



UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA, GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA

MECANISMOS MOLECULARES DE LA TRANSCRIPCIÓN
EN *STREPTOMYCES GRISEUS* IMRU 3570:
RNA POLIMERASA Y FACTORES SIGMA

Memoria que para optar al grado de
Doctor en Biología:

ANA TERESA MARCOS RODRÍGUEZ

León, 1996

D. Juan Francisco Martín Martín

Catedrático de Microbiología de la Facultad

De Biología de la Universidad de León

CERTIFICA: Que la licenciada Dña. Ana Teresa Marcos Rodríguez ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado: “**Mecanismos Moleculares de la Transcripción en *Streptomyces griseus* IMRU 3570: RNA Polimerasa y Factores Sigma**”, en el Departamento de Ecología, Genética y Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de León.

Para que así conste, extendiendo el presente certificado en León a 9 de enero de mil novecientos noventa y seis

Fdo. D. Juan Francisco Martín Martín

A mis padres
A Betty y a Carola
A Bruno

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han contribuido a la realización del presente trabajo:

Al profesor Juan Francisco Martín por su dirección, apoyo y constante estímulo durante el desarrollo de este trabajo.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, Programa de Cooperación con Iberoamérica, por la concesión de una beca de doctorado.

A Bruno Díez y Santiago Gutiérrez, quienes con sus conocimientos, orientación y dedicación hicieron posible la caracterización genética aquí expuesta.

A José Antonio Oguiza por mantenerme cerca del mundo de los factores sigma, por su inestimable ayuda y *pressing* durante la escritura de la tesis.

A los penicilinos Javier Velasco, Katarina Kosalkova, Francisco José Fernández, Eduardo Montenegro, Francisco Fierro, Javier Casqueiro y Oscar Bañuelos por formar el mejor equipo de trabajo que he conocido.

A mis compañeros de Inbiotec, Rosa Elena Cardoza, Bernabé Martín, Angel Colina, Francisco Moralejo, Josefina Merino y Ana Lucía Monteiro, por el extraordinario ambiente de colaboración y trabajo que disfrutamos.

A todos los compañeros del Área de Microbiología por su valiosa colaboración, particularmente la de Maribel Corrales y Rosario Barrientos.

A Berta Alba y su familia, José Antonio Vázquez Boland, Marcos Malumbres, Begoña Miguélez y Alicia Martín, por su cariño, comprensión e inmejorable compañía.

A mis padres y hermanas, por su confianza, apoyo y cercanía a pesar de la distancia.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCION	17
1.1. CARACTERISTICAS DEL GENERO <i>STREPTOMYCES</i>	17
1.1.1. Ciclo de vida de los microorganismos del género <i>Streptomyces</i>	17
1.1.2. Diferenciación en <i>Streptomyces</i>	18
1.1.3. Organización genómica.....	20
1.2. REGULACION DE LA TRANSCRIPCION.....	21
1.2.1. El proceso de transcripción	21
1.2.2. Promotores en <i>Streptomyces</i>	23
1.2.3. Proteínas reguladoras en <i>Streptomyces</i>	25
1.3. RNA POLIMERASA.....	28
1.3.1. Subunidades del núcleo de la RNA polimerasa: Subunidad	28
1.3.2. Subunidad	29
1.3.3. Subunidad	30
1.4. FACTORES SIGMA	32
1.4.1. Agrupación de los factores sigma. Familias ⁷⁰ y ⁵⁴	33
1.4.2. Estructura de los factores sigma de la familia ⁷⁰	34
1.4.3. Factores sigma en <i>Streptomyces</i>	35
1.5. ANTI-SIGMAS.....	37
1.6. OBJETIVO DEL PRESENTE TRABAJO	38
2. MATERIALES Y METODOS	39
2.1. REACTIVOS.....	39
2.1.1. Reactivos Químicos y Bioquímicos	39
2.1.2. Reactivos Específicos para Biología Molecular.....	39
2.2. MICROORGANISMOS	41
2.2.1. Cepas de <i>Streptomyces</i>	41
2.2.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	41
2.3. VECTORES DE CLONACION.....	41
2.4. MEDIOS DE CULTIVO	42
2.4.1. Medios de cultivo de <i>Streptomyces</i>	42
2.4.2. Medios de cultivo de <i>E. coli</i> y bacteriófagos.....	43
2.4.3. Suplemento de antibióticos en los medios de cultivo	43
2.5. CULTIVO Y CONSERVACION DE LOS MICROORGANISMOS.....	43
2.6. ENSAYO ENZIMATICO DE LA ACTIVIDAD RNA POLIMERASA	44
2.7. PURIFICACION DE LA RNA POLIMERASA DE <i>S. griseus</i> IMRU 3570.....	45
2.7.1. Precipitado con Polymin P	45
2.7.2. Precipitado con sulfato amónico.....	45
2.7.3. Cromatografía en columna de filtración en gel	45
2.7.4. Cromatografía de pseudoafinidad heparina-agarosa	46
2.7.5. Cromatografía de afinidad DNA-agarosa	46

