la galactosa aparecieron la α -galactosidasa *agaB1* (SAV1082) subexpresada en todos los contrastes (incluyendo los de MUR), la UDP-glucosa 4-epimerasa *galE5* (SAV1011) y la fosfoglucomutasa *pgmA* (SAV803). El MUF presentó además GES relacionados con el ciclo TCA (SAV3859), como la citrato sintasa *citA2* (SAV3859), o la citrato liasa *citE* (SAV1913), y la vía del glioxilato (*mea1*-SAV1912 y *accA2*-SAV3866). La PPP, así como la glicólisis y glucogénesis en el caso del MUF, también aparecen afectadas en ambos mutantes, con la fosfoglucomutasa *pgmA*-SAV803 (MUF) y la transcetolasa *tket1*-SAV1766 (MUR). En la fase exponencial (t1), el MUR mostró también una disminución en la expresión de *malE* (SAV5977), el primer gen del *cluster malEFG* implicado en el transporte de maltosa y maltodextrina (van Wezel *et al.* 1997), por lo que la utilización de esta fuente de carbono puede estar comprometida en el mismo.

3.8.2.4. Metabolismo de lípidos

Los GES relacionados con el metabolismo de lípidos identificados en el análisis de los *microarrays* están englobados en la Tabla S4. Uno de esos GES es *fabC4* (SAV217), que codifica una ACP, y aparece en todos los contrastes como sobreexpresado. Esto indica que la síntesis de ácidos grasos y/o policétidos podrían verse afectadas por las mutaciones $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$. FabC4 contiene un dominio de unión a fosfopanteteína por lo que estaría sujeto a activación por una fosfopanteteínil transferasa (PPTasas, del inglés *phosphopantetheinyl transferase*), en una reacción de modificación post-transcripcional (Bunet *et al.* 2014). En *S. avermitilis* se han identificado 7 PPTasas responsables de la activación de los dominios ACP y PCP en los 13 *clusters* PKS y 8 *clusters* NRPS existentes en el genoma. Una de esas PPTasas es *pptA1* (SAV2905), localizada en el *cluster* de la oligomicina (Ikeda *et al.* 2003, Omura *et al.* 2001). Otro resultado interesante, que apunta en la misma dirección, es la identificación de un gen que codifica una acetil/propionil CoA carboxilasa (*accA2*-SAV3866) (Rodríguez & Gramajo 1999) como GES sobreexpresado en el contraste MUF

vs WT en la fase estacionaria. Esta enzima cataliza las reacciones que convierten acetyl-CoA en malonil-CoA, y propionil-CoA en metilmalonil-CoA, que son los primeros pasos para la biosíntesis de ácidos grasos y policétidos, además de participar en otras rutas metabólicas del metabolismo primario (Rodríguez *et al.* 2001).

Cabe resaltar que el análisis permitió identificar en MUF dos genes que coinciden con los resultados obtenidos en la búsqueda informática de dianas de PteF (ver apartado 3.7.1). Se trata del gen *fabB2* (SAV2994) que codifica una II 3-oxoacil-ACP sintasa y que está subexpresado en el mutante (valor p de 0,0410), y el *plsC1* (SAV1485) que codifica una 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa cuya expresión aumenta en el mutante (valor p de 0,0471). Estos resultados apoyan las predicciones anteriores y confirman el papel de PteF sobre otros procesos aparte de la regulación de la biosíntesis de filipina y oligomicina.

3.8.2.5. Metabolismo de nucleótidos y metabolismo de vitaminas y cofactores

Relativamente a los GES que están relacionados con el metabolismo de nucleótidos y el metabolismo de vitaminas y cofactores (Tabla S5), la mayoría fue identificada en los contrastes en la fase exponencial (t1), donde el MUF presentó el mayor número de genes. De entre estos, son de destacar los genes *purN* (SAV3445) y *purQ* (SAV4139) involucrados en el metabolismo de purinas y que se identificaron como sobreexpresados, y *phoA* (SAV5915) (Sola-Landa *et al.* 2008), una fosfatasa alcalina que además de participar en el sistema de dos componentes PhoRP, también está relacionada con la biosíntesis de folato. Respecto al metabolismo de vitaminas y cofactores, se identificó una metilasa de cobalamina *cobJ* (SAV64107) y una adenosiltransferasa de cobalamina *cobA* (SAV6413), ambas subexpresadas en MUF en la fase exponencial.

3.8.2.6. Fosforilación oxidativa y producción de energía

El análisis de los resultados de los *microarrays* mostró algunos genes relacionados con la fosforilación oxidativa y la producción de energía (Tabla S6). En todos ellos, el cambio de expresión observado fue negativo. En la fase exponencial (t1) se identificaron dos genes del operón *nuo* subexpresados en el MUF, *nuoJ1* (SAV4846) y *nuoK1* (SAV4847), mientras que en MUR sólo se identificó el *nuoK1*. En la fase estacionaria (t2), se identificó un mismo gen subexpresado en ambos contrastes con MUF y MUR, la cadena b de una ATP sintasa *atpF* (SAV2885). El operon *nuo* (*nuoA1-M1*) codifica la NADH ubiquinona oxireductasa (complejo I) (Ingledeew & Poole 1984), que acopla la oxireducción con la

translocación de protones, convirtiendo así la energía redox en un gradiente de protones. Este gradiente electroquímico es subsecuentemente utilizado para impulsar la síntesis de ATP, proceso en el que participa AtpF. Aunque se trata de pocos GES relacionados con las cadenas respiratorias, el hecho de que todos estén subexpresados es bastante significativo y podría indicar un déficit de producción de energía si no existe una compensación por parte de otros sistemas.

3.8.2.7. Transporte y procesamiento de señales externas

En el grupo funcional de los GES relacionados con el transporte y procesamiento de señales externas (Tabla S7) fue de resaltar la identificación en MUF t1 de varios genes que constituyen sistemas de transporte ABC, e.g. los transportadores de azúcares SAV2246-SAV2247, ambos subexpresados, y la permeasa SAV694-SAV695, ambos sobreexpresados. En MUR t1 también se identificó como subexpresado el transportador de azúcares, *aglE* (SAV6308) (Wendler *et al.* 2013). El hecho de que varios genes que codifican transportadores de azúcares, como SAV2246, SAV2247 y *aglE*, estén subexpresados apoya las observaciones de que el metabolismo de carbohidratos está afectado en ambas cepas, especialmente en MUF donde el número de genes con cambios estadísticamente significativos es mayor. Los transportadores de carbohidratos pueden tener un gran impacto en los procesos de fermentación, concretamente en la utilización de diferentes fuentes de carbono y pueden llevar al aumento de la producción, como se ha descrito para la producción de avermectina e ivermectina en *S. avermitilis* (Li *et al.* 2010a).

Curiosamente, en todos los contrastes excepto en MUF t2 el gen SAV610, que codifica un transportador MFS, presentó un aumento de expresión. Además, en todos los contrastes se han identificado como sobreexpresados los genes *fecC1* (SAV600) y *fecB* (SAV602), ambos implicados en el transporte de hierro III. En este sentido, es interesante destacar que se ha postulado que los genes SAV600, SAV601 y SAV602 podrían formar un sistema de transporte ABC homólogo al sistema de transporte FecBCD de *E. coli* (Staudenmaier *et al.* 1989). Además, estas observaciones confirman resultados anteriores, concretamente los ensayos EMSA que demostraron la unión del regulador a sondas de las regiones promotoras de SAV602 y SAV610. Así, todo apunta a que este sistema FecBCD, junto con el transportador MFS, estarían implicados en el transporte de hierro mediante el sideróforo nrps6 cuyo *cluster* génico flanquean (ver apartados 3.7.1 y 3.7.2).

3.8.2.8. Regulación

El análisis de los *microarrays* reveló un número sorprendentemente elevado de genes relacionados con mecanismos de regulación (Tabla S8). En total, se han identificado 42 GES con cambios estadísticamente significativos. De estos, la mayoría resulta del contraste con MUF en ambos tiempos de crecimiento, con un total de 36 genes (26 GES en la fase exponencial y 10 en la fase estacionaria). Un hecho interesante es la identificación de hasta 28 genes que codifican reguladores transcripcionales, lo que indica que el regulador PteF controla otros moduladores de la red global de regulación, y confirmándose así su papel pleiotrópico. Además, cabe destacar que 8 de estos reguladores transcripcionales están directamente implicados en procesos de regulación de metabolitos secundarios: *avaL2* (SAV2268) y *avaL1* (SAV2270), reguladores de la biosíntesis de una posible γ -butirolactona (Omura *et al.* 2001, Ikeda *et al.* 2003); *avaR1* (SAV3705), receptor de la avenolida (Kitani *et al.* 2011, Wang *et al.* 2014); *olmRII* (SAV2901) y *olmRI* (SAV2902), reguladores positivos de la biosíntesis de oligomicina (Yu *et al.* 2012); *ptIR* (SAV2989), regulador de la biosíntesis del terpenoide neopentalenocetolactona (Jiang *et al.* 2009); *pteR* (SAV4010), regulador positivo de la filipina (Omura *et al.* 2001, Ikeda *et al.* 2003); *aveR* (SAV935), regulador positivo de la avermectina (Kitani *et al.* 2009). De todos estos, solamente *pteR* y *aveR* mostraron sobreexpresión.

La identificación de los reguladores de la biosíntesis de la oligomicina *olmRI* y *olmRII* es otro indicador que confirma resultados anteriores, que revelaban PteF como regulador positivo de este macrólido así como su función reguladora pleiotrópica (ver apartado 3.7.3).

Se identificó además el gen SAV2301 que codifica un regulador homólogo a RedD, un activador de la biosíntesis de undecilprodigiosina en *S. coelicolor* (Narva & Feitelson 1990) y que podría estar implicado en la regulación de otro metabolito secundario.

Cabe también destacar la identificación del gen *bldC* (SAV4130) como subexpresado en MUF (t2). Este regulador es homólogo al regulador BldC de *S. coelicolor*, que pertenece al regulón BldD y está implicado en la diferenciación morfológica y en la producción de metabolitos secundarios (Hunt *et al.* 2005, den Hengst *et al.* 2010).

Por otro lado, en los contrastes con MUR se han identificado 6 reguladores cuya expresión cambia de manera significativa. Entre ellos está el gen *cutS* (SAV2404), que codifica una quinasa sensora de un sistema de dos componentes y cuya expresión

dismunuye en el mutante (de igual modo que en el MUF). El sistema de dos componentes CutRS se ha caracterizado en *S. lividans* y regula negativamente el metabolismo secundario (Chang *et al.* 1996).

3.8.2.9. Biosíntesis de la envuelta celular y diferenciación morfológica

Los genes identificados en el análisis de los *microarrays* relacionados con la biosíntesis de la envuelta celular y la diferenciación morfológica están incluido en la Tabla S9. Aparecen dos genes directamente relacionados con la biosíntesis de los componentes de la pared celular sobreexpresados, *ampD1* (SAV2754) que codifica una N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa en MUF, y *tkt1* (SAV1766) que codifica una transcetolasa en MUR.

Respecto a los genes implicados en la diferenciación morfológica, se identificaron 5 genes exclusivos de MUF. Se trata, además de los ya mencionados, el regulador transcripcional *wlbE* (SAV3016) tipo-WhiB y regulador transcripcional *bldC* (SAV4130), asociados a fenotipos deficientes en la producción de esporas (fenotipo *white*) y en el desarrollo de micelio aéreo (fenotipo *bald*), respectivamente (ambos aparecen subexpresados en el mutante), de otros tres genes en este caso sobreexpresados: el gen *mreC* (SAV5456), que codifica una proteína determinante de la forma cilíndrica y necesaria para la síntesis de la pared de las esporas en *S. coelicolor* (Burger *et al.* 2000, Kleinschmitz *et al.* 2011), el gen *kipA* (SAV6937), antagonista de KipI, y *kipI* (SAV6938), que codifica un inhibidor de KinA. Genes homólogos a *kipI* son ubicuos entre las bacterias y habitualmente se encuentran adyacentes a genes homólogos a *kipA*, como es el caso en *S. avermitilis*. La proteína KipI es un regulador de los procesos de fosforilación que controlan el desencadenamiento de la esporulación en *Bacillus subtilis*, uniéndose a la quinasa de histidina sensora KinA e inhibiendo su autofosforilación. KipA inhibe la actividad antiquinasa de KipI, permitiendo de este modo la esporulación (Wang *et al.* 1997, Jacques *et al.* 2011). Resulta interesante que ambos genes *kipA* y *kipI* se encuentren sobreexpresados en MUF, por lo que PteF actuaría como un represor de ambos.

Los resultados de los contrastes con MUR mostraron que dos genes son exclusivos de este mutante, el *ssgA* (SAV4267) que codifica una proteína de división celular específica de la esporulación y está sobreexpresado, y *terD3* (SAV5803), subexpresado en el mutante y que según las bases de datos codifica una proteína de resistencia a telurio. Las proteínas TerD se pensaban estar asociadas a una resistencia al telurio por su similitud con la

proteína TerD de *Serratia marcescens* (y de ahí su designación). Sin embargo, estudios recientes en *S. coelicolor* ha revelado que un mutante deleciónado en uno de los 14 genes existentes en el genoma que contienen dominios tipo-TerD no es resistente a telurio potásico, sino que la mutación tiene un efecto en la diferenciación morfológica (Sanssouci *et al.* 2011, 2012). La proteína SsgA, por otro lado, fue identificada por primera vez en *S. griseus* y se cree que es responsable del control de la división celular durante el proceso de esporulación, ya que mutantes Δ s sgA son incapaces de producir esporas (Kawamoto *et al.* 1997).

Común a ambos mutantes e identificado como sobreexpresado en todos los contrastes está el gen *ctpB* (SAV617), una ATPasa tipo-P transportadora de cationes que se ha relacionado con la activación de la esporulación en *Bacillus subtilis* (Campo & Rudner 2007). Otros dos genes diferencialmente expresados en las dos cepas mutantes son el *sit2* (SAV7486), un inhibidor de subtilisina secretado que está relacionado con la diferenciación morfológica a través de *sigU* en *S. coelicolor* (Gordon *et al.* 2008) y que se identificó como subexpresado, y el SAV2505, que codifica una proteína de unión al DNA. Curiosamente, el ortólogo de SAV2505 en *S. coelicolor* es el regulador transcripcional *clpR* (Bellier & Mazodier 2004) que controla la expresión del gen *clpC1*, que a su vez codifica una proteasa Clp dependiente de ATP implicada en la diferenciación morfológica en *S. lividans* (Bellier *et al.* 2006). CplC1 junto con la proteasa ClpC2 ya habían sido propuestas como dianas de la regulación de PteF después del análisis de resultados de la búsqueda informática, y de hecho el regulador se une a la posible región promotora de *clpC1* (ver apartado 3.7.2). Así, estos resultados vienen a confirmar el papel modulador de PteF sobre la expresión de *clpC1* y *clpC2*, que puede ser indirecto via el regulador ClpR como se observó en el análisis transcripcional, o directo con la unión de PteF a sus regiones promotoras.

3.8.2.10. Metabolismo secundario

Sin duda, el grupo funcional más afectado por las mutaciones MUF y MUR es el de los genes para la biosíntesis de metabolitos secundarios (Tabla S10). En el caso de MUF, el efecto es particularmente significativo puesto que es donde se observan la mayoría de los cambios (48 de un total de 76). Resulta también interesante que el mayor número de GES se encontraran en los contrastes de la fase exponencial del crecimiento (t1). Solamente en ese punto del tiempo (t1) se identificaron genes relacionados con la biosíntesis de precursores de metabolitos secundarios. En el contraste MUF estos genes fueron: *rocD3* (SAV2285) que codifica una aminotransferasa de ornitina, *putA* (SAV2724) que codifica

una deshidrogenasa de prolina, y *rocD2* (SAV7112) que codifica una aminotransferasa de ornitina, en el caso de los subexpresados; y en el caso de los sobreexpresados: *pgmA* (SAV803) que codifica una fosfoglucomutasa, *leuB* (SAV2718) que codifica una 3-isopropilmalato deshidrogenasa, *purN* (SAV3445) que codifica una formiltransferasa de fosforibosilglicinamida, y *citA2* (SAV3859) que codifica una sintasa de citrato. En el MUR se identificaron como genes relacionados con la síntesis de precursores el *ard* (SAV649) que codifica una fosfotransferasa, *tkt1* (SAV1766) que codifica una transcetolasa, *wrbA* (SAV2661) que codifica una flavodoxina multimérica, y *trpB* (SAV6177) que codifica una sintasa de triptófano, todos ellos sobreexpresados en el mutante.

El análisis de los microarrays mostró que MUF presentaba cambios en la expresión de genes relacionados con 15 de los 38 posibles metabolitos secundarios sintetizados por *S. avermitilis*, un número sorprendentemente elevado para un regulador típicamente designado como específico de ruta como es el caso de PteF (Figura 3.43).

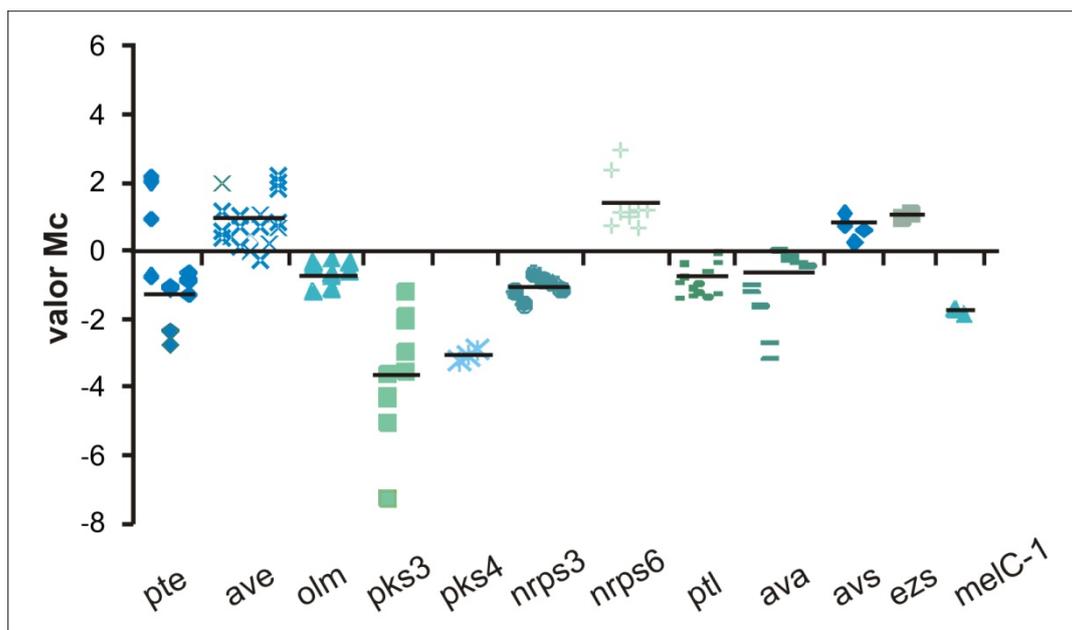


Figura 3.43. Expresión de los genes de clusters biosintéticos de metabolitos secundarios de *S. avermitilis* en la cepa mutante MUF. Representación gráfica de la tendencia transcripcional en los clusters para algunos metabolitos secundarios. El valor Mc corresponde al cambio de expresión obtenido en el análisis transcripcional mediante *microarrays* (eje vertical), y los clusters biosintéticos se indican abajo (eje horizontal): filipina (*pte*), avermectina (*ave*), oligomicina (*olm*), policétidos (*pks3* y *pks4*), péptido no ribosomal (*nrps3*), péptido no ribosomal/sideróforo (*nrps6*), neopentalenocetolactona (*pti*), γ -butirolactona (*ava*), sideróforo (*avs*), albaflavenol/albaflavenona (*ezs*) y melanina (*melC-1*). Las barras horizontales representan la tendencia media de la expresión génica.

Los metabolitos secundarios cuya biosíntesis se vería afectada según el contraste MUF fueron: la oligomicina (*olm*), la filipina (*pte*), los policétidos productos de *pks3* y *pks4*, la neopentalenocetolactona (*ptl*), el péptido no ribosomal producto de *nrps3*, la γ -butirolactona (*ava*) (regulación positiva identificada en el t1), la avermectina (*ave*), la geosmina/germacradienol, el albaflavenol/albaflavenona (*ezs*), el sideróforo tipo-vibrioferrina (*avs*) y el sideróforo producto de *nrps6* (regulación negativa identificada en el t1); la melanina (*melC-1*) (regulación positiva identificada en el t2), el sideróforo producto de *nrps6*, el péptido no ribosomal producto de *nrps5*, y la microcina (*mcj2*) (regulación negativa identificada en el t2).

En el caso del MUR, en la fase exponencial (t1) se identificaron como subexpresados los genes implicados en la biosíntesis de nocardamina/desferrioxamina B (*sidD*-SAV5272), de microcina (*mcjD*-SAV5686, SAV5688 y *mcjC2*-SAV5689), y como sobreexpresados los genes de la biosíntesis del sideróforo producto de *nrps6* (SAV604, *fadD2*-SAV605, SAV607, *fabC2*-SAV608), y de la ectoína/5-hidroxiectoína (*ectB*-SAV6397). En fase estacionaria (t2) se identificó como regulada positivamente la biosíntesis de melanina (*melC2*-SAV1137), y como regulada negativamente la biosíntesis del sideróforo producto de *nrps6* (SAV604, *fadD2*-SAV605, SAV607 y *fabC2*-SAV608). Sorprendentemente, se identificó el gen *pteB* (SAV414) como sobreexpresado en MUR, un resultado que sin embargo no es contrario a lo observado en el análisis transcripcional del mutante $\Delta pteR$ mediante RT-qPCR puesto que este se realizó solamente con muestras de la fase exponencial de crecimiento (t1).

3.8.3. Validación de los resultados mediante RT-qPCR

Para confirmar los resultados de los microarrays, la transcripción de algunos genes identificados como GES en las diferentes comparaciones se analizó mediante RT-qPCR. Los primers utilizados, su secuencia y valores de T_m, se encuentran en el Anexo I de esta memoria. Las eficiencias de reacción se calcularon como se ha descrito en el apartado 2.10.2.3 y se indican en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Eficiencias de las reacciones qPCR. Se mencionan solamente los *primers* nuevos, los restantes se encuentran incluidos en listados anteriores.

	Pendiente	R^2	Eficiencia
Q-sav602 4.0 3fw/rev	-3,9301	0,996	0,80
Q-sav935 3.1 2fw/rev	-3,2291	0,998	1,04
Q-sav1082 3.1 2fw/rev	-3,5398	0,994	0,92
Q-sav2273 4.1 1fw/rev	-3,2740	0,996	1,02
Q-sav4891 4.0 4fw/rev	-3,3973	0,995	0,97

La selección de este conjunto de genes se hizo con base en dos criterios: genes regulados positiva y negativamente en diferentes contrastes, y genes de grupos funcionales diferentes. Así, se seleccionaron un total de 12 genes: *htpX1*, *agaB1*, *SAV2273*, *fecB*, *aveR*, *olmRI*, *pteG*, *pteR*, *pteB*, *pteC*, *pteD* y *pteA4*. La correlación entre la expresión normalizada de los genes seleccionados en el análisis con *microarrays* y con RT-qPCR se representa en la Figura 3.44.

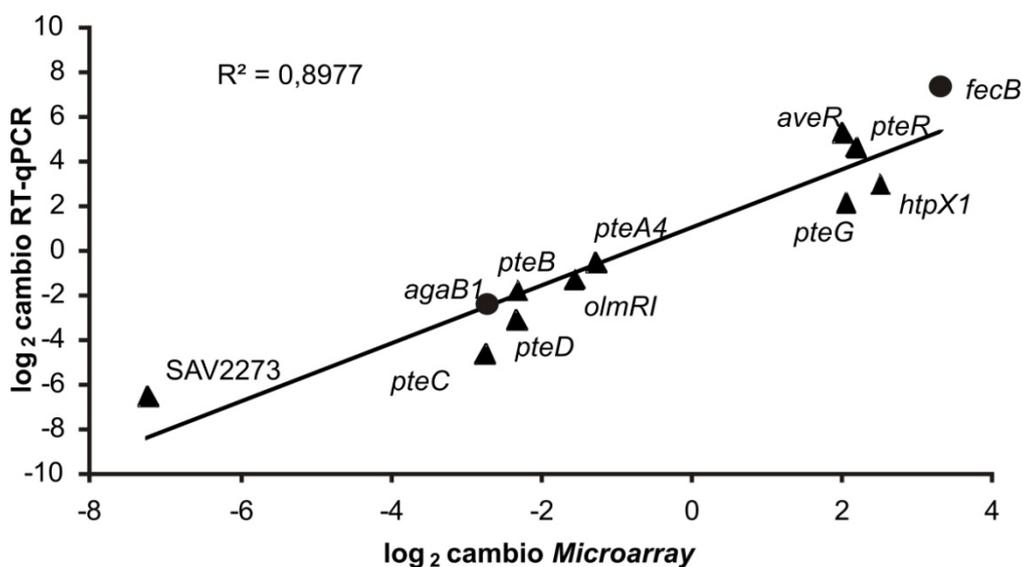


Figura 3.44. Correlación entre la expresión normalizada en el análisis por *microarrays* y RT-qPCR. Se utilizó la expresión de 12 genes identificados como GES: *htpX1*, *agaB1*, *SAV2273*, *fecB*, *aveR*, *olmRI*, *pteG*, *pteR*, *pteB*, *pteC*, *pteD* y *pteA4*. Los genes GES de la comparación MUF *vs* WT en el t1 se representan con triángulos, y los GES de la comparación MUR *vs* WT en el t1 se representan con círculos. La expresión media de los genes se calculó respecto a la transcripción del gen de referencia *rrnA1* (rRNA 16S). El \log_2 del cambio se calculó utilizando los valores de transcripción del WT como control. Los resultados derivan de dos réplicas biológicas y tres técnicas. Se utilizó el \log_2 del cambio para cada gen en los *microarrays* en esta correlación.

Puesto que ambas técnicas presentan sensibilidades diferentes, es de esperar alguna discrepancia entre los valores obtenidos. Así, los valores \log_2 obtenidos con los *microarrays*

oscilaron entre -7,24 y 3,31, mientras que los valores \log_2 de las RT-qPCR correspondientes varían entre -6,53 y 7,29. La correlación entre el cambio de expresión normalizado en el análisis con *microarrays* y el de las RT-qPCR fue de $R^2 = 0,90$.

PteF y PteR actúan como reguladores pleiotrópicos

El análisis de los transcriptomas de las cepas mutantes MUF y MUR permitió obtener una visión más amplia de las funciones que estos reguladores transcripcionales tienen en el metabolismo de *S. avermitilis*, más allá de la biosíntesis del polieno filipina. Ambos reguladores desempeñan funciones de modulación similares, aunque en el caso de PteF existe una mayor diversidad de genes afectados pertenecientes a un mismo grupo funcional, por lo que las consecuencias de la mutación de este regulador son más globales.

En general, el metabolismo de carbohidratos parece estar activado transcripcionalmente en ambos mutantes cuando se compara con el de la WT. Sin embargo, se trata de genes con funciones muy generales y no es posible establecer un patrón claro de flujo de carbono. Este aumento de expresión de genes del metabolismo del carbono no se refleja, sin embargo, en las tasas de crecimiento de las cepas mutantes que fueron muy similares a la de la cepa silvestre.

Los genes que codifican las enzimas responsables del metabolismo de lípidos están sobreexpresados en ambos mutantes, incluyendo *accA2* que codifica una acetil/propionil CoA carboxilasa. Se trata de una enzima clave en la biosíntesis de ácidos grasos y también muy importante para la producción de policétidos, puesto que genera precursores como el malonil-CoA y acetil-CoA, y metilmalonil-CoA (Arabolaza *et al.* 2010). Estos resultados indican que existen más precursores disponibles para la biosíntesis de metabolitos secundarios, lo que coincide con el aumento de expresión de los genes biosintéticos de algunos de estos compuestos en las cepas mutantes, e.g. el péptido no-ribosomal producto de *mrs6* y la avermectina.

El metabolismo de aminoácidos también es una fuente de precursores para la biosíntesis de metabolitos secundarios. Los genes relacionados con la degradación de arginina y prolina están subexpresados. Por el contrario, los genes relacionados con la degradación de aminoácidos ramificados (e.g. leucina, isoleucina y valina) que permiten generar precursores de policétidos como el acetil-CoA y metilmalonil-CoA (Denoya *et al.* 1995, Stirrett *et al.* 2009), están sobreexpresados en MUF. Este resultado indica que podría existir una mayor cantidad de este tipo de precursores disponibles, aunque no obstante el

mutante $\Delta pteF$ es deficiente en la producción de varios metabolitos secundarios. Se ha demostrado que un exceso de valina en el medio provoca una disminución de la producción de espiramicina (un macrólido de 16 átomos de carbono) en *S. ambofaciens* (Lounès *et al.* 1995). Esto indica que por encima de un cierto umbral de concentración, este tipo de aminoácidos puede tener un impacto negativo en la producción de metabolitos secundarios, y este podría ser el caso de MUF ya que el mutante mostró una expresión del gen *leuB* 5 veces superior a la de WT.

Durante el análisis transcripcional se observaron cambios en la expresión de varios genes relacionados con la diferenciación morfológica en los diferentes contrastes. Probablemente los resultados más interesantes fueron la subexpresión de *wblE* (Soliveri *et al.* 2000) y de *bldC* (Merrick 1976), dos genes esenciales en última instancia para la formación de esporas. Aunque la cepa MUF no presentó una alteración en la diferenciación morfológica *per se*, sí mostró un retraso en la formación de esporas (Vicente *et al.* 2014). La menor expresión de estos genes, podría explicar este fenotipo puesto que es posible que cambios en la expresión de otros genes contrarreste finalmente su efecto y de ahí el retraso en la producción de esporas observado. Además, se sabe que el efecto de las mutaciones *bld* son dependientes del medio (Merrick 1976), y lo mismo pasa con el fenotipo de MUF.

Curiosamente, también se registraron cambios de expresión en otros genes relacionados con la diferenciación morfológica en la cepa MUR, sin que se haya observado un fenotipo diferente.

Los procesos de regulación transcripcional son una de las principales dianas de PteF y PteR, especialmente en el caso del primer regulador. Se observó tanto la subexpresión y como la sobreexpresión de genes reguladores, que en muchos casos son suficientes para explicar los cambios de transcripción observados en los demás genes de los *clusters* biosintéticos de metabolitos secundarios. Es el caso del regulador *ptlR* del *cluster* de la neopentalenocetolactona, el regulador *aveR* de biosíntesis de la avermectina, los reguladores *avaL2* y *avaL1* de biosíntesis de la γ -butirolactona, y de los reguladores *olmRI* y *olmRII* del *cluster* de la oligomicina (Vicente *et al.* 2015) (todos relativos a MUF). La mayoría de las proteínas reguladoras, sin embargo, tiene una función desconocida por lo que las mutaciones pueden tener un abanico de efectos más amplio. La cascada reguladora del metabolismo secundario constituye una red muy compleja de señales, por lo que estos resultados no resultan sorprendentes. De hecho, ya se han descrito otros casos de

regulación cruzada entre varios reguladores (Bate *et al.* 2002, Huang *et al.* 2005, Santos-Beneit *et al.* 2009, Santos-Aberturas *et al.* 2012, Vicente *et al.* 2015).

Las alteraciones transcripcionales en los *clusters* biosintéticos de metabolitos secundarios son sin duda el resultado más impactante, especialmente en el caso de MUF. Los resultados corroboran la menor producción de filipina en el mutante y confirman el análisis transcripcional del *cluster*, con prácticamente todos los genes *pte* mostrando la misma tendencia de subexpresión (Figura 4.44). Las excepciones son *pteH*, *pteG* y *pteR*, que presentan un aumento de transcripción que también coincide con el análisis mediante RT-qPCR (Vicente *et al.* 2014). Asimismo, la subexpresión de la mayoría de los genes *olm* confirma la menor producción de oligomicina observada en el mutante $\Delta pteF$, así como el análisis transcripcional del *cluster* (Vicente *et al.* 2015). En este caso, además de la menor expresión de los genes biosintéticos también se observó una menor transcripción de los reguladores positivos de la biosíntesis del macrólido, *olmRI* y *olmRII* (Yu *et al.* 2012), lo que refuerza los resultados obtenidos (Figura 3.44).

Además de los macrólidos filipina y oligomicina, en MUF también se observaron alteraciones importantes en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de otros metabolitos secundarios, cuya producción, sin embargo, no fue posible estimar. Los resultados indican, no obstante, que esta cepa mutante es deficiente en la producción de varios de ellos, y en otros casos es capaz de producir niveles superiores a los de la cepa WT (Figura 3.44). Es el caso de la posible γ -butirolactona, cuyos principales genes biosintéticos están subexpresados (incluyendo el de la proteína de síntesis, *avaA*), además de los reguladores transcripcionales presentes en el *cluster* de los cuales existe hasta 10 veces menos transcrito que en la cepa silvestre. También en el *cluster pks3* se observaron efectos de regulación positiva considerables, con entre 8 y 151 veces menos expresión de varios genes biosintéticos. En los casos de los metabolitos producto de *nmps3* y *pks4*, el número de genes identificados pertenecientes al *cluster* fue menor, pero al tratarse de genes cruciales de la ruta biosintética (una sintasa de péptido no-ribosomal y una policétido sintasa tipo I, respectivamente), se puede decir que el efecto es absoluto en cuando a la disminución de la producción de estos compuestos. Curiosamente, el *cluster* de la avermectina mostró una tendencia general de sobreexpresión de todos los genes (Figura 3.44). En particular, los que codifican las enzimas implicadas en la síntesis de la porción dTDP-azúcar de la molécula (*aveBVII* y *aveBVIII*), y la tioesterasa (*aveG*), puesto que son las que presentan valores p más fiables. Dado que no se han identificado sitios de unión del regulador PteF en el *cluster* de la

avermetina (Vicente *et al.* 2015), la regulación ejercida por el regulador debe ser de tipo indirecto. También es posible que este aumento se deba, no a un fenómeno de regulación transcripcional, sino al flujo de energía y precursores redirigido hacia la producción de avermectina puesto que la producción de otros compuestos como la filipina y oligomicina está afectada negativamente en MUF (Chen *et al.* 2009).

En el caso de MUR, y con respecto a la biosíntesis de filipina, los resultados del análisis transcripcional no permitieron establecer una relación directa de PteR con la expresión de los genes *pte*, puesto que los valores p obtenidos fueron demasiado altos. Sin embargo, se pudo apreciar una disminución significativa en la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de un sideróforo (la nocardamina/desferroxamina B) y de microcina, y el aumento de expresión de genes biosintéticos de otro sideróforo (sideróforo nrps6) y de la ectoína/5-hidroxiectoína. Dado que los genes identificados participan en las fases iniciales de las rutas de síntesis de estos compuestos, se puede predecir que la capacidad de la cepa $\Delta pteR$ para producir estos metabolitos difiere de la de la cepa silvestre *S. avermitilis*.