2.8. ESTUDIOS DE TRANSCRIPCIÓN <i>in vitro</i>	46
2.9. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	46
2.10. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	46
2.11. AISLAMIENTO DE DNA	47
2.11.1. Aislamiento de DNA total de <i>Streptomyces</i>	47
2.11.2. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Streptomyces</i>	47
2.11.3. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	47
2.11.4. Aislamiento de DNA de derivados del fago lambda.....	48
2.11.5. Aislamiento de DNA de simple cadena.....	48
2.12. AISLAMIENTO DE RNA TOTAL	48
2.13. CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA DE <i>S. griseus</i>	49
2.14. MANIPULACIONES ENZIMÁTICAS DE DNA	49
2.14.1. Digestión con enzimas de restricción.....	49
2.14.2. Desfosforilación del DNA.....	49
2.14.3. Obtención de DNA con extremos romos.....	50
2.14.4. Ligación de DNA.....	50
2.14.5. Fosforilación de DNA.....	50
2.14.6. Marcaje uniforme de DNA.....	50
2.14.7. Generación de deleciones unidireccionales.....	50
2.15. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS EN GELES DE AGAROSA	51
2.15.1. Electroforesis de DNA.....	51
2.15.2. Electroforesis de RNA.....	51
2.16. RECUPERACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA	51
2.17. HIBRIDACIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS	51
2.17.1. Hibridación de DNA transferido a filtros (<i>Southern</i>).....	51
2.17.2. Hibridación de RNA (<i>Northern</i>).....	52
2.17.3. Hibridación <i>in situ</i> de placas de lisis.....	52
2.17.4. Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA y su purificación.....	52
2.18. SECUENCIACIÓN DE DNA	53
2.19. TRANSFORMACIÓN DE <i>E. coli</i>	53
2.20. TRANSFORMACIÓN DE <i>Streptomyces lividans</i>	53
2.21. EXPRESIÓN DE LOS GENES CLONADOS EN <i>E. coli</i>	54
2.21.1. Amplificación de los genes mediante la técnica de PCR.....	54
2.21.2. Condiciones de cultivo para la expresión de los genes en <i>E. coli</i>	54
2.22. DETERMINACIÓN DE CANDICIDINA	54
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	55
3.1. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA RNA POLIMERASA	55
3.1.1. Ensayo de la actividad RNA polimerasa.....	55
3.1.2. Condiciones del cultivo.....	57
3.1.3. Obtención del extracto crudo.....	57
3.1.4. Precipitación con Polymin P.....	57
3.1.5. Precipitación con sulfato amónico.....	58
3.1.6. Cromatografía de filtración en gel Sephacryl S-300.....	58
3.1.7. Cromatografía de pseudoafinidad en heparina-agarosa.....	60
3.1.8. Cromatografía de afinidad DNA-agarosa.....	61
3.1.9. Resumen de la purificación de la actividad RNA polimerasa.....	61

3.2. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD RNA POLIMERASA DE <i>S. griseus</i>	62
3.2.1. Actividad sobre distintos moldes de DNA.....	62
3.2.2. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad RNA polimerasa.....	63
3.2.3. Estudios de transcripción <i>in vitro</i> con RNA polimerasa de <i>S. griseus</i>	64
3.3. CLONACION Y ANALISIS DEL GEN <i>hrdB</i> DE <i>S. griseus</i>	70
3.3.1. Aislamiento de clones de <i>S. griseus</i> homólogos al gen <i>hrdB</i> de <i>S. coelicolor</i>	70
3.3.2. Determinación y análisis de la secuencia del fragmento que contiene el gen <i>hrdB</i>	71
3.4. CLONACION Y ANALISIS DE LOS GENES <i>hrdD</i> Y <i>hrdT</i>	75
3.4.1. Aislamiento de clones homólogos a la caja <i>rpoD</i>	75
3.4.2. Secuencia de la región portadora del gen <i>hrdD</i>	76
3.4.3. Secuenciación y análisis del gen <i>hrdT</i> de <i>S. griseus</i>	78
3.5. DOMINIOS FUNCIONALES EN LAS PROTEINAS Hrd	80
3.6. ANALISIS TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES <i>hrd</i>	81
3.7. EXPRESION DE LOS GENES <i>hrdB</i> Y <i>sprC</i> EN <i>S. lividans</i>	84
3.8. ESTUDIOS DE EXPRESION DE LOS GENES <i>hrd</i> EN <i>E. coli</i>	86
3.9. ANALISIS DE ORFs CONTIGUAS A LOS GENES <i>hrd</i>	88
3.9.1. Análisis de la proteína codificada por la ORF3B: SprC.....	88
3.9.2. Análisis de la proteína codificada por la ORF4B: GyrB	91
3.9.3. Análisis de la proteína codificada por la ORF2D: Nat.....	92
3.9.4. Análisis de la proteína codificada por la ORF3T: Mdr.....	93
4. DISCUSION	95
4.1. PURIFICACION DE LA ACTIVIDAD RNA POLIMERASA	95
4.2. ESTUDIOS DE TRANSCRIPCION <i>in vitro</i>	97
4.3. GENES <i>hrd</i> DE <i>S. griseus</i>	99
4.4. ANALISIS TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES <i>hrd</i>	101
4.5. EXPRESION DEL GEN <i>hrdB</i> EN <i>S. lividans</i>	102
4.6. EXPRESION DE LOS GENES <i>hrd</i> EN <i>E. coli</i>	102
5. CONCLUSIONES	105
6. BIBLIOGRAFIA	107

SIGLAS Y ABREVIATURAS

A	adenina o adenosina
ABC	Dominio de unión de ATP (<i>ATP-binding cassette</i>)
Ap	ampicilina
AT	adenosina más timina
ATP	ácido adenosín - 5' - trifosfato
AUD	DNA susceptible de amplificación (<i>Amplifiable unit of DNA</i>)
BSA	albúmina de suero bovino
C	citocina o citidina
ccc	circular covalentemente cerrado
CDA	Antibiótico dependiente de calcio
Ci	curio
CIA	cloroformo y alcohol isoamílico
CIAP	fosfatasa alcalina de intestino de ternera
CIR	Secuencia conservada repetida e invertida (<i>Conserved Inverted Repeat</i>)
col	colaboradores
cpm	cuentas por minuto
CTAB	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CTD	dominio carboxilo terminal (<i>C-terminal domain</i>)
CTP	citocina 5' trifosfato
Da	Daltons
dATP	desoxiadenosina 5' trifosfato
dCTP	desoxicitosina 5' trifosfato
ddATP	didesoxiadenosina 5' trifosfato
ddCTP	didesoxicitosina 5' trifosfato
ddGTP	didesoxiguanosina 5' trifosfato
ddNTP	cualquiera de los didesoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)
ddTTP	didesoxitimidina 5' trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP	desoxiguanosina 5' trifosfato
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	desoxirribonucleasa
DNAss	DNA de cadena sencilla
dNTP	cualquiera de los desoxinucleótidos
DO₆₀₀	densidad óptica a 600 nm
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimidina 5' trifosfato
E	núcleo de la RNA polimerasa
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
G	guanosina
g	gramo
g	unidades de fuerza centrífuga relativa
GBTran	<i>Translated Genbank</i>
G+C	guanosinas más citosinas
GTP	guanosina 5' trifosfato
HTH	hélice-giro-hélice
IC	inosina más citosina
IPTG	isopropil -D-galactopiranosido
kb	kilobase
kDa	kilodalton
l	litro
ln	logaritmo neperiano
M	molar
mCi	milicurio
Mdr	resistencia a multidrogas (<i>Multidrug resistance</i>)
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
Mr	masa relativa
mRNA	RNA mensajero
NBRF	<i>National Biochemical Research Foundation</i>

ng	nanogramo
nm	nanometro
nt	nucleótidos
NTD	dominio amino terminal (<i>N-terminal domain</i>)
ORF	marco de lectura abierto
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PEG	polietilenglicol
pH	logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones
PIR	<i>Protein Identification Resource</i>
pmol	picomol
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfónico
PPi	pirofosfato inorgánico
PPT	fosfinotricina
psi	libras por pulgada cuadrada <i>pounds per square inch</i>)
p/v	peso/volumen
R	indica resistencia a algún antibiótico
RBS	secuencia de unión al ribosoma
RD	Región dispensable
RNA	ácido ribonucléico
RNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosómico
SDS	sodio dodecilsulfato
SEP	secuencia promotora de <i>Streptomyces</i> similar a la secuencia consenso de <i>E. Coli</i> (<i>Streptomyces-E. coli like promoter</i>)
SSC	citrato sódico, cloruro sódico
T	timina
TAE	tampón tris-acetato-EDTA
TBE	tampón tris-borato-EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA
TES	ácido N-tris(hidroximetil)metil 2-amino etano sulfónico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilén diamina
TGED	Tris, Glicerol, EDTA, DTT
TLE	Tris, LiCl, EDTA
TLP	proteasa similar a tripsina
Tris-HCl	Tris clorhídrico
tRNA	RNA transferente
u	unidades
U	uracilo o uridina
ufp	unidades formadoras de placa
v/v	volumen/volumen
X-gal	5-bromo 4-cloro 3-indol- -D- galactopiranósido
%	porcentaje
°C	grados centígrados
E	holoenzima RNA polimerasa
μCi	microcurio
μg	microgramo
μl	microlitro
μM	micromolar

1. Introducción

1.1. CARACTERÍSTICAS DEL GENERO *STREPTOMYCES*

Los actinomicetos y en particular los miembros del género *Streptomyces* constituyen uno de los grupos de microorganismos más abundantes en el suelo, cuya importancia deriva de su capacidad de producir antibióticos y otros compuestos de valor comercial. Etimológicamente *Streptomyces* deriva del griego (*streptos*, plegado, encorvado, torcido; *myces*, hongo). Su nombre refleja la confusión que existió durante mucho tiempo con este grupo de microorganismos que presenta características afines con bacterias y hongos. La determinación de su morfología y composición química, iniciada en los años 50, confirmó su naturaleza procariota y ha permitido clasificarlos como un género de la familia *Streptomycetaceae*, del orden bacteriano *Actinomycetales* (Goodfellow, 1989).

El género *Streptomyces* está formado por bacterias Gram positivas, aerobias obligadas y cuyo principal hábitat es el suelo. Presentan micelio sustrato o vegetativo y micelio aéreo, que madura para formar esporas no móviles. Producen gran variedad de pigmentos responsables del color de las esporas y también pigmentos coloreados difusibles. La mayoría de las cepas producen uno o más antibióticos. Son capaces de utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos como única fuente de carbono para energía y crecimiento. Generalmente reducen los nitratos a nitritos y degradan adenina, esculina, caseína, gelatina, hipoxantina, almidón y L-tirosina. En general, su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 25-35°C y el rango óptimo de pH oscila entre 6.5 y 8.0 (Goodfellow, 1989).

El género *Streptomyces* produce aproximadamente el 90% de los antibióticos conocidos (Baltz y Seno, 1988; Chater, 1990). Estos antibióticos son de una gran diversidad química: macrólidos, aminoglicósidos, β -lactamas, oligopéptidos, etc. Se han clonado gran cantidad de genes implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, incluyendo algunas rutas biosintéticas completas, así como genes de resistencia (véase revisiones de Tomick, 1988; Martín y Liras, 1989; Chater, 1990). Además de los antibióticos, el género *Streptomyces* sintetiza pigmentos, alcaloides, agentes antivirales, inhibidores de enzimas, agentes antiparasitarios y numerosas enzimas extracelulares, muchas de ellas con valor económico.