Cabe destacar que los resultados de los *microarrays* y los del análisis bioinformático coinciden un 24 %. Este valor refleja que el efecto regulador ejercido por PteF no siempre es directo, ni es posible deducir en todos los casos el objeto de la modulación por la localización del operador reconocido.

3.9. Estudios de proteómica de los mutantes $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$ mediante 2D-DIGE

3.9.1. Optimización de la purificación de proteínas intracelulares de *S. avermitilis*

Antes de realizar los estudios de proteómica se procedió a optimizar el método de purificación de proteínas de *S. avermitilis*. Como en todos los experimentos de este tipo, poseer muestras de buena calidad es algo esencial para asegurar resultados fiables y reproducibles. Así, en los primeros intentos nos basámos en metodologías previamente descritas (Fernández-Acero *et al.* 2006, Jami *et al.* 2010). Los principales pasos del procedimiento sobre los cuales se trabajó fueron la lisis celular y la precipitación de proteínas que habitualmente se realiza a continuación.

En un principio se empezó utilizando la misma técnica que para la purificación de RNA, la lisis celular mecánica mediante sonicador, empleando dos condiciones diferentes (2 y 4 pulsos energizados, de 10 s cada). Se lisó el precipitado celular de 3 réplicas de cada tipo de muestra (cepas silvestre, $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$) resuspendido en 1 ml de una solución de Tris-HCl 50 mM pH 7,2, suplementada con COMPLETE⁵⁸. Posteriormente, se digirió el sobrenadante obtenido con Benzonasa⁵⁹ (Merck), una mezcla de DNasas y RNasas que permite eliminar los ácidos nucleicos de las muestras. A continuación, se procedió a precipitar las proteínas citosólicas con ácido tricloroacético⁶⁰ (TCA) y, por otro lado, con acetona (con 1 volumen, y 4-9 volúmenes, respectivamente) durante toda la noche a -20 °C. Transcurrido este tiempo, las proteínas precipitadas se resuspendieron en tampón RB (500 μ l). Las proteínas obtenidas, sin precipitar y con los dos tratamientos de precipitación se cuantificaron mediante Bradford (Bradford 1976), y se analizaron en un gel SDS-PAGE (Figura 3.45).

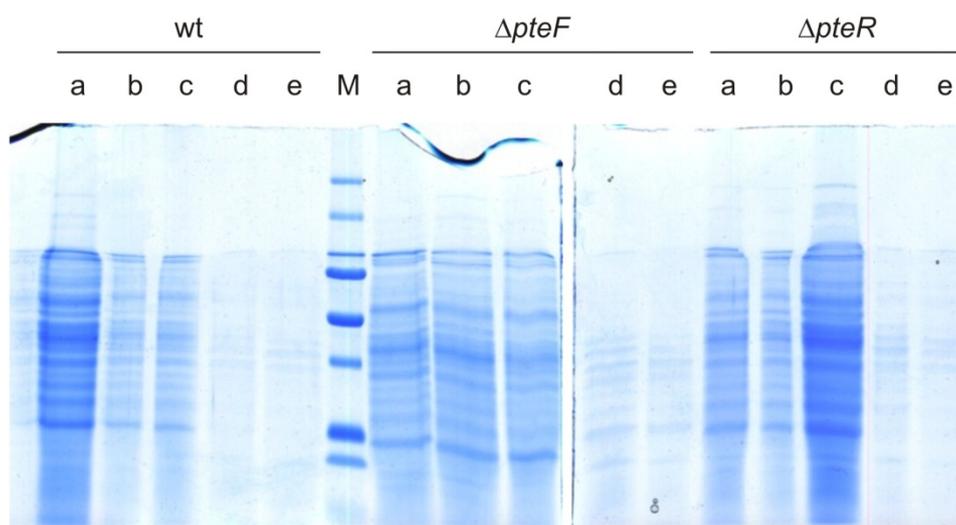


Figura 3.45. SDS-PAGE de muestras obtenidas a partir de diferentes métodos de lisis celular y precipitación. Muestras de las cepas silvestre, $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$ tratadas con sonicador y 4 pulsos energizados sin precipitar (a), precipitadas con acetona tras la posteriormente a lisis con 2 (b) y 4 pulsos (c), y precipitadas con TCA con 2 (d) y 4 pulsos (e). Se utilizó un gel de 12,5 % y 20 μ g de proteínas totales de cada muestra. En el carril M se encuentra el marcador de peso molecular. Los gels se tiñeron con *Coomassie* para la visualización de proteínas.

⁵⁸ COMPLETE: cóctel comercial de inhibidores de proteasas (Roche). Se utilizan dos pastillas por cada 50 ml de tampón de rotura. Preparar en el momento de uso.

⁵⁹ Digestión con Benzonasa: añadir 2 μ l de benzonasa por cada 600-700 μ l de sobrenadante obtenido a partir de la lisis celular, e incubar a 37 °C durante 30 minutos.

⁶⁰ Solución de TCA: 20 % (p/v) de ácido tricloroacético y 0,14 % (p/v) de ditiotreitol en acetona.

Los resultados mostraron claras diferencias entre las muestras obtenidas. La precipitación con TCA reveló ser la menos eficaz. De hecho, se observó más proteína en las muestras sin precipitar que en las restantes (Figura 3.45). Lo más sorprendente es que pareció existir un problema con la cuantificación de proteínas totales de las muestras, de tal modo que la concentración aplicada no corresponde con la intensidad de bandas obtenidas, y aunque se aplicó la misma concentración de todas las muestras en el gel (20 μg) se observaron claras diferencias. Esto indica que los protocolos de precipitación concentran no sólo proteínas pero algún compuesto más que interfiere con el método de Bradford, de modo que la concentración de las muestras termina sobreestimada.

Así, el paso siguiente fue probar otros métodos, concretamente con el sistema *FastPrep* FP120 (BIO101, Savant) empleando tubos de lisis preparados artesanalmente con esferas de vidrio de 1 mm (3 pulsos de 30 segundos a 6,5 de potencia, con 1 minuto de descanso entre pulsos) en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,2. Se probó, además, un kit comercial de limpieza de muestras proteicas, el *2-D Clean-Up Kit* (GE Healthcare). Este tratamiento permite eliminar contaminantes de tipo iónico (como detergentes o compuestos fenólicos), y se empleó utilizando 300 μg de proteínas totales de las muestras anteriormente obtenidas con lisis mediante 2 pulsos de sonicación sin precipitar (muestras a de la Figura 3.45). Todas las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 3.46).

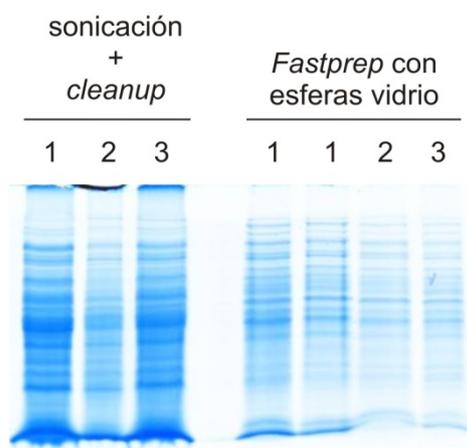


Figura 3.46. SDS-PAGE de muestras procesadas de manera diferente. Se comparan muestras de lisis mediante sonicación y posterior limpieza de 300 μg de proteínas totales con el kit comercial *Clean-Up*, con muestras de lisis con *FastPrep* y esferas de vidrio sin precipitar. Se utilizaron 20 μg de proteína de muestras de las cepas silvestre, Δpte^F y Δpte^R (carriles 1, 2 y 3, respectivamente). Los gels son de 12,5 % y se tiñieron con *Coomassie* para la visualización de proteínas.

Las muestras tratadas con el kit comercial mejoraron un poco, observándose bandas más definidas. Por otro lado, con la lisis empleando *Fastprep* y esferas de vidrio se obtuvieron muestras muy similares a las obtenidas con la sonicación (Figura 3.46).

En un intento de mejorar la pureza de las muestras, se utilizó un método alternativo de precipitación de proteínas empleando cloroformo y metanol, que hace uso de la separación de fases de los dos solventes para eliminar sales y detergentes. El protocolo consiste en: mezclar 100 µg de proteínas totales en un volumen de 100 µl con 400 µl de metanol, agitar bien con vortex y se añadir 100 µl de cloroformo volviendo a mezclar bien; añadir 300 µl de agua mili-Q, mezclar bien con vortex y eliminar la fase superior; añadir 300 µl de metanol, mezclar bien y precipitar las proteínas por centrifugación; eliminar el sobrenadante, dejar secar el precipitado de proteínas y resuspender en tampón RB2 con 30 mM Tris-HCl. Así, se analizaron con SDS-PAGE varios tipos de muestras diferentes: las proteínas obtenidas anteriormente mediante *Fastprep*, una versión de esas mismas tratadas con el kit comercial *2-D Clean-Up* (GE Healthcare), otra versión de las mismas precipitadas con cloroformo y metanol, muestras de proteínas obtenidas a partir de lisis de cultivos con esferas de vidrio en tampón RB2 con 30 mM Tris-HCl, sin precipitar y precipitadas con cloroformo y metanol, y finalmente muestras de proteínas obtenidas a partir de lisis de cultivos con sonicación en tampón RB2 y 30 mM Tris-HCl, sin precipitar y precipitadas con cloroformo y metanol (Figura 3.47A). A continuación, dos de esas muestras (lisis con esferas de vidrio en tampón 50 mM Tris-HCl seguido de tratamiento con el kit *Clean-Up*, y lisis con sonicación en tampón RB2 suplementado con 30 mM Tris-HCl) se analizaron con geles 2-D (tiras de 7 cm y pH 3-10) (Figura 3.47B).

Con cualquiera de los tipos de lisis celular probados, el método de precipitación con cloroformo y metanol no dió buenos resultados, obteniéndose bandas proteicas poco definidas y con algo de fondo en los carriles. Sin embargo, cuando se comparó con las mismas muestras sin tratar, el uso del kit *Clean-Up* sí mejoró el aspecto general de las muestras. De las 10 muestras analizadas, se seleccionaron dos métodos distintos para realizar un gel 2-D (una muestra de cada). Dichos métodos fueron la lisis en tampón 50 mM Tris-HCl con esferas de vidrio seguida de tratamiento con el kit *Clean-Up*, y la lisis con sonicación en tampón RB2 con 30 mM Tris-HCl. Los resultados de los geles 2-D mostraron que el rendimiento del primer método es inferior al método de lisis con sonicación en tampón RB2 suplementado con 30 mM Tris-HCl, obteniéndose puntos de proteínas más pequeños y en menor cantidad. Esto se puede deber a que, en esencia, el kit emplea una precipitación de tipo TCA, una metodología que ya demostró ser poco eficaz para este tipo de muestras (bajo rendimiento). Al mismo tiempo, quedó patente que los puntos isoelectrónicos del proteoma de *S. avermitilis* son mayoritariamente ácidos, así que en ensayos futuros se emplearon tiras IPG de pH 4-7.

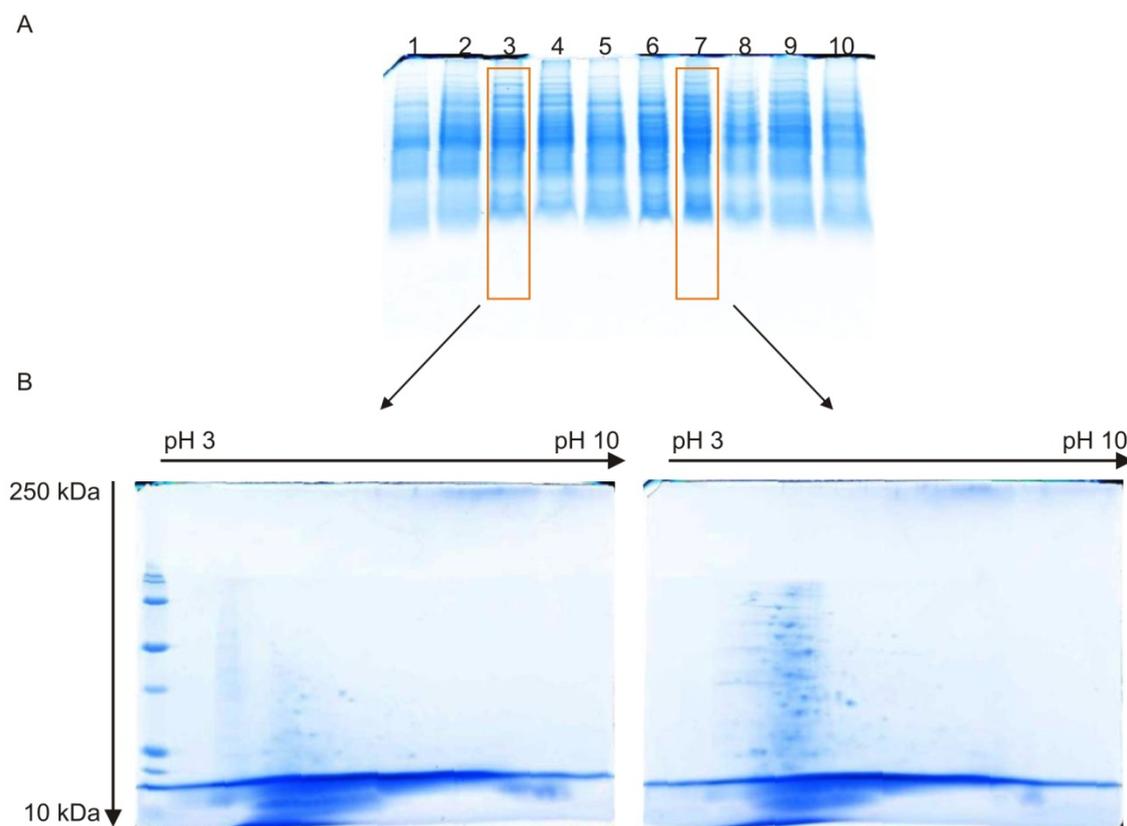


Figura 3.47. Estudio de diferentes técnicas de purificación de proteínas de *S. avermitilis*. (A) SDS-PAGE (12,5 %) de varias muestras proteicas (20 μ g) obtenidas con distintos métodos: carriles 1 y 2, lisis con esferas vidrio sin precipitar; carriles 3 y 4, lisis con esferas de vidrio y tratamiento con el kit *Clean-Up*; carriles 5 y 6, lisis con esferas de vidrio y precipitación con cloroformo/metanol; carril 7 y 8, lisis con sonicación y esferas de vidrio, respectivamente, sin precipitar; carriles 9 y 10, lisis con sonicación y esferas de vidrio, respectivamente, y precipitación con cloroformo/metanol. Para cada condición se probó una muestra de cultivo de la cepa silvestre y otra de una cepa mutante. (B) Las muestras de los carriles 3 y 7 se seleccionaron para realizar un gel 2-D (12,5 %), empleando 100 μ g de proteínas totales y tiras IPG de 7 cm y pH 3-10. En todos los casos, para la visualización de proteínas los geles se tiñeron con *Coomassie*.

Con base en estos resultados, se optó por establecer como metodología estándar para los estudios posteriores la lisis celular con sonicación en tampón RB2 suplementado con 30 mM Tris-HCl. El principal obstáculo al usar metodologías basadas en la precipitación de proteínas, en cualquiera de sus modalidades, es la contaminación de las muestras con algún compuesto que interfiera con la cuantificación mediante Bradford, de modo que se obtienen muestras sobreestimadas. Para intentar circunvalar este problema se utilizó un método alternativo de cuantificación, el kit *2-D Quant* (GE Healthcare). Sin embargo, este kit también se basa en la precipitación de proteínas (aunque ligeramente diferente, con una solución de cobre) por lo que problema inicial persistió. El hecho de que los métodos habituales de precipitación con TCA y acetona resultasen en muestras poco

puras y con una valoración de concentración errónea (sobreestimación) fue inesperado, puesto que se han publicado trabajos de análisis proteómica en *S. avermitilis* en los que se emplean metodologías similares (Yin *et al.* 2008).

3.9.2. Diseño experimental

La técnica DIGE se desarrolló siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (GE Healthcare), junto con algunas modificaciones detalladas en trabajos anteriores (Flores *et al.* 2005). Con base en los resultados de transcriptómica mediante *microarrays*, se decidió analizar solamente muestras de la fase exponencial de crecimiento (t1), por ser la fase donde se observaron más cambios estadísticamente significativos. De cada una de las tres condiciones, cepa silvestre y cepas mutantes $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$, se analizaron previamente 5 réplicas biológicas para comprobar su estado y homogeneidad para todas las condiciones (Figura 3.48).

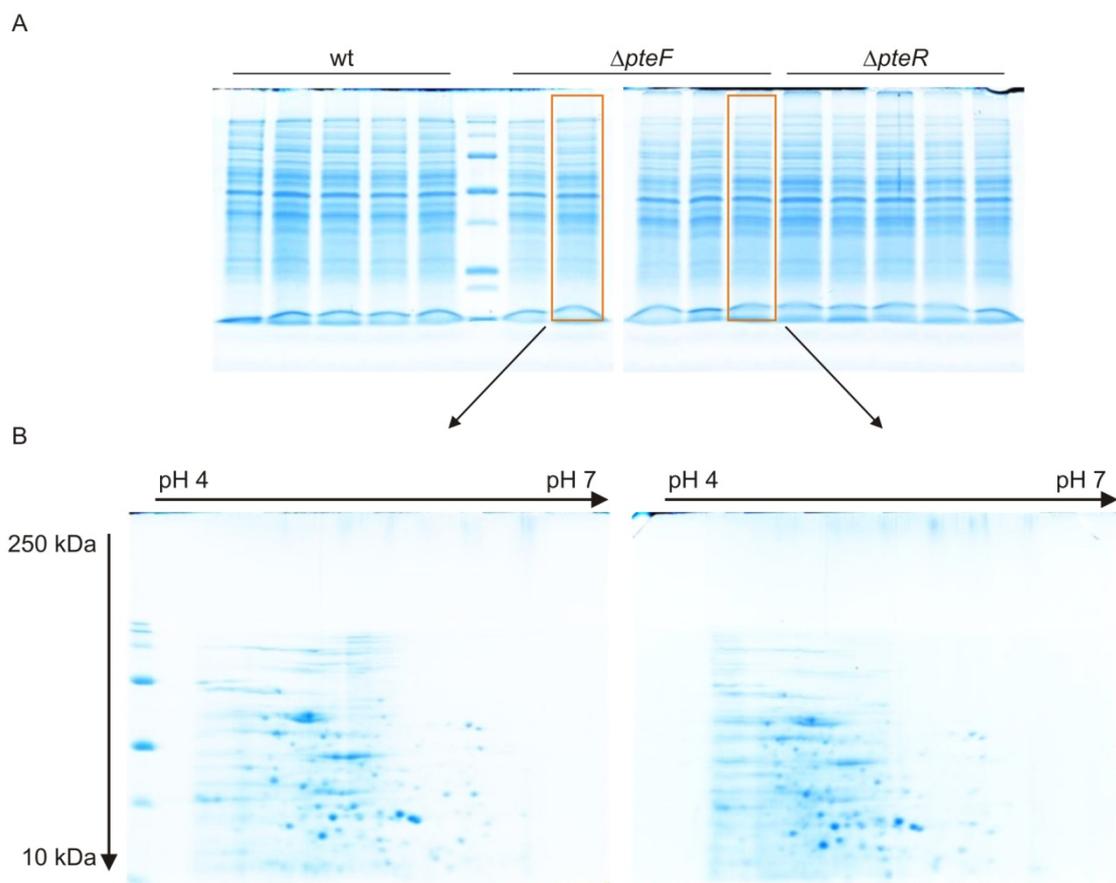


Figura 3.48. Análisis preliminar de las muestras objeto de estudio. (A) SDS-PAGE de las 5 réplicas biológicas de cada una de las condiciones: cepa silvestre, $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$. Se utilizaron 20 μg de proteínas totales obtenidas con el procedimiento estándar establecido. (B) Geles 2-D con 120 μg de proteínas totales de las dos muestras seleccionadas al azar. Se utilizaron tiras IPG pH 4-7 y un gel de 12,5 %. Los geles se tiñieron con *Coomassie*.

Tras verificar que todas las muestras eran similares, se seleccionaron 4 al azar y se procedió al marcaje con los fluoróforos. Se empleó la estrategia de alternancia de marcaje (*Dye swap*) con los fluoróforos Cy3 y Cy5 para las diferentes condiciones, de tal modo que 2 réplicas biológicas de una misma condición fueron marcadas con Cy3 y las otras 2 con Cy5. En un gel se analizaron dos muestras, cada una marcada con un fluoróforo diferente, y se incluyó además un estándar interno (marcado con Cy2), que es una mezcla equimolar de todas las muestras a analizar (Figura 3.49). De este modo, a partir de los 6 geles iniciales se obtuvieron un total de 18 imágenes (cada gel se escaneó 3 veces, una por cada fluoróforo presente). El estándar interno reduce la variabilidad entre geles, permitiendo obtener resultados estadísticamente significativos entre las condiciones con mayor nivel de confianza. Además, torna innecesaria la presencia de una muestra de la condición control en cada uno de los geles.

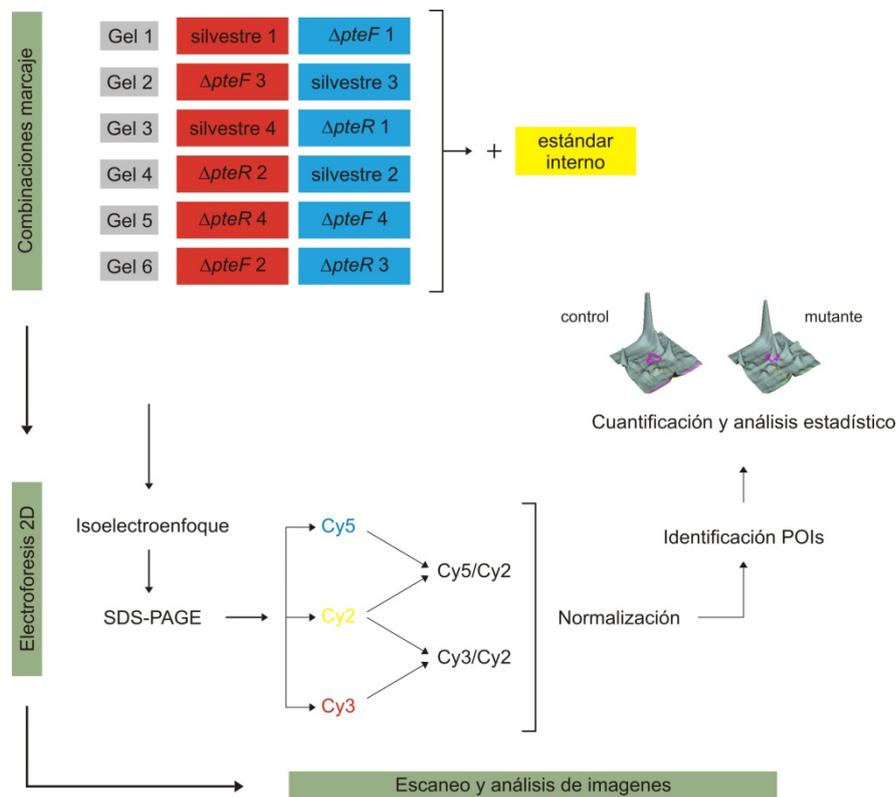


Figura 3.49. Esquema de las etapas del análisis proteómico comparativo de los tres grupos experimentales.

Una vez marcadas todas las muestras, se procedió a su separación con electroforesis 2-D en geles (Figura 3.49). Posteriormente, se escanearon todos los geles con el equipo *Ettan™ DIGE Imager* (GE Healthcare). Se detectaron un total de 2484 puntos de proteínas

individuales (*spots*) del proteoma de *S. avermitilis*, lo que demuestra la eficiencia del marcaje con DIGE, superior incluso a la tinción con plata (Miller *et al.* 2006).

Las imágenes obtenidas se compararon entre si utilizando el modelo “A-B”, habitual para experimentos de control versus tratado. Después de un análisis estadístico para estudiar las diferencias entre los proteomas de las diferentes cepas, se identificaron las proteínas de interés o POIs (del inglés *proteins of interest*). Estas se extrajeron de uno de los gels del experimento y, en aquellos casos en los que no se consiguieron encontrar los *spots*, se extrajeron de un gel preparativo realizado *a posteriori* con 3 veces más proteína (400 µg) sin marcar utilizando una mezcla equimolar de todas las muestras.

Después de digitalizados, los gels se tiñieron con azul de *Coomassie* coloidal (*Blue Silver*) (Candiano *et al.* 2004). Este método de detección de proteínas colorimétrico es altamente sensible (límite de 1 ng) y no interfiere con el proceso de digestión trípica por ser fácilmente eliminado. De este modo, es posible visualizar las proteínas que se identificaron como de interés mediante fluorescencia y que se pretenden cortar para su posterior identificación (Figura 3.50).

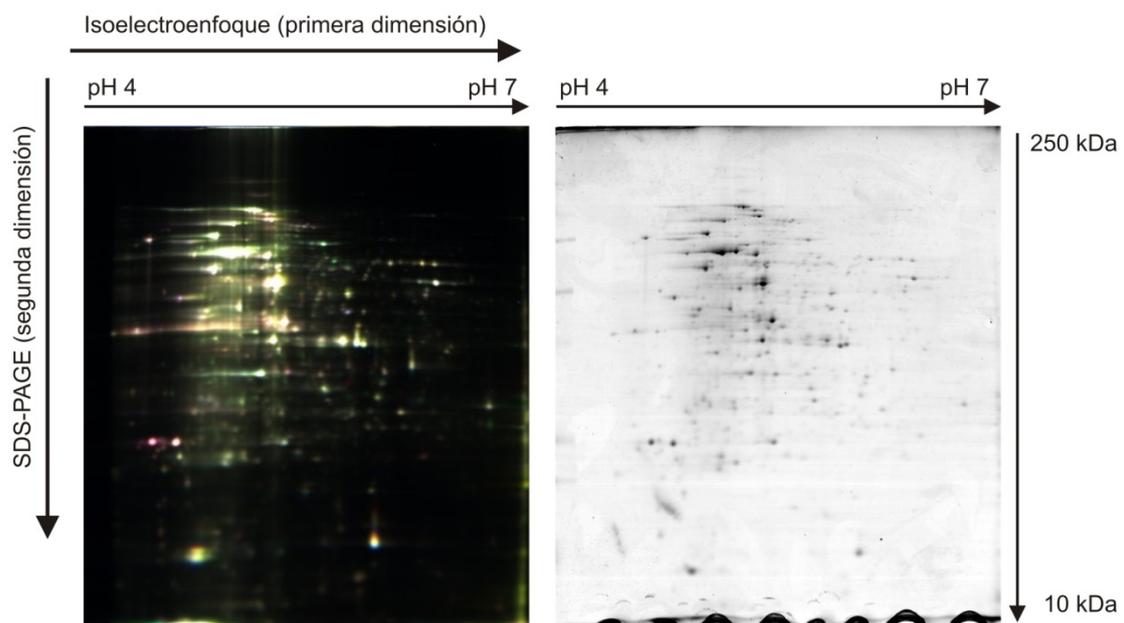


Figura 3.50. Proteoma de *S. avermitilis*. Detección de proteínas de un mismo gel con los fluoróforos (izda.) y mediante tinción con *Coomassie*.

3.9.3. Análisis estadístico del proteoma de las cepas mutantes

El análisis estadístico de la expresión diferencial, a partir de las imágenes digitalizadas de los 6 geles que contienen el proteoma de las tres cepas de *S. avermitilis* a estudiar, se hizo utilizando el software *DeCyder 2D* versión 7.0 (GE Healthcare). En el primer análisis realizado, el módulo *Biological Variance Analysis* (BVA) del programa permite comparar las imágenes y determina las diferencias estadísticamente significativas, utilizando diferentes pruebas estadísticas: el promedio de proporciones, la distribución *t-student* y la ANOVA. Los criterios estadísticos aplicados para identificar una proteína de interés fueron: cambio lineal de la abundancia de proteína en la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre mayor que o igual a 1,5 veces (positivo o negativo), cambios con una significación estadística de valor p inferior a 0,05, y la presencia de dicha proteína en el 70 % de las imágenes de los geles (en 13 de las 18 imágenes). De este modo, el BVA posibilita seleccionar las proteínas de interés, que más tarde se escindirán del gel para su identificación.

El siguiente módulo del software, el *Extended Data Analysis* (EDA), permite hacer una primera valoración y encontrar patrones de expresión diferencial dentro del total de los datos. El PCA (*Principal Component Analysis*) es una herramienta de este módulo que se utilizó para reducir la dimensión de las variables utilizando la correlación que existe entre ellas. Estas definen el objeto de estudio, en este caso la presencia de una mutación en el genoma de *S. avermitilis*. El primer componente principal contiene la mayoría de la información (o variabilidad del conjunto de datos), y sucesivamente el resto de los componentes contienen menos información. Este análisis proporciona información sobre la similitud que existe entre los diferentes proteomas, el de la cepa silvestre y los dos de los mutantes $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$, en función de la presencia/ausencia, posición e intensidad de los puntos de proteínas de los geles. Para ello se establecieron como parámetros a considerar los puntos de proteínas con abundancia estadísticamente significativa con valor $p < 0,05$ y que estuvieran presentes en al menos el 80 % de todas las imágenes de geles (14 de las 18 en total).

Lo más evidente del análisis PCA es que la mayoría de las 4 réplicas biológicas de cada condición se agruparon en zonas distintas de la gráfica (Figura 3.51). Esto es especialmente evidente en las cepas silvestre y mutante $\Delta pteF$, que son las condiciones donde se agruparon el mayor número de réplicas (4 y 3 réplicas, respectivamente). Esto indica que los valores de abundancia relativa de cada proteína fueron reproducibles entre

las réplicas de cada condición. Esta reproducibilidad confiere mayor confianza estadística a las conclusiones que se infieren sobre el comportamiento del proteoma de cada cepa. En el caso del mutante $\Delta pteR$, las réplicas estaban más dispersas y sólo dos estaban en la misma región de la gráfica.

Por otro lado, también se observó que el proteoma de *S. avermitilis* responde de manera distinta a cada mutación, ya que los grupos de réplicas biológicas de cada cepa se encontraron en regiones distintas de la gráfica. Así, la cepa silvestre (control) difirió claramente de las otras dos condiciones, mostrando sus 4 réplicas biológicas situadas en el cuadrante inferior izquierdo. La cepa $\Delta pteF$ las mostró en el cuadrante directamente opuesto (cuadrante superior derecho), y la cepa $\Delta pteR$ en un cuadrante diferente al ocupado por las otras dos condiciones (cuadrante inferior derecho) pero presentando también la mayor distancia entre réplicas (Figura 3.51).

Figura 3.51. Representación gráfica del análisis PCA. Se compararon 18 imágenes 2D-DIGE de proteínas intracelulares de *S. avermitilis* marcadas con Cy3 y Cy5, y se agruparon las tres condiciones individuales por dos componentes principales (PC1 y PC2). Los puntos representan valores de expresión global de cada réplica biológica cuyos cocientes o ratio superan un factor de 1,5 (ANOVA $p < 0,05$). Wt, cepa silvestre; pteF, cepa mutante $\Delta pteF$; pteR, cepa mutante $\Delta pteR$.

Los resultados del análisis transcripcional de las cepas mediante *microarrays* (apartado 3.8.2) confirman las diferencias de patrón observados, en los que ambas cepas mutantes presentaron un comportamiento distinto al de la cepa silvestre, y el mutante $\Delta pteR$ es el que menos cambios estadísticamente significativos mostró.

El análisis estadístico de la expresión diferencial de proteínas en las tres cepas, siguiendo los parámetros establecidos, mostró que existía un total de 47 POIs en el proteoma de la cepa $\Delta pteF$ (17 subexpresadas y 30 sobreexpresadas), y 36 en el proteoma de la cepa $\Delta pteR$ (11 POIs subexpresadas y 25 sobreexpresadas), con respecto al de la cepa silvestre. Estos resultados también concuerdan con los obtenidos anteriormente (apartado 3.8.2), y una vez más se observó un efecto predominantemente negativo en ambos reguladores.

3.9.4. Identificación de proteínas diferencialmente expresadas

Una vez procesados los datos y seleccionadas las POIs, se consiguieron escisar un total de 35 POIs. Este número reducido de proteínas picadas (42 % del total de POIs identificadas) se debe a que, incluso utilizando el gel preparativo con 400 μg de proteínas totales, la cantidad de proteína presente en los *spots* fue demasiado baja para su detección con un método de tinción como el *Coomassie*.

Estos *spots* se digirieron con tripsina y los péptidos obtenidos se analizaron por espectrometría de masas MALDI TOF/TOF (apartado 2.13.4). Los patrones de digestión obtenidos de huella peptídica (PMF) y las secuencias de aminoácidos obtenidos por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se contrastaron con todas las proteínas de la base de datos no redundante del NCBI, utilizando el software *Mascot* (apartado 2.13.5).

Se consiguieron identificar aproximadamente un 43 % de los *spots* digeridos (15 proteínas), de los cuales 14 fueron proteínas únicas. Se trata de un número relativamente bajo cuando se compara con otros trabajos publicados, que habitualmente rondan el 70 % (Rodríguez-García *et al.* 2007, Le Maréchal *et al.* 2013, Michta *et al.* 2014). Como es habitual en este tipo de experimentos, se detectaron isoformas de proteínas. La presencia de variantes de proteínas se ha descrito en varios organismos como *E. coli* y *C. glutamicum*, con una media de 1,18 y 1,15 variantes por proteína, respectivamente, que se deben a modificaciones en el *pI* o variaciones en la masa molecular (Schaffer *et al.* 2001). En *S. coelicolor*, se han descrito una media de 1,2 variantes por proteína, incluyendo varias proteínas involucradas en la biosíntesis de actinorrodina que presentan más de una isoforma (Hesketh & Chater 2003, Hesketh *et al.* 2002). Estas proteínas identificadas se indican en las Tablas 3.11 y 3.12.

Las proteínas expresadas diferencialmente en la cepa $\Delta pteF$ que se identificaron pertenecen a los mismos grupos funcionales que ya se habían identificado como afectados en el análisis transcripcional mediante *microarrays* (apartado 3.8.2). De hecho, en algunos casos se identificó exactamente la misma proteína o proteínas de la misma familia. Es el caso del gen *galE5* (SAV1011), que codifica una UDP-glucosa 4-epimerasa involucrada en el metabolismo de carbohidratos, o el caso del gen *accD1* (SAV5278) que codifica una acetil/propionil CoA carboxilasa, o el gen *echA9* (SAV3327) que codifica una enoil-CoA hidratasa. Estos últimos dos genes pertenecen a familias génicas ya anteriormente identificadas en el análisis de *microarrays* (*accA2* (SAV5277) y *echA1* (SAV492), respectivamente).

Tabla 3.11. Proteínas diferencialmente expresadas en el mutante $\Delta pteF$ identificadas mediante espectrometría de masas. Se indica la posición del *spot* (Pos.), la posición en el genoma (Locus), el nombre del gen cuando es conocido (Gen), el cambio de expresión observado (ratio), el resultado de la prueba estadística *t-student* (t-test), el resultado de la prueba estadística de análisis de varianza entre los grupos experimentales (ANOVA) y la puntuación de identificación por *Mascot* (*score*).