1.1.1. Ciclo de vida de los microorganismos del género *Streptomyces*

La germinación de una spora de *Streptomyces* se produce en condiciones ambientales favorables. La síntesis de RNA y proteínas comienza casi inmediatamente y en 120 minutos emerge el tubo germinativo, iniciándose entonces la síntesis de DNA (Hardisson y col., 1978). Durante la germinación se degrada rápidamente el disacárido trehalosa, que es el componente mayoritario de la spora (Ensign, 1978). El tubo germinativo crece y origina hifas ramificadas y escasamente septadas formando el micelio sustrato, que penetra en el suelo y obtiene nutrientes mediante degradación del material orgánico a través de numerosas enzimas hidrolíticas extracelulares: proteasas, nucleasas, lipasas, celulasas, amilasas, quitinasas y xilanasas (Kalakoustsikii y Agre, 1974; Williams y col., 1983). El crecimiento de las hifas es apical, tanto en medio sólido como en medio líquido (Braña y

col, 1982). El crecimiento apical es lineal, mientras que el crecimiento exponencial tiene lugar mediante la formación de ramificaciones en las secciones más viejas de la hifa (Allan y Prosser, 1983).

A partir del micelio sustrato emergen una serie de hifas formando el micelio aéreo (Ensign, 1978; Chater, 1984). Las hifas aéreas aparecen después de un corto período de reducida síntesis macromolecular (Granozzi y col., 1990) inducido por la limitación de nutrientes y mediante la reutilización de material previamente asimilado por el micelio sustrato, bien en forma de macromoléculas (DNA y proteínas) o compuestos almacenados (Méndez y col., 1985; Braña y col., 1986).

Las hifas aéreas necesitan una presión osmótica interna suficiente para dirigir el crecimiento en una dirección determinada, la cual puede ser generada mediante la solubilización de macromoléculas como glucógeno y por condensación de moléculas de superficie propias de hifas aéreas denominadas Saps (*spore-associated proteins*) (Guijarro y col., 1988; Willey y col., 1991). Las proteínas Saps podrían realizar también otras funciones: ruptura de la tensión superficial de la interfase agua-aire, prevención de la desecación de las hifas aéreas, mantenimiento de un compartimento acuoso fuera de la membrana celular o provisión de superficie hidrofóbica para las esporas, análoga a la acción de las hidrofobinas fúngicas (Chater, 1991).

Cuando cesa el crecimiento de las hifas aéreas comienza la formación de tabiques que subdividen las hifas en varios compartimientos unigenómicos, dando origen a las cadenas de esporas (Hardisson y Manzanal, 1976). El septo de esporulación es morfológicamente distinto de los septos que se encuentran en las hifas vegetativas y está formado por dos capas de membrana separadas por una doble capa de material de pared celular, permitiendo la separación de esporas adyacentes (Locci y Sharples, 1983). Estas diferencias estructurales sugieren que algunos genes deben estar específicamente involucrados en la septación de la esporulación, ya que se han caracterizado mutantes que pierden el septo de esporulación pero no el septo vegetativo (Chater, 1972). Durante la formación de las esporas se suele depositar algún pigmento en la pared celular; la naturaleza de estos pigmentos es utilizada con fines taxonómicos.

1.1.2. Diferenciación en *Streptomyces*

La diferenciación morfológica en *Streptomyces* (formación de micelio aéreo) está asociada con el proceso de diferenciación fisiológica (metabolismo secundario), por lo que se especula que puedan compartir algunos elementos reguladores similares (Chater, 1984). El metabolismo secundario tiene lugar cuando ha cesado el crecimiento rápido e implica la biosíntesis de productos no esenciales para el crecimiento vegetativo, pero en muchos casos de gran interés industrial.

El proceso de diferenciación en *Streptomyces* se ha relacionado habitualmente con el crecimiento en medio sólido, pero se ha descrito también la esporulación de varias especies en medio líquido (Kendrick y Ensign, 1983; Daza y col, 1989; Glazebrook y col, 1990). Teniendo en cuenta la complejidad que existe en el ciclo de vida de estos microorganismos cabe pensar en numerosos mecanismos reguladores necesarios para coordinar todos estos procesos. La mayor parte de los estudios de diferenciación se han realizado en *Streptomyces coelicolor* A3(2) y en *Streptomyces griseus* NRRL 2682, siendo el primero el género más estudiado genéticamente, conociéndose ya un mapa genético y físico de muchos de estos genes en el cromosoma (Kieser y col., 1992; van Wezel y col., 1995).

En *S. coelicolor*, se han aislado al menos siete clases distintas de mutantes *bld* (incapaces de formar micelio aéreo): *bldA*, *bldB*, *bldC*, *bldD*, *bldE*, *bldG*, *bldH* cuyos genes se han encontrado en distintas posiciones del cromosoma (revisado por Chater, 1989a; 1989b y 1993). Todos los mutantes *bld*, excepto *bldC*, presentan deficiencias en la producción de antibiótico. El fenotipo *bld* es condicional en los mutantes *bldA*, *D*, *G* y *H*, ya que en medio mínimo con glucosa o celobiosa como fuente de carbono no desarrollan micelio aéreo, mientras que con manitol o maltosa son capaces de desarrollar micelio aéreo y de esporular, pero restaura la producción de antibiótico (Merrick, 1976).