Pos.	Locus	Gen	Descripción	ratio	t-test	ANOVA	score
486	SAV5278	<i>accD1</i>	acetil/propionil CoA carboxilasa, subunidad β	-2,01	0,0013	0,0083	294
618	SAV5342	<i>iolA2</i>	metilmalonato semialdehído deshidrogenasa	-1,72	0,0010	0,0410	154
855	SAV3962	<i>msiK</i>	proteína de unión a ATP transportador azúcares	-1,62	0,0066	0,0090	405
949	SAV5617	<i>arcB3</i>	ornitina ciclodesaminasa	-2,03	0,0005	0,0130	599
1154	SAV1011	<i>galE5</i>	UDP-glucosa 4-epimerasa	2,44	0,0007	0,0000	137
1227	SAV1937		inositol monofosfatasa	1,66	0,0110	0,0160	144
1280	SAV6713		proteína interacción sideróforo	1,86	0,0002	0,0004	309
1379	SAV4238		proteína hipotética	-1,63	0,0048	0,0370	630
1440	SAV3628	<i>exoA</i>	exodesoxiribonucleasa	4,10	0,0026	0,0094	116
1541	SAV3327	<i>echA9</i>	enoil-CoA hidratasa	-1,60	0,0077	0,0059	593
1850	SAV696		proteína hipotética	4,52	0,0000	0,0000	345
1892	SAV6274	<i>terD6</i>	proteína resistencia a telurio	1,53	0,0002	0,0000	347
1907	SAV3232	<i>ahpC</i>	alquil hidroperóxido reductasa	1,52	0,0025	0,0014	112

Interesantemente, el cambio de expresión de la proteína GalE5 es muy similar al calculado con la expresión génica para el mismo momento de la fase de crecimiento (ratio 2,44 y 1,94 de valor Mc, respectivamente). Asimismo, en la cepa $\Delta pteR$ también se identificó GalE5 y una vez más coincide con el análisis transcripcional, con un valor de Mc

de 2,93 y ratio 4,20 (Figura 3.52A). En conjunto, estas observaciones dan confianza y robustez a los resultados obtenidos.

Además, se identificaron en $\Delta pteF$, proteínas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos como ArcB3 (SAV5617), una ornitina ciclodesaminasa detectada en menor cantidad en el mutante, que igualmente que otros genes relacionados con este tipo de metabolismo se habían identificado como subexpresados en el análisis transcripcional. También IolA2 (SAV5342), una metilmalonato semialdehído deshidrogenasa, se encontró en menor abundancia en el mutante (Figura 3.52B). Esta proteína está relacionada con el metabolismo de carbohidratos, pero también con la degradación de aminoácidos ramificados (como la valina, leucina e isoleucina) cuyos productos se emplean como precursores en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Denoya *et al.* 1995, Stirrett *et al.* 2009). Otros genes relacionados con este tipo de catabolismo también se vieron afectados en el análisis de transcriptómica, como es el caso de *leuB*, lo que indica una tendencia del regulador para afectar los mismos procesos.

Otras de las proteínas identificadas están relacionadas con: el metabolismo de lípidos, como EchA9 (SAV3327), una enoil-CoA hidratasa que estaba expresada en menor cantidad en el mutante (Figura 3.52C); el transporte, como Msik (SAV3962), una proteína de unión a ATP transportador de azúcares detectada también en menor cantidad en la cepa mutante; la reparación de DNA, como ExoA (SAV3528), una exodesoxiribonucleasa se observó en mayor cantidad en el mutante; la proteína SAV1937 que es una inositol monofosfatasa relacionada con el metabolismo secundario cuya expresión aumentó; SAV6713, una proteína de interacción con sideróforos que también apareció en mayor cantidad; y con el metabolismo de carbohidratos, como *accD1* (SAV5278), una acetil/propionil CoA carboxilasa que resultó estar en menor abundancia en la cepa mutante $\Delta pteF$ (Figura 3.52D).

Curiosamente, también se identificó una proteína de resistencia al telurio, TerD6 (SAV6377), que se ha relacionado con la diferenciación morfológica (Sanssouci *et al.* 2011, 2012). En el análisis de transcriptómica también se identificó un gen de la misma familia, *terD3* (SAV), pero en este caso estaba subexpresado en el mutante $\Delta pteR$, y no sobreexpresado en la cepa $\Delta pteF$ como en este caso (Figura 3.52E). Puede que la diferencia se deba a que en el análisis transcriptómico este gen se identificase en la fase estacionaria de crecimiento (t2), que no coincide con el tiempo de análisis del proteoma del mutante.

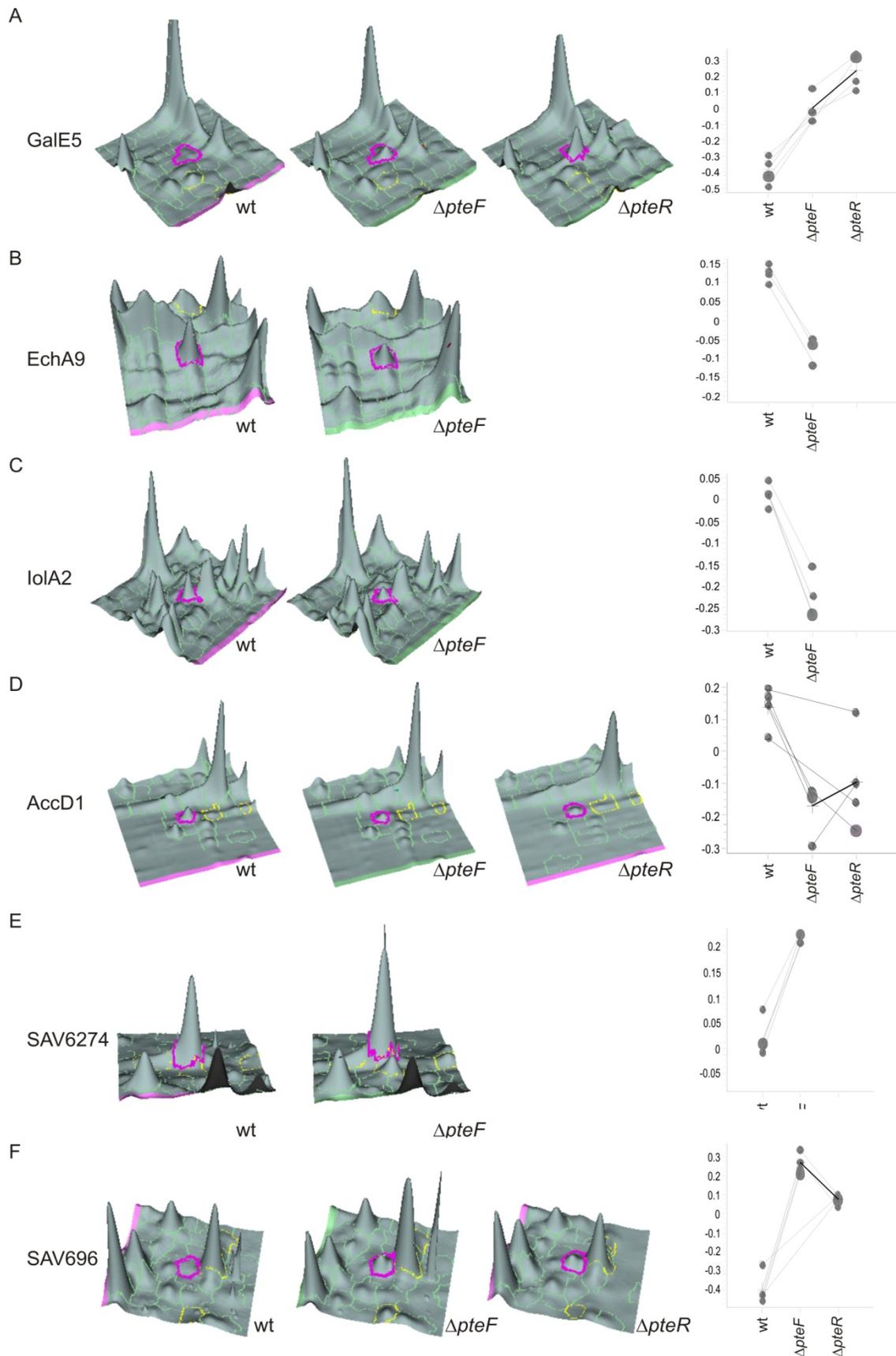


Figura 3.52. Análisis de la expresión diferencial de proteínas. Representaciones gráficas de la expresión de las proteínas GalE5 (A), EchA9 (B), IolA2 (C), AccD1 (D), SAV6274 (E) y SAV696

(F). Para cada proteína, los tres primeros paneles representan la intensidad de los *spots* en el gel en forma de volumen, y el cuarto panel representa los cambios en el logaritmo de la abundancia estandarizada (eje vertical) para cada una de las cepas (eje horizontal).

Tabla 3.12. Proteínas diferencialmente expresadas en el mutante Δ pteR identificadas mediante espectrometría de masas. Se indica la posición del *spot* (Pos.), la posición en el genoma (Locus), el nombre del gen cuando es conocido (Gen), el cambio de expresión observado (ratio), el resultado de la prueba estadística *t-student* (t-test), el resultado de la prueba estadística de análisis de varianza entre los grupos experimentales (ANOVA) y la puntuación de identificación por *Mascot* (*score*).

Pos.	Locus	Gen	Descripción	ratio	t-test	ANOVA	Score
486	SAV5278	<i>accD1</i>	acetil/propionil CoA carboxilasa, subunidad β	-1,63	0,0340	0,0083	294
855	SAV3962	<i>msiK</i>	proteína de unión a ATP transportador azúcares	-1,62	0,0057	0,0090	405
1030	SAV6296	<i>gap2</i>	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	-1,41	0,0011	0,0230	572
1154	SAV1011	<i>galE5</i>	UDP-glucosa 4-epimerasa	4,20	0,0001	0,0000	137
1850	SAV696		proteína hipotética	2,92	0,0000	0,0000	345
1907	SAV3232	<i>ahpC</i>	alquil hidroperóxido reductasa	1,59	0,0044	0,0014	112

En la cepa mutante Δ pteR el número de proteínas identificadas fue menor que en Δ pteF. La única proteína exclusiva de esta cepa fue Gap2 (SAV6296), una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa involucrada en el metabolismo de carbohidratos y en la biosíntesis de aminoácidos. Curiosamente, esta enzima también se ha relacionado con la biosíntesis de metabolitos secundarios, puesto que es responsable de la degradación del D-gliceraldehído-3-fosfato, un precursor esencial para algunas rutas biosintéticas. Es el caso del ácido clavulánico producido por *S. clavurigerus*, cuya biosíntesis se inicia con la condensación de L-arginina y D-gliceraldehído-3-fosfato, y se ha demostrado que es posible aumentar su producción con la delección de este tipo de enzimas (Li & Townsend 2006, Jnawali *et al.* 2010). También se han relacionado estas enzimas con la pentalenolactona, un antibiótico sesquiterpeno producido por *S. avermitilis*. Se ha descrito que, mientras la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa Gap1 (SAV2990) que está situada en el *cluster* biosintético del metabolito (*ptl*), confiere resistencia al antibiótico, la isozima Gap2 (SAV6296) es inactivada por la pentalenolactona, por lo que su función sería distinta (Tetzlaff *et al.* 2006).

Del mismo modo que la cepa mutante Δ pteF, en Δ pteR las proteínas MsiK (SAV3962) y AccD1 (SAV5278), también se encontraron con niveles de expresión inferiores a la cepa silvestre (Figura 3.52D).

Una proteína cuyos cambios observados fueron notables fue SAV696, que en ambas cepas mutantes apareció subexpresada y con valores de significancia muy buenos (Figura 3.52E). Al tratarse de una proteína hipotética no es posible deducir un efecto celular de estos reguladores, pero es una prueba más de que estos reguladores tienen papeles similares.

Por último, la AhpC (SAV3232) también se identificó en ambos mutantes como sobreexpresada. Se trata de una alquil hidroperóxido reductasa que forma un sistema con AhpD que está relacionado con el estrés oxidativo en actinobacterias (Hillas *et al.* 2000), incluyendo *S. natalensis* (Beites *et al.* 2011, 2014). En los estudios ómicos realizados en este trabajo, es la primera vez que se identifica una proteína de este tipo, lo que sugiere que aun quedan muchos aspectos relacionados con el papel de estos reguladores por desvelar.

Todas estas observaciones parecen confirmar los resultados anteriores de transcriptómica. Aunque con un número inferior de proteínas para estudiar, parece evidente que la acción de los reguladores aquí detectada sigue la misma tendencia y afecta el mismo tipo de procesos funcionales. Curiosamente, una de las pocas diferencias encontradas es la ausencia entre las proteínas identificadas de reguladores y proteínas relacionadas directamente con el metabolismo secundario. Es posible que estas proteínas, al estaren naturalmente en menor cantidad que otras relacionadas con el metabolismo primario, sean más difíciles de encontrar. Además, bajo número de proteínas que se consiguieron identificar correctamente no facilitó la tarea.

4. VISIÓN GLOBAL

Los *Streptomyces* son conocidos por su capacidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios, mucho de ellos de gran importancia clínica y económica. De hecho, las bacterias de este género se utilizan en la producción industrial de medicamentos como antibióticos, anticancerígenos o antifúngicos. Entre estos últimos se cuentan los macrólidos polienos, y su característica elevada actividad antifúngica les convierte en el grupo de compuestos de origen natural más importante en el tratamiento de las infecciones causadas por hongos. Sin embargo, la prevalencia de las micosis, en especial de las de tipo oportunista invasivo, hace necesario la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos para el desarrollo de nuevas terapias.

El avance en los estudios de los macrólidos polienos ha sido enorme en los últimos años. Conocer sus mecanismos de acción, biosíntesis y regulación es una herramienta fundamental para comprender la producción de este tipo de compuestos y conseguir aumentar su producción. En este sentido, el objetivo principal de esta tesis ha sido el de contribuir al conocimiento de los polienos utilizando como modelo la filipina, un pentaeno no glicosilado.

La agrupación biosintética de la filipina en *S. avermitilis* incluye dos genes reguladores, *pteF* y *pteR*, ortólogos a los genes *pimM* y *pimR* (respectivamente) de *S. natalensis*, y que presumiblemente actuarían como reguladores positivos específicos de ruta. Los reguladores *pimM* y *pimR* fueron los primeros de su tipo en ser descritos y codifican proteínas con arquitecturas muy particulares. El hecho de que existan genes ortólogos a *pimM* altamente conservados en todos los *clusters* biosintéticos de macrólidos polienos conocidos hasta la fecha, así como la presencia del ortólogo de *pimR* en el *cluster* de la filipina (*pteR*), convierte a estos dos genes en modelos de la regulación de la producción de polienos.

La regulación de la producción de metabolitos secundarios es una de las vías más intuitivas y fácilmente manipulables cuando se pretende aumentar la producción industrial e incluso descubrir nuevos compuestos (Chen *et al.* 2010b, Olano *et al.* 2014, Vicente *et al.* 2014, 2015). La disponibilidad del genoma completamente secuenciado de *S. avermitilis* (Ikeda *et al.* 2003, Omura *et al.* 2001) permite el estudio integral de los efectos de los reguladores PteF y PteR, y así se plantearon los objetivos de este trabajo.

El estudio funcional de *pteF* y *pteR* reveló que efectivamente los reguladores PteF y PteR actúan como reguladores positivos (activadores transcripcionales) de la biosíntesis de

filipina. PteF lleva a cabo su función mediante la interacción directa con dos promotores de la agrupación génica, *pteA1* y *pteA2*. Además, se demostró que *pteF* está incorrectamente anotado en las bases de datos y tiene en realidad 579 bp, un tamaño idéntico al de *pimM* (Vicente *et al.* 2014). Igualmente, es posible que lo mismo suceda con la anotación de los genes *pscRI* de *S. griseus* y *nysRIV* de *S. noursei*.

En el caso de PteR, inicialmente se creía que su efecto modulador sobre la biosíntesis de filipina podría estar mediado por el control de la expresión del regulador PteF. Ensayos EMSA realizados anteriormente mostraron que la proteína PimR^{SARP} (Santos-Aberturas *et al.* 2012) reconoce y se une al promotor de PteF (comunicación personal del Dr. Javier Santos Aberturas). Puesto que las regiones intergénicas entre los genes ortólogos están altamente conservadas y que la secuencia reconocida por PimR está presente en la región intergénica *pteF-pteR* con una identidad del 100 %, se supuso que en *S. avermitilis* existía un mecanismo similar al observado en *S. natalensis* donde la única diana de PimR es el promotor de *pimM* donde actúa como modulador positivo de la expresión del gen (Santos-Aberturas *et al.* 2012). Sin embargo, en *S. avermitilis* la expresión de *pteF* aumenta en el mutante Δ *pteR*, lo que debería producir un aumento en la producción de filipina y no una disminución como se observó. Así, esto indica que el sistema regulador de PteF y PteR en *S. avermitilis* es distinto, y que PteR controla la biosíntesis de filipina a través de un mecanismo diferente y probablemente incluyendo proteínas intermediarias.

El regulador PteF tiene además un papel en la diferenciación morfológica, como sugiere el retraso en el proceso de esporulación visible en la cepa mutante. Se trata de la primera evidencia de un regulador PAS-LuxR que es capaz de afectar a la esporulación. Además, este papel funcional independiente de la producción de filipina apunta hacia otras posibles funciones. Efectivamente, el análisis bioinformático del genoma de *S. avermitilis* para la búsqueda de sitios de unión de PteF, con base en la secuencia de reconocimiento de su ortólogo funcional PimM, mostró que puede existir un abanico de procesos celulares afectados por el regulador PteF. Entre ellos está el procesamiento de la información genética, la reparación y recombinación de DNA, el metabolismo de carbohidratos, de lípidos, de aminoácidos, energético, y de vitaminas y cofactores, la diferenciación morfológica, el metabolismo secundario, y diversos procesos de regulación (Vicente *et al.* 2015).

La comprobación del efecto regulador positivo del regulador PteF sobre la producción de oligomicina, uno de los procesos predicho como afectado durante la

búsqueda bioinformática con dos operadores directamente reconocidos por el regulador, confirma el papel pleiotrópico de PteF. Aunque el tipo de regulación que efectúa es difícil de predecir solamente con la localización del operador, es evidente que el regulador PteF tiene diferentes funciones puesto que más de la mitad de los sitios de unión identificados están localizados en regiones codificantes, lejos de los promotores que son su diana canónica (Vicente *et al.* 2015).

Estudios globales, como el análisis transcripcional mediante *microarrays* y el estudio de proteómica, confirman la tendencia de los procesos antes identificados como objeto de la acción reguladora de PteF. Aunque no se puede establecer una vía directa de efectos entre los cambios observados (transcripcionales y de expresión de proteínas) y el fenotipo observado en la cepa mutante, queda claro que PteF desempeña un papel en la diferenciación morfológica. Esto confirma los restantes efectos sobre otros aspectos del metabolismo celular analizados y el carácter pleiotrópico de PteF. Además, también el regulador PteR presenta un comportamiento de regulador global, aunque en menor medida.

Uno de los procesos más afectados por PteF es sin duda el metabolismo secundario, bien a través de la regulación de otros reguladores o directamente sobre las rutas biosintéticas. Aunque es un regulador positivo de la producción de dos macrólidos, la filipina y la oligomicina, PteF actúa simultáneamente como regulador positivo y negativo de la biosíntesis de varios metabolitos secundarios producidos por *S. avermitilis*.

Los resultados aquí presentados muestran que el papel regulador de PteF y PteR es mucho más complejo de lo que antes se prevía. Las redes reguladoras en *Streptomyces* son característicamente complejas, y estos resultados lo confirman. Pero más impresionante resulta el hecho de que reguladores situados en *clusters* biosintéticos tengan efectos tan globales como los identificados en el presente trabajo. Aunque es la primera evidencia para reguladores PAS-LuxR y SARP/LAL, no se trata sin embargo de algo completamente novedoso en *S. avermitilis* (Chen *et al.* 2009). La tradicional clasificación jerárquica “reguladores globales *vs* reguladores específicos de ruta” está pues obsoleta, y no se adapta a las redes reguladoras dinámicas y de multiseñales que constantemente se descubren en *Streptomyces* por lo que debe ser revisada.

5. CONCLUSIONES

1. PteF y PteR son reguladores positivos de la biosíntesis de filipina en *S. avermitilis*, y PteF ejerce su efecto a través de la interacción directa con dos promotores del *cluster* que controla la producción de este polieno.
2. El regulador PteF tiene un papel en la diferenciación morfológica de *S. avermitilis*.
3. El análisis bioinformático revela que PteF actúa sobre otros procesos aparte de la biosíntesis de filipina, e indica que el regulador no actúa exclusivamente sobre los promotores de los genes diana.
4. El carácter regulador promiscuo de PteF se confirma a través de su efecto modulador positivo sobre la biosíntesis de oligomicina, afectando directamente la expresión de uno de los principales genes biosintéticos responsables de la síntesis de este macrólido.
5. Los procesos celulares modulados por PteF son: el procesamiento de la información genética, mecanismos de replicación, recombinación y reparación de DNA, metabolismo de carbohidratos, metabolismo de lípidos, metabolismo de nucleótidos, vitaminas y cofactores, metabolismo energético, transporte y procesamiento de señales externas, regulación, biosíntesis de la envuelta celular y diferenciación morfológica, y metabolismo secundario.
6. Los análisis de expresión transcripcional y del proteoma de los mutantes $\Delta pteF$ y $\Delta pteR$ confirman que ambos reguladores controlan varios procesos celulares fundamentales.
7. PteF y PteR son reguladores situados en un *cluster* biosintético pero su naturaleza es pleiotrópica.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abe I, Morita H. 2010. Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type iii polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* 27(6):809–38
- Adrio JL, Demain AL. 2006. Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiol. Rev.* 30(2):187–214
- Aigle B, Lautru S, Spitteller D, Dickschat JS, Challis GL, et al. 2014. Genome mining of streptomyces ambofaciens. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41(2):251–63
- Aizawa S, Shibuya M, Shirato S. 1971. Resistaphylin, a new antibiotic. i. production, isolation and properties. *J. Antibiot. (Tokyo).* 24(6):393–96
- Alban A, David SO, Bjorkestén L, Andersson C, Sloge E, et al. 2003. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics.* 3(1):36–44
- Ali SA, Iqbal J, Nabeel, Khalil Y, Manzoor A, et al. 1997. Leishmanicidal activity of nystatin (mycostatin): a potent polyene compound. *JPMA J. Pak. Med. Assoc.* 47(10):246–48
- Allenby NEE, Laing E, Bucca G, Kierzek AM, Smith CP. 2012. Diverse control of metabolism and other cellular processes in streptomyces coelicolor by the phop transcription factor: genome-wide identification of in vivo targets. *Nucleic Acids Res.* 40(19):9543–56
- Altena K, Guder A, Cramer C, Bierbaum G. 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type b lantibiotic gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(6):2565–71
- Aminov RI. 2009. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ. Microbiol.* 11(12):2970–88
- Ammann A, Gottlieb D, Brock TD, Carter HE, Whitfield GB. 1955. Filipin, an antibiotic effective against fungi. *Phytopathology.* 45:559–63
- Ando N, Matsumori N, Sakuda S, Beppu T, Horinouchi S. 1997. Involvement of afsA in a-factor biosynthesis as a key enzyme. *J. Antibiot. (Tokyo).* 50(10):847–52
- Angert ER. 2005. Alternatives to binary fission in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(3):214–24
- Antón N, Mendes MV, Martín JF, Aparicio JF. 2004. Identification of pimR as a positive regulator of pimarin biosynthesis in streptomyces natalensis. *J. Bacteriol.* 186(9):2567–75
- Antón N, Santos-Aberturas J, Mendes MV, Guerra SM, Martín JF, Aparicio JF. 2007. PimM, a pas domain positive regulator of pimarin biosynthesis in streptomyces natalensis. *Microbiol. Read. Engl.* 153(Pt 9):3174–83
- Aparicio JF, Caffrey P, Gil JA, Zotchev SB. 2003. Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61(3):179–88

- Aparicio JF, Colina AJ, Ceballos E, Martín JF. 1999. The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin. a new polyketide synthase organization encoded by two subclusters separated by functionalization genes. *J. Biol. Chem.* 274(15):10133–39
- Aparicio JF, Fouces R, Mendes MV, Olivera N, Martín JF. 2000. A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimaricin in streptomyces natalensis. *Chem. Biol.* 7(11):895–905
- Aparicio JF, Mendes MV, Antón N, Recio E, Martín JF. 2004. Polyene macrolide antibiotic biosynthesis. *Curr. Med. Chem.* 11(12):1645–56
- Aparicio JF, Molnár I, Schwecke T, König A, Haydock SF, et al. 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
- Arabolaza A, Shillito ME, Lin T-W, Diacovich L, Melgar M, et al. 2010. Crystal structures and mutational analyses of acyl-coa carboxylase beta subunit of streptomyces coelicolor. *Biochemistry (Mosc.)*. 49(34):7367–76
- Arias P, Fernández-Moreno MA, 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):6958–68
- Aszalos A, Robison RS, Lemanski P, Berk B. 1968. Trienine, an antitumor triene antibiotic. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 21(10):611–15
- Aziz MA, Diallo S, Diop IM, Lariviere M, Porta M. 1982. Efficacy and tolerance of ivermectin in human onchocerciasis. *Lancet.* 2(8291):171–73
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, et al. 2008. The rast server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* 9:75
- Baltz RH. 1998. Genetic manipulation of antibiotic-producing streptomyces. *Trends Microbiol.* 6(2):76–83
- Baltz RH, McHenney MA, Cantwell CA, Queener SW, Solenberg PJ. 1997. Applications of transposition mutagenesis in antibiotic producing streptomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 71(1-2):179–87
- Bao K, Cohen SN. 2001. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in streptomyces. *Genes Dev.* 15(12):1518–27
- Bao K, Cohen SN. 2003. Recruitment of terminal protein to the ends of streptomyces linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear dna replication. *Genes Dev.* 17(6):774–85
- Bate N, Bignell DRD, Cundliffe E. 2006. Regulation of tylosin biosynthesis involving “sarp-helper” activity. *Mol. Microbiol.* 62(1):148–56
- Bate N, Stratigopoulos G, Cundliffe E. 2002. Differential roles of two sarp-encoding regulatory genes during tylosin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 43(2):449–58

- Becker NA, Peters JP, Maher LJ, Lionberger TA. 2013. Mechanism of promoter repression by lac repressor-dna loops. *Nucleic Acids Res.* 41(1):156–66
- Beites T, Pires SDS, Santos CL, Osório H, Moradas-Ferreira P, Mendes MV. 2011. Crosstalk between ros homeostasis and secondary metabolism in *s. natalensis* atcc 27448: modulation of pimarinic acid production by intracellular ros. *PLoS One.* 6(11):e27472
- Beites T, Rodríguez-García A, Moradas-Ferreira P, Aparicio JF, Mendes MV. 2014. Genome-wide analysis of the regulation of pimarinic acid production in *Streptomyces natalensis* by reactive oxygen species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Beknke O, Tranum-Jensen J, van Deurs B. 1984. Filipin as a cholesterol probe. i. morphology of filipin-cholesterol interaction in lipid model systems. *Eur. J. Cell Biol.* 35(2):189–99
- Belitsky BR, Sonenshein AL. 1999. An enhancer element located downstream of the major glutamate dehydrogenase gene of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(18):10290–95
- Bellier A, Gominet M, Mazodier P. 2006. Post-translational control of the *Streptomyces lividans* clgR regulon by clpp. *Microbiol. Read. Engl.* 152(Pt 4):1021–27
- Bellier A, Mazodier P. 2004. ClgR, a novel regulator of clp and lon expression in *Streptomyces*. *J. Bacteriol.* 186(10):3238–48
- Bentley SD, Brown S, Murphy LD, Harris DE, Quail MA, et al. 2004. Scp1, a 356,023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* a3(2). *Mol. Microbiol.* 51(6):1615–28
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga A-M, Challis GL, Thomson NR, et al. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* a3(2). *Nature.* 417(6885):141–47
- Bergy ME, Eble TE. 1968. The filipin complex. *Biochemistry (Mosc.)*. 7(2):653–59
- Bharati BK, Swetha RK, Chatterji D. 2013. Identification and characterization of starvation induced msdgc-1 promoter involved in the c-di-gmp turnover. *Gene.* 528(2):99–108
- Bibb M. 1996. 1995 Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* a3(2). *Microbiol. Read. Engl.* 142 (Pt 6):1335–44
- Bibb MJ. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.* 8(2):208–15
- Bi C, Rogan PK. 2006. Bipad: a web server for modeling bipartite sequence elements. *BMC Bioinformatics.* 7:76
- Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schoner BE. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene.* 116(1):43–49
- Bignell DRD, Bate N, Cundliffe E. 2007. Regulation of tylosin production: role of a tylP-interactive ligand. *Mol. Microbiol.* 63(3):838–47

- Birkó Z, Bialek S, Buzás K, Szájli E, Traag BA, et al. 2007. The secreted signaling protein factor c triggers the a-factor response regulon in streptomyces griseus: overlapping signaling routes. *Mol. Cell. Proteomics MCP*. 6(7):1248–56
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic Acids Res*. 7(6):1513–23
- Biró S, Békési I, Vitális S, Szabó G. 1980. A substance effecting differentiation in streptomyces griseus. purification and properties. *Eur. J. Biochem. FEBS*. 103(2):359–63
- Bolard J. 1986. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. Biophys. Acta*. 864(3-4):257–304
- Boos W, Shuman H. 1998. Maltose/maltodextrin system of escherichia coli: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR*. 62(1):204–29
- Börnig H, Geyer G. 1974. Staining of cholesterol with the fluorescent antibiotic “filipin.” *Acta Histochem*. 50(1):110–15
- Bourn WR, Babb B. 1995. Computer assisted identification and classification of streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res*. 23(18):3696–3703
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72:248–54
- Brautaset T, Bruheim P, Sletta H, Hagen L, Ellingsen TE, et al. 2002. Hexaene derivatives of nystatin produced as a result of an induced rearrangement within the nysc polyketide synthase gene in s. noursei atcc 11455. *Chem. Biol*. 9(3):367–73
- Brautaset T, Sekurova ON, Sletta H, Ellingsen TE, StrLm AR, et al. 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
- Brautaset T, Sletta H, Degnes KF, Sekurova ON, Bakke I, et al. 2011. New nystatin-related antifungal polyene macrolides with altered polyol region generated via biosynthetic engineering of streptomyces noursei. *Appl. Environ. Microbiol*. 77(18):6636–43
- Bruheim P, Borgos SEF, Tsan P, Sletta H, Ellingsen TE, et al. 2004. Chemical diversity of polyene macrolides produced by streptomyces noursei atcc 11455 and recombinant strain erd44 with genetically altered polyketide synthase nysc. *Antimicrob. Agents Chemother*. 48(11):4120–29
- Bunet R, Riclea R, Laureti L, Hôtel L, Paris C, et al. 2014. A single sfp-type phosphopantetheinyl transferase plays a major role in the biosynthesis of pks and nrps derived metabolites in streptomyces ambofaciens atcc23877. *PloS One*. 9(1):e87607
- Burger A, Sichler K, Kelemen G, Buttner M, Wohlleben W. 2000. Identification and characterization of the mre gene region of streptomyces coelicolor a3(2). *Mol. Gen. Genet. MGG*. 263(6):1053–60

- Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, et al. 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15(3):361–67
- Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. 2003. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(2):175–88
- Byrne B, Carmody M, Gibson E, Rawlings B, Caffrey P. 2003. Biosynthesis of deoxyamphotericins and deoxyamphoteronolides by engineered strains of streptomyces nodosus. *Chem. Biol.* 10(12):1215–24
- Caffrey P. 2003. Conserved amino acid residues correlating with ketoreductase stereospecificity in modular polyketide synthases. *ChemBioChem.* 4(7):654–57
- Caffrey P, Lynch S, Flood E, Finnan S, Oliynyk M. 2001. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem. Biol.* 8(7):713–23
- Calne RY, Collier DS, Lim S, Pollard SG, Samaan A, et al. 1989. Rapamycin for immunosuppression in organ allografting. *Lancet.* 2(8656):227
- Campelo AB, Gil JA. 2002. The candicidin gene cluster from streptomyces griseus imru 3570. *Microbiol. Read. Engl.* 148(Pt 1):51–59
- Campo N, Rudner DZ. 2007. Spoivb and ctpb are both forespore signals in the activation of the sporulation transcription factor sigmak in bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* 189(16):6021–27
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, et al. 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie g-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis.* 25(9):1327–33
- Cane DE, He X, Kobayashi S, Omura S, Ikeda H. 2006. Geosmin biosynthesis in streptomyces avermitilis. molecular cloning, expression, and mechanistic study of the germacradienol/geosmin synthase. *J. Antibiot. (Tokyo).* 59(8):471–79
- Cane DE, Liang TC, Kaplan L, Nallin MK, Schulman MD, et al. 1983. Biosynthetic origin of the carbon skeleton and oxygen atoms of the avermectins. *J. Am. Chem. Soc.* 105(12):4110–12
- Cann JR. 1998. Theoretical studies on the mobility-shift assay of protein-dna complexes. *Electrophoresis.* 19(2):127–41
- Carmody M, Byrne B, Murphy B, Breen C, Lynch S, et al. 2004. Analysis and manipulation of amphotericin biosynthetic genes by means of modified phage kc515 transduction techniques. *Gene.* 343(1):107–15
- Carmody M, Murphy B, Byrne B, Power P, Rai D, et al. 2005. Biosynthesis of amphotericin derivatives lacking exocyclic carboxyl groups. *J. Biol. Chem.* 280(41):34420–26

- Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindós G. 2006. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev. Esp. Quimioter. Publ. Of. Soc. Esp. Quimioter.* 19(2):130–39
- Chabala JC, Mrozik H, Tolman RL, Eskola P, Lusi A, et al. 1980. Ivermectin, a new broad-spectrum antiparasitic agent. *J. Med. Chem.* 23(10):1134–36
- Chakraborty R, 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):5854–61
- Challis GL. 2008. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiol. Read. Engl.* 154(Pt 6):1555–69
- Challis GL, Hopwood DA. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 Suppl 2:14555–61
- Champness WC. 1988. New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. *J. Bacteriol.* 170(3):1168–74
- Chandra G, Chater KF. 2008. Evolutionary flux of potentially *bldA*-dependent *Streptomyces* genes containing the rare leucine codon *tta*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 94(1):111–26
- Chang HM, Chen MY, Shieh YT, Bibb MJ, Chen CW. 1996. The *cutS* signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin. *Mol. Microbiol.* 21(5):1075–85
- Chang PC, Cohen SN. 1994. Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid. *Science.* 265(5174):952–54
- Chapman HD, Jeffers TK, Williams RB. 2010. Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poult. Sci.* 89(9):1788–1801
- Chapman SW, Sullivan DC, Cleary JD. 2008. In search of the holy grail of antifungal therapy. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 119:197–215; discussion 215–16
- Chater K, Losick R. 1997. The mycelial life-style of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its relatives. In *Bacteria as multicellular organisms*. Shapiro JH, Dworkin M (ed):149–82. New York: Oxford University Press
- Chater KF. 1972. A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 72(1):9–28
- Chater KF, Biró S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H. 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Rev.* 34(2):171–98
- Chater KF, Chandra G. 2006. The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol. Rev.* 30(5):651–72
- Chater KF, Chandra G. 2008. The use of the rare *uua* codon to define “expression space” for genes involved in secondary metabolism, development and environmental adaptation in *Streptomyces*. *J. Microbiol. Seoul Korea.* 46(1):1–11