El gen *bldA* codifica para un leucil-tRNA_{UUA}, cuyo triplete es poco frecuente en *Streptomyces* que se caracteriza por tener un elevado porcentaje de G+C en el genoma (Lawlor y col., 1987). Los codones UUA se han encontrado en muy pocos genes que además no son esenciales para el

crecimiento vegetativo: en un gen involucrado en la esporulación de *S. griseus* (Babcock y Kendrick, 1990) y tres genes reguladores, la ORF4 del gen *actII* de la biosíntesis de actinorrodina (Fernández-Moreno y col., 1991), en el gen *srmR*, activador de la biosíntesis de espiramicina (Geistlich y col., 1992) y en el gen *amfR*, un gen activador de la formación de micelio aéreo (Ueda y col., 1993). Todos ellos parecer depender del gen *bldA* para su expresión.

Aún se conoce poco acerca de cómo los productos de los demás genes *bld* participan en la diferenciación morfológica del género *Streptomyces*. Sin embargo, la adición de una pequeña proteína denominada SapB restaura la formación de micelio aéreo en varios mutantes *bld* que carecen de ella (Guijarro y col., 1988; Willey y col., 1991; 1993). La proteína SapB tiene un tamaño aproximado de 18 aminoácidos y su síntesis es independiente de la adición de cloranfenicol. Estos resultados sugieren la implicación de una péptido sintetasa, que podría estar codificada por el gen *bldD* (Willey y col., 1993).

En *S. griseus*, la esporulación y la producción de estreptomicina depende de factores endógenos difusibles, siendo el mejor conocido el factor A, 2-(6'-metilheptanoil)-3R-hidroximetilbutanólido. Estos factores fueron identificados al observar que mutantes *bld* recobraban el fenotipo normal si crecían cerca de cepas silvestres.

La síntesis de factor A depende del gen *afsA* (Horinouchi y col., 1984; 1989) y tiene lugar previamente al inicio de la producción de antibiótico y de la esporulación. El factor A interacciona con una proteína represora de las secuencias promotoras de genes necesarios para la producción de estreptomicina y esporulación. La unión del factor A con el represor deja libres los promotores permitiendo que los genes previamente reprimidos se transcriban (Miyake y col., 1990). A su vez, el gen *afsA* esta regulado por la proteína AfsB (también llamada AfsR), un activador general de la síntesis de varios metabolitos secundarios (Stein y Cohen, 1989; Horinouchi y col., 1986; Horinouchi y col., 1990).

El factor A y los compuestos relacionados son sintetizados por diversos *Streptomyces*, pero no parecen funcionar del mismo modo: ciertos mutantes *afsA* de *S. coelicolor* no muestran deficiencias morfológicas ni fisiológicas obvias (Hara y col., 1983). Por otra parte su efecto es muy concreto en la especie productora: algunos compuestos similares al factor A producidos por *Streptomyces virginiae*, no tienen efecto sobre *S. griseus*, pero son necesarios para la producción de virginiamicina. La proteína receptora de estos butanólidos en *S. virginiae* se ha caracterizado bioquímicamente y genéticamente y es homóloga a la proteína NusG de *E. coli* (Okamoto y col., 1992). NusG parece formar parte del complejo cuaternario de la RNA polimerasa durante la elongación y su función consiste en modular la terminación de la transcripción (Li y col., 1992).

En *S. coelicolor* se han aislado otro tipo de mutantes, denominados *whi*, debido a que son capaces de formar micelio aéreo pero permanecen de color blanco (*white*), al fallar el desarrollo de la pigmentación asociada con la espora madura. Se han descubierto al menos seis loci *whi* (Chater, 1972), de los cuales *whiG* es epistático para las mutaciones *whiA*, *whiB*, *whiH* y *whiI*, indicando que el producto del gen *whiG* actúa primero en la iniciación de la esporulación que los productos de los otros genes (Chater y col., 1989c). El gen *whiG* codifica para un factor sigma asociado con la esporulación del que se hablará más adelante.

El gen *whiB* codifica para un activador transcripcional relacionado con la esporulación (Davis y Chater, 1992). El gen *whiB* presenta similitud con la cadena complementaria del gen *saf* de *S. griseus*, que codifica para una proteína reguladora capaz de estimular la producción de enzimas extracelulares cuando se introduce en *S. lividans* en alto número de copias (Daza y col., 1990). El gen *whiB* parece existir en todos los *Streptomyces* y en otros géneros del orden *Actinomycetales* (Soliveri y col., 1993).

La secuencia de nucleótidos del locus *whiE* reveló siete marcos de lectura abiertos, de los cuales seis mostraron homología con enzimas biosintéticas de antibióticos poliquétidos. Una de ellas correspondía a un gen previamente descrito que codifica para un pigmento marrón, lo cual indica que este locus dirige la síntesis de compuestos poliquétidos responsables de la pigmentación de la espora (Davis y Chater, 1990).

Adamidis y colaboradores (1990; 1992) definieron los locus *absA* y *absB* en *S. coelicolor*, cuya mutación bloquea la síntesis de los cuatro antibióticos, actinorrodina, undecilprodigiosina,

metilenomicina y antibiótico dependiente de calcio (CDA), pero no afecta la esporulación. Este hecho sugiere que una vez comenzada la diferenciación, la producción de antibióticos y la esporulación podrían estar reguladas independientemente. El gen *abaA* de *S. coelicolor* estimula la biosíntesis de actinorrodina y su disrupción ocasiona la no producción de este antibiótico, así como la reducción de la producción de undecilprodigiosina y CDA, pero no inhibe la producción de metilenomicina (Fernández-Moreno y col., 1992).