- Chater KF, Hopwood DA, Kieser T, Thompson CJ. 1982. Gene cloning in *Streptomyces*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 96:69–95
- Chater KF, Horinouchi S. 2003. Signalling early developmental events in two highly diverged streptomyces species. *Mol. Microbiol.* 48(1):9–15
- Chen CW. 1996. Complications and implications of linear bacterial chromosomes. *Trends Genet. TIG.* 12(5):192–96
- Chen CW, Huang C-H, Lee H-H, Tsai H-H, Kirby R. 2002. Once the circle has been broken: dynamics and evolution of streptomyces chromosomes. *Trends Genet. TIG.* 18(10):522–29
- Cheng Y-Q, Tang G-L, Shen B. 2003. Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(6):3149–54
- Chen L, Chen J, Jiang Y, Zhang W, Jiang W, Lu Y. 2009. Transcriptomics analyses reveal global roles of the regulator aveI in streptomyces avermitilis. *FEMS Microbiol. Lett.* 298(2):199–207
- Chen L, Lu Y, Chen J, Zhang W, Shu D, et al. 2008. Characterization of a negative regulator aveI for avermectin biosynthesis in streptomyces avermitilis nrr18165. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80(2):277–86
- Chen S, Huang X, Zhou X, Bai L, He J, et al. 2003. Organizational and mutational analysis of a complete fr-008/candicidin gene cluster encoding a structurally related polyene complex. *Chem. Biol.* 10(11):1065–76
- Chen W, He F, Zhang X, Chen Z, Wen Y, Li J. 2010a. Chromosomal instability in streptomyces avermitilis: major deletion in the central region and stable circularized chromosome. *BMC Microbiol.* 10:198
- Chen Y, Smanski MJ, Shen B. 2010b. Improvement of secondary metabolite production in streptomyces by manipulating pathway regulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86(1):19–25
- Choi K-Y, Jung E, Jung D-H, Pandey BP, Yun H, et al. 2011. Cloning, expression and characterization of cyp102d1, a self-sufficient p450 monooxygenase from streptomyces avermitilis. *FEBS J.*
- Cho YH, Lee EJ, Ahn BE, Roe JH. 2001. SigB, an rna polymerase sigma factor required for osmoprotection and proper differentiation of streptomyces coelicolor. *Mol. Microbiol.* 42(1):205–14
- Claessen D, de Jong W, Dijkhuizen L, Wösten HAB. 2006. Regulation of streptomyces development: reach for the sky! *Trends Microbiol.* 14(7):313–19
- Claessen D, Rink R, de Jong W, Siebring J, de Vreugd P, et al. 2003. A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in streptomyces coelicolor by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev.* 17(14):1714–26
- Claessen D, Wösten HAB, van Keulen G, Faber OG, Alves AMCR, et al. 2002. Two novel homologous proteins of streptomyces coelicolor and streptomyces lividans are

involved in the formation of the rodlet layer and mediate attachment to a hydrophobic surface. *Mol. Microbiol.* 44(6):1483–92

Clardy J, Fischbach MA, Currie CR. 2009. The natural history of antibiotics. *Curr. Biol. CB.* 19(11):R437–41

Cohen BE, Benaim G, Ruiz MC, Michelangeli F. 1990. Increased calcium permeability is not responsible for the rapid lethal effects of amphotericin b on leishmania sp. *FEBS Lett.* 259(2):286–88

Combes P, Till R, Bee S, Smith MCM. 2002. The streptomyces genome contains multiple pseudo-attB sites for the (phi)c31-encoded site-specific recombination system. *J. Bacteriol.* 184(20):5746–52

Corre C, Song L, O'Rourke S, Chater KF, Challis GL. 2008. 2-alkyl-4-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acids, antibiotic production inducers discovered by streptomyces coelicolor genome mining. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105(45):17510–15

Cortes J, Haydock SF, Roberts GA, Bevitt DJ, Leadlay PF. 1990. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of saccharopolyspora erythraea. *Nature.* 348(6297):176–78

Cournac A, Plumbridge J. 2013. Dna looping in prokaryotes: experimental and theoretical approaches. *J. Bacteriol.* 195(6):1109–19

Criado LM, Martín JF, Gil JA. 1993. The pab gene of streptomyces griseus, encoding p-aminobenzoic acid synthase, is located between genes possibly involved in candicidin biosynthesis. *Gene.* 126(1):135–39

Cropp TA, Wilson DJ, Reynolds KA. 2000. Identification of a cyclohexylcarbonyl coa biosynthetic gene cluster and application in the production of doramectin. *Nat. Biotechnol.* 18(9):980–83

Curdová E, Jechová V, Zima J, Vaněk Z. 1989. The effect of inorganic phosphate on the production of avermectin in streptomyces avermitilis. *J. Basic Microbiol.* 29(6):341–46

Das A, Khosla C. 2009. Biosynthesis of aromatic polyketides in bacteria. *Acc. Chem. Res.* 42(5):631–39

Datsenko KA, 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):6640–45

Daza A, Martín JF, Dominguez A, Gil JA. 1989. Sporulation of several species of streptomyces in submerged cultures after nutritional downshift. *J. Gen. Microbiol.* 135(9):2483–91

De la Fuente A, Lorenzana LM, Martín JF, Liras P. 2002. Mutants of streptomyces clavuligerus with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *J. Bacteriol.* 184(23):6559–65

Den Hengst CD, Tran NT, Bibb MJ, Chandra G, Leskiw BK, Buttner MJ. 2010. Genes essential for morphological development and antibiotic production in streptomyces coelicolor are targets of bldd during vegetative growth. *Mol. Microbiol.* 78(2):361–79

Denoya CD, Fedechko RW, Hafner EW, McArthur HA, Morgenstern MR, et al. 1995. A second branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase gene cluster (bkdfgh) from streptomyces avermitilis: its relationship to avermectin biosynthesis and the construction of a bkdf mutant suitable for the production of novel antiparasitic avermectins. *J. Bacteriol.* 177(12):3504–11

De Schrijver A, De Mot R. 1999. A subfamily of malt-related atp-dependent regulators in the luxr family. *Microbiol. Read. Engl.* 145 (Pt 6):1287–88

Dickschat JS, Wenzel SC, Bode HB, Müller R, Schulz S. 2004. Biosynthesis of volatiles by the myxobacterium myxococcus xanthus. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* 5(6):778–87

Di Marco A, Gaetani M, Scarpinato B. 1969. Adriamycin (nsc-123,127): a new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemother. Rep.* 53(1):33–37

Dole S, Nagarajavel V, Schnetz K. 2004. The histone-like nucleoid structuring protein h-ns represses the escherichia coli bgl operon downstream of the promoter. *Mol. Microbiol.* 52(2):589–600

Donadio S, Staver MJ, McAlpine JB, Swanson SJ, Katz L. 1991. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science.* 252(5006):675–79

D'Onofrio A, Crawford JM, Stewart EJ, Witt K, Gavrish E, et al. 2010. Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chem. Biol.* 17(3):254–64

Du Y-L, Chen S-F, Cheng L-Y, Shen X-L, Tian Y, Li Y-Q. 2009. Identification of a novel streptomyces chattanoogensis 110 and enhancing its natamycin production by overexpressing positive regulator scnrii. *J. Microbiol. Seoul Korea.* 47(4):506–13

Edwards DM. 1989. Direct liquid introduction lc-ms of polyene macrolide antibiotics: comment on the structure of filipin ii. *J. Antibiot. (Tokyo).* 42(2):322–24

Egerton JR, Ostlind DA, Blair LS, Eary CH, Suhayda D, et al. 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: efficacy of the b1a component. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15(3):372–78

Elliot MA, Bibb MJ, Buttner MJ, Leskiw BK. 2001. Bldd is a direct regulator of key developmental genes in streptomyces coelicolor a3(2). *Mol. Microbiol.* 40(1):257–69

Elliot MA, Karoonuthaisiri N, Huang J, Bibb MJ, Cohen SN, et al. 2003. The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in streptomyces coelicolor. *Genes Dev.* 17(14):1727–40

Embley TM, Hirt RP, Williams DM. 1994. Biodiversity at the molecular level: the domains, kingdoms and phyla of life. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 345(1311):21–33

- Enríquez LL, Mendes MV, Antón N, Tunca S, Guerra SM, et al. 2006. An efficient gene transfer system for the pimaricin producer streptomyces natalensis. *FEMS Microbiol. Lett.* 257(2):312–18
- Fabret C, Feher VA, Hoch JA. 1999. Two-component signal transduction in bacillus subtilis: how one organism sees its world. *J. Bacteriol.* 181(7):1975–83
- Feinberg AP, Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabeling dna restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132(1):6–13
- Fernández-Acero FJ, Jorge I, Calvo E, Vallejo I, Carbú M, et al. 2006. Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus botrytis cinerea. *Proteomics.* 6 Suppl 1:S88–96
- Fischer G, Kyriacou A, Decaris B, Leblond P. 1997. Genetic instability and its possible evolutionary implications on the chromosomal structure of streptomyces. *Biochimie.* 79(9-10):555–58
- Fitch ME, Chang CM, Parslow TG. 2000. The bh3 domain is required for caspase-independent cell death induced by bax and oligomycin. *Cell Death Differ.* 7(4):338–49
- Flores FJ, Barreiro C, Coque JJR, Martín JF. 2005. Functional analysis of two divalent metal-dependent regulatory genes dmdr1 and dmdr2 in streptomyces coelicolor and proteome changes in deletion mutants. *FEBS J.* 272(3):725–35
- Fried M, Crothers DM. 1981. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 9(23):6505–25
- Frith MC, Li MC, Weng Z. 2003. Cluster-buster: finding dense clusters of motifs in dna sequences. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3666–68
- Funa N, Ohnishi Y, Fujii I, Shibuya M, Ebizuka Y, Horinouchi S. 1999. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature.* 400(6747):897–99
- Gadgil M, Lian W, Gadgil C, Kapur V, Hu W-S. 2005. An analysis of the use of genomic dna as a universal reference in two channel dna microarrays. *BMC Genomics.* 6:66
- Gaisser S, Reather J, Wirtz G, Kellenberger L, Staunton J, Leadlay PF. 2000. A defined system for hybrid macrolide biosynthesis in saccharopolyspora erythraea. *Mol. Microbiol.* 36(2):391–401
- Gao B, Gupta RS. 2012. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 76(1):66–112
- Gao C, Hindra, Mulder D, Yin C, Elliot MA. 2012. Crp is a global regulator of antibiotic production in streptomyces. *mBio.* 3(6):
- Garner MM, Revzin A. 1981. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific dna regions: application to components of the escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* 9(13):3047–60
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn T. 2005. The revised road map to the manual. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* vol 2, The Proteobacteria, Part A, Introductory

- Essays. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (ed):159–206. New York: Springer. 2nd ed.
- Gehring AM, Mori I, Walsh CT. 1998. Reconstitution and characterization of the escherichia coli enterobactin synthetase from entb, ente, and entf. *Biochemistry (Mosc.)*. 37(8):2648–59
- Gehring AM, Yoo NJ, Losick R. 2001. Rna polymerase sigma factor that blocks morphological differentiation by streptomyces coelicolor. *J. Bacteriol.* 183(20):5991–96
- Gerber NN, Lechevalier HA. 1965. Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Appl. Microbiol.* 13(6):935–38
- Ghorbel S, Kormanec J, Artus A, Virolle M-J. 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):677–86
- Gil JA, Campelo-Diez AB. 2003. Candicidin biosynthesis in streptomyces griseus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60(6):633–42
- Gil JA, Hopwood DA. 1983. Cloning and expression of a p-aminobenzoic acid synthetase gene of the candicidin-producing streptomyces griseus. *Gene*. 25(1):119–32
- Gil JA, Naharro G, Villanueva JR, Martín JF. 1985. Characterization and regulation of p-aminobenzoic acid synthase from *Streptomyces griseus*. *J. Gen. Microbiol.* 131(6):1279–87
- Golding BT, Rickards RW. 1966. The structure of the macrolide antibiotic pimarcin. *Tetrahedron Lett.* 30:3551–57
- Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. 2011. Engineering streptomyces coelicolor for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb. Biotechnol.* 4(2):207–15
- Gomez-Escribano JP, Martín JF, Hesketh A, Bibb MJ, Liras P. 2008. Streptomyces clavuligerus rela-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin c: negative regulation of secondary metabolism by (p)ppgpp. *Microbiol. Read. Engl.* 154(Pt 3):744–55
- Gordon ND, Ottaviano GL, Connell SE, Tobkin GV, Son CH, et al. 2008. Secreted-protein response to sigma activity in streptomyces coelicolor. *J. Bacteriol.* 190(3):894–904
- Granozzi C, Billetta R, Passantino R, Sollazzo M, Puglia AM. 1990. A breakdown in macromolecular synthesis preceding differentiation in streptomyces coelicolor a3(2). *J. Gen. Microbiol.* 136(4):713–16
- Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Uno BE, et al. 2012. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(7):2234–39

- Grimm A, Madduri K, Ali A, Hutchinson CR. 1994. Characterization of the streptomyces peucetius atcc 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. *Gene*. 151(1-2):1–10
- Guerra SM, Rodríguez-García A, Santos-Aberturas J, Vicente CM, Payero TD, et al. 2012. Lal regulators sco0877 and sco7173 as pleiotropic modulators of phosphate starvation response and actinorhodin biosynthesis in streptomyces coelicolor. *PloS One*. 7(2):e31475
- Guillot C, Moran CP. 2007. Essential internal promoter in the spoIIIA locus of bacillus subtilis. *J. Bacteriol*. 189(20):7181–89
- Guo J, Zhang X, Chen Z, Wen Y, Li J. 2014. Two adjacent and similar tetr family transcriptional regulator genes, sav577 and sav576, co-regulate avermectin production in streptomyces avermitilis. *PloS One*. 9(6):e99224
- Guo J, Zhang X, Luo S, He F, Chen Z, et al. 2013. A novel tetr family transcriptional regulator, sav576, negatively controls avermectin biosynthesis in streptomyces avermitilis. *PloS One*. 8(8):e71330
- Guo J, Zhao J, Li L, Chen Z, Wen Y, Li J. 2010. The pathway-specific regulator aver from streptomyces avermitilis positively regulates avermectin production while it negatively affects oligomycin biosynthesis. *Mol. Genet. Genomics MGG*. 283(2):123–33
- Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, 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):1541–46
- Haeder S, Wirth R, Herz H, Spiteller D. 2009. Candicidin-producing streptomyces support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus escovopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 106(12):4742–46
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol*. 166(4):557–80
- Hanahan D. 1985. *Techniques for transformation of E. coli DNA cloning: a practical approach*. Oxford: DM Glover, ed. IRL Press. 109–135 pp.
- Hara H, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2009. Dna microarray analysis of global gene regulation by a-factor in streptomyces griseus. *Microbiol. Read. Engl*. 155(Pt 7):2197–2210
- Harrison SC. 1991. A structural taxonomy of dna-binding domains. *Nature*. 353(6346):715–19
- Havlis J, Thomas H, Sebela M, Shevchenko A. 2003. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal. Chem*. 75(6):1300–1306
- Hazen EL, Brown R. 1950. Two antifungal agents produced by a soil actinomycete. *Science*. 112(2911):423

- Hefti MH, François K-J, de Vries SC, Dixon R, Vervoort J. 2004. The pas fold. a redefinition of the pas domain based upon structural prediction. *Eur. J. Biochem. FEBS*. 271(6):1198–1208
- Heia S, Borgos SEF, Sletta H, Escudero L, Seco EM, et al. 2011. Initiation of polyene macrolide biosynthesis: interplay between polyketide synthase domains and modules as revealed via domain swapping, mutagenesis, and heterologous complementation. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(19):6982–90
- Hendrickson L, Davis CR, Roach C, Nguyen DK, Aldrich T, et al. 1999. Lovastatin biosynthesis in aspergillus terreus: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chem. Biol.* 6(7):429–39
- Hertweck C, Luzhetskyy A, Rebets Y, Bechthold A. 2007. Type ii polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat. Prod. Rep.* 24(1):162–90
- Hesketh A, Chater KF. 2003. Evidence from proteomics that some of the enzymes of actinorhodin biosynthesis have more than one form and may occupy distinctive cellular locations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30(8):523–29
- Hesketh AR, Chandra G, Shaw AD, Rowland JJ, Kell DB, et al. 2002. Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of streptomyces coelicolor. *Mol. Microbiol.* 46(4):917–32
- He W, Lei J, Liu Y, Wang Y. 2008. The luxr family members gdmri and gdmrii are positive regulators of geldanamycin biosynthesis in streptomyces hygroscopicus 17997. *Arch. Microbiol.* 189(5):501–10
- Higgins CE, Hamill RL, Sands TH, Hoehn MM, Davis NE. 1974. Letter: The occurrence of deacetoxycephalosporin C in fungi and streptomycetes. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 27(4):298–300
- Higo A, Horinouchi S, Ohnishi Y. 2011. Strict regulation of morphological differentiation and secondary metabolism by a positive feedback loop between two global regulators adpa and blda in streptomyces griseus. *Mol. Microbiol.* 81(6):1607–22
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. 1993. Kinetic pcr analysis: real-time monitoring of dna amplification reactions. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* 11(9):1026–30
- Hillas PJ, del Alba FS, Oyarzabal J, Wilks A, Ortiz De Montellano PR. 2000. The ahpc and ahpd antioxidant defense system of mycobacterium tuberculosis. *J. Biol. Chem.* 275(25):18801–9
- Hobbs G, Frazer CM, Gardner DCJ, Cullum JA, Oliver SG. 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31(3):272–77
- Holmes DS, Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114(1):193–97
- Homerová D, Sevcíková J, Kormanec J. 2003. Characterization of the streptomyces coelicolor a3(2) wble gene, encoding a homologue of the sporulation transcription factor. *Folia Microbiol. (Praha)*. 48(4):489–95

- Hopwood DA. 1967. Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriol. Rev.* 31(4):373–403
- Hopwood DA. 2006. Soil to genomics: the streptomyces chromosome. *Annu. Rev. Genet.* 40:1–23
- Hopwood DA. 2007. *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers*. OUP USA. 272 pp.
- Hopwood DA, Malpartida F, Kieser HM, Ikeda H, Duncan J, et al. 1985. Production of “hybrid” antibiotics by genetic engineering. *Nature*. 314(6012):642–44
- Hopwood DA, Sherman DH. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 24:37–66
- Hopwood DA, Wildermuth H, Palmer HM. 1970. Mutants of streptomyces coelicolor defective in sporulation. *J. Gen. Microbiol.* 61(3):397–408
- 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):462–67
- Horinouchi S, Kito M, Nishiyama M, Furuya K, Hong SK, et al. 1990. Primary structure of afsr, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in streptomyces coelicolor a3(2). *Gene*. 95(1):49–56
- Horinouchi S, Ohnishi Y, Kang DK. 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):177–82
- Hotson IK. 1982. The avermectins: a new family of antiparasitic agents. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 53(2):87–90
- Hsiao N-H, Nakayama S, Merlo ME, de Vries M, Bunet R, et al. 2009. Analysis of two additional signaling molecules in streptomyces coelicolor and the development of a butyrolactone-specific reporter system. *Chem. Biol.* 16(9):951–60
- Huang J, Shi J, Molle V, Sohlberg B, Weaver D, et al. 2005. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of streptomyces coelicolor. *Mol. Microbiol.* 58(5):1276–87
- Hunt AC, Servín-González L, Kelemen GH, Buttner MJ. 2005. The bldc developmental locus of streptomyces coelicolor encodes a member of a family of small dna-binding proteins related to the dna-binding domains of the merr family. *J. Bacteriol.* 187(2):716–28
- Hutchings MI, Hoskisson PA, Chandra G, Buttner MJ. 2004. Sensing and responding to diverse extracellular signals? analysis of the sensor kinases and response regulators of streptomyces coelicolor a3(2). *Microbiol. Read. Engl.* 150(Pt 9):2795–2806
- Hutchinson CR. 1997. Biosynthetic studies of daunorubicin and tetracenomycin c. *Chem. Rev.* 97(7):2525–36

- Hutchinson CR. 2003. Polyketide and non-ribosomal peptide synthases: falling together by coming apart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(6):3010–12
- Hutchinson E, Murphy B, Dunne T, Breen C, Rawlings B, Caffrey P. 2010. Redesign of polyene macrolide glycosylation: engineered biosynthesis of 19-(o)-perosaminylamphoteronolide b. *Chem. Biol.* 17(2):174–82
- Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, et al. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* 21(5):526–31
- Ikeda H, Kazuo S, Omura S. 2014. Genome mining of the streptomyces avermitilis genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41(2):233–50
- Ikeda H, Kotaki H, Tanaka H, Omura S. 1988. Involvement of glucose catabolism in avermectin production by streptomyces avermitilis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32(2):282–84
- Ikeda H, Nonomiya T, Omura S. 2001. Organization of biosynthetic gene cluster for avermectin in streptomyces avermitilis: analysis of enzymatic domains in four polyketide synthases. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27(3):170–76
- Ikeda H, Nonomiya T, Usami M, Ohta T, Omura S. 1999. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in streptomyces avermitilis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(17):9509–14
- Ikeda H, Omura S. 1997. Avermectin biosynthesis. *Chem. Rev.* 97(7):2591–2610
- IngledeW WJ, Poole RK. 1984. The respiratory chains of escherichia coli. *Microbiol. Rev.* 48(3):222–71
- Jacques DA, Langley DB, Hynson RMG, Whitten AE, Kwan A, et al. 2011. A novel structure of an antikinase and its inhibitor. *J. Mol. Biol.* 405(1):214–26
- Jakimowicz P, Cheesman MR, Bishai WR, Chater KF, Thomson AJ, Buttner MJ. 2005. Evidence that the streptomyces developmental protein whid, a member of the whib family, binds a [4fe-4s] cluster. *J. Biol. Chem.* 280(9):8309–15
- Jami M-S, Barreiro C, García-Estrada C, Martín J-F. 2010. Proteome analysis of the penicillin producer penicillium chrysogenum: characterization of protein changes during the industrial strain improvement. *Mol. Cell. Proteomics MCP.* 9(6):1182–98
- Jang B-Y, Hwang Y-I, Choi S-U. 2011. Effects of pimm and pimr on the increase of natamycin production in streptomyces natalensis. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54(1):141–44
- Jiang J, Tetzlaff CN, Takamatsu S, Iwatsuki M, Komatsu M, et al. 2009. Genome mining in streptomyces avermitilis: a biochemical baeyer-villiger reaction and discovery of a new branch of the pentalenolactone family tree. *Biochemistry (Mosc.)* 48(27):6431–40

- Jnawali HN, Lee HC, Sohng JK. 2010. Enhancement of clavulanic acid production by expressing regulatory genes in gap gene deletion mutant of streptomyces clavuligerus nrr13585. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(1):146–52
- Jonsbu E, McIntyre M, Nielsen J. 2002. The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by streptomyces noursei. *J. Biotechnol.* 95(2):133–44
- Kaltenpoth M. 2009. Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? *Trends Microbiol.* 17(12):529–35
- Kaneshiro ES. 2004. Sterol metabolism in the opportunistic pathogen pneumocystis: advances and new insights. *Lipids.* 39(8):753–61
- Kato J, Funa N, Watanabe H, Ohnishi 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):2378–83
- Kato J-Y, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2005. Autorepression of adpa of the arac/xyls family, a key transcriptional activator in the a-factor regulatory cascade in streptomyces griseus. *J. Mol. Biol.* 350(1):12–26
- Katz L, Donadio S. 1993. Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:875–912
- Kawachi R, Akashi T, Kamitani Y, Sy A, Wangchaisoonthorn U, et al. 2000. Identification of an afsa homologue (barx) from streptomyces virginiae as a pleiotropic regulator controlling autoregulator biosynthesis, virginiamycin biosynthesis and virginiamycin m1 resistance. *Mol. Microbiol.* 36(2):302–13
- Kawamoto S, Watanabe H, Hesketh A, Ensign JC, Ochi K. 1997. Expression analysis of the ssga gene product, associated with sporulation and cell division in streptomyces griseus. *Microbiol. Read. Engl.* 143 (Pt 4):1077–86
- Keijser BJF, van Wezel GP, Canters GW, Vijgenboom E. 2002. Developmental regulation of the streptomyces lividans ram genes: involvement of ramr in regulation of the ramcsab operon. *J. Bacteriol.* 184(16):4420–29
- Kells PM, Ouellet H, Santos-Aberturas J, Aparicio JF, Podust LM. 2010. Structure of cytochrome p450 pimd suggests epoxidation of the polyene macrolide pimaricin occurs via a hydroperoxoferric intermediate. *Chem. Biol.* 17(8):841–51
- Kennedy J, Auclair K, Kendrew SG, Park C, Vederas JC, Hutchinson CR. 1999. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science.* 284(5418):1368–72
- Kessler HA, Dixon J, Howard CR, Tsiquaye K, Zuckerman AJ. 1981. Effects of amphotericin b on hepatitis b virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 20(6):826–33
- Khokhlov AS, Tovarova II, Borisova LN, Pliner SA, Shevchenko LN, et al. 1967. [the a-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of actinomyces streptomycini]. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* 177(1):232–35

- Kieser T, Bibb M, Buttner M, Chater K, Hopwood DA. 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. United Kingdom: The John Innes Foundation
- Kim BS, Cropp TA, Beck BJ, Sherman DH, Reynolds KA. 2002. Biochemical evidence for an editing role of thioesterase ii in the biosynthesis of the polyketide pikromycin. *J. Biol. Chem.* 277(50):48028–34
- Kim D-J, Huh J-H, Yang Y-Y, Kang C-M, Lee I-H, et al. 2003. Accumulation of s-adenosyl-l-methionine enhances production of actinorhodin but inhibits sporulation in streptomyces lividans tk23. *J. Bacteriol.* 185(2):592–600
- Kim JD, Han JW, Hwang IC, Lee D, Kim BS. 2012. Identification and biocontrol efficacy of streptomyces mihaensis producing filipin iii against fusarium wilt. *J. Basic Microbiol.* 52(2):150–59
- Kim W, Lee JJ, Paik S-G, Hong Y-S. 2010. Identification of three positive regulators in the geldanamycin pks gene cluster of streptomyces hygroscopicus jcm4427. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20(11):1484–90
- Kinashi H. 2011. Giant linear plasmids in streptomyces: a treasure trove of antibiotic biosynthetic clusters. *J. Antibiot. (Tokyo).* 64(1):19–25
- Kirby R. 2011. Chromosome diversity and similarity within the actinomycetales. *FEMS Microbiol. Lett.* 319(1):1–10
- Kirby R, Hopwood DA. 1977. Genetic determination of methylenomycin synthesis by the scp1 plasmid of streptomyces coelicolor a3(2). *J. Gen. Microbiol.* 98(1):239–52
- Kirby R, Sangal V, Tucker NP, Zakrzewska-Czerwinska J, Wierzbicka K, et al. 2012. Draft genome sequence of the human pathogen streptomyces somaliensis, a significant cause of actinomycetoma. *J. Bacteriol.* 194(13):3544–45
- Kitani S, Ikeda H, Sakamoto T, Noguchi S, Nihira T. 2009. Characterization of a regulatory gene, aver, for the biosynthesis of avermectin in streptomyces avermitilis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82(6):1089–96
- Kitani S, Miyamoto KT, Takamatsu S, Herawati E, Iguchi H, et al. 2011. Avenolide, a streptomyces hormone controlling antibiotic production in streptomyces avermitilis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(39):16410–15
- Kitani S, Yamada Y, Nihira T. 2001. Gene replacement analysis of the butyrolactone autoregulator receptor (fara) reveals that fara acts as a novel regulator in secondary metabolism of streptomyces lavendulae fri-5. *J. Bacteriol.* 183(14):4357–63
- Kleinschnitz E-M, Heichlinger A, Schirner K, Winkler J, Latus A, et al. 2011. Proteins encoded by the mre gene cluster in streptomyces coelicolor a3(2) cooperate in spore wall synthesis. *Mol. Microbiol.* 79(5):1367–79
- Klose J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. a novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* 26(3):231–43

- Knirschová R, Nováková R, Fecková L, Timko J, Turna J, et al. 2007. Multiple regulatory genes in the salinomycin biosynthetic gene cluster of streptomyces albus ccm 4719. *Folia Microbiol. (Praha)*. 52(4):359–65
- Kobayashi K, Nishino C, Ohya J, Sato S, Mikawa T, et al. 1987. Oligomycin e, a new antitumor antibiotic produced by streptomyces sp. mci-2225. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 40(7):1053–57
- Komatsu M, Komatsu K, Koiwai H, Yamada Y, Kozono I, et al. 2013. Engineered streptomyces avermitilis host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth. Biol.* 2(7):384–96
- Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, Cane DE, Ikeda H. 2010. Genome-minimized streptomyces host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107(6):2646–51
- Kong D, Lee M-J, Lin S, Kim E-S. 2013. Biosynthesis and pathway engineering of antifungal polyene macrolides in actinomycetes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*
- Korystov YN, Kublik LN, Kudryavtsev AA, Levitman MK, Shaposhnikova VV, et al. 2003. Opposite effects of low oligomycin concentrations on the apoptosis of normal and tumor cells. *Dokl. Biol. Sci. Proc. Acad. Sci. USSR Biol. Sci. Sect. Transl. Russ.* 392:475–77
- Kotler-Brajtburg J, Medoff G, Kobayashi GS, Boggs S, Schlessinger D, et al. 1979. Classification of polyene antibiotics according to chemical structure and biological effects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15(5):716–22
- Kroiss J, Kaltenpoth M, Schneider B, Schwinger M-G, Hertweck C, et al. 2010. Symbiotic streptomycetes provide antibiotic combination prophylaxis for wasp offspring. *Nat. Chem. Biol.* 6(4):261–63
- Kruth HS, Comly ME, Butler JD, Vanier MT, Fink JK, et al. 1986. Type c niemann-pick disease. abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261(35):16769–74
- Kumon Y, Sasaki Y, Kato I, Takaya N, Shoun H, Beppu T. 2002. Codenitrification and denitrification are dual metabolic pathways through which dinitrogen evolves from nitrate in streptomyces antibioticus. *J. Bacteriol.* 184(11):2963–68
- Kuscer E, Coates N, Challis I, Gregory M, Wilkinson B, et al. 2007. Roles of raph and rapg in positive regulation of rapamycin biosynthesis in streptomyces hygroscopicus. *J. Bacteriol.* 189(13):4756–63
- Kwon H-J, Smith WC, Scharon AJ, Hwang SH, Kurth MJ, Shen B. 2002. C-o bond formation by polyketide synthases. *Science.* 297(5585):1327–30
- Kwon HJ, Smith WC, Xiang L, Shen B. 2001. Cloning and heterologous expression of the macrotetrolide biosynthetic gene cluster revealed a novel polyketide synthase that lacks an acyl carrier protein. *J. Am. Chem. Soc.* 123(14):3385–86
- Laatsch H, Kellner M, Wolf G, Lee YS, Hansske F, et al. 1993. Oligomycin f, a new immunosuppressive homologue of oligomycin a. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 46(9):1334–41

- Lardy H, Reed P, Lin CH. 1975. Antibiotic inhibitors of mitochondrial atp synthesis. *Fed. Proc.* 34(8):1707–10
- Larson MH, Peterson WH. 1960. Chromatographic study of the oligomycin complex produced under various conditions of fermentation. *Appl. Microbiol.* 8:182–89
- Lautru S, Deeth RJ, Bailey LM, Challis GL. 2005. Discovery of a new peptide natural product by streptomyces coelicolor genome mining. *Nat. Chem. Biol.* 1(5):265–69
- Leblond P, Decaris B. 1994. New insights into the genetic instability of streptomyces. *FEMS Microbiol. Lett.* 123(3):225–32
- Lechevalier H. 1953. Fungicidal antibiotics, produced by actinomycetes, candicidin. *Presse Médicale.* 61(66):1327–28
- Lechevalier HA. 1989. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams ST, Sharpe MD and Holt JG (ed):2344–47. Baltimore, USA: Williams & Wilkins
- Lee E-J, Karoonuthaisiri N, Kim H-S, Park J-H, Cha C-J, et al. 2005a. A master regulator sigma b governs osmotic and oxidative response as well as differentiation via a network of sigma factors in streptomyces coelicolor. *Mol. Microbiol.* 57(5):1252–64
- Lee K-M, Lee C-K, Choi S-U, Park H-R, Hwang Y-I. 2008. Functional analysis of a barX homologue (snga) as a pleiotropic regulator in streptomyces natalensis. *Arch. Microbiol.* 189(6):569–77
- Lee K-M, Lee C-K, Choi S-U, Park H-R, Kitani S, et al. 2005b. Cloning and in vivo functional analysis by disruption of a gene encoding the gamma-butyrolactone autoregulator receptor from streptomyces natalensis. *Arch. Microbiol.* 184(4):249–57
- Lee M-J, Kong D, Han K, Sherman DH, Bai L, et al. 2012. Structural analysis and biosynthetic engineering of a solubility-improved and less-hemolytic nystatin-like polyene in pseudonocardia autotrophica. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95(1):157–68
- Lee P-C, Umeyama T, 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):1413–30
- Le Maréchal P, Decottignies P, Marchand CH, Degrouard J, Jaillard D, et al. 2013. Comparative proteomic analysis of streptomyces lividans wild-type and ppk mutant strains reveals the importance of storage lipids for antibiotic biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(19):5907–17
- Lerat S, Simao-Beauvoir A-M, Beaulieu C. 2009. Genetic and physiological determinants of streptomyces scabies pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.* 10(5):579–85
- Leskiw BK, Bibb MJ, Chater KF. 1991. The use of a rare codon specifically during development? *Mol. Microbiol.* 5(12):2861–67
- Lian W, Jayapal KP, Charaniya S, Mehra S, Glod F, et al. 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

- Li C, Hazzard C, Florova G, Reynolds KA. 2009a. High titer production of tetracenomycins by heterologous expression of the pathway in a streptomyces cinnamomensis industrial monensin producer strain. *Metab. Eng.* 11(6):319–27
- Li M, Chen Z, Zhang X, Song Y, Wen Y, Li J. 2010a. Enhancement of avermectin and ivermectin production by overexpression of the maltose atp-binding cassette transporter in streptomyces avermitilis. *Bioresour. Technol.* 101(23):9228–35
- Linares JF, Gustafsson I, Baquero F, Martinez JL. 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(51):19484–89
- Linton KJ, Higgins CF. 1998. The escherichia coli atp-binding cassette (abc) proteins. *Mol. Microbiol.* 28(1):5–13
- Lin YS, Kieser HM, Hopwood DA, Chen CW. 1993. The chromosomal dna of streptomyces lividans 66 is linear. *Mol. Microbiol.* 10(5):923–33
- Li R, Khaleeli N, Townsend CA. 2000. Expansion of the clavulanic acid gene cluster: identification and in vivo functional analysis of three new genes required for biosynthesis of clavulanic acid by streptomyces clavuligerus. *J. Bacteriol.* 182(14):4087–95
- Li R, Liu G, Xie Z, He X, Chen W, et al. 2010b. Poly, a transcriptional regulator with atpase activity, directly activates transcription of polr in polyoxin biosynthesis in streptomyces cacaoi. *Mol. Microbiol.* 75(2):349–64
- Li R, Townsend CA. 2006. Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in streptomyces clavuligerus. *Metab. Eng.* 8(3):240–52
- Li R, Xie Z, Tian Y, Yang H, Chen W, et al. 2009b. Polr, a pathway-specific transcriptional regulatory gene, positively controls polyoxin biosynthesis in streptomyces cacaoi subsp. asoensis. *Microbiol. Read. Engl.* 155(Pt 6):1819–31
- Liras P, Martín JF. 2006. Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 9(1):9–19
- Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu G, Tan H. 2013. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in streptomyces. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 77(1):112–43
- Liu G, Tian Y, Yang H, Tan H. 2005. A pathway-specific transcriptional regulatory gene for nikkomycin biosynthesis in streptomyces ansochromogenes that also influences colony development. *Mol. Microbiol.* 55(6):1855–66
- Liu T, Cane DE, Deng Z. 2009. The enzymology of polyether biosynthesis. *Methods Enzymol.* 459:187–214
- Li YC, Fung KP, Kwok TT, Lee CY, Suen YK, Kong SK. 2004. Mitochondria-targeting drug oligomycin blocked p-glycoprotein activity and triggered apoptosis in doxorubicin-resistant hepg2 cells. *Chemotherapy.* 50(2):55–62

- Locci R. 1989. Streptomyces and related genera. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams ST, Sharpe MD and Holt JG (ed):2451–92. Baltimore, USA: Williams & Wilkins
- Lombó F, Braña AF, Salas JA, Méndez C. 2004. Genetic organization of the biosynthetic gene cluster for the antitumor angucycline oviedomycin in streptomyces antibioticus atcc 11891. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 5(9):1181–87
- Long PF, Wilkinson CJ, Bisang CP, Cortés J, Dunster N, et al. 2002. Engineering specificity of starter unit selection by the erythromycin-producing polyketide synthase. *Mol. Microbiol.* 43(5):1215–25
- Lounès A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, Germain P. 1995. Regulation of valine catabolism by ammonium in streptomyces ambofaciens, producer of spiramycin. *Can. J. Microbiol.* 41(9):800–808
- Ludwig W, Euzéby J, Schumann P, Busse H-J, Trujillo ME, et al. 2012a. Road map of the phylum actinobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol 5, The Actinobacteria. Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki K, Ludwig W and Whitman WB (ed):1–28. New York: Springer. 2nd ed.
- Ludwig W, Euzéby J, Whitman WB. 2012b. Taxonomic outline of the phylum actinobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol 5, The Actinobacteria. Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki K, Ludwig W and Whitman WB (ed):29–31. New York: Springer. 2nd ed.
- Ludwig W, Klenk HP. 2005. Overview: a phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol 2, The Proteobacteria, Part A, Introductory Essays. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT and Garrity GM (ed):49–65. New York: Springer. 2nd ed.
- Lu G, Edwards CG, Fellman JK, Mattinson DS, Navazio J. 2003. Biosynthetic origin of geosmin in red beets (*beta vulgaris* l.). *J. Agric. Food Chem.* 51(4):1026–29
- Luo J-M, Li J-S, Liu D, Liu F, Wang Y-T, et al. 2012. Genome shuffling of streptomyces gilvosporeus for improving natamycin production. *J. Agric. Food Chem.*
- Luo Y, Xiao J, Wang Y, Xu J, Xie S, Xu J. 2011. Streptomyces indicus sp. nov., an actinomycete isolated from deep-sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61(Pt 11):2712–16
- Madduri K, Hutchinson CR. 1995. Functional characterization and transcriptional analysis of the dnrr1 locus, which controls daunorubicin biosynthesis in streptomyces peucetius. *J. Bacteriol.* 177(5):1208–15
- Madduri K, Kennedy J, Rivola G, Inventa-Solari A, Filippini S, et al. 1998. Production of the antitumor drug epirubicin (4'-epidoxorubicin) and its precursor by a genetically engineered strain of streptomyces peucetius. *Nat. Biotechnol.* 16(1):69–74
- Magnusson LU, Farewell A, Nyström T. 2005. Ppgpp: a global regulator in escherichia coli. *Trends Microbiol.* 13(5):236–42

- Maharjan S, Oh T-J, Lee HC, Sohng JK. 2009. Identification and functional characterization of an afsr homolog regulatory gene from streptomyces venezuelae atcc 15439. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19(2):121–27
- Malewicz B, Momsen M, Jenkin HM, Borowski E. 1984. Potentiation of antiviral activity of acyclovir by polyene macrolide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25(6):772–74
- Mallick B, Ghosh Z. 2012. *Regulatory RNAs: Basics, Methods and Applications*. Springer Berlin Heidelberg. 554 pp. Edición: 1 ed.
- Malpartida F, Hopwood DA. 1984. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a streptomyces antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature.* 309(5967):462–64
- Mangé A, Nishida N, Milhavet O, McMahon HE, Casanova D, Lehmann S. 2000. Amphotericin b inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures. *J. Virol.* 74(7):3135–40
- Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yagüe P, Sanchez J. 2008. Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of streptomyces coelicolor. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(12):3877–86
- Marella M, Lehmann S, Grassi J, Chabry J. 2002. Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular prp release. *J. Biol. Chem.* 277(28):25457–64
- Maris AE, Sawaya MR, Kaczor-Grzeskowiak M, Jarvis MR, Bearson SMD, et al. 2002. Dimerization allows dna target site recognition by the narl response regulator. *Nat. Struct. Biol.* 9(10):771–78
- Martín JF. 1977. Biosynthesis of polyene macrolide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 31:13–38
- 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
- Martín JF, Aparicio JF. 2009. Enzymology of the polyenes pimarin and candicidin biosynthesis. *Methods Enzymol.* 459:215–42
- Martín JF, Demain AL. 1976. Control by phosphate of candicidin production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71(4):1103–9
- Martín JF, Demain AL. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* 44(2):230–51
- Martín J-F, Liras P. 2010. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in streptomyces. *Curr. Opin. Microbiol.* 13(3):263–73
- Martín JF, McDaniel LE. 1977. Production of polyene macrolide antibiotics. *Adv. Appl. Microbiol.* 21:1–52

Martín JF, Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Smith MCM, et al. 2012. Transcriptomic studies of phosphate control of primary and secondary metabolism in streptomyces coelicolor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95(1):61–75

Martin R, Sterner O, Alvarez MA, de Clercq E, Bailey JE, Minas W. 2001. Collinone, a new recombinant angular polyketide antibiotic made by an engineered streptomyces strain. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 54(3):239–49

Marty EW, McCoy E. 1959. The chromatographic separation and biological properties of the oligomycins. *Antibiot. Chemother.* 9(5):286–93

Masamune S, Sehgal JM, van Tاملen EE, Strong FM, Peterson WH. 1958. Separation and preliminary characterization of oligomycins a, b and c1. *J. Am. Chem. Soc.* 80(22):6092–95

Mattheis JP, Roberts RG. 1992. Identification of geosmin as a volatile metabolite of penicillium expansum. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(9):3170–72

Mazodier P, Petter R, Thompson C. 1989. Intergeneric conjugation between escherichia coli and streptomyces species. *J. Bacteriol.* 171(6):3583–85

Mazodier P, Thompson C, Boccard F. 1990. The chromosomal integration site of the streptomyces element psam2 overlaps a putative trna gene conserved among actinomycetes. *Mol. Gen. Genet. MGG.* 222(2-3):431–34

Mazzei T, Mini E, Novelli A, Periti P. 1993. Chemistry and mode of action of macrolides. *J. Antimicrob. Chemother.* 31 Suppl C:1–9

McBride MJ, Ensign JC. 1987. Metabolism of endogenous trehalose by streptomyces griseus spores and by spores or cells of other actinomycetes. *J. Bacteriol.* 169(11):5002–7

McCormick JR, Flårdh K. 2012. Signals and regulators that govern streptomyces development. *FEMS Microbiol. Rev.* 36(1):206–31

McDaniel R, Thamchaipenet A, Gustafsson C, Fu H, Betlach M, Ashley G. 1999. Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel “unnatural” natural products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(5):1846–51

Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, van den Berg M, Müller U, et al. 2010. The sequence of a 1.8-mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol. Evol.* 2:212–24

Mehra S, Lian W, Jayapal KP, Charaniya SP, Sherman DH, Hu W-S. 2006. A framework to analyze multiple time series data: a case study with streptomyces coelicolor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33(2):159–72

Mendes MV, Antón N, Martín JF, Aparicio JF. 2005. Characterization of the polyene macrolide p450 epoxidase from streptomyces natalensis that converts de-epoxypimaricin into pimaricin. *Biochem. J.* 386(Pt 1):57–62

- Mendes MV, Aparicio JF, Martín JF. 2000. Complete nucleotide sequence and characterization of *psna1* from pimaricin-producing *streptomyces natalensis* that replicates by a rolling circle mechanism. *Plasmid*. 43(2):159–65
- Mendes MV, Recio E, Antón N, Guerra SM, Santos-Aberturas J, et al. 2007a. Cholesterol oxidases act as signaling proteins for the biosynthesis of the polyene macrolide pimaricin. *Chem. Biol.* 14(3):279–90
- Mendes MV, Recio E, Fouces R, Luiten R, Martín JF, Aparicio JF. 2001. Engineered biosynthesis of novel polyenes: a pimaricin derivative produced by targeted gene disruption in *streptomyces natalensis*. *Chem. Biol.* 8(7):635–44
- Mendes MV, Tunca S, Antón N, Recio E, Sola-Landa A, et al. 2007b. 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):217–27
- Méndez C, Braña AF, Manzanal MB, Hardisson C. 1985. Role of substrate mycelium in colony development in *streptomyces*. *Can. J. Microbiol.* 31(5):446–50
- Merrick MJ. 1976. A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 96(2):299–315
- Michta E, Ding W, Zhu S, Blin K, Ruan H, et al. 2014. Proteomic approach to reveal the regulatory function of aconitase *acna* in oxidative stress response in the antibiotic producer *streptomyces viridochromogenes* tū494. *PLoS ONE*. 9(2):
- Miller I, Crawford J, Gianazza E. 2006. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics*. 6(20):5385–5408
- Miller JH. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbor Press. 352–355 pp.
- Miller TW, Chaiet L, Cole DJ, Cole LJ, Flor JE, et al. 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: isolation and chromatographic properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15(3):368–71
- Miyamoto KT, Kitani S, Komatsu M, Ikeda H, Nihira T. 2011. The autoregulator receptor homologue *avar3* plays a regulatory role in antibiotic production, mycelial aggregation and colony development of *streptomyces avermitilis*. *Microbiol. Read. Engl.* 157(Pt 8):2266–75
- Miyoshi N, Oubrahim H, Chock PB, Stadtman ER. 2006. Age-dependent cell death and the role of *atp* in hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103(6):1727–31
- Morin JB, Sello JK. 2010. Efficient synthesis of a peculiar vicinal diamine semiochemical from *streptomyces natalensis*. *Org. Lett.* 12(15):3522–24
- Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M, Yee H, Dubrow R, et al. 2000. A microfluidic system for high-speed reproducible dna sizing and quantitation. *Electrophoresis*. 21(1):128–34

- Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of dna in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335–50
- Muñoz-Centeno MC, Martín-Guevara C, Flores A, Pérez-Pulido AJ, Antúnez-Rodríguez C, et al. 2012. Mpg2 interacts and cooperates with mpg1 to maintain yeast glycosylation. *FEMS Yeast Res.* 12(5):511–20
- Murphy B, Anderson K, Borissow C, Caffrey P, Griffith G, et al. 2010. Isolation and characterisation of amphotericin b analogues and truncated polyketide intermediates produced by genetic engineering of streptomyces nodosus. *Org. Biomol. Chem.* 8(16):3758–70
- Musialowski MS, Flett F, Scott GB, Hobbs G, Smith CP, 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):5123–25
- Nair MG, Putnam AR, Mishra SK, Mulks MH, Taft WH, et al. 1989. Faeriefungin: a new broad-spectrum antibiotic from streptomyces griseus var. autotrophicus. *J. Nat. Prod.* 52(4):797–809
- Narva KE, Feitelson JS. 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the redd locus of streptomyces coelicolor a3(2). *J. Bacteriol.* 172(1):326–33
- Nealson KH, Hastings JW. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43(4):496–518
- Nealson KH, Platt T, Hastings JW. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* 104(1):313–22
- Nedal A, Sletta H, Brautaset T, Borgos SEF, Sekurova ON, et al. 2007. Analysis of the mycosamine biosynthesis and attachment genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of streptomyces noursei atcc 11455. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(22):7400–7407
- Nedal A, Zotchev SB. 2004. Biosynthesis of deoxyaminosugars in antibiotic-producing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64(1):7–15
- Nishikiori T, Masuma R, Oiwa R, Katagiri M, Awaya J, et al. 1978. Aurantinin, a new antibiotic of bacterial origin. *J. Antibiot. (Tokyo).* 31(6):525–32
- Nodwell JR. 2014. Are you talking to me? a possible role for γ -butyrolactones in interspecies signalling. *Mol. Microbiol.* 94(3):483–85
- Novák J, Kopecký J, Kofronová O, Vaněk Z. 1993. Instability of the production of avermectins, sporulation, and pigmentation in streptomyces avermitilis. *Can. J. Microbiol.* 39(2):265–67
- Novella IS, Barbés C, Sánchez J. 1992. Sporulation of streptomyces antibioticus ethz 7451 in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* 38(8):769–73
- Novotna J, Vohradsky J, Berndt P, Gramajo H, Langen H, et al. 2003. Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote streptomyces coelicolor reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. *Mol. Microbiol.* 48(5):1289–1303

- Núñez LE, Nybo SE, González-Sabín J, Pérez M, Menéndez N, et al. 2012. A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis. *J. Med. Chem.* 55(12):5813–25
- O'Farrell PH. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250(10):4007–21
- Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, et al. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* ifo 13350. *J. Bacteriol.* 190(11):4050–60
- Ohnishi Y, Kameyama S, Onaka H, Horinouchi S. 1999. The a-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the a-factor receptor. *Mol. Microbiol.* 34(1):102–11
- Ohnishi Y, Yamazaki H, Kato J-Y, Tomono A, 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):431–39
- Okamoto S, Lezhava A, Hosaka T, Okamoto-Hosoya Y, Ochi K. 2003. Enhanced expression of s-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* a3(2). *J. Bacteriol.* 185(2):601–9
- O'Keefe DP, Harder PA. 1991. Occurrence and biological function of cytochrome p450 monooxygenases in the actinomycetes. *Mol. Microbiol.* 5(9):2099–2105
- Olano C, García I, González A, Rodríguez M, Rozas D, et al. 2014. Activation and identification of five clusters for secondary metabolites in *Streptomyces albus* j1074. *Microb. Biotechnol.* n/a – n/a
- Olano C, Lombó F, Méndez C, Salas JA. 2008. Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metab. Eng.* 10(5):281–92
- Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, et al. 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):12215–20
- Omura S, Ikeda H, Tanaka H. 1991. Selective production of specific components of avermectins in *Streptomyces avermitilis*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 44(5):560–63
- Omura T. 2010. Structural diversity of cytochrome p450 enzyme system. *J. Biochem. (Tokyo)*. 147(3):297–306
- Oura M, Sternberg TH, Wright ET. 1955. A new antifungal antibiotic, amphotericin b. *Antibiot. Annu.* 3:566–73
- Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, 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):204–11
- Pandey RC, Narasimhachari N, Rinehart KL, Millington DS. 1972. Polyene antibiotics. iv. structure of chainin. *J. Am. Chem. Soc.* 94(12):4306–10

- Pandey RC, Rinehart KL. 1970. Polyene antibiotics. v. characterization of components of the filipin complex by mass spectrometry. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 23(8):414–17
- Pang C, Shiiyama M, Ikeda H, Tanaka H, Omura S. 1994. Cosmid vector for cloning and analysis of *Streptomyces* DNA. *Actinomycetologica*. 8:21–25
- Pawlak J, Sowiński P, Borowski E, Gariboldi P. 1995. Stereostructure of perimycin a. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 48(9):1034–38
- Pawlak J, Zieliński J, Golik J, Gumieniak J, Borowski E. 1980. The structure of lienomycin, a pentaene macrolide antitumor antibiotic. i. the structure of the carbon skeleton and the location of functionalities. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 33(9):989–97
- Pereda A, Summers RG, Stassi DL, Ruan X, Katz L. 1998. The loading domain of the erythromycin polyketide synthase is not essential for erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Microbiol. Read. Engl.* 144 (Pt 2):543–53
- Pérez-Llarena FJ, Liras P, Rodríguez-García A, 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):2053–59
- Pérez-Redondo R, Rodríguez-García A, Martín JF, 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):311–21
- Pérez-Rueda E, Collado-Vides J. 2000. The repertoire of dna-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 28(8):1838–47
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (rest) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time pcr. *Nucleic Acids Res.* 30(9):e36
- Piret JM, Chater KF. 1985. Phage-mediated cloning of blda, a region involved in *Streptomyces coelicolor* morphological development, and its analysis by genetic complementation. *J. Bacteriol.* 163(3):965–72
- Pisarnitskiĭ AF, Egorov IA. 1988. Low molecular weight metabolites produced by various *Penicillium* species. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 24(6):760–64
- Pontani DR, Sun D, Brown JW, Shahied SI, Plescia OJ, et al. 1989. Inhibition of HIV replication by liposomal encapsulated amphotericin B. *Antiviral Res.* 11(3):119–25
- Pospiech A, Neumann B. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends Genet. TIG.* 11(6):217–18
- Power P, Dunne T, Murphy B, Nic Lochlainn L, Rai D, et al. 2008. Engineered synthesis of 7-oxo- and 15-deoxy-15-oxo-amphotericins: insights into structure-activity relationships in polyene antibiotics. *Chem. Biol.* 15(1):78–86

- Quackenbush J. 2006. Standardizing the standards. *Mol. Syst. Biol.* 2:2006.0010
- Quadri LE, Sello J, Keating TA, Weinreb PH, Walsh CT. 1998. Identification of a mycobacterium tuberculosis gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem. Biol.* 5(11):631–45
- Quintana ET, Wierzbicka K, Mackiewicz P, Osman A, Fahal AH, et al. 2008. *Streptomyces sudanensis* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 93(3):305–13
- Radonić A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time pcr. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313(4):856–62
- Rajkarnikar A, Kwon H-J, Ryu Y-W, Suh J-W. 2006. Catalytic domain of afsKv modulates both secondary metabolism and morphologic differentiation in streptomyces avermitilis atcc 31272. *Curr. Microbiol.* 53(3):204–8
- Rajkarnikar A, Kwon H-J, Ryu Y-W, Suh J-W. 2007. Two threonine residues required for role of afsKv in controlling morphogenesis and avermectin production in streptomyces avermitilis. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(9):1563–67
- Rawlings BJ. 1997. Biosynthesis of polyketides. *Nat. Prod. Rep.* 14(5):523–56
- Rawlings BJ. 2001. Type i polyketide biosynthesis in bacteria (part a--erythromycin biosynthesis). *Nat. Prod. Rep.* 18(2):190–227
- Recio E, Aparicio JF, Rumbero A, Martín JF. 2006. Glycerol, ethylene glycol and propanediol elicit pimarin biosynthesis in the pi-factor-defective strain streptomyces natalensis npi287 and increase polyene production in several wild-type actinomycetes. *Microbiol. Read. Engl.* 152(Pt 10):3147–56
- Recio E, Colinas A, Rumbero A, Aparicio JF, Martín JF. 2004. Pi factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimarin production in streptomyces natalensis. *J. Biol. Chem.* 279(40):41586–93
- Redenbach M, Kieser HM, Denapaite D, Eichner A, Cullum J, et al. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 mb streptomyces coelicolor a3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* 21(1):77–96
- Riesenberg D, Bergter F, Kari C. 1984. Effect of serine hydroxamate and methyl alpha-d-glucopyranoside treatment on nucleoside polyphosphate pools, rna and protein accumulation in streptomyces hygrosopicus. *J. Gen. Microbiol.* 130(10):2549–58
- Robles-Reglero V, Santamarta I, Álvarez-Álvarez R, Martín JF, Liras P. 2013. Transcriptional analysis and proteomics of the holomycin gene cluster in overproducer mutants of streptomyces clavuligerus. *J. Biotechnol.* 163(1):69–76
- Rocak S, Linder P. 2004. Dead-box proteins: the driving forces behind rna metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5(3):232–41

- Rodríguez AM, Olano C, Méndez C, Hutchinson CR, Salas JA. 1995. A cytochrome p450-like gene possibly involved in oleandomycin biosynthesis by streptomyces antibioticus. *FEMS Microbiol. Lett.* 127(1-2):117–20
- Rodríguez E, Banchio C, Diacovich L, Bibb MJ, Gramajo H. 2001. Role of an essential acyl coenzyme a carboxylase in the primary and secondary metabolism of streptomyces coelicolor a3(2). *Appl. Environ. Microbiol.* 67(9):4166–76
- Rodríguez E, Gramajo H. 1999. Genetic and biochemical characterization of the alpha and beta components of a propionyl-coa carboxylase complex of streptomyces coelicolor a3(2). *Microbiol. Read. Engl.* 145 (Pt 11):3109–19
- Rodríguez-García A, Barreiro C, Santos-Beneit F, Sola-Landa A, Martín JF. 2007. Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in streptomyces coelicolor m145 and in a deltaphop mutant. *Proteomics.* 7(14):2410–29
- Rodríguez-García A, Ludovice M, Martín JF, Liras P. 1997. Arginine boxes and the argr gene in streptomyces clavuligerus: evidence for a clear regulation of the arginine pathway. *Mol. Microbiol.* 25(2):219–28
- Rodríguez-García A, Santamarta I, Pérez-Redondo R, Martín JF, Liras P. 2006. Characterization of a two-gene operon epeRA involved in multidrug resistance in *Streptomyces clavuligerus*. *Res. Microbiol.* 157(6):559–68
- Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Apel K, Santos-Beneit F, 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):3230–42
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyren P. 1996. Real-time dna sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 242(1):84–89
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 132:365–86
- Rueda B, Miguélez EM, Hardisson C, Manzanal MB. 2001. Mycelial differentiation and spore formation by streptomyces brasiliensis in submerged culture. *Can. J. Microbiol.* 47(11):1042–47
- Ryding NJ, Anderson TB, Champness WC. 2002. Regulation of the streptomyces coelicolor calcium-dependent antibiotic by absa, encoding a cluster-linked two-component system. *J. Bacteriol.* 184(3):794–805
- Ryding NJ, Bibb MJ, Molle V, Findlay KC, Chater KF, Buttner MJ. 1999. New sporulation loci in streptomyces coelicolor a3(2). *J. Bacteriol.* 181(17):5419–25
- Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3rd ed.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnol. Read. Mass.* 24:104–8

- Sanssouci É, Lerat S, Daigle F, Grondin G, Shareck F, Beaulieu C. 2012. Deletion of terd-domain-encoding genes: effect on streptomyces coelicolor development. *Can. J. Microbiol.* 58(10):1221–29
- Sanssouci E, Lerat S, Grondin G, Shareck F, Beaulieu C. 2011. Tdd8: a terd domain-encoding gene involved in streptomyces coelicolor differentiation. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 100(3):385–98
- Santamarta I, López-García MT, Kurt A, Nárdiz N, Álvarez-Álvarez R, et al. 2011. Characterization of dna-binding sequences for ccar in the cephamycin–clavulanic acid supercluster of streptomyces clavuligerus. *Mol. Microbiol.* 81(4):968–81
- Santamarta I, Rodríguez-García A, Pérez-Redondo R, Martín JF, Liras P. 2002. Ccar is an autoregulatory protein that binds to the ccar and cefd-cmci promoters of the cephamycin c-clavulanic acid cluster in streptomyces clavuligerus. *J. Bacteriol.* 184(11):3106–13
- Santos-Aberturas J, Engel J, Dickerhoff J, Dörr M, Rudroff F, et al. 2015. Exploration of the substrate promiscuity of biosynthetic tailoring enzymes as a new source of structural diversity for polyene macrolide antifungals. *ChemCatChem.* 7(3):490–500
- Santos-Aberturas J, Payero TD, Vicente CM, Guerra SM, Cañibano C, et al. 2011a. Functional conservation of pas-luxr transcriptional regulators in polyene macrolide biosynthesis. *Metab. Eng.*
- Santos-Aberturas J, Vicente CM, Guerra SM, Payero TD, Martín JF, Aparicio JF. 2011b. Molecular control of polyene macrolide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 286(11):9150–61
- Santos-Aberturas J, Vicente CM, Payero TD, Martín-Sánchez L, Cañibano C, et al. 2012. Hierarchical control on polyene macrolide biosynthesis: pimr modulates pimaricin production via the pas-luxr transcriptional activator pimm. *PLoS ONE.* 7(6):e38536
- Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Martín JF. 2009. 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
- Sasaki J, Mizoue K, Morimoto S, Omura S. 1996. Microbial glycosylation of macrolide antibiotics by streptomyces hygroscopicus atcc 31080 and distribution of a macrolide glycosyl transferase in several streptomyces strains. *J. Antibiot. (Tokyo).* 49(11):1110–18
- Sawai R, Suzuki A, Takano Y, Lee P-C, Horinouchi S. 2004. Phosphorylation of afsr by multiple serine/threonine kinases in streptomyces coelicolor a3(2). *Gene.* 334:53–61
- Schaffer S, Weil B, Nguyen VD, Dongmann G, Günther K, et al. 2001. A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of corynebacterium glutamicum. *Electrophoresis.* 22(20):4404–22
- Scheu AK, Martínez E, Soliveri J, Malpartida F. 1997. Abab, a putative regulator for secondary metabolism in streptomyces. *FEMS Microbiol. Lett.* 147(1):29–36

- Schneider TD, Stephens RM. 1990. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* 18(20):6097–6100
- Schröder J, Schröder G. 1990. Stilbene and chalcone synthases: related enzymes with key functions in plant-specific pathways. *Z. Für Naturforschung C J. Biosci.* 45(1-2):1–8
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, et al. 2006. The rin: an rna integrity number for assigning integrity values to rna measurements. *BMC Mol. Biol.* 7:3
- Schwecke T, Aparicio JF, Molnár I, König A, Khaw LE, et al. 1995. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(17):7839–43
- Seco EM, Fotso S, Laatsch H, Malpartida F. 2005. A tailoring activity is responsible for generating polyene amide derivatives in streptomyces diastaticus var. 108. *Chem. Biol.* 12(10):1093–1101
- Seco EM, Pérez-Zúñiga FJ, Rolón MS, Malpartida F. 2004. Starter unit choice determines the production of two tetraene macrolides, rimocidin and ce-108, in streptomyces diastaticus var. 108. *Chem. Biol.* 11(3):357–66
- Sekurova ON, Brautaset T, Sletta H, Borgos SEF, Jakobsen M ØM, et al. 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):1345–54
- Seshime Y, Juvvadi PR, Fujii I, Kitamoto K. 2005. Discovery of a novel superfamily of type iii polyketide synthases in aspergillus oryzae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331(1):253–60
- Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV Jr. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in sds-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28(5):815–20
- Shen B. 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type i, ii and iii polyketide synthase paradigms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7(2):285–95
- Shen B, Du L, Sanchez C, Edwards DJ, Chen M, Murrell JM. 2001. The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from streptomyces verticillus atcc15003 as a model for hybrid peptide-polyketide natural product biosynthesis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27(6):378–85
- Shepherd MD, Liu T, Méndez C, Salas JA, Rohr J. 2011. Engineered biosynthesis of gilyvocarcin analogues with altered deoxyhexopyranose moieties. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(2):435–41
- Shikiya K, Kinjo N, Uehara T, Uechi H, Ohshiro J, et al. 1992. Efficacy of ivermectin against strongyloides stercoralis in humans. *Intern. Med. Tokyo Jpn.* 31(3):310–12
- Smith RM, Peterson WH, McCoy E. 1954. Oligomycin, a new antifungal antibiotic. *Antibiot. Chemother.* 4(9):962–70

- Smith S. 1994. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 8(15):1248–59
- 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, Michaud J, Scott HS. 2005. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 21(9):2067–75
- Smyth GK, Speed T. 2003. Normalization of cdna microarray data. *Methods San Diego Calif.* 31(4):265–73
- Sola-Landa A, Moura RS, 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):6133–38
- Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Apel AK, 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):1358–68
- Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Franco-Domínguez E, Martín JF. 2005. Binding of phop to promoters of phosphate-regulated genes in streptomyces coelicolor: identification of pho boxes. *Mol. Microbiol.* 56(5):1373–85
- Soler L, Caffrey P, McMahon HEM. 2008. Effects of new amphotericin analogues on the scrapie isoform of the prion protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1780(10):1162–67
- Soliveri JA, Gomez J, Bishai WR, Chater KF. 2000. Multiple paralogous genes related to the streptomyces coelicolor developmental regulatory gene whib are present in streptomyces and other actinomycetes. *Microbiology.* 146(2):333–43
- Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among dna fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98(3):503–17
- Stach JEM, Bull AT. 2005. Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 87(1):3–9
- Staudenmaier H, Van Hove B, Yaraghi Z, Braun V. 1989. Nucleotide sequences of the fecbcde genes and locations of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron(iii) dicitrate in escherichia coli. *J. Bacteriol.* 171(5):2626–33
- Staunton J, Caffrey P, Aparicio JF, Roberts GA, Bethell SS, Leadlay PF. 1996. Evidence for a double-helical structure for modular polyketide synthases. *Nat. Struct. Biol.* 3(2):188–92
- Staunton J, Weissman KJ. 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.* 18(4):380–416
- Stirrett K, Denoya C, Westpheling J. 2009. Branched-chain amino acid catabolism provides precursors for the type ii polyketide antibiotic, actinorhodin, via pathways that are nutrient dependent. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36(1):129–37

- Stratigopoulos G, Bate N, Cundliffe E. 2004. Positive control of tylosin biosynthesis: pivotal role of tylr. *Mol. Microbiol.* 54(5):1326–34
- Struyk AP, Hoette I, Drost G, Waisvisz JM, Van Eek T, Hoogerheide JC. 1957. Pimaricin, a new antifungal antibiotic. *Antibiot. Annu.* 5:878–85
- Süsstrunk U, Pidoux J, Taubert S, Ullmann A, Thompson CJ. 1998. Pleiotropic effects of camp on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in streptomyces coelicolor. *Mol. Microbiol.* 30(1):33–46
- Takano E. 2006. Gamma-butyrolactones: streptomyces signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr. Opin. Microbiol.* 9(3):287–94
- Takano E, Chakraborty R, Nihira T, Yamada Y, Bibb MJ. 2001. A complex role for the gamma-butyrolactone scb1 in regulating antibiotic production in streptomyces coelicolor a3(2). *Mol. Microbiol.* 41(5):1015–28
- Takano E, Kinoshita H, Mersinias V, Bucca G, Hotchkiss G, et al. 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):465–79
- Takano E, Tao M, Long F, Bibb MJ, Wang L, et al. 2003. A rare leucine codon in adpa is implicated in the morphological defect of blda mutants of streptomyces coelicolor. *Mol. Microbiol.* 50(2):475–86
- Talaat AM, Howard ST, Hale W, Lyons R, Garner H, Johnston SA. 2002. Genomic dna standards for gene expression profiling in mycobacterium tuberculosis. *Nucleic Acids Res.* 30(20):e104
- Tanaka A, Takano Y, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2007. Afsr recruits rna polymerase to the afss promoter: a model for transcriptional activation by sarps. *J. Mol. Biol.* 369(2):322–33
- Tang L, Grimm A, Zhang YX, Hutchinson CR. 1996. Purification and characterization of the dna-binding protein dnri, a transcriptional factor of daunorubicin biosynthesis in streptomyces peucetius. *Mol. Microbiol.* 22(5):801–13
- Taylor BL, Zhulin IB. 1999. Pas domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 63(2):479–506
- Te Poele EM, Bolhuis H, Dijkhuizen L. 2008a. Actinomycete integrative and conjugative elements. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 94(1):127–43
- Te Poele EM, Samborsky M, Oliynyk M, Leadlay PF, Bolhuis H, Dijkhuizen L. 2008b. Actinomycete integrative and conjugative pmea-like elements of amycolatopsis and saccharopolyspora decoded. *Plasmid.* 59(3):202–16
- Tetzlaff CN, You Z, Cane DE, Takamatsu S, Omura S, Ikeda H. 2006. A gene cluster for biosynthesis of the sesquiterpenoid antibiotic pentalenolactone in streptomyces avermitilis. *Biochemistry (Mosc.).* 45(19):6179–86

Te Welscher YM, Jones L, van Leeuwen MR, Dijksterhuis J, de Kruijff B, et al. 2010. Natamycin inhibits vacuole fusion at the priming phase via a specific interaction with ergosterol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(6):2618–25

Te Welscher YM, ten Napel HH, Balagué MM, Souza CM, Riezman H, et al. 2008. Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. *J. Biol. Chem.* 283(10):6393–6401

Thomas PA. 2003. Fungal infections of the cornea. *Eye Lond. Engl.* 17(8):852–62

Trepanier NK, Jensen SE, Alexander DC, Leskiw BK. 2002. The positive activator of cephamycin c and clavulanic acid production in streptomyces clavuligerus is mistranslated in a blda mutant. *Microbiol. Read. Engl.* 148(Pt 3):643–56

Turner WB. 1973. Secondary metabolism with special reference to actinomycetales. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 2:209–17

Turpin PE, Dhir VK, Maycroft KA, Rowlands C, Wellington EMH. 1992. The effect of streptomyces species on the survival of salmonella in soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 101(4):271–80

Tzagoloff A, Meagher P. 1972. Assesmbly of the mitochondrial membrane system. vi. mitochondrial synthesis of subunit proteins of the rutamycin-sensitive adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 247(2):594–603

Uchida M, Takamatsu S, Arima S, Miyamoto KT, Kitani S, et al. 2011. Total synthesis and absolute configuration of avenolide, extracellular factor in streptomyces avermitilis. *J. Antibiot. (Tokyo)*

Ueki M, Suzuki R, Takamatsu S, Takagi H, Uramoto M, et al. 2009. Nocardamin production by streptomyces avermitilis. *Actinomycetologica.* 23(2):34–39

Uguru GC, Stephens KE, Stead JA, Towle JE, Baumberg S, McDowall KJ. 2005. Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in streptomyces coelicolor. *Mol. Microbiol.* 58(1):131–50