1.1.3. Organización genómica

Mediante la técnica de electroforesis en pulsos se ha calculado que el genoma de *Streptomyces* tiene un tamaño aproximado de 8000 kb, siendo constante este valor para distintas especies: *S. coelicolor* A3(2) (Kieser y col., 1992), *S. ambofaciens* (Leblond y col., 1990) y *S. lividans* 66 ZX7 (Leblond y col., 1993). En cuanto a la composición nucleotídica, el genoma de *Streptomyces* posee un contenido en G + C que oscila entre 70 y 74%, valor cercano al límite superior encontrado en la naturaleza (Enquist y Bradley, 1971).

Hasta finales de 1993 se pensaba que *Streptomyces* tenía un cromosoma o grupo de ligamiento circular, lo cual ha constituido una característica diferencial importante entre procariotas y eucariotas. Lin y col. (1993) han caracterizado el DNA cromosómico de *Streptomyces lividans* 66 como un fragmento lineal con dos extremos libres idénticos, unido cada uno de ellos covalentemente a proteínas. Además de *S. lividans* 66, se examinaron seis miembros del mismo género: *S. moderatus*, *S. parvulus*, *S. rochei*, *S. antibioticus*, *S. coelicolor* y *S. lipmanii*, los cuales revelaron también la existencia de cromosomas lineales, por lo cual los autores sugieren que esta característica es común en el género. El cromosoma de *Streptomyces* presenta una estructura telomérica como la encontrada en genomas virales y plásmidos lineales (Salas, 1988; Chen y col., 1993; Wu y Roy, 1993).

Sobre el modo de replicación del cromosoma de *Streptomyces*, se ha sugerido que las proteínas terminales podrían servir de cebadores para la iniciación de la replicación desde los telómeros (Lin y col., 1993). Se ha localizado un origen de replicación *oriC* en el centro del cromosoma de *S. lividans* (Zakrzewska-Czerwinska y Schrempf, 1992; Leblond y col., 1993) y en *S. coelicolor* A3(2) (Kieser y col., 1992), de modo que la replicación del cromosoma lineal de *Streptomyces* podría ocurrir desde el *oriC* y los telómeros. De hecho los telómeros de *S. lividans* se localizan en una región del cromosoma que es estructuralmente inestable, la cual sufre deleciones y amplificaciones (Redenbach y col., 1993). Algunas deleciones podrían resultar en circularización del cromosoma sin afectar la viabilidad de los microorganismos como lo han demostrado Lin y colaboradores (1993) al generar artificialmente un cromosoma circular.

La existencia de elementos extracromosomales en *Streptomyces* es un fenómeno muy frecuente. Existen plásmidos gigantes lineales en numerosas especies (Kinashi y col., 1987), múltiples secuencias de inserción (Chater y col., 1988) y secuencias repetidas (Usdin y Kirby, 1988). Su tamaño y número de copias son muy variables (revisado por Hopwood y col., 1987; Hütter y Eckhardt, 1988). Los actinomicetos muestran un marcado grado de fluidez e inestabilidad genética que puede afectar a diferentes facetas de su ciclo de vida: diferenciación, producción y resistencia a antibióticos, formación y secreción de enzimas y prototrofia o auxotrofia (revisado por Cullum y col., 1986).

En un 30% de cepas silvestres de *Streptomyces*, se encuentran plásmidos en su forma circular covalente cerrada (DNACcc) (Hopwood y col., 1986). Se han descrito también plásmidos lineales con proteínas asociadas en sus extremos: el plásmido lineal pSA1 de 8,8 kb aislado de *Streptomyces azureus*, que es circular cuando se aísla de cultivos líquidos (Miyoshi y col., 1986); un plásmido parecido, pSAM1 de 80 kb ha sido detectado en *Streptomyces ambofaciens* (Leblond y col., 1990). Se han descrito maxiplásmidos lineales de hasta 580 kb, algunos de los cuales parecen estar asociados con la producción de antibióticos (Kinashi, 1988), si bien sólo existen pruebas concluyentes en el caso de los genes para la producción y resistencia de metilenomicina, que se hallan en el plásmido SCP1 de *S. coelicolor* (Kinashi y Shimaji-Murayama, 1991). Los plásmidos lineales SLP2 de *S. lividans*, pSA1 y pSA2 de *S. avermitilis* presentan un inusual sistema de modificación sitio específico (Ray y col., 1992; Evans y col., 1994). Ocho plásmidos: SLP1 de *S. coelicolor* A3(2), pSAM2 de *S. ambofaciens*, pIJ110 de *S. parvulus*, pIJ408 de *S. glaucescens*, pSG1 de *S. griseus*, pSE101 y pSE211 de *Saccharopolyspora erythraea* y pMEA100 de *Amycolatopsis mediterranei*, se integran en sitios específicos del cromosoma en genes que codifican para tRNA (Kieser y Hopwood, 1991).

Los *Streptomyces* pueden contener elementos que existen tanto integrados en el cromosoma como en forma extracromosomal, entre ellos cabría destacar los fagos atenuados, tipo C31 (Chater, 1980) y elementos que se encuentran siempre integrados en el huésped original, pero se comportan como elementos extracromosomales en un nuevo huésped, como SLP1, pIJ101 y pIJ400. Recientemente se han detectado pequeños segmentos del genoma de *Streptomyces* que podrían comportarse como transposones: IS110 (Chater y col, 1985), KC591 (Lydiate y col, 1986), Tn4556 (Chung, 1987), IS493 (Solenberg y Burgett, 1989), IS117 (previamente llamado minicirculo de 2.6 kb) (Herderson y col, 1990), IS116 (Leskiw y col, 1990) y Tn4811 (Chen y col., 1992).