Ulanova D, Kitani S, Fukusaki E, Nihira T. 2013. Sdra, a new deor family regulator involved in streptomyces avermitilis morphological development and antibiotic production. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(24):7916–21

Umeyama T, Lee PC, Ueda K, Horinouchi S. 1999. An afsk/afsr system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in streptomyces griseus. *Microbiol. Read. Engl.* 145 (Pt 9):2281–92

Valentin-Hansen P, Højrup P, Short S. 1985. The primary structure of the deor repressor from escherichia coli k-12. *Nucleic Acids Res.* 13(16):5927–36

Valeriote F, Medoff G, Dieckman J. 1984. Potentiation of cytotoxicity of anticancer agents by several different polyene antibiotics. *J. Natl. Cancer Inst.* 72(2):435–39

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, et al. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative rt-pcr data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7):RESEARCH0034

Van Keulen G, Jonkers HM, Claessen D, Dijkhuizen L, Wösten HAB. 2003. Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 185(4):1455–58

Van Lanen SG, Shen B. 2008. Advances in polyketide synthase structure and function. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 11(2):186–95

Van Leeuwen MR, Golovina EA, Dijksterhuis J. 2009. The polyene antimycotics nystatin and filipin disrupt the plasma membrane, whereas natamycin inhibits endocytosis in germinating conidia of *Penicillium discolor*. *J. Appl. Microbiol.* 106(6):1908–18

Vannini A, Volpari C, Gargioli C, Muraglia E, Cortese R, et al. 2002. The crystal structure of the quorum sensing protein Trar bound to its autoinducer and target DNA. *EMBO J.* 21(17):4393–4401

Van Wezel GP, White J, Bibb MJ, Postma PW. 1997. The malefg gene cluster of *Streptomyces coelicolor* a3(2): characterization, disruption and transcriptional analysis. *Mol. Gen. Genet. MGG.* 254(5):604–8

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, et al. 2007. Genomics of actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR.* 71(3):495–548

Vicente CM, Payero TD, Santos-Aberturas J, Barreales EG, de Pedro A, Aparicio JF. 2015. Pathway-specific regulation revisited: cross-regulation of multiple disparate gene clusters by pas-luxr transcriptional regulators. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

Vicente CM, Santos-Aberturas J, Guerra SM, Payero TD, Martín JF, Aparicio JF. 2009. PimT, an amino acid exporter controls polyene production via secretion of the quorum sensing pimarinin-inducer PI-factor in *Streptomyces natalensis*. *Microb. Cell Factories.* 8:33

Vicente CM, Santos-Aberturas J, Payero TD, Barreales EG, de Pedro A, Aparicio JF. 2014. Pas-luxr transcriptional control of filipin biosynthesis in *S. avermitilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

Voeykova T, Emelyanova L, Tabakov V, 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

Volff JN, Altenbuchner J. 1998. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Mol. Microbiol.* 27(2):239–46

Volff JN, Altenbuchner J. 2000. A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiol. Lett.* 186(2):143–50

Volff JN, Viell P, Altenbuchner J. 1997. Artificial circularization of the chromosome with concomitant deletion of its terminal inverted repeats enhances genetic instability and genome rearrangement in *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet. MGG.* 253(6):753–60

Volpon L, Lancelin J. 2000. Solution NMR structures of the polyene macrolide antibiotic filipin III. *FEBS Lett.* 478(1-2):137–40

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of atp synthase, myosin, kinases and other atp-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1(8):945–51

Walsh CT. 2002. Combinatorial biosynthesis of antibiotics: challenges and opportunities. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 3(2-3):125–34

Wang J-B, Zhang F, Pu J-Y, Zhao J, Zhao Q-F, Tang G-L. 2014. Characterization of avar1, an autoregulator receptor that negatively controls avermectins production in a high avermectin-producing strain. *Biotechnol. Lett.* 36(4):813–19

Wang L, Grau R, Perego M, Hoch JA. 1997. A novel histidine kinase inhibitor regulating development in bacillus subtilis. *Genes Dev.* 11(19):2569–79

Wanner BL. 1993. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J. Cell. Biochem.* 51(1):47–54

Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. 2001. How many antibiotics are produced by the genus streptomyces? *Arch. Microbiol.* 176(5):386–90

Wei J, Meng X, Wang Q. 2011. Enhanced production of aureofuscin by over-expression of aurj3m, positive regulator of aureofuscin biosynthesis in streptomyces aureofuscus. *Let. Appl. Microbiol.* 52(4):322–29

Wei X, Yunxiang L, Yinghua Z. 2006. Enhancement and selective production of oligomycin through inactivation of avermectin's starter unit in streptomyces avermitilis. *Biotechnol. Lett.* 28(12):911–16

Wendler S, Hürtgen D, Kalinowski J, Klein A, Niehaus K, et al. 2013. The cytosolic and extracellular proteomes of actinoplanes sp. se50/110 led to the identification of gene products involved in acarbose metabolism. *J. Biotechnol.* 167(2):178–89

Whitfield GB, Brock TD, Ammann A, Gottlieb D, Carter HE. 1955. Filipin, an antifungal antibiotic: isolation and properties. *J. Am. Chem. Soc.* 77(18):4799–4801

Wietzorrek A, Bibb M. 1997. A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an ompr-like dna-binding fold. *Mol. Microbiol.* 25(6):1181–84

Williams DH, Stone MJ, Hauck PR, Rahman SK. 1989. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J. Nat. Prod.* 52(6):1189–1208

Williams GJ. 2013. Engineering polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23(4):603–12

Wilson DJ, Xue Y, Reynolds KA, Sherman DH. 2001. Characterization and analysis of the pikd regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of streptomyces venezuelae. *J. Bacteriol.* 183(11):3468–75

Wisedchaisri G, Wu M, Rice AE, Roberts DM, Sherman DR, Hol WGJ. 2005. Structures of mycobacterium tuberculosis dosr and dosr-dna complex involved in gene activation during adaptation to hypoxic latency. *J. Mol. Biol.* 354(3):630–41

- Wright F, Bibb MJ. 1992. Codon usage in the g+c-rich streptomyces genome. *Gene*. 113(1):55–65
- Xue Y, Wilson D, Zhao L, Liu H w, Sherman DH. 1998. Hydroxylation of macrolactones yc-17 and narbomycin is mediated by the pikc-encoded cytochrome p450 in streptomyces venezuelae. *Chem. Biol.* 5(11):661–67
- Xu L-H, Fushinobu S, Ikeda H, Wakagi T, Shoun H. 2009. Crystal structures of cytochrome p450 105p1 from streptomyces avermitilis: conformational flexibility and histidine ligation state. *J. Bacteriol.* 191(4):1211–19
- Xu L-H, Fushinobu S, Takamatsu S, Wakagi T, Ikeda H, Shoun H. 2010. Regio- and stereospecificity of filipin hydroxylation sites revealed by crystal structures of cytochrome p450 105p1 and 105d6 from streptomyces avermitilis. *J. Biol. Chem.* 285(22):16844–53
- Yamaguchi H, Abe S, Tokuda Y. 1993. Immunomodulating activity of antifungal drugs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 685:447–57
- Yamazaki M, Yamashita T, Harada T, Nishikiori T, Saito S, et al. 1992. 44-homooligomycins a and b, new antitumor antibiotics from streptomyces bottropensis. producing organism, fermentation, isolation, structure elucidation and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 45(2):171–79
- Yang YH, Speed T. 2002. Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat. Rev. Genet.* 3(8):579–88
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13Mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 33(1):103–19
- Yao J, Rock CO. 2013. Phosphatidic acid synthesis in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*. 1831(3):495–502
- Yim G, Wang HH, Davies J. 2007. Antibiotics as signalling molecules. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 362(1483):1195–1200
- Yin P, Wang Y-H, Zhang S-L, Chu J, Zhuang Y-P, et al. 2008. Isolation of soluble proteins from an industrial strain streptomyces avermitilis in complex culture medium for two-dimensional gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods*. 73(2):105–10
- Yoo H-G, Kwon S-Y, Kim S, Karki S, Park Z-Y, Kwon H-J. 2011. Characterization of 2-octenoyl-coa carboxylase/reductase utilizing pteb from streptomyces avermitilis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75(6):1191–93
- Young TS, Walsh CT. 2011. Identification of the thiazolyl peptide ge37468 gene cluster from streptomyces atcc 55365 and heterologous expression in streptomyces lividans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(32):13053–58
- Yu Q, Bai L, Zhou X, Deng Z. 2012. Inactivation of the positive luxr-type oligomycin biosynthesis regulators olmri and olmrii increases avermectin production in streptomyces avermitilis. *Chin. Sci. Bull.* 57(8):869–76

Zaleta-Rivera K, Charkoudian LK, Ridley CP, Khosla C. 2010. Cloning, sequencing, heterologous expression, and mechanistic analysis of a-74528 biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 132(26):9122–28

Zhang X, Chen Z, Li M, Wen Y, Song Y, Li J. 2006. Construction of ivermectin producer by domain swaps of avermectin polyketide synthase in streptomyces avermitilis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72(5):986–94

Zhang X, Chen W, Zhang Y, Jiang L, Chen Z, et al. 2012. Deletion of ku homologs increases gene targeting frequency in streptomyces avermitilis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39(6):917–25

Zotchev S, Caffrey P. 2009. Genetic analysis of nystatin and amphotericin biosynthesis. *Methods Enzymol.* 459:243–58

Zou Z, Du D, Zhang Y, Zhang J, Niu G, Tan H. 2014. A γ -butyrolactone-sensing activator/repressor, jadR3, controls a regulatory mini-network for jadomycin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 94(3):490–505

7. ANEXOS

Anexo I. Listado de *primers*

A continuación se presentan las secuencias de todos los *primers* empleados a lo largo de este trabajo. Los sitios de corte para enzimas de restricción están subrayados. Aquellos *primers* que se han utilizado en reacciones de PCR o RT-PCR, su temperatura de fusión (T_m) se encuentra indicada entre paréntesis. En el caso de las reacciones de qPCR, se indican para cada *primer* la temperatura de anillamiento y concentración final empleadas.

Obtención de mutantes y construcciones

pteF fw: cgcgagcgagcgggcgccgggagggcccgatgcccgtcaTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

pteF rev: gttcaacatctggcgataccgctggtcccagggccgatgATTCCGGGGATCCGTCGACC

pteF 2.1 fw: CCGGTTCCGACCGTCCTGCGAC (68,1)

pteF 2.1 rev: GCGCCTTCCAAGCTGGAGATCCATCG (69,7)

pteF 3 fw: CAGCTTCCGCAGCAGGCAGGTCAC (65,6)

pteF 3 rev: CAACGGCTCGTCCGAGGACATATGC (66,1)

pteF 4 fw: GCGTGATATCGAGGTGCTTCTCCCGTG (67,9)

pteF 4 rev: GCTCGATATCCCATCGTGCTTGCGG (67,7)

int: CGCCGACGCTGACCCGACC (65,4) (cedido por la Dra. Guerra Martínez)

pimM+P directo: GGTGACACGTTTGCGGTCCGGTGGTGCGGGC (80,0)

pimM+P reverso: GTCGTCCTCGGGTTCTTGCGG (62,4)

pimM S: GGCCGCAATTTCCGTGAC (58,1)

pteR fw: ggtcagccatatccgcaagcacgatggggaccgttcatgATTCCGGGGATCCGTCGACC

pteR rev: gtgggtccgcaactgacgaggcagagcacggatccatcaTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

pteR 2 fw: CGATGGATCTCCAGCTTGGAAGGCGC (69,7)

pteR 2 rev: GCATCACCATCGACCGCGACCG (68,0)

pteR 3 fw: CGACTGCACTTCGCTCACGCC (65,6)

pteR 3 rev: GCGAGTGGTGGCGAGCACCTGG (67,5)

pteR 7 fw: CCCTGGGACCAGCGGTATCGCC (67,0)

Análisis de co-transcripción

pteH 2 fw: GGGTACTGCACGCACAGCACGTCG (67,2)
 intergHG rev: CTTCGCCGACGACTTCTGCTACCACC (66,4)
 intergGF fw: GCGACAGAGGCTGGTGTGCAATC (62,6)
 intergGF rev: CCGCCCGAGGTCGTGGACG (65,2)
 pteE fw: GAAGATCGCGACCGCCTGCACG (67,4)
 intergED rev: GCCTGCGGCTGGCGGTCCC (62,5)
 pteC 2 fw: GGCCGCAGCGCCTGCATG (65,4)
 intergCB rev: CGCACTACGCCGACACTCGCCAG (67,3)
 pteB 2 fw: GTGGATCCGTGCCCATCCGG (63,8)
 intergBA5 rev: GGCGGCGGTGGATTCTGGC (67,1)
 pteA5 2 fw: CCGACTCCGCGTCGATGCC (63,2)
 intergA5A4 rev: CGCAGCGACAGCTCCAGGACG (64,8)
 pteA4 2 fw: CGCTGAAGGTAGGCGTGGTCCTGGC (68,9)
 intergA4A3 rev: CGGCTGGAGGCGCAGCTCGC (68,8)
 pteA3 2 fw: CCGGTGCGGCTGCCCTTGAG (66,4)
 intergA3A2 2 rev: GCGACGCTGGTCTTCGACC (57,9)
 pteA2 2 fw: GCCCGCTCGAAGAGCTCCCACG (67,6)
 intergA2A1 rev: CGACGTTGGCAGCGAGTGAAGCTC (65,8)
 E-pteA2 rev: CGACGCTGGTCTTCGACCATC (59,2)

Experimentos 5'-RACE

(los tres *primers* empleados para el análisis de cada gen, se indican por orden secuencial de uso)

PteH RACE 1: GGTCCCAGGTGTAGGTTTCGGC (61,5)
 PteH RACE 2: CGGAGTCCAGGAGAGGTTTCGG (59,5)
 PteH RACE 3: CGGGACACGGGGAAGTAGAAGC (60,6)
 PTEG11: GACGAGGGAACCGCCACCGAC (64,7) (cedido por la Dra. Tamara Diez Payero)
 PteG RACE 1: GAGGTCGAGCCACAGGAATGA (56,4)
 PteG RACE 5: CGGCCATCTCCAGCATCAGG (63,3)
 PteF RACE 1: GGAGAGGATCTTCTTGAGTTTGGG (56,3)
 PteF RACE 2: GGAACGGTGAAGGCGGACTCC (61,5)

PteF RACE 3: CGATGACGGGCGTGACGAAAC (62,0)
PteR RACE 1: GCCGTGCCACAGCCCCAAGG (66,2)
PteR RACE 2: GCTCTGGAGTGTGGCGACGG (60,2)
PteR RACE 3: GCTCCGTCACCCCACAGTTCC (60,2)
PteE RACE 1: CCTCGAAGATCGCGACCGCC (63,5)
PteE RACE 2: GTGAAAACGCCGGGTGCG (59,5)
PteE RACE 3: CGGTCGCGGTCGATGGTG (60,4)
PteD RACE 1: GCCAGCATGTCGTCCAAGAGCC (62,6)
PteD RACE 2: CGACACCGCTCAGGGGGAAGG (64,4)
PteD RACE 3: GTGACCTGCGTCAGCGGGC (61,1)
PteC RACE 1: CGACGATGCGCTGGATGTTCG (63,1)
PteC RACE 2: GGTGACGACGCCGTCCTGG (60,8)
PteC RACE 3: GGACGCTGAACGAGGAGTCGC (60,7)
PteB RACE 1: CGCTGCGGACGCCCTCGC (66,6)
PteB RACE 2: CAGCGAGGACCACACGTTGTTG (60,0)
PteB RACE 3: CACGTAGACCAGCACCTGGCCC (62,4)
PteA5 RACE 1: CGCCTCGTACAGGAATCCACCG (62,3)
PteA5 RACE 2: GCCACCAGGTGCCACAGGTCC (63,2)
PteA5 RACE 3: CGGATACCGGCACGCCATACC (62,8)
PteA4 RACE 1: GCTGCTGCGGGTCCATGACCAG (65,4)
PteA4 RACE 2: GGGTCGTAGATCGTGTCCAGGTCCC (64,4)
PteA4 RACE 3: GGAACCCGGACACGCCGTCG (66,1)
PteA3 RACE 1: CGGTGCGGCTGCCCTTGAG (63,3)
PteA3 RACE 2: CGTCGTGCAGGAAGCCGCCC (66,4)
PteA3 RACE 3: GCGGTCCACGGGGAAGTTCG (66,2)
PteA2 RACE 1: GTCTCCAGCAGCAGCCGTTG (58,1)
PteA2 RACE 2: GGTCGTAGAGGGCGTCCAGG (58,1)
PteA2 RACE 3: GAACTCCGAGACGGCGTCGC (61,6)
PteA1 RACE 1: GCGTCCTCCAGTGCTTCCCAG (60,6)
PteA1 RACE 4: GCGTGAAGCCGTAGTCGTGGTAC (59,6)
PteA1 RACE 5: GCCTCCAGCAGCAGCCG (57,6)

AmphA RACE 1: GCCGTTGGTGCCGACGAAGAC (63,6)

AmphA RACE 2: GCGACATCCCGAAGAAGCCG (61,3)

PAMPH_AR: ACCAGCTCCACAGGTCCTCGG (63,2) (cedido por el Dr. Javier Santos Aberturas)

Q-sav2899 3.1 2fw: CGGGACAGCGTGGCGTAG (57,3)

OlmA1 RACE 2: GCTGCGGGTCCATCGCCG (64,2)

OlmA1 RACE 3: CGACGGAGTCGAGGAATCCG (59,1)

OlmA2 RACE 1: CAGGAGGTCTCCAGGAGCAGCC (61,0)

OlmA2 RACE 2: GAAGTCGCCGCGCAGGTGG (63,4)

Q-sav2898 3.0 4fw: GCGCACGCACTCCACAG (58,4)

OlmA2i RACE 1: CATGCCGTCGGTGGAGCC (59,4)

OlmA2i RACE 2: GACGATTCGAGCAGCAGCCG (60,4)

OlmA2i RACE 3: GCGAGATGCCGAAGAAGCC (57,1)

Análisis cuantitativo de expresión génica

(los *primers* están listados por parejas y se indican las condiciones de reacción para cada una de ellas)

Q-rrnA1 4.0 7fw: GACGCAACGCGAAGAACC (70 °C, 200nM)

Q-rrnA1 4.0 7rev: TGCGGGACTTAACCCAACATC

Q-pteH 4.2 9fw: CCGAACAGGGCGATGG (70 °C, 200nM)

Q-pteH 4.2 9rev: GCCGCACCGAACCTCTC

Q-pteG 4.1 6fw: CGGTGCCGACCACGAC (68 °C, 200 nM)

Q-pteG 4.1 6rev: GCGGGGCAGACTACGATCAC

Q-pteF 4.1 9fw: TTGGAGAATTGACGCACCAG (66 °C, 300 nM)

Q-pteF 4.1 9rev: ATCCAGCAGGCGAACCAG

Q-pteR 4.1 2fw: GGCCCTGCTGCTCATCC (62 °C, 200nM)

Q-pteR 4.1 2rev: CCTGTTCCCGCCTTTGTG

Q-pteD 4.1 1fw: GCCAGCATGTCTGTCGAAGAG (62 °C, 200nM)

Q-pteD 4.1 1rev: CTTCCCCCTGATCGGTGTC

Q-pteC 4.1 12fw: GTGCTCCGGCTCGTCCTG (66 °C, 100 nM)

Q-pteC 4.1 12rev: CCTGCTGCGCGACTCCTC

Q-pteB 4.2 9fw: CCAGCGAGGACCACACG (66 °C, 300 nM)

Q-pteB 4.2 9rev: GCCGAAGCAGGCGTTCC

Q-pteA5 4.1 6fw: CCACGAGCGACGACGAG (70 °C, 100 nM)
Q-pteA5 4.1 6rev: ACTCCGCCAGTGTGATGTCC
Q-pteA4 4.2 4fw: GCGCCACCAGCGAGGAC (68 °C, 300nM)
Q-pteA4 4.2 4rev: AGGGCGACAGCGACAGC
Q-pteA3 4.0 1fw: GAACCGGCAGCTCATACCC (68 °C, 300 nM)
Q-pteA3 4.0 1rev: ACCTCAAGCGGACCACCAC
Q-pteA2 4.1 3fw: CGCGGGCGTAGCTGGTC (68 °C, 300 nM)
Q-pteA2 4.1 3rev: CGAGGATCTGTGGGAGTTGGTC
Q-pteA1 4.0 1fw: GCTTCCCAGGCCAACTCC (66 °C, 350 nM)
Q-pteA1 4.0 1rev: CGGCTTCCTCGACAGCATC
Q-sav2890 3.0 8fw: CCACACGGTGTGTAGTTGACC (70 °C, 200 nM)
Q-sav2890 3.0 8rev: AGGTCCCGATGCCCGAAC
Q-sav2892 4.0 6fw: TCGACGCGGAGTTCTTCGG (70 °C, 200 nM)
Q-sav2892 4.0 6rev: CGGTGTTCTCCAGGGCTTCC
Q-sav2894 3.0 1fw: ACCAAGCACGCCGATGTCC (70 °C, 200 nM)
Q-sav2894 3.0 1rev: CCATGCCGACGAGCGACTC
Q-sav2898 3.0 4fw: GCGCACGCACTCCCACAG (68 °C, 200 nM)
Q-sav2898 3.0 4rev: GCGCCGCCGAACCCATC
Q-sav2899 3.1 2fw: CGGGACAGCGTGGCGTAG (70 °C, 200 nM)
Q-sav2899 3.1 2rev: AGCGGCTGGTCCTTGAGC
Q-sav2901 3.0 4fw: CCGACGACGCCGAACTCG (70 °C, 200 nM)
Q-sav2901 3.0 4rev: GAGTCGGCAGAACGGCACTG
Q-sav2902 3.0 10fw: GAGGTCGTCCGGGAAAGGAG (68 °C, 200 nM)
Q-sav2902 3.0 10rev: TCGGCCTGATCGCTCTGC
Q-sav602 4.0 3fw: CGGGCGCCTTGGTGAAC (70 °C, 200 nM)
Q-sav602 4.0 3rev: GCCACCGGCCGACAAGGC
Q-sav935 3.1 2fw: GCACGGTGAAACTGCTCGTC (70 °C, 200 nM)
Q-sav935 3.1 2rev: GTGGTCCGCGGGAAGCC
Q-sav1082 3.1 2fw: GCAGACCGAGTGTGGGAGAG (70 °C, 200 nM)
Q-sav1082 3.1 2rev: CCGGTGGGCTGCCATTCG
Q-sav2273 4.1 1fw: GCCAGCGGATCGATGTACGG (70 °C, 200 nM)

Q-sav2273 4.1 1rev: AGTACCTCGCCCTGTGGAAC

Q-sav4891 4.0 4fw: GTCGTCGCACTCTTCATCGC (70 °C, 200 nM)

Q-sav4891 4.0 4rev: GGCCTCGAACTCGCTCACC

Ensayos de retraso en gel (EMSA)

Forward M13 -20 6FAM: TGTA AACGACGGCCAGT (48,6)

Reverse: GGAAACAGCTATGACCATG (44,9)

Forward M13 -20: GTAA AACGACGGCCAGT (45,2)

Reverse 6FAM: AGGAAACAGCTATGACCATG (46,6)

intergHG fw: AGTAGAAGCTGGCGGAGCCGC (61,6)

intergHG rev: CTTCGCCGACGACTTCTGCTACCACC (66,4)

pteR 7 fw: CCCTGGGACCAGCGGTATCGCC (67,0)

E-pteA2 fw: GGCGGAGCTTGTCTCGTTTCGC (65,7)

E-pteA2 rev: CGACGCTGGTCTTCGACCATC (59,2)

E-sav602 fw: GTCGTTGAGCTTGACCTTGCCG (60,6)

E-sav602 rev: GGAAGCAGAGCCATCTCGCAACC (62,9)

E-sav610 fw: GAGCGGAGCCTTCGCCGG (62,5)

E-sav610 rev: GCGGAGGTAGGAATACAGGAAAG (55,2)

E-sav1485 fw: CCTCGGCTGCGAGCTTTACCTG (61,9)

E-sav1485 rev: CGACGACGGGACGGTAGACAAG (60,3)

E-sav1619 fw: GTGCCTGTGCAACCTAAATCTAGCCAAG (62,3)

E-sav1619 rev: GAGCACGTCAGTACCTCGGACAGTACG (62,9)

E-sav2600 fw: GACTGAACGACAAGGAGATCGACGC (62,0)

E-sav2600 rev: GCGACAGCTCCAGGACCTTCTTG (61,0)

E-sav2898 fw: CACAGGTCCTCGGCGGAGGC (63,5)

E-sav2898 rev: CATGGTCTTCGACCACCCGACC (62,1)

E-sav2899 fw: CACCGCTATCGGCTGAATGGATC (61,4)

E-sav2899 rev: CCTTCGAGGAGTTGCGGTTCC (59,5)

E-sav2943/4 fw: GGACTGAACATTTGGCAG (45,4)

E-sav2943/4 rev: CCATGCCTCCCGCCGAC (59,4)

E-sav3804/5 fw: GCTGCACCTGGAGACGGATCGC (64,7)

E-sav3804/5 rev: CCACAACCGCTGACGGCTCGC (66,4)

E-sav4155 fw: GCCGAGAACATCGTTCGCCCTG (67,2)

E-sav4155 rev: GTCGTTTCGTGCGTGTGCGG (60,6)

E-sav4164/5 fw: GGACACATGGCTCGCTGACG (58,7)

E-sav4164/5 rev: CTGCCTGAATCATGCGCTCTCC (60,6)

E-sav4561/2 fw: GCTGTCTGAAGCCGATGCCG (61,2)

E-sav4561 /2rev: CGACCGTCCGTGTCCGTGTTTC (62,0)

E-sav4717/8 fw: GCACGATCACGGACCCGAGC (62,2)

E-sav4717/8 rev: GCCGCCTCTTCCGTACCCGAG (63,6)

E-sav4772/3 fw: GCCGCCTTGAACGCCTCGTACG (66,2)

E-sav4772/3 rev: GAGGTGGGCGGCGGCGGTG (69,2)

E-sav4924/5 fw: GTACTCCGTCCGCTGTTCG (53,0)

E-sav4924/5 rev: CTCAGTAGTCCTTCGTCTC (40,1)

E-sav5123 fw: CTGAGAGTGAAATCTCCGTCCGGC (58,9)

E-sav5123 rev: CGGCAACCAGTCGCAACAC (57,2)

E-sav7210 fw: TGGTCTTCATGGACGGCG (54,9)

E-sav7210 rev: GGAGTCTGCTGCGGAGGC (55,5)

(los siguientes *primers* fueron cedidos por la Dra. Tamara Diez Payero)

Seq3-F: GGACGACTTCGTGAAGTGAGCGG (61,8)

Seq4-R: CGAACGTGCCGCCGGAACC (65,1)

pteF-Rp F: CGGCCCTGGGACCAGCGGTATCG (70,3)

pteF-Rp R: GAACGGTCCCCATCGTGCTTGCG (67,9)

interFR rev: AGGTCATGCCCCGTTTCAGTCGC (61,8)

pteA4p F: CCACAGGATCCGGTACGGGACAAGATC (66,8)

pteA4p R: GTCGGTGGGGAATTCGGACACGCC (69,4)

pteA3p F: CACCCGAACCAGGATCCACATGCGTCTCCAGG (76,6)

pteA3p R: GGCGAAATCCCGAAGAATTCGG (62,4)

pteA1p F: CATGAGAGAGGAATTCAACTGGCATGACCC (66,9)

pteA1p R: CTGCCGAAGCTTAACAGTCCCGATTCC (66,2)

Anexo II. Matriz de pesos para la búsqueda de sitios de unión de PteF/PimM

Basada en el logotipo de la secuencia nucleotídica consenso de reconocimiento de PimM, construido a partir de 40 secuencias de operadores con 16 bp localizados en diferentes *clusters* biosintéticos (Santos-Aberturas *et al.* 2011a).

P0	A	C	G	T	
01	3	10	1	5	C
02	1	10	3	50	T
03	5	3	3	1	A
04	1	1	30	1	G
05	1	3	60	1	G
06	10	1	35	3	G
07	30	1	6	3	A
08	40	1	1	35	A
09	35	1	1	40	T
10	1	10	3	30	T
11	3	40	1	10	C
12	1	60	1	10	C
13	3	18	1	2	C
14	1	8	25	20	G
15	50	1	30	1	A
16	1	1	10	1	G

Anexo III. Listado de operadores de PteF en *S. avermitilis*

Tabla S1. Lista de operadores identificados en el cromosoma de *S. avermitilis* con la matriz de pesos.

Posible diana	Hebra	Secuencia	Loci (bp)	valor <i>Ri</i>	Posición sitio unión	Gen	Descripción																																																															
SAV13	+	cttgggggtattcctga	18851	4.39	Dentro SAV13 (cerca extremo 3')	-	proteína hipotética																																																															
	-	tcaggaataccccaag		5.85				SAV118 y SAV119	+	ctggcaaattcccgat	136109	6.88	Región intergénica SAV117-SAV118	-	posible transposasa tipo-IS1647 familia IS5	-	atcgggaatttgccag	5.57	-	posible transposasa tipo-IS1647 familia IS5	SAV209	+	ttcgggatatcactga	245061	5.61	Región intergénica SAV209-SAV210	-	posible transposasa tipo-IS900 familia IS110	-	tcagtgatatcccgaa	6.53	SAV225	+	ccagggctttccagaa	263744	7.73	Dentro SAV225 (centro)	-	posible transposasa tipo-IS666 familia IS256	-	ttctggaaagccctgg	5.82	SAV295	+	gtgaggaaatcccgag	346180	12.23	Dentro SAV296 (cerca extremo 3')	-	proteína hipotética	-	ctcgggatttcctcac	13.69	SAV368	+	ctggggatacccctgc	437684	10.84	Dentro SAV368 (centro)	-	proteína hipotética	o	gcaggggtatccccag	11.00	SAV402	+	cccgggatttcccgga	479368	12.71	Dentro SAV402 (centro)
SAV118 y SAV119	+	ctggcaaattcccgat	136109	6.88	Región intergénica SAV117-SAV118	-	posible transposasa tipo-IS1647 familia IS5																																																															
	-	atcgggaatttgccag		5.57		-	posible transposasa tipo-IS1647 familia IS5																																																															
SAV209	+	ttcgggatatcactga	245061	5.61	Región intergénica SAV209-SAV210	-	posible transposasa tipo-IS900 familia IS110																																																															
	-	tcagtgatatcccgaa		6.53																																																																		
SAV225	+	ccagggctttccagaa	263744	7.73	Dentro SAV225 (centro)	-	posible transposasa tipo-IS666 familia IS256																																																															
	-	ttctggaaagccctgg		5.82																																																																		
SAV295	+	gtgaggaaatcccgag	346180	12.23	Dentro SAV296 (cerca extremo 3')	-	proteína hipotética																																																															
	-	ctcgggatttcctcac		13.69																																																																		
SAV368	+	ctggggatacccctgc	437684	10.84	Dentro SAV368 (centro)	-	proteína hipotética																																																															
	o	gcaggggtatccccag		11.00																																																																		
SAV402	+	cccgggatttcccgga	479368	12.71	Dentro SAV402 (centro)	-	proteína hipotética																																																															
	-	tccgggaaatcccggg		12.02																																																																		

SAV418	+	gtcaggaaatcccga	543776	11.69	Dentro SAV419 (cerca extremo 3')	<i>pteA2</i>	PKS modular
	-	ttcgggatttcctgac		13.23			
	+	gtagggaatccactag	543998	10.62			
	-	ctagtggattccctac		11.08			
SAV419	+	ttaggggaatcccaa	567169	8.88	Región intergénica SAV419-SAV420	<i>pteA1</i>	PKS modular
	-	ttggggattcccctaa		9.15			
	+	tcgggaaaatctctaa	567211	4.83			
	-	ttagagattttcccga		2.06			
SAV518	+	ttcgaggaattcctgg	663407	3.14	Dentro SAV519 (cerca extremo 3')	-	proteína hipotética
	-	ccaggaattcctcgaa		7.79			
SAV602	+	ctcggacattccgtag	753986	8.85	Dentro SAV602 (cerca región 5')	<i>fecB</i>	proteína unión-transportador ABC sideróforo hierro(III)
	-	ctacggaatgtccgag		8.25			
SAV610	+	tttgggaatttccacag	764857	4.99	Región intergénica SAV610-SAV611	-	posible proteína transportadora MFS
	-	ctgtggaaattccaaa		3.61			
SAV790	+	tcttggatttcccgga	942736	7.68	Dentro SAV790 (cerca extremo 5')	-	proteína hipotética
	-	tccgggaaatccagga		7.38			
SAV992	+	ctacgacattcccgag	1258214	9.17	Dentro SAV992 (centro)	-	posible proteína membrana familia ribonucleasa BN
	-	ctcgggaatgtcgtag		7.92			
SAV1065 o SAV1066	+	ctaggaaatcccctct	1344585	7.84	Región intergénica SAV1065-SAV1066	-	posible S-transferasa glutatión posible proteína secretada
	-	agaggggatttcctag		6.86			

SAV1208 o SAV1209	+	tcaaggaatacccgac	1499851	8.04	Región intergénica SAV1208-SAV1209	-	posible monooxigenasa
	-	gtcgggtattccttga		7.31			
	+	ccatggaatttcacga	1499884	4.02			
	-	tcgtgaaattccatgg		4.53			
SAV1428	+	ctacggatatccgcag	1762464	10.15	Dentro SAV1428 (centro)	-	proteína hipotética
	-	ctgcggatatccgtag		9.94			
SAV1458	+	ctcgggatagtcgcag	1796896	8.71	Dentro SAV1458 (cerca región 3')	-	posible glicosiltransferasa
	-	ctcggactatcccgag		9.63			
SAV1485	+	ctgggaaaactccgag	1828436	8.18	Región intergénica SAV1484-SAV1485	<i>plsCI</i>	posible O-aciltransferasa 1- acilglicerol-3-fosfato
	-	ctcggagttttcccgag		8.36			
SAV1619	+	tcaggaatcctcggg	1986913	8.55	Región intergénica SAV1619-SAV1620	-	posible regulador transcripcional GntR
	-	cccgaggattcctga		6.25			
SAV1661 o SAV1662	+	atcggggatttctggg	2034430	7.74	Región intergénica SAV1661-SAV1662	-	posible glicosiltransferasa
	-	cccagaaatccccgat		8.72			
SAV2243	+	acagggatttcttgag	2730243	10.55	Dentro SAV2243 (cerca extremo 5')	-	posible transportador aminoácidos catiónicos
	-	ctcaagaaatccctgt		6.55			
SAV2324 y SAV2323 o SAV2325	+	ccagggattttccccg	2831797	7.63	Región intergénica SAV2324-SAV2325	<i>prpA1</i>	posible fosfatasa proteínas serina/treonina
	-	cggggaaaatccctgg		7.50			