En algunos casos se ha observado que las regiones delecionadas se hallan localizadas próximas a regiones del DNA susceptibles de amplificación (AUD). Estas regiones se hallan presentes en numerosas especies de *Streptomyces* y estarían compuestas por dos zonas de secuencias repetidas de 0.7 a 1.7 kb, y una región interna de longitud variable (Hütter y Eckhardt, 1988; Hornemann y col, 1989).

1.2. REGULACION DE LA TRANSCRIPCION

La regulación de la expresión génica es un proceso que permite la expresión selectiva de la información codificada por el DNA. El primer paso de la expresión génica es la transcripción, proceso que depende de la RNA polimerasa y sus proteínas accesorias. En la transcripción se pueden distinguir tres etapas: iniciación, elongación y terminación. La iniciación se considera la etapa más importante a nivel de regulación, ya que de ella depende que un gen sea o no transcrito en un momento determinado. Este proceso es muy interesante en microorganismos como *Streptomyces* que presentan complejos procesos de diferenciación morfológica y fisiológica.

1.2.1. El proceso de transcripción

Iniciación

La iniciación es el primer paso del proceso de transcripción, un proceso múltiple catalizado por la holoenzima RNA polimerasa, de cuya especificidad depende el reconocimiento de los promotores y que determina la localización y orientación del extremo 5' de mRNA así como la frecuencia de iniciación de la transcripción.

La iniciación de la transcripción puede dividirse en varias etapas. En la primera tiene lugar el reconocimiento de la secuencia promotora por la holoenzima RNA polimerasa (formada por el núcleo y el factor sigma), que se une al DNA formando el complejo cerrado promotor-RNA polimerasa; el siguiente paso consiste en separar las dos hebras del DNA para dar origen a la "burbuja de transcripción" que le permite acceder al molde formándose el complejo abierto promotor-RNA polimerasa y es entonces cuando se incorpora el primer ribonucleótido trifosfato de la cadena de RNA. La unión del segundo nucleótido y la formación del enlace fosfodiéster es la etapa que se repite durante el proceso de elongación, sin embargo se considera que el momento de transición entre la iniciación y la elongación es cuando se libera el factor sigma, hecho que ocurre cuando el RNA tiene aproximadamente 12 bases de longitud (Revisado por von Hippel y col., 1984; Reznikoff y col., 1985).

Para poder comprender el mecanismo de control de la expresión génica es necesario conocer toda la maquinaria implicada. Durante la iniciación de la transcripción interviene la holoenzima RNA polimerasa, los promotores y las proteínas reguladoras, que tienen una función de control sobre el proceso.

Elongación

La elongación de la transcripción consiste en la repetición de los siguientes pasos: unión del ribonucleótido trifosfato, formación del enlace fosfodiéster, liberación del pirofosfato y translocación de la RNA polimerasa a lo largo del DNA molde.

Durante la elongación la RNA polimerasa cubre una región del DNA que contiene entre 25 y 40 bases, de las cuales entre 12 y 20 se encuentran separadas en dos hebras de simple cadena formando la burbuja de transcripción. Esta burbuja está formada por el complejo ternario de transcripción: la RNA polimerasa, el DNA molde y el RNA. Los últimos 10 nucleótidos del RNA que se está sintetizando permanecen próximos a la burbuja de transcripción, unidos a la enzima, probablemente en un canal de salida del transcrito (revisado por Das, 1993; Chamberlin, 1994; Chan y Landick, 1994).

La elongación se ha descrito como un proceso discontinuo, debido a que la RNA polimerasa no transcribe a velocidad constante. El avance y la pausa constituyen las dos etapas de un ciclo que se sucede repetidamente durante la elongación. Dicho ciclo se conoce en inglés como *inchworming* para significar que durante el proceso la RNA polimerasa incorpora nucleótidos y corrige los posibles errores (relee la escritura varias veces). Las regiones del DNA donde se detiene momentáneamente la RNA polimerasa se han denominado sitios de pausa. Estos sitios de pausa dependen de la secuencia molde (por ejemplo, secuencias simétricas complementarias) y dan como resultado dos posibles conformaciones del complejo ternario de transcripción, una conformación tensa o relajada (Nudler y col., 1994; 1995; Wang y col., 1995).

Los sitios de pausa pueden estar ocasionados también por elementos externos. El nucleótido regulador ppGpp es capaz de causar pausas durante la elongación de la región líder del operón *rrnB* de *E. coli*, reduciendo la velocidad de elongación a la mitad y por consiguiente la expresión de los operones ribosomales. La adición de novobiocina, un inhibidor de la DNA girasa, altera el grado de superenrollamiento del DNA y la velocidad de la elongación *in vivo* (revisado por von Hippel y col., 1984). La proteína NusA también podría ocasionar pausas durante la elongación (Schmidt y Chamberlin, 1984; 1987).

Terminación

En la terminación de la transcripción el complejo ternario de elongación se disocia en sus tres componentes: el RNA, el DNA molde y la RNA polimerasa. La terminación obedece a señales presentes en el DNA molde.