SAV2506	+	ccaggggaattcacctgt	3056539	7.03	Región intergénica SAV2506-SAV2507	<i>cinA</i>	posible proteína de competencia inducible por daños
	-	acggtgaattccctgg		6.49			
SAVt65	+	ctcgaggtttccctcg	3072718	5.78	Región intergénica SAVt65-SAV2514	<i>trn65</i>	tRNA-Thr, codón reconocido: ACC
	-	cgagggaaacctcgag		7.96			
SAV2600	+	ctcgggatttcgctcg	3194442	8.01	Dentro SAV2600 (cerca extremo 5')	<i>clpC1</i>	posible protease Clp dependiente ATP
	-	cgagcgaaatcccag		8.08			
SAV2847 y SAV2846 y SAV2845	+	atccggaatccccag	3492442	8.67	Región intergénica SAV2847-SAV2848	-	proteína hipotética
	-	ctgggggattccggat		9.36		-	proteína hipotética posible regulador transcripcional familia TetR
SAV2898	+	ccaggaaatccgccag	3598866	6.62	Dentro SAV2898 (centro)	<i>olmA2</i>	PKS modular
	-	ctggcggatttctctgg		4.83			
SAV2899	+	ctaggaaaatgcgaag	3626437	4.58	Región intergénica SAV2899-SAV2900	<i>olmA1</i>	PKS modular
	-	cttcgcattttctctag		3.88			
SAV2943 o SAV2944	+	ctcggagattccctac	3691827	13.39	Región intergénica SAV2943-SAV2944	-	proteína hipotética
	-	gtagggaaatctccgag		12.39		<i>fabB2</i>	posible sintasa II 3-oxoacil-ACP
SAV3235	+	ccagggaaatccggaa	4033031	12.03	Región intergénica SAV3235-SAV3236	-	posible proteína secretada
	-	ttccggatttccctgg		11.08			
SAV3286	+	atcgggaacttctctgg	4088368	6.75	Dentro SAV3285 (cerca extremo 3')	-	proteína hipotética
	-	ccaggaagtcccgat		9.11			

SAV3391	+	ttatggatttccggag	4213763	10.63	Dentro SAV3392 (cerca extremo 3')	-	proteína hipotética
	-	ctccggaaatccataa		9.85			
SAV3582	+	ctgcgataaccgtaa	4433612	5.61	Región intergénica SAV3582-SAV3583	-	posible proteína membrana
	-	ttacgggtatccgcag		5.61			
SAV3583	+	ctgggatagccgtaa	4435434	5.55	Dentro SAV3583 (cerca región 5')	-	posible proteína membrana
	-	ttacggctatccccag		5.37			
	+	ctgggatagccgtag	4435575	7.77			
	-	ctacggctatccccag	7.79				
SAV3612	+	accggaattccagag	4469504	9.24	Región intergénica SAV3612-SAV3613	-	proteína hipotética
	-	ctctggaattaccggt		8.59			
SAV3619 o SAV3620	+	ctgaagataccccgag	4475596	7.75	Región intergénica SAV3619-SAV3620	-	posible regulador transcripcional TetR
	-	ctcggggtatcttcag		8.13			
	+	ttaggtgaacccccgag	4475702	8.18	Dentro SAV3620 (cerca extremo 5')	<i>pepD2</i>	posible peptidasa núcleo tricorn
	-	ctcggggttcacctaa	8.22				
SAV3727	+	cttgagaattcctgg	4613613	5.08	Región intergénica SAV3727-SAV3728	-	proteína hipotética
	-	ccaggaattctccaag		6.30			
SAV3742	+	ctcggggaattcatgg	4627717	8.18	Dentro SAV3742 (cerca extremo 5')	-	proteína hipotética
	-	ccatgaattccccgag		10.45			
SAV3804	+	ctcgggcattccctca	4707453	6.40	Dentro SAV3804 (cerca región 3')	-	proteína hipotética
	-	tgagggaatgcccag		6.85			

SAV4155	+	ctcgggaattccttga	5103364	13.22	Región intergénica SAV4154-SAV4155	-	posible helicasa RNA dependiente ATP
	-	tcaaggaattcccag		13.36			
SAV4164 o SAV4165	+	atcgggaaattcatag	5114559	9.34	Región intergénica SAV4164-SAV4165	-	posible proteína membrana proteína hipotética
	-	ctatgaatttcccgat		11.29			
SAV4198 y SAV4197	+	cctgtgattttcctaa	5151004	2.94	Dentro SAV4198 (cerca extremo 5')	-	posible regulador respuesta sistema dos componentes posible quinasa sensora sistema dos componentes
	-	ttaggaaaatcacagg		2.97			
SAV4231	+	ctgggcatatcccggg	5187752	8.61	Dentro SAV4231 (cerca extremo 5')	-	posible regulador transcripcional GntR
	-	cccgggatatgccag		8.71			
SAV4235	+	ccggggaaatccttgt	5194837	9.68	Dentro SAV4235 (centro)	-	posible 2'-fosfotransferasa RNA
	-	acaaggatttcccgg		9.47			
SAV4260	+	cccgggattcccggag	5226685	11.85	Región intergénica SAV4260-SAV4261	<i>cydA1</i>	posible subunidad I citocromo bd-I oxidasa (complejo citocromo bd)
	-	ctccgggaatcccggg		10.66			
SAV4293	+	ctaggaatacgccgag	5259921	8.27	Región intergénica SAV4293-SAV4294	-	posible proteína transmembrana
	-	ctcggcgtattcctag		6.98			
SAV4355 y SAV4356 y SAV4357	+	ctggatatatcccag	5332664	6.92	Dentro SAV4355 (centro)	-	posible proteína membrana posible proteína membrana posible metiltransferasa rRNA
	-	ctcgggatatatccag		8.47			
SAV4471	+	ctcggggttctccgag	5461402	10.19	Dentro SAV4471 (centro)	-	posible proteína unión-DNA
	-	ctcggagaaccccag		10.64			

SAV4495	+	ccaggagattccccgac	5492099	12.96	Dentro SAV4495 (centro)	-	posible proteína secretada
	-	gtcgggaatctcctgg		10.41			
SAV4561 y SAV4562	+	ctggggatatcgctgg	5570347	8.58	Dentro SAV4561 (cerca extremo 3')	<i>sig40</i>	posible factor sigma RNA polimerasa subfamilia ECF proteína hipotética
	-	ccagcgatatccccag		9.20		-	
SAV4563	+	gcgggaaaatccccag	5571780	9.17	Dentro SAV4563 (cerca extremo 3')	-	proteína hipotética
	-	ctggggattttcccgc		8.77			
SAV4579	+	ctatgggaatcccgac	5592307	12.34	Dentro SAV4579 (centro)	-	proteína hipotética
	-	gtcgggattcccatag		11.91			
SAV4697	+	ctcgggatttcgctcg	5722136	8.01	Dentro SAV4697 (cerca extremo 5')	<i>clpC2</i>	posible protease Clp dependiente ATP
	-	cgagcgaaatccccgag		8.08			
SAV4717	+	gccgggaaataccgaa	5750656	9.67	Dentro SAV4717 (cerca región 5')	<i>pkn16</i>	posible quinasa proteínas serina/treonina
	-	ttcggatatttcccggc		10.13			
SAV4772 o SAV4773	+	ccatagaaatccgcat	5817262	2.42	Región intergénica SAV4772-SAV4773	-	posible regulador transcripcional DJ- 1/PfpI
	-	atgcggtatttctatgg		3.94			
	+	ccatgagattcctgat	5817302	7.56	Dentro SAV4773 (cerca extremo 5')	<i>abaB2</i>	posible regulador transcripcional LysR
	-	atcaggaatctcatgg		4.87			
SAV4781 o SAV4782	+	tcagtgaattccccgaa	5825966	7.93	Dentro SAV4782 (cerca extremo 5')	-	proteína hipotética posible regulador transcripcional TetR
	-	ttcgggaattcactga		7.00			

SAV4793 o SAV4794 y SAV4795 y SAV4796	+	ctctggaatcccggag	5834560	10.64	Región intergénica SAV4793-SAV4794	-	proteína hipotética
	-	ctccgggattccagag		10.64		<i>hemL</i>	proteína hipotética posible 2,1-aminotransferasa glutamato-1-semialdehído posible mutasa fosfoglicerato
SAV4832 y SAV4833	+	cctgggaatccccaag	5874089	7.35	Dentro SAV4832 (cerca extremo 5')	-	proteína hipotética
	-	cttggggattcccagg		6.81		-	proteína hipotética
SAV4880 o SAV4881 y SAV4882-4	+	ctggggaaaaccccac	5934958	7.89	Región intergénica SAV4880-SAV4881	-	posible quinasa sensora sistema dos componentes
	-	gtgggggttttcccag		7.78		<i>nuoA2</i>	posible cadena A deshidrogenasa I NADH (complejo I)
SAV4890	+	acagggaaattcccga	5944236	5.69	Dentro SAV4890 (cerca región 5')	<i>nuoN2</i>	posible cadena N deshidrogenasa I NADH (complejo I)
	-	tcgggaatttcctgt		6.88			
SAV4924 o SAV4925	+	gtagggaaatccatat	5987009	12.08	Región intergénica SAV4924-SAV4925	-	posible proteína secretada
	-	atatggatttcctac		12.76		<i>rpsJ</i>	posible proteína ribosomal S10
SAV5011	+	atgaggatttcccggg	6068530	9.95	Región intergénica SAV5011-SAV5012	-	posible lipoproteína
	-	cccgggaaatcctcat		10.61			
SAV5076 y SAV5077	+	ctaggggaattccggc	6157213	10.57	Región intergénica SAV5075-SAV5076	-	proteína hipotética
	-	gccggaattcccctag		11.42		-	posible proteína integral membrana
SAV5123	+	ctgggggaacccccgg	6221175	7.51	Región intergénica SAV5122-SAV5123	<i>sig45</i>	posible factor sigma RNA polimerasa subfamilia ECF
	-	ccgggggttccccag		8.52			

SAV5361 y SAV5362	+	gtcggagaatccctca	6499693	5.02	Región intergénica SAV5360-SAV5361	<i>melC2-2</i>	posible proteína co-factor tirosinasa
	-	tgagggattctccgac		5.61		<i>melC1-2</i>	posible tirosinasa
SAV5530	+	ctcggacttttctcctgg	6698461	6.44	Dentro SAV5530 (centro)	-	probablemente de un genoma fágico
	-	ccaggaaaagtccgag		7.00			
SAV5587 y SAV5586-4 o SAV5588	+	atcggaatatccgtgg	6761240	8.34	Región intergénica SAV5587-SAV5588	-	posible proteína eflujo transmembrana
	-	ccacggatattccgat		8.49		-	posible proteína tipo-MmCQ posible proteína unión-DNA
SAV5715 y SAV5714	+	ctatggattttcagaa	6912936	7.93	Dentro SAV5715 (cerca extremo 5')	-	proteína hipotética posible acetiltransferasa-aminoglicosida N3
	-	ttctgaaaatccatag		7.67		<i>aac2</i>	
SAV5815	+	atagaactttccctac	7022589	3.56	Región intergénica SAV5815-SAV5816	<i>int15</i>	posible recombinasa/integrasa familia tirosina
	-	gtagggaaagtcttat		3.78			
SAV5882 y SAVm3	+	ctggggcattccctat	7092716	9.37	Dentro SAV5882 (cerca extremo 5')	-	posible proteína integral membrana
	-	atagggaaatgccccag		9.37		<i>rnpB</i>	posible componente RNA RNasa P
SAV5916	+	cccggggtatcccgaa	7129034	11.13	Dentro SAV5916 (cerca región 5')	-	posible oxidoreductasa
	-	ttcgggataccccggg		10.38			
SAV5963	+	atggggatatccctaa	7180195	10.33	Región intergénica SAV5963-SAV5964	-	proteína hipotética
	-	ttagggatatccccat		10.54			
SAV6012	+	ttctggaatacccgag	7240652	7.98	Región intergénica SAV6012-SAV6013	-	posible oxidoreductasa
	-	ctcgggtattccagaa		8.37			
SAV6090	+	ccaggggtattcccat	7327616	7.01	Dentro SAV6090 (cerca extremo 5')	-	proteína hipotética
	-	atgggaatacccctgg		6.98			

SAV6272	+	tcaaggaaacccccat	7527738	6.13	Dentro SAV6272 (cerca región 5')	-	posible proteína integral membrana
	-	atgggggtttccttga		6.55			
	+	gtagggatcttcatag	7527812	7.39			
	-	ctatgaagatccctac		8.42			
SAV6273	+	ctcgggctatcgccag	7530287	4.72	Dentro SAV6273 (cerca región 3')	<i>uvrB</i>	posible subunidad B excinucleasa ABC
	-	ctggcgatagcccag		4.90			
SAV6498 o SAV6499	+	ctggggaaaaccccac	7782852	7.89	Inside SAV6498 (cerca extremo 5')	-	posible proteína membrana posible proteína de recombinación y reparación DNA
	-	gtggggttttcccag		7.78			
SAV6526 o SAV6527	+	cttgggggatcccggg	7814086	5.42	Región intergénica SAV6526-SAV6527	-	proteína hipotética
	-	cccgggatccccaag		5.95			
	+	agagggaaatacatgt	7814109	1.93			
	-	acatgtatttccctct		2.74			
SAV6632 y SAV6631	+	ctggggattgcccgac	7932919	10.33	Dentro SAV6632 (cerca región 5')	-	putative metalopeptidasa proteína hipotética
	-	gtcgggcaatcccag		8.97			
SAV6669	+	acggggaatttccaag	7978657	6.01	Región intergénica SAV6668-SAV6669	<i>oppA9</i>	posible proteína de unión oligopéptido lipoproteínas
	-	cttggaaattcccgt		6.61			
SAV6802	+	cgcgggatattcctgg	8122009	7.78	Dentro SAV6802 (cerca extremo 5')	-	proteína hipotética
	-	ccaggaatatcccgcg		9.59			

SAVt32 o SAV6803 y SAV6804	+	ctagcggattcccggg	8122860	9.91	Región intergénica SAVt32-SAV6803	<i>trn32</i>	tRNA-Gly, codón reconocido: GGC
	-	cccgggaatccgctag		10.06		<i>pabB</i>	posible sintasa antranilato
SAV6805	+	cccgggacttcccgag	8125245	12.55	Dentro SAV6805 (centro)	-	posible aminotransferasa D-alanina
	-	ctcgggaagtcccggg		11.83		-	posible acetiltransferasa
SAV6982	+	ctcggggatcgcaag	8340556	5.51	Dentro SAV6982 (cerca región 5')	-	posible proteína reguladora familia MerR
	-	cttgcgataccccgag		5.69		-	posible proteína integral membrana
SAV7027 o SAV7028	+	ctctgggtatccctga	8387798	8.23	Región intergénica SAV7027-SAV7028	-	posible factor de elongación EF-Tu
	-	tcaggatacccagag		9.25		<i>tufA2</i>	posible proteína eflujo transmembrana
SAV7030	+	ctcggggatctctga	8390531	7.21	Dentro SAV7030 (cerca región 3')	-	posible regulador transcripcional AsnC
	-	tcaggagatccccgag		8.97		-	proteína sulfurtransferasa relacionada-rodanasa
SAV7057 o SV7058	+	gcaggggaatccccgg	8418675	9.98	Región intergénica SAV7057-SAV7058	-	posible proteína secretada
	-	ccggggattcccctgc		10.84		-	posible 5-desidro-2-desoxigluconoquinasa
SAV7121	+	cctgggaaatcttgag	8482018	8.19	Dentro SAV7121 (cerca región 5')	-	proteína unión sustrato-transportadora ABC mio-inositol
	-	ctcaagatttcccagg		5.16		-	proteína ABC unión sustrato-transportadora
SAV7150 o SAV7151	+	cgaggaatttcccgaa	8510674	9.41	Dentro SAV7150 (cerca extremo 5')	<i>iolC2</i>	proteína ABC unión sustrato-transportadora
	-	ttcgggaaattcctcg		7.13		<i>iolTA</i>	
SAV7210	+	ccagggatttctgag	8587466	16.02	Dentro SAV7209 (cerca extremo 3')	<i>glt3</i>	
	-	ctcaggaaatccctgg		13.81			

SAV7394	+	acggggaaatttcgag	8821455	5.87	Dentro SAV7394 (centro)	-	proteína hipotética
	-	ctcgaaatttccccgt		4.66			
SAV7458 o SAV7459	+	ccatgaaaatcccggg	8887673	10.61	Región intergénica SAV7458-SAV7459	-	proteína hipotética posible oxireductasa asociada membrana
	-	cccgggattttcatgg		9.84			

Tabla S1: Cuando el gen diana no se pudo deducir por la localización del sitio de unión al DNA, se incluyen ambas dianas posibles separadas por “o”. Cuando se prevé que esté más de un gen afectado, se indican ambos genes separados por “y”. Cuando se prevé que todo un operón esté afectado, se indican el primer y el último gen separados por “-“. Los operadores situados en las regiones codificantes a más de 300 bp de los codones de inicio o fin de un determinado gen, se dejan de denominar como “cerca extremo” y pasan a ser “cerca región”.

Anexo IV. Código en 'R' para el análisis estadístico de los datos de los *microarrays*

Preprocesamiento

Bibliotecas

```
library(limma)
setwd("V:/SavCSR/R")
library("genefilter")
library("vsn")
```

Carga de datos cuantificación

```
dianas <- readTargets("dianas.txt")
dianas
RG <- read.maimages(dianas$Nombrearchivo, source="agilent",
names=dianas$Muestra, columns=list(Gf="rMeanSignal", Rf="gMeanSignal",
Gb="rBGMedianSignal", Rb="gBGMedianSignal"),
other.columns=c("gIsPosAndSignif", "rIsPosAndSignif", "gBGPixSDev", "rBGPixSDev",
" , "gIsFeatNonUnifOL", "rIsFeatNonUnifOL", "gIsBGNonUnifOL", "rIsBGNonUnifOL"))
summary(RG)
251904/16
plotDensities(RG,arrays=c(1:16), col=c("green","red"))
```

Control de la calidad del fondo y con el gráfico MA

```
layout(matrix(1:2,1,2))
boxplot(data.frame(log2(RG$Gb)),main="Fondo Cy3",ylim=c(5,10),names=dianas$Nhib)
boxplot(data.frame(log2(RG$Rb)),main="Fondo Cy5",ylim=c(5,10),names=dianas$Nhib)

layout(matrix(1:16,4,4))
plotMA(RG,array=1,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=2,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=3,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=4,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=5,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=6,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=7,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=8,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=9,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=10,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=11,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=12,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=13,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=14,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=15,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=16,ylim=c(-10,10))
```

Identificación de los tipos de puntos

```
GeneName <- read.table("GeneNameCompletadoParaSAV.txt", header = TRUE, sep =
"\t")
summary(GeneName)
RG$genes$GeneName <- as.character(GeneName[,1])
summary(RG$genes$GeneName)
TiposPuntos <- readSpotTypes(file="TiposPuntos.txt")
```

TiposPuntos

```
RG$genes$Status <- controlStatus(TiposPuntos, RG)
sum(RG$genes$Status=="SAV")
sum(RG$genes$Status=="Control")
```

Control de calidad visual

```
range(RG$Rb)
range(RG$Gb)

imageplot3by2(RG, z="Rb", zlim=c(35,200))
imageplot3by2(RG, z="Gb", zlim=c(35,200))

plotMA3by2(RG)

plotFB(RG, array=1)
plotFB(RG, array=7)
plotFB(RG, array=16)
```

Corrección de fondo por sustracción con uso de valores sucedáneos

```
RG.fc <- backgroundCorrect(RG, method="subtract")
RG.fc.z <- RG.fc
for (x in 1:ncol(RG$R))
  RG.fc.z$R[(RG$other$gBGPixSDev[,x] > (RG$R[,x]-RG$Rb[,x])),x] <-
  RG$other$gBGPixSDev[(RG$other$gBGPixSDev[,x] > (RG$R[,x]-RG$Rb[,x])),x]
for (x in 1:ncol(RG$G))
  RG.fc.z$G[(RG$other$rBGPixSDev[,x] > (RG$G[,x]-RG$Gb[,x])),x] <-
  RG$other$rBGPixSDev[(RG$other$rBGPixSDev[,x] > (RG$G[,x]-RG$Gb[,x])),x]
  min(RG.fc.z$R)
  min(RG.fc.z$G)
RG.fc <- RG.fc.z
rm(RG.fc.z)
```

Eliminación de todos los puntos controles y que no sean de sondas homólogas antes de las normalizaciones

```
esSAV <- RG$genes$Status=="SAV"
summary(esSAV)
RG.fc <- RG.fc[esSAV,]
summary(RG)
summary(RG.fc)
125232/16
```

Inspección de las intensidades

```
layout(matrix(1:1,1,1))
plotDensities(RG.fc,arrays=c(1:16), col=c("green","red"))

layout(matrix(1:2,1,2))
boxplot(log2(RG.fc$R[,]),range=0, xlab="Hibridación",ylab="log2(Rf)", main="Canal verde",
col="darkgreen")
boxplot(log2(RG.fc$G[,]),range=0,xlab="Hibridación",ylab="log2(Gf)", main="Canal rojo",
col="darkred")

layout(matrix(1:2,1,2))
```

```

plotMA(RG,array=1,ylim=c(-10,10))
plotMA(RG,array=4,ylim=c(-10,10))

layout(matrix(1:4,2,2))
Quiénes <- RG$genes$Status=="SAV"
MAparaMA <- normalizeWithinArrays(RG, method="none", bc.method="subtract", weights=NULL)
Matriz <- c(1)
smoothScatter(MAparaMA$A[Quiénes,Matriz], MAparaMA$M[Quiénes,Matriz], xlab="A", ylab="M",
ylim=c(-10,10), xlim=c(5,17), cex=0.8)
abline(h=0, col="red")
Matriz <- c(2)
smoothScatter(MAparaMA$A[Quiénes,Matriz], MAparaMA$M[Quiénes,Matriz], xlab="A", ylab="M",
ylim=c(-10,10), xlim=c(5,17), cex=0.8)
abline(h=0, col="red")
Matriz <- c(3)
smoothScatter(MAparaMA$A[Quiénes,Matriz], MAparaMA$M[Quiénes,Matriz], xlab="A", ylab="M",
ylim=c(-10,10), xlim=c(5,17), cex=0.8)
abline(h=0, col="red")
Matriz <- c(4)
smoothScatter(MAparaMA$A[Quiénes,Matriz], MAparaMA$M[Quiénes,Matriz], xlab="A", ylab="M",
ylim=c(-10,10), xlim=c(5,17), cex=0.8)
abline(h=0, col="red")

```

Asignación de etiquetas por parámetros de calidad

```

summary(RG.fc$other)
sum(RG.fc$other$gIsPosAndSignif == 0)
RG.fc$other$gIsPosAndSignif[1:4,1:5]
RG.fc$other[[1]][1:4,1:5]
RG.fc$other$etiquetas <- RG.fc$other$gIsPosAndSignif
dim(RG.fc$other$etiquetas)
RG.fc$other$etiquetas[(RG.fc$other[[1]]+ RG.fc$other[[2]])==2 &
(RG.fc$other[[5]] + RG.fc$other[[6]] + RG.fc$other[[7]] +
RG.fc$other[[8]])==0] <- "A"
RG.fc$other$etiquetas[(RG.fc$other[[1]]+ RG.fc$other[[2]])==2 &
(RG.fc$other[[5]] + RG.fc$other[[6]] + RG.fc$other[[7]] +
RG.fc$other[[8]])==1] <- "B"
RG.fc$other$etiquetas[(RG.fc$other[[1]]+ RG.fc$other[[2]])==2 &
(RG.fc$other[[5]] + RG.fc$other[[6]] + RG.fc$other[[7]] +
RG.fc$other[[8]])>=2] <- "C"
RG.fc$other$etiquetas[RG.fc$other[[1]]==1 & RG.fc$other[[2]]==0] <- "D"
RG.fc$other$etiquetas[RG.fc$other[[1]]==0 & RG.fc$other[[2]]==1] <- "E"
RG.fc$other$etiquetas[RG.fc$other[[1]]==0 & RG.fc$other[[2]]==0] <- "F"
summary(RG.fc$other[[9]])

```

Normalizaciones con pesos simples para calcular varianza por etiqueta

Normalizaciones intramatriz

```

MA.m <- normalizeWithinArrays(RG.fc, method="median")
MA.0 <- normalizeWithinArrays(RG.fc, method="none")
MA.c1 <- normalizeCyclicLoess(MA.0$M, span=0.3, iterations = 3)
MA.0$M <- MA.c1
MA.c1 <- MA.0
rm(MA.0)
MA.c1m <- normalizeWithinArrays(MA.c1, method="median")

```

Comprobación del efecto de las normalizaciones

```

layout(matrix(1:2,1,2))
meansdPlot(MA.m)
meansdPlot(MA.clm)

layout(matrix(1:2,1,2))
plotDensities(MA.m, col=c("green","red"))
plotDensities(MA.clm, col=c("green","red"))

layout(matrix(1:2,1,2))
boxplot(MA.m$M~col(MA.m$M), names=c(1:16), ylim=c(-6,6) , main="MA.m", col="forestgreen")
boxplot(MA.clm$M~col(MA.clm$M), names=c(1:16), ylim=c(-6,6) , main="MA.clm",
col="forestgreen")

layout(matrix(1:4,2,2))
plot(MA.m$M[,1], MA.m$M[,2],col="darkgreen")
abline(a=0, b=1,col="gray50")
plot(MA.m$M[,4], MA.m$M[,5],col="darkgreen")
abline(a=0, b=1,col="gray50")
plot(MA.clm$M[,1], MA.clm$M[,2],col="darkgreen")
abline(a=0, b=1,col="gray50")
plot(MA.clm$M[,4], MA.clm$M[,5],col="darkgreen")
abline(a=0, b=1,col="gray50")

layout(matrix(1:4,2,2))
MAparaDiaG <- MA.m
Quiénes <- grep("SAV",MAparaDiaG$genes$Status)
Matriz1 <- c(1)
Matriz2 <- c(2)
smoothScatter(MAparaDiaG$M[Quiénes,Matriz1], MAparaDiaG$M[Quiénes,Matriz2], xlab=
colnames(MAparaDiaG$M)[Matriz1], ylab= colnames(MAparaDiaG$M)[Matriz2], ylim=c(-6,10),
xlim=c(-6,10), cex=0.8)
abline(a=0, b=1,col="gray50")
Matriz1 <- c(4)
Matriz2 <- c(5)
smoothScatter(MAparaDiaG$M[Quiénes,Matriz1], MAparaDiaG$M[Quiénes,Matriz2], xlab=
colnames(MAparaDiaG$M)[Matriz1], ylab= colnames(MAparaDiaG$M)[Matriz2], ylim=c(-6,10),
xlim=c(-6,10), cex=0.8)
abline(a=0, b=1,col="gray50")
MAparaDiaG <- MA.clm
Matriz1 <- c(1)
Matriz2 <- c(2)

smoothScatter(MAparaDiaG$M[Quiénes,Matriz1], MAparaDiaG$M[Quiénes,Matriz2], xlab=
colnames(MAparaDiaG$M)[Matriz1], ylab= colnames(MAparaDiaG$M)[Matriz2], ylim=c(-6,10),
xlim=c(-6,10), cex=0.8)
abline(a=0, b=1,col="gray50")
Matriz1 <- c(4)
Matriz2 <- c(5)

smoothScatter(MAparaDiaG$M[Quiénes,Matriz1], MAparaDiaG$M[Quiénes,Matriz2], xlab=
colnames(MAparaDiaG$M)[Matriz1], ylab= colnames(MAparaDiaG$M)[Matriz2], ylim=c(-6,10),
xlim=c(-6,10), cex=0.8)
abline(a=0, b=1,col="gray50")

rm(MAparaDiaG)
rm(MAparaMA)
rm(Matriz1, Matriz2,Matriz)

```

Modelo lineal para la estimación de pesos de punto

```

diseño <- modelMatrix(dianas, ref="ADNg")
diseño
ajustel.clm <- lmFit(MA.clm, diseño)

```

```

Resid.clm <- matrix(nrow=dim(MA.clm$M)[1], ncol=dim(MA.clm$M)[2],
dimnames=dimnames(MA.clm$M))
residuals(ajuste1.clm, MA.clm) -> Resid.clm
Desvest.clm <- matrix(nrow=dim(ajuste1.clm$stdev.unscaled)[1], ncol=
dim(ajuste1.clm$stdev.unscaled)[2],
dimnames=dimnames(ajuste1.clm$stdev.unscaled))
Desvest.clm <- ajuste1.clm$stdev.unscaled * ajuste1.clm$sigma
  boxplot(Desvest.clm~col(Desvest.clm))
ResidE.clm <- Resid.clm
head(Desvest.clm)
for (y in 1:4) { for (x in 1:3)
ResidE.clm[,3*y+x-3] <- (Resid.clm[,3*y+x-3] /Desvest.clm [,y])}
for (y in 5:5) { for (x in 1:2)
ResidE.clm[,3*y+x-3] <- (Resid.clm[,3*y+x-3] /Desvest.clm [,y])}
for (y in 6:6) { for (x in 1:2)
ResidE.clm[,3*y+x-4] <- (Resid.clm[,3*y+x-4] /Desvest.clm [,y])}
  ResidE.clm[1:4,]
  dim(ResidE.clm)
  head(ResidE.clm)

matrix(ResidE.clm[,],ncol=1, nrow= length(ResidE.clm[,])) -> ResidEi.clm
matrix(RG.fc$other$set[,],ncol=1, nrow= length(RG.fc$other$set[,])) ->
EtiqueEi.clm
ResidEi2.clm <- ResidEi.clm
ResidEi2.clm <- ResidEi.clm^2
  summary(EtiqueEi.clm)
Varianza <- tapply(ResidEi2.clm, EtiqueEi.clm,mean)
  Varianza
Varianza <- as.data.frame(Varianza)
  Varianza
PesosEstimados.clm <- (1/Varianza)/(1/min(Varianza))
  PesosEstimados.clm

```

Asignación de pesos por punto en le objeto RGp.fc

```

summary(RG.fc)
RGp.fc <- RG.fc
RGp.fc$weights <- RGp.fc$R
for (z in c("A","B","C","D","E","F")) {for (y in 1:dim(RGp.fc$R)[2])
RGp.fc$weights[RGp.fc$other$set[,y]==z,y] <-
as.numeric(PesosEstimados.clm[as.character(z),1])}

```

Normalización clm con pesos estimados para los resultados finales

Normalización intramatriz, promediado de las hibridaciones que son réplicas técnicas y normalización intermatriz, todo con pesos estimados

```

MAp.m <- normalizeWithinArrays(RGp.fc, method="median", weights =
RGp.fc$weights)
MAp.mcl <- normalizeCyclicLoess(MAp.m$M, weights = MAp.m$weights, span=0.3,
iterations = 3)
MAp.m$M <- MAp.mcl
MAp.mcl <- MAp.m
rm(MAp.m)

```

Comprobación del efecto de las normalizaciones con pesos estimados

```
layout(matrix(1:2,1,2))
meansdPlot(MA.c1m)
meansdPlot(MAp.mcl)
```

Promediado para genes con múltiples sondas de expresión

Promediado de los objetos MA

```
MA.z <- MAp.mcl
MA.z <- avereps(MA.z, ID=MA.z$genes$GeneName)
MA.z -> MAP.mcl
rm(MA.z)
summary(MAP.mcl)
121984 /16
length(unique(MAp.mcl$genes$SystematicName[]))
length(unique(MAP.mcl$genes$SystematicName[]))
```

Modelos lineales y resultados estadísticos

Matriz de contraste

```
matcon <- makeContrasts(CS_t2-CS_t1,MUF_t1-CS_t1,MUF_t2-CS_t2,MUR_t1-
CS_t1,MUR_t2-CS_t2,MUF_t2-MUF_t1,MUR_t2-MUR_t1,(MUF_t2-MUF_t1)-(CS_t2-
CS_t1),(MUR_t2-MUR_t1)-(CS_t2-CS_t1),levels=diseño)
matcon
```

Resultados con normalización loess cíclico y mediana

```
MA.z <- MAP.mcl
ajuste <- lmFit(MA.z, diseño, weights = MA.z$weights)
ajuste <- eBayes(ajuste)
ajusteC <- contrasts.fit(ajuste, matcon)
ajusteC <- eBayes(ajusteC)
RES.BH <-decideTests(ajusteC, method="separate", adjust.method="BH",
p.value=0.05, lfc=0)
RES.BH -> RES.BH.mcl
ajuste -> ajuste.mcl
ajusteC -> ajusteC.mcl
rm(ajuste)
rm(ajusteC)
rm(RES.BH)
summary(RES.BH.mcl)
```

Exploración de los resultados

```
layout(matrix(1:2,1,2))
ylim <- c(-5,5)
xlim <- c(7,18)
contraste <- 1
ajusteC.z <-ajusteC.mcl
cuántos <- 7308
```

```

plotMA(ajusteC.z,array=contraste, ylim=yylim, xlim=xlim, cex=0.8)
abline(0,0,col="blue")
plotMA(ajusteC.z,array=contraste, ylim=yylim, xlim=xlim, cex=0.8)
abline(0,0,col="blue")
Primeros <- order(ajusteC.z$lods[,contraste],decreasing=FALSE)[1:cuántos]
text(ajusteC.z$Amean[Primeros],
ajusteC.z$coef[Primeros,contraste],labels=".",cex=1.8,col="darkgrey")
rm(Primeros)
rm(contraste)
rm(cuántos)

layout(matrix(1:2,1,2))
ylim <- c(-5,5)
xlim <- c(7,18)
contraste <- 3
ajusteC.z <- ajusteC.mcl
cuántos <- 7512
plotMA(ajusteC.z,array=contraste, ylim=yylim, xlim=xlim, cex=0.8)
abline(0,0,col="blue")
plotMA(ajusteC.z,array=contraste, ylim=yylim, xlim=xlim, cex=0.8)
abline(0,0,col="blue")
Primeros <- order(ajusteC.z$lods[,contraste],decreasing=FALSE)[1:cuántos]
text(ajusteC.z$Amean[Primeros],
ajusteC.z$coef[Primeros,contraste],labels=".",cex=1.8,col="darkgrey")
rm(Primeros)
rm(contraste)
rm(cuántos)

```

Número total de GES

```
dim(RES.BH.mcl[apply(abs(as.matrix(RES.BH.mcl[, ])),1,sum)>0,])
```

Exportación de los resultados del análisis

Exportación los resultados de limma a Excel

```

ajuste.z <- ajuste.mcl
MA.z <- MAP.mcl
Mg <- ajuste.z$coef
decimales <- 4
row.names(Mg) <- NULL
dt <- as.data.frame(ajuste.z$coef)
row.names(dt) <- NULL
for (i in 1:ncol(dt))

dt[,i] <- apply(MA.z$M[,grep(colnames(ajuste.z$coef)[i], colnames(MA.z$M))],
1,sd)
paste("dt",colnames(ajuste.z$coef),sep=".") -> colnames(dt)
paste("Mg",colnames(Mg),sep=".") -> colnames(Mg)
round(Mg,decimales) -> Mg
round(dt,decimales) -> dt
Juntos <- cbind(MA.z$genes[,c(5,8)],Mg,dt)
boxplot(as.matrix(dt)~col(dt),main="desviaciones típicas de valores Mg", col="skyblue")

Juntos -> Mg.dt
rm(ajuste.z,MA.z,Mg,Juntos)
Mg.dt[1:2,]
dim(Mg.dt)

```

```
dim(ajusteC.mcl)
```

Exportación de los resultados de valores Mg

```
write.table(Mg.dt, "ResExp_VALORES  
Mg_SavCSR.mcl_V1.0_8D12.txt", sep="\t", quote=FALSE, row.names=FALSE)
```

Exportación de los resultados de los contrastes

```
write.fit(ajusteC.mcl, results=NULL,  
"ResExp_Contrastes_SavCSR.mcl_V1.0_8D12.txt", digits=3, adjust="BH",  
method="separate")
```

Fin del análisis en R

```
save.image("V:\\SavCSR\\R\\Análisis SavCSR _1.0_8D12.RData")
```

Anexo V. Tablas de genes cuya expresión es estadísticamente diferente

Tabla S1. Lista de genes del procesamiento de la información genética, metabolismo de aminoácidos y procesamiento de proteínas diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR).

	Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUF vs WT – t1					
SAV2723	<i>rocA</i>	Deshidrogenasa de Δ -1-pirrolina-5-carboxilato	-1,83	0,0219	0,0005
SAV2724	<i>putA</i>	deshidrogenasa de prolina	-1,41	0,0095	0,0002
SAV2795	<i>zmp4</i>	metaloproteasa de zinc neutra, secretada	-1,04	0,0473	0,0014
SAV4551		aminotransferasa	-1,89	0,0166	0,0004
SAV4561	<i>sig40</i>	factor sigma subfamilia-ECF de RNA polimerasas	-0,81	0,1009	0,0045
SAV7112	<i>rocD2</i>	aminotransferasa de ornitina	-1,59	0,0212	0,0005
SAV213	<i>sig60</i>	factor sigma subfamilia-ECF de RNA polimerasas	1,78	0,0135	0,0003
SAV321	<i>prpB1</i>	fosfatasa dependiente-magnesio o manganeso	1,58	0,0054	0,0001
SAV703		acetiltransferasa	1,27	0,0022	0,0000
SAV898	<i>sig10</i>	factor sigma subfamilia-ECF de RNA polimerasas	2,54	0,0007	0,0000
SAV993		transferasa de cisteína	1,64	0,0077	0,0001
SAV997	<i>sig13</i>	factor sigma subfamilia-ECF de RNA polimerasas	1,42	0,0071	0,0001
SAV1061		aminotransferasa	2,74	0,0002	0,0000
SAV1986	<i>paaI</i>	proteína degradación de ácido fenilacético	1,40	0,0031	0,0000
SAV2718	<i>leuB</i>	3-isopropilmalato deshidrogenasa	2,23	0,0252	0,0006
SAV4891	<i>htpX1</i>	proteasa de proteínas <i>heat shock</i>	2,50	0,0064	0,0001
MUR vs WT – t1					
SAV703		acetiltransferasa	1,09	0,0180	0,0002
SAV741	<i>sig8</i>	factor sigma	2,55	0,0024	0,0000
SAV898	<i>sig10</i>	factor sigma subfamilia-ECF de RNA polimerasas	2,01	0,0124	0,0001
SAV954	<i>yerD1</i>	glutamato sintasa	1,88	0,0204	0,0002

Tabla S1. Lista de genes del procesamiento de la información genética, metabolismo de aminoácidos y procesamiento de proteínas diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR) - continuación.

	Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
SAV1061		aminotransferasa	2,14	0,0025	0,0000
MUF vs WT – t2					
SAV2675	<i>rpmB1</i>	proteína ribosomal L28	-1,17	0,0397	0,0005
SAV3016	<i>nblE</i>	factor transcripcional tipo-WhiB	-1,12	0,0451	0,0006
SAV3888	<i>sig32</i>	factor sigma subfamilia-ECF de RNA polimerasas	-3,61	0,0010	0,0000
SAV4561	<i>sig40</i>	factor sigma subfamilia-ECF de RNA polimerasas	-0,75	0,1641	0,0074
SAV898	<i>sig10</i>	factor sigma subfamilia-ECF de RNA polimerasas	1,61	0,0283	0,0003
SAV1061		aminotransferasa	1,67	0,0087	0,0000
MUR vs WT – t2					
SAV3888	<i>sig32</i>	factor sigma subfamilia-ECF de RNA polimerasas	-3,32	0,0056	0,0000
SAV4920	<i>tufA1</i>	factor de elongación EF-Tu	-1,97	0,0152	0,0000
SAV6925	<i>rpbA</i>	proteína unión a RNA polimerasas	-1,16	0,0398	0,0002
SAV692	<i>hsp18_2</i>	proteína <i>heat shock</i>	1,38	0,0152	0,0006
SAV898	<i>sig10</i>	factor sigma subfamilia-ECF de RNA polimerasas	1,89	0,0398	0,0002
SAV1061		aminotransferasa	1,73	0,0246	0,0001

Tabla S2. Lista de genes de la replicación, recombinación y reparación del DNA diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR).

Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUF vs WT – t1				
SAV47	posible transposasa tipo-IS1136A familia IS605	1,75	0,0135	0,0003
SAV61	transposasa tipo-I1136A0 familia IS605	1,71	0,0145	0,0003
SAV120	transposasa tipo-ISRhosp2 familia IS701	1,25	0,0293	0,0007
SAV288	transposasa tipo-ISMac13 familia IS630	1,34	0,0082	0,0001
SAV757	transposasa tipo-IS885 familia IS630	1,45	0,0137	0,0002
SAV821	transposasa tipo-ISFsp4 familia IS200/IS605	1,60	0,0003	0,0000
SAV879	<i>ku2</i> proteína Ku70/Ku80	1,01	0,0135	0,0003
SAV3463	<i>uvrD1</i> helicasa de DNA dependiente de ATP	0,77	0,0312	0,0008
MUR vs WT – t1				
SAV289	transposasa tipo-ISAzvi8 familia IS701	1,78	0,0025	0,0000
SAV821	transposasa tipo-ISFsp4 familia IS200/IS605	1,77	0,0006	0,0000
SAV1606	proteína tipo-endonucleasa III	1,30	0,047	0,0007
MUF vs WT – t2				
SAV4626	<i>int12</i> recombinasa/integrasa familia tirosina	-1,51	0,0125	0,0001
SAV288	transposasa tipo-ISMac13 familia IS630	1,17	0,0358	0,0004
SAV289	transposasa tipo-ISAzvi8 familia IS701	1,43	0,0078	0,0001
SAV757	transposasa tipo-IS885 familia IS630	1,51	0,016	0,0001
MUR vs WT – t2				
SAV289	transposasa tipo-ISAzvi8 familia IS701	1,36	0,0398	0,0002

Tabla S3. Lista de genes del metabolismo de carbohidratos diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR).

	Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUF vs WT – t1					
SAV1082	<i>agaB1</i>	α -galactosidasa	-2,91	0,0000	0,0000
SAV2060		desacetilasa de polisacáridos secretada	-1,06	0,0116	0,0002
SAV6534		glicosiltransferasa	-1,30	0,0126	0,0002
SAV649	<i>ard</i>	fosfotransferasa	1,47	0,0087	0,0000
SAV803	<i>pgmA</i>	fosfoglucomutasa	1,67	0,0155	0,0003
SAV1009		glicosiltransferasa	1,55	0,0067	0,0001
SAV1011	<i>galE5</i>	UDP-glucosa 4-epimerasa	1,94	0,0027	0,0000
SAV1013	<i>mpg2</i>	manosa-1-fosfato guaniltransferasa	1,99	0,0101	0,0002
SAV1014		NDP-hexosa4-cetoreductasa	1,47	0,0077	0,0001
SAV1911	<i>ccrA2</i>	reductasa de crotonil-CoA	1,32	0,0040	0,0000
SAV1912	<i>meaA1</i>	metilmalonil-CoA mutasa, subunidad α dependiente de coenzima B12	1,93	0,0003	0,0000
SAV1913	<i>citE</i>	cadena β liasa de citrato	1,37	0,0016	0,0000
SAV3859	<i>citA2</i>	sintasa de citrato	1,38	0,0144	0,0003
MUR vs WT – t1					
SAV1082	<i>agaB1</i>	α -galactosidasa	-2,71	0,0002	0,0000
SAV5977	<i>malE</i>	proteína de unión a maltosa	-1,42	0,0308	0,0004
SAV1009		glicosiltransferasa	1,41	0,039	0,0006
SAV1011	<i>galE5</i>	4-epimerasa UDP-glucosa	2,93	0,0006	0,0000
SAV1013	<i>mpg2</i>	manosa-1-fosfato guaniltransferasa	2,69	0,0048	0,0000
SAV1014		NDP-glucosa4-cetoreductasa	2,19	0,0020	0,0000
SAV1766	<i>tkt1</i>	transcetolasa	1,33	0,0112	0,0001
MUF vs WT – t2					
SAV1082	<i>agaB1</i>	α -galactosidasa	-1,26	0,0180	0,0001
SAV3866	<i>accA2</i>	acetil/propionil CoA carboxilasa, subunidad α	1,05	0,0138	0,0001

Tabla S3. Lista de genes del metabolismo de carbohidratos diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR) – continuación.

	Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUR vs WT – t2					
SAV1082	<i>agaB1</i>	α -galactosidasa	-1,69	0,0134	0,0000

Tabla S4. Lista de genes del metabolismo de lípidos diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR).

	Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUF vs WT – t1					
SAV2944	<i>fabB2</i>	3-oxoacil-ACP sintasa II	-0,84	0,3338	0,0410
SAV217	<i>fabC4</i>	ACP	1,68	0,0011	0,0000
SAV492	<i>echA1</i>	enoi-CoA hidratasa	1,17	0,0474	0,0014
SAV1485	<i>plsC1</i>	1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa	0,88	0,3542	0,0471
SAV1912	<i>meaA1</i>	metilmalonil-CoA mutasa, subunidad α dependiente de coenzima B12	1,93	0,0003	0,0000
SAV4208	<i>ltp3</i>	proteína de transferencia no específica de lípidos	1,16	0,0092	0,0001
SAV4210	<i>fadE28</i>	deshidrogenasa de acil-CoA	1,60	0,0035	0,0000
MUR vs WT – t1					
SAV217	<i>fabC4</i>	ACP	1,61	0,0048	0,0000
MUF vs WT – t2					
SAV217	<i>fabC4</i>	ACP	1,50	0,0048	0,0000
SAV1485	<i>plsC1</i>	1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa	0,89	0,3609	0,0463
SAV3866	<i>accA2</i>	acetil/propionil CoA carboxilasa, subunidad α	1,05	0,0138	0,0001
MUR vs WT – t2					
SAV7026	<i>fadA6</i>	3-cetoacil-CoA acetiltransferasa/tiolasa	-0,88	0,0398	0,0002
SAV217	<i>fabC4</i>	ACP	1,30	0,0398	0,0002

Tabla S5. Lista de genes del metabolismo de nucleótidos y del metabolismo de vitaminas y cofactores diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR).

	Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUF vs WT – t1					
SAV5915	<i>phoA</i>	fosfatasa alcalina, secretada	-2,39	0,0013	0,0000
SAV6215	<i>cpdB</i>	2',3'-nucleótico-cíclico-2'-fosfodiesterasa, secretada	-1,57	0,0341	0,0009
SAV6407	<i>cobJ</i>	posible metilasa de cobalamina	-1,03	0,0166	0,0004
SAV6413	<i>cobA</i>	posible adenosiltransferasa de cobalamina	-0,61	0,0336	0,0008
SAV803	<i>pgmA</i>	fosfoglucomutasa	1,67	0,0155	0,0003
SAV3445	<i>purN</i>	formiltransferasa de fosforibosilglicinamida	1,29	0,0005	0,0000
SAV4139	<i>purQ</i>	sintasa I de fosforibosil formilglicinamida	0,85	0,0313	0,0008
SAV4265	<i>thiC</i>	proteína de biosíntesis de tiamina	1,60	0,0018	0,0000
MUR vs WT – t1					
SAV404	<i>pntA</i>	transhidrogenasa de nucleótidos de piridina, subunidad α	1,12	0,0291	0,0004
SAV1766	<i>tkt1</i>	transcetolasa	1,32	0,0119	0,0001
SAV3434	<i>gbsA2</i>	glicina betaína aldehído deshidrogenasa	1,57	0,0453	0,0007
SAV6177	<i>trpB</i>	sintasa de triptófano, subunidad β	1,00	0,0415	0,0006
MUF vs WT – t2					
SAV3866	<i>accA2</i>	acetil/propionil CoA carboxilasa, subunidad α	1,05	0,0138	0,0001
MUR vs WT – t2					
SAV7026	<i>fadA6</i>	3-cetoacil-CoA acetiltransferasa/tiolasa	-0,88	0,0398	0,0002

Tabla S6. Lista de genes del metabolismo de energía diferencialmente expresados en las cepas mutantes ΔpteF (MUF) y ΔpteR (MUR).

	Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUF vs WT – t1					
SAV4846	<i>nuoJ1</i>	NADH deshidrogenasa cadena J (complejo I)	-1,71	0,0434	0,0012
SAV4847	<i>nuoK1</i>	NADH deshidrogenasa cadena K (complejo I)	-1,67	0,0100	0,0002
MUR vs WT – t1					
SAV4847	<i>nuoK1</i>	NADH deshidrogenasa cadena K (complejo I)	-2,01	0,0118	0,0001
MUF vs WT – t2					
SAV2885	<i>atpF</i>	ATPasa tipo-F	-1,37	0,0110	0,0001
MUR vs WT – t2					
SAV2885	<i>atpF</i>	ATPasa tipo-F	-1,49	0,0246	0,0001

Tabla S7. L Lista de genes relacionados con el transporte y procesamiento de información de señales externas, diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR).

Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUF vs WT – t1				
SAV2246	proteína unión a sustrato transportador ABC de azúcares simples	-1,10	0,0155	0,0003
SAV2247	proteína unión a sustrato transportador ABC de azúcares simples	-1,64	0,0327	0,0009
SAV2609	proteína unión a sustrato transportador ABC	-1,20	0,0229	0,0005
SAV3618	transportador transmembrana	-1,12	0,0314	0,0008
SAV5915	<i>phoA</i> fosfatasa alcalina, secretada	-2,39	0,0013	0,0000
SAV5971	<i>phoC</i> fosfatasa ácida, secretada	-2,63	0,0353	0,0009
SAV600	<i>fecC1</i> transportador ABC hierro(III)/proteína unión-ATP sistema transporte sideróforo	2,40	0,0003	0,0000
SAV602	<i>fecB</i> transportador ABC hierro(III)/proteína unión sideróforo	2,95	0,0006	0,0000
SAV610	transportador MFS	1,19	0,0165	0,0004
SAV694	permeasa transportadora ABC	2,18	0,0027	0,0000
SAV695	proteína unión-ATP transportador ABC	1,79	0,0224	0,0005
MUR vs WT – t1				
SAV6308	<i>aglE</i> proteína unión a sustrato transportador ABC de múltiples azúcares	-1,87	0,0290	0,0004
SAV6713	proteína interacción sideróforo	-2,10	0,0014	0,0000
SAV600	<i>fecC1</i> transportador ABC hierro(III)/proteína unión-ATP sistema transporte sideróforo	2,69	0,0006	0,0000
SAV602	<i>fecB</i> transportador ABC hierro(III)/proteína unión-sideróforo	3,31	0,0010	0,0000
MUF vs WT – t2				
SAV1804	proteína unión a sustrato transportador ABC de múltiples azúcares	-1,00	0,0486	0,0007
SAV602	<i>fecB</i> transportador ABC hierro(III)/proteína unión-sideróforo	2,24	0,0094	0,0001
SAV610	transportador MFS	1,43	0,0122	0,0001
SAV2534	proteasa de serinas secretada	1,07	0,0297	0,0003

Tabla S7. Lista de genes relacionados con el transporte y procesamiento de información de señales externas, diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR) – continuación.

	Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUR vs WT – t2					
SAV5611	<i>oppA7</i>	proteína unión a sustrato transportador ABC	-1,79	0,0048	0,0000
SAV600	<i>fecC1</i>	transportador ABC hierro(III)/proteína unión-ATP sistema transporte sideróforo	1,52	0,0453	0,0003
SAV602	<i>fecB</i>	transportador ABC hierro(III)/proteína unión-sideróforo	3,50	0,0019	0,0000
SAV610		transportador MFS	1,45	0,0398	0,0002

Tabla S8. Lista de genes de regulación diferencialmente expresados en las cepas mutantes Δ *pteF* (MUF) y Δ *pteR* (MUR). El metabolito correspondiente se indica entre paréntesis.

Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUF vs WT – t1				
SAV1081	regulador transcripcional ROK	-1,86	0,0035	0,0000
SAV2268	<i>avaL2</i> regulador transcripcional TetR (γ -butirolactona?)	-3,15	0,0078	0,0001
SAV2270	<i>avaL1</i> regulador transcripcional TetR (γ -butirolactona?)	-2,68	0,0035	0,0000
SAV2301	posible proteína reguladora	-3,93	0,0252	0,0006
SAV2404	<i>cutS</i> quinasa sensora, sistema dos componentes	-1,09	0,0487	0,0000
SAV2901	<i>olmRII</i> regulador transcripcional LuxR (oligomicina)	-1,47	0,0712	0,0026
SAV2902	<i>olmRI</i> regulador transcripcional LuxR (oligomicina)	-1,56	0,0006	0,0000
SAV2989	<i>ptIR</i> regulador transcripcional MarR (neopentalenocetolactona)	-1,06	0,0487	0,0015
SAV4398	posible proteína reguladora	-1,99	0,0396	0,0011
SAV4903	regulador transcripcional TetR	-1,41	0,0095	0,0002
SAV218	posible regulador transcripcional	1,11	0,0396	0,0011
SAV244	regulador transcripcional MerR	2,68	0,0029	0,0000
SAV323	regulador transcripcional MerR	1,98	0,0028	0,0000
SAV343	posible proteína reguladora	1,61	0,0148	0,0003
SAV410	<i>pteR</i> regulador transcripcional SARP-LAL (filipina)	2,18	0,0027	0,0000
SAV448	regulador transcripcional TetR	1,12	0,0126	0,0002
SAV513	<i>bdpJ</i> regulador transcripcional AraC	1,45	0,0137	0,0003
SAV576	regulador transcripcional TetR	2,08	0,0014	0,0000
SAV678	posible regulador transcripcional	1,56	0,0045	0,0001
SAV705	regulador transcripcional TetR	1,16	0,0145	0,0003
SAV742	regulador transcripcional AraC	1,07	0,0443	0,0012
SAV831	regulador transcripcional LacI	1,21	0,0035	0,0000
SAV935	<i>aveR</i> regulador transcripcional LuxR (avermectina)	2,00	0,0049	0,0001
SAV980	regulador transcripcional GntR	1,00	0,0116	0,0000
SAV5755	posible proteína reguladora	1,62	0,0280	0,0007
SAV6982	regulador transcripcional MerR	0,59	0,1726	0,0110

Tabla S8. Lista de genes de regulación diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR) – continuación.

Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUR vs WT – t1				
SAV1081	regulador transcripcional ROK	-1,71	0,0214	0,0002
SAV2404	<i>cntS</i> quinasa sensora, sistema dos componentes	-0,87	0,047	0,0007
SAV5755	posible proteína reguladora	-2,21	0,0148	0,0001
SAV576	regulador transcripcional TetR	1,61	0,0221	0,0003
SAV831	regulador transcripcional LacI	1,28	0,0095	0,0001
MUF vs WT – t2				
SAV3705	<i>avaR1</i> posible receptor γ -butirolactona (γ -butirolactona?)	-0,92	0,1344	0,0043
SAV4130	<i>bldC</i> regulador transcripcional MerR	-1,88	0,0279	0,0002
SAV218	posible regulador transcripcional	1,22	0,0386	0,0005
SAV244	regulador transcripcional MerR	2,58	0,0079	0,0000
SAV323	regulador transcripcional MerR	1,85	0,0093	0,0000
SAV410	<i>pteR</i> regulador transcripcional SARP-LAL (filipina)	1,44	0,0266	0,0002
SAV576	regulador transcripcional TetR	1,31	0,0436	0,0006
SAV678	posible regulador transcripcional	1,26	0,0343	0,0004
SAV3850	posible regulador transcripcional	1,41	0,0094	0,0000
SAV5755	posible proteína reguladora	1,83	0,0279	0,0002
MUR vs WT – t2				
SAV5755	posible proteína reguladora	-2,73	0,0022	0,0000

Tabla S9. Lista de genes para la biosíntesis de la envuelta celular y diferenciación morfológica diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR).

Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUF vs WT – t1				
SAV2505	proteína de unión a DNA	-0,89	0,0129	0,0002
SAV7486	<i>sti2</i> inhibidor de subtilisina, secretado	-1,09	0,0298	0,0007
SAV617	<i>ctpB</i> ATPasa tipo-P transportador de cationes	1,78	0,0009	0,0000
SAV2754	<i>ampD1</i> N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa	1,38	0,0095	0,0002
SAV5456	<i>mreC</i> posible proteína determinante de forma cilíndrica	0,93	0,0443	0,0012
SAV6937	<i>kjpA</i> antagonista de KipI	2,57	0,0022	0,0000
SAV6938	<i>kjpI</i> inhibidor de KinA	1,51	0,0593	0,0020
MUR vs WT – t1				
SAV2505	proteína de unión a DNA	-1,12	0,0116	0,0001
SAV617	<i>ctpB</i> ATPasa tipo-P transportador de cationes	1,51	0,0109	0,0001
SAV741	<i>sig8</i> factor sigma	2,55	0,0024	0,0000
SAV1766	<i>tkt1</i> transcetolasa	1,33	0,0112	0,0001
SAV4267	<i>ssgA</i> proteína división celular, específica de la esporulación	2,18	0,0011	0,0000
MUF vs WT – t2				
SAV2505	proteína unión-DNA	-0,83	0,0375	0,0004
SAV3016	<i>mbIE</i> regulador transcripcional familia WhiB	-1,12	0,0451	0,0006
SAV4130	<i>bldC</i> regulador transcripcional MerR	-1,88	0,0279	0,0002
SAV7486	<i>sti2</i> inhibidor de subtilisina, secretado	-1,74	0,0039	0,0000
SAV617	<i>ctpB</i> ATPasa tipo-P transportador de cationes	1,87	0,0017	0,0000
MUR vs WT – t2				
SAV5803	<i>terD3</i> proteína resistencia telurio	-1,66	0,0152	0,0000
SAV7486	<i>sti2</i> inhibidor de subtilisina, secretado	-1,74	0,0147	0,0000
SAV617	<i>ctpB</i> ATPasa tipo-P transportador de cationes	1,93	0,0048	0,0000
SAV4267	<i>ssgA</i> proteína división celular, específica de la esporulación	2,86	0,0004	0,0000

Tabla S10. Lista de genes para la biosíntesis de metabolitos secundarios diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR). Cuando es conocido, se indica el metabolito relacionado con la función entre paréntesis.

	Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUF vs WT – t1					
SAV412	<i>pteD</i>	citocromo P450 monooxigenasa (filipina)	-2,74	0,0005	0,0000
SAV413	<i>pteC</i>	citocromo P450 monooxigenasa (filipina)	-2,33	0,0016	0,0000
SAV414	<i>pteB</i>	deshidrogenasa (filipina)	-2,34	0,0004	0,0000
SAV416	<i>pteA4</i>	policétido sintasa tipo I (filipina)	-1,28	0,0095	0,0002
SAV2266	<i>avaC</i>	fosfatasa (γ -butirolactona?)	-0,98	0,0794	0,0030
SAV2267	<i>avaB</i>	oxidoreductasa (γ -butirolactona?)	-1,20	0,2777	0,0279
SAV2269	<i>avaA</i>	proteína de biosíntesis γ -butirolactona (γ -butirolactona?)	-1,59	0,1456	0,0083
SAV2273		isomerasa (pks3)	-7,24	0,0208	0,0005
SAV2274		proteína secretada (pks3)	-5,02	0,0473	0,0014
SAV2276	<i>fabH7</i>	3-oxoacil-ACP sintasa III (pks3)	-4,24	0,1242	0,0063
SAV2277		tioesterasa (pks3)	-3,62	0,2222	0,0183
SAV2278		deshidrogenasa dependiente-F420 (pks3)	-3,52	0,3037	0,0327
SAV2279		sintetasa acil-CoA (pks3)	-2,97	0,3522	0,0462
SAV2285	<i>rocD3</i>	aminotransferasa ornitina (pks3)	-3,27	0,3205	0,0377
SAV2290	<i>fabH3</i>	3-oxoacil-ACP sintasa III (pks3)	-3,30	0,3281	0,0397
SAV2724	<i>putA</i>	deshidrogenasa prolina	-1,41	0,0095	0,0002
SAV2894	<i>olmB</i>	citocromo P450 monooxigenasa (oligomicina)	-1,09	0,1512	0,0087
SAV2895	<i>olmA7</i>	policétido sintasa tipo I (oligomicina)	-0,64	0,0746	0,0028
SAV2896	<i>olmA6</i>	policétido sintasa tipo I (oligomicina)	-0,74	0,1443	0,0080
SAV2899	<i>olmA1</i>	policétido sintasa tipo I (oligomicina)	-0,61	0,1817	0,0121
SAV2903	<i>olmC</i>	tioesterasa (oligomicina)	-1,86	0,1234	0,0062
SAV2994	<i>ptIE</i>	monooxigenasa Baeyer-Villiger (neopentalenocetolactona)	-1,30	0,0087	0,0001
SAV2995	<i>ptID</i>	dioxigenasa (neopentalenocetolactona)	-1,21	0,0962	0,0041
SAV3156	<i>nrps3-1</i>	sintetasa de péptido no-ribosomal (nrps3)	-1,56	0,0867	0,0035
SAV7112	<i>rocD2</i>	aminotransferasa ornitina	-1,59	0,0212	0,0005

Tabla S10. Lista de genes para la biosíntesis de metabolitos secundarios diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR) – continuación. Cuando conocido, se indica el metabolito relacionado con la función entre paréntesis.

	Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
SAV7184	<i>pks4</i>	policétido sintasa tipo I (pks4)	-3,22	0,2980	0,0315
SAV7185		UDP-glucosa:esterol glicosiltransferasa (pks4)	-3,05	0,2753	0,0271
SAV7186	<i>cyp26</i>	citocromo P450 monooxigenasa (pks4)	-2,88	0,2419	0,0213
SAV7469	<i>cyp28</i>	citocromo P450 monooxigenasa	-1,55	0,0359	0,0010
SAV408	<i>pteG</i>	colesterol oxidasa (filipina)	2,05	0,0025	0,0000
SAV604		proteína hipotética (nrps6)	1,18	0,0224	0,0005
SAV605	<i>fadD2</i>	acil-CoA sintetasa, ligasa ácidos grasos:CoA de cadena larga (nrps6)	1,20	0,0049	0,0001
SAV607		dioxigenasa catabolismo taurina (nrps6)	1,15	0,0017	0,0000
SAV758	<i>mcjB1</i>	proteína hipotética (micromicina)	1,16	0,0063	0,0001
SAV803	<i>pgmA</i>	fosfoglucomutasa	1,67	0,0155	0,0003
SAV951	<i>aveBVII</i>	3-O-metiltransferasa d'TDP-6-desoxi-L-hexosa (avermectina)	2,01	0,0020	0,0000
SAV952	<i>aveBVIII</i>	2,3-reductasa d'TDP-4-ceto-6-desoxi-L-hexosa (avermectina)	1,83	0,0049	0,0001
SAV953	<i>aveG</i>	tioesterasa (avermectina)	2,20	0,0018	0,0000
SAV2164		hidrolasa (geosmina, germacradienol)	0,92	0,0429	0,0012
SAV2718	<i>leuB</i>	3-isopropilmalato deshidrogenasa	2,23	0,0252	0,0006
SAV3031	<i>cyp14</i>	epi-isozizaeno hidroxilasa (citocromo P450) (albaflavenol, albaflavenona)	1,00	0,2918	0,0301
SAV3032	<i>ezs</i>	epi-isozizaeno sintasa (albaflavenol, albaflavenona)	1,10	0,1621	0,0097
SAV3445	<i>purN</i>	formiltransferasa de fosforibosilglicinamida	1,29	0,0005	0,0000
SAV3859	<i>citA2</i>	citrato sintasa	1,38	0,0144	0,0003
SAV6068		colesterol oxidasa secretada	1,18	0,0060	0,0001
SAV7319	<i>fhuF2</i>	reductasa de hierro férrico	1,26	0,0071	0,0001
SAV7320	<i>avsA</i>	sintetasa de componentes sideróforos (sideróforo tipo-vibrioferrina)	1,11	0,0295	0,0007
SAV7321		(sideróforo tipo-vibrioferrina)	0,77	0,2474	0,0224

Tabla S10. Lista de genes para la biosíntesis de metabolitos secundarios diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR) – continuación. Cuando es conocido, se indica el metabolito relacionado con la función entre paréntesis.

	Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUR vs WT – t1					
SAV5272	<i>sidD</i>	Descarboxilasa de lisina (nocardamina, desferrioxamina B)	-2,01	0,0178	0,0002
SAV5686	<i>mjD</i>	proteína unión-ATP transportador ABC (micromicina)	-1,88	0,0453	0,0007
SAV5688		proteína hipotética (microcina)	-1,91	0,0333	0,0004
SAV5689	<i>mjC2</i>	sintasa de asparagina (microcina)	-2,24	0,0109	0,0001
SAV604		proteína hipotética (nrps6)	1,90	0,0039	0,0000
SAV605	<i>fadD2</i>	acil-CoA sintetasa, ligasa ácidos grasos:CoA de cadena larga (nrps6)	1,76	0,0014	0,0000
SAV607		dioxigenasa catabolismo taurina (nrps6)	2,22	0,0001	0,0000
SAV608	<i>fabC2</i>	ACP (nrps6)	1,94	0,0109	0,0001
SAV649	<i>ard</i>	fosfotransferasa (resistencia aminonucleósido)	1,13	0,0160	0,0001
SAV1766	<i>tkt1</i>	transcetolasa	1,33	0,0120	0,0001
SAV2661	<i>wrbA</i>	flavodoxina multimérica	3,06	0,0048	0,0000
SAV6084	<i>phzE</i>	componente I sintasas antranilato/ ρ -aminobenzoato	2,92	0,0002	0,0000
SAV6177	<i>trpB</i>	sintasa triptófano, subunidad β	1,00	0,0415	0,0001
SAV6397	<i>ectB</i>	L-2,4-diaminobutirato aminotransferasa (ectoína, 5-hidroxiectoína)	1,37	0,0483	0,0008
MUF vs WT – t2					
SAV1137	<i>melC2</i>	tirosinasa (melanina)	-1,85	0,0078	0,0000
SAV604		proteína hipotética (nrps6)	1,22	0,0357	0,0004
SAV605	<i>fadD2</i>	acil-CoA sintetasa, ligasa ácidos grasos:CoA de cadena larga (nrps6)	1,60	0,0019	0,0000
SAV606		proteína hipotética (nrps6)	1,44	0,0484	0,0007
SAV607		dioxigenasa catabolismo taurina (nrps6)	1,75	0,0006	0,0000
SAV758	<i>mjB1</i>	proteína hipotética (microcina)	1,02	0,0286	0,0003
SAV6632		metalopectidasa (nrps5)	1,47	0,1043	0,0027

Tabla S10. Lista de genes para la biosíntesis de metabolitos secundarios diferencialmente expresados en las cepas mutantes $\Delta pteF$ (MUF) y $\Delta pteR$ (MUR) – continuación. Cuando conocido, se indica el metabolito relacionado con la función entre paréntesis.

	Nombre Gen	Descripción	Mc	valor p corregido	valor p
MUR vs WT – t2					
SAV1137	<i>melC2</i>	tirosinasa (melanina)	-1,65	0,0463	0,0003
SAV7026	<i>fadA6</i>	3-cetoacil-CoA acetiltransferasa/tiolasa	-0,88	0,0398	0,0002
SAV414	<i>pteB</i>	deshidrogenasa (filipina)	1,16	0,0228	0,0001
SAV604		proteína hipotética (nrps6)	1,51	0,0398	0,0002
SAV605	<i>fadD2</i>	sintetasa acil-CoA, ligasa ácidos grasos:CoA de cadena larga (nrps6)	2,13	0,0009	0,0000
SAV607		dioxigenasa catabolismo taurina (nrps6)	1,90	0,0004	0,0000
SAV608	<i>fabC2</i>	ACP (nrps6)	2,05	0,0167	0,0000

Anexo VI. Publicaciones

A continuación se presentan los artículos relacionados con el trabajo desarrollado y publicados durante esta tesis doctoral.

Vicente CM, Santos-Aberturas J, Guerra SM, Payero TD, Martín JF, Aparicio JF. (2009). *PimT, an amino acid exporter controls polyene production via secretion of the quorum sensing pimaricin-inducer PI-factor in Streptomyces natalensis*. Microb Cell Fact. 8:33. doi: 10.1186/1475-2859-8-33

Vicente CM, Santos-Aberturas J, Payero TD, Barreales EG, Pedro deA, Aparicio JF. (2014). *PAS-LuxR transcriptional control of filipin biosynthesis in S. avermitilis*. Appl Microbiol Biotechnol. doi: 10.1007/s00253-014-5998-7

Vicente CM, Payero TD, Santos-Aberturas J, Barreales EG, Pedro deA, Aparicio JF. (2015). *Pathway-specific regulation revisited: cross-regulation of multiple disparate gene clusters by PAS-LuxR transcriptional regulators*. Appl Microbiol Biotechnol. doi: 10.1007/s00253-015-6472-x

Santos-Aberturas J, **Vicente CM**, Guerra SM, Payero TD, Martín JF, Aparicio JF. (2011). *Molecular control of polyene macrolide biosynthesis: direct binding of the regulator PimM to eight promoters of pimaricin genes and identification of binding boxes*. J Biol Chem. 286(11):9150-61. doi: 10.1074/jbc.M110.182428

Santos-Aberturas J, **Vicente CM**, Payero TD, Martín-Sánchez L, Cañibano C, Martín JF, Aparicio JF. (2012). *Hierarchical control on polyene macrolide biosynthesis: PimR modulates pimaricin production via the PAS-LuxR transcriptional activator PimM*. PLoS One. 7(6):e38536. doi: 10.1371/journal.pone.0038536

Santos-Aberturas J, Payero TD, **Vicente CM**, Guerra SM, Cañibano C, Martín JF, Aparicio JF. (2011). *Functional conservation of PAS-LuxR transcriptional regulators in polyene macrolide biosynthesis*. Metab Eng. 13(6):756-67. doi: 10.1016/j.ymben.2011.09.011.

Guerra SM, Rodríguez-García A, Santos-Aberturas J, **Vicente CM**, Payero TD, Martín JF, Aparicio JF. (2012). *LAL regulators SCO0877 and SCO7173 as pleiotropic modulators of phosphate starvation response and actinorbodin biosynthesis in Streptomyces coelicolor*. PLoS One. 7(2):e31475. doi: 10.1371/journal.pone.0031475