El proceso de terminación modula la expresión génica permitiendo definir unidades de transcripción u operones, modular la transcripción de un operón en respuesta a un exceso de producto génico (atenuación), disminuir los niveles de transcripción de genes sucesivos de una unidad transcripcional (polaridad natural), separar operones de una unidad de transcripción (antiterminación) y proteger la terminación prematura de RNAs muy largos que no se traducen, como los RNAs ribosomales.

En *E. coli* se han descrito dos tipos de terminadores, los de tipo I, que no requieren *in vitro* de un factor de terminación y los de tipo II o Rho-dependientes, que precisan de la proteína Rho para terminar la transcripción tanto *in vivo* como *in vitro*. Además del factor Rho, se han identificado otras proteínas que intervienen en la terminación y antiterminación como NusA y NusB, necesarias en cantidades equimolares (Friedman y col., 1987).

La terminación de la transcripción en *Streptomyces* parece ser similar al tipo I de *E. coli*, mediante terminadores transcripcionales rho-independientes (Hopwood y col., 1986). Este tipo de terminación se basa en que el DNA presenta secuencias repetidas e invertidas que conducen a la formación de una estructura en forma de horquilla en el RNA. En *E. coli* esta estructura suele ser previa a una cadena de varios residuos de uridina en el extremo 3' del RNA (Platt, 1986; Friedman y col., 1987). En *Streptomyces* la cola poli-U no es necesaria, aunque es reconocida eficientemente (Pulido y col., 1987). Algunos ejemplos de este tipo de estructura en *Streptomyces* son la secuencia invertida que actúa como terminador transcripcional para los transcritos convergentes de los genes *mmr* y *mmv* involucrados en la biosíntesis de metilenomicina (Chater y Hopwood, 1989), las estructuras de horquilla e^{a-c} del actinofago C31 que actúan como terminadores transcripcionales *in vivo* e *in vitro* (Ingham y col., 1995) y el terminador P_{cd} que funciona como tal en *Streptomyces* y en *E. coli* (Deng y col., 1987). Se han descrito en *Streptomyces* secuencias conservadas repetidas e invertidas (CIR) que se encuentran adyacentes a los terminadores, las cuales podrían ser sitios de unión de represores (Hartley y col., 1994). Secuencias de este tipo se sitúan junto a los terminadores

et^{a-c} del actinofago C31, pero no afectan la eficiencia de la terminación, por lo que su función en este proceso no está muy clara (Ingham y col., 1995).

La antiterminación es un mecanismo de control que depende de la existencia de una proteína que modifica la RNA polimerasa de modo que puede leer a través de terminadores situados en el extremo 3' del gen. En *Streptomyces* se han descrito como antiterminadores el producto del gen *strR* de *S. griseus*, que permitiría la lectura de los genes *strA* y *strB* situados posteriormente al mismo (Distler y col., 1990) y el gen *nsh*, cuyo producto confiere resistencia al antibiótico tiopeptídico nosiheptida en *S. actuosus* (Li y col., 1990).

La regulación por atenuación es bien conocida en operones biosintéticos de aminoácidos de distintas bacterias. Este mecanismo se caracteriza por la presencia de una estructura terminadora que precede al primer gen estructural, por lo que la expresión génica tiene lugar solamente si este terminador se vuelve inactivo. Pruebas que apoyan la existencia de este mecanismo se han propuesto recientemente para la regulación del gen de resistencia a tilosina *thrA* de *S. fradiae* (Kelemen y col., 1994). La posible estructura terminadora y las posibles conformaciones de la secuencia líder de este gen fueron descritas previamente por Kamimiya y Weisblum en 1988.

La terminación dependiente del factor rho o el producto del gen *nusA*, no está documentada en *Streptomyces*. En *S. virginiae* se ha descrito la proteína VbrA que posee un 78% de aminoácidos idénticos al antiterminador transcripcional NusG de *E. coli* (Li y col., 1992). La proteína VbrA es un receptor de butanólidos (compuestos similares al factor A) y el gen *vbrA* se encuentra formando parte de un operón de proteínas ribosómicas similar al que contiene a *nusG* en *E. coli* (Okamoto y col., 1992). Mediante la técnica de *Southern* se ha demostrado la presencia de un gen homólogo en 55 especies de *Streptomyces* (Puttikhunt y col., 1993;1995).

1.2.2. Promotores en *Streptomyces*

Un gran número de fragmentos de DNA de *Streptomyces* con actividad promotora han sido identificados y caracterizados. Dada su importancia han sido publicadas numerosas recopilaciones (Hütter y Eckhardt, 1988; Martín y Liras, 1989; Seno y Baltz, 1989; Strohl, 1992; Bourn y Babb, 1995).

Los promotores bacterianos más estudiados son los de *E. coli* y en ellos se han definido dos regiones conservadas: la región -10 o Caja de Pribnow, que se encuentra separada por unas seis bases del sitio de inicio de la transcripción y presenta la secuencia consenso TATAAT, y separada por unas 17 bases, se encuentra la región -35 cuya secuencia consenso es TTGACA (Hawley y McClure, 1983). Estas dos regiones promotoras se han encontrado en otras bacterias como *Salmonella typhimurium* o *Bacillus subtilis* y por ello se ha denominado secuencia consenso de promotores procariotas.

Algunos promotores de *Streptomyces* tienen una secuencia similar a la secuencia consenso de promotores procariotas. Strohl (1992) ha recopilado 139 secuencias promotoras de estreptomicetos, de las cuales 29 se agrupan como promotores SEP (“*Streptomyces* - *E. coli* type promoters”) (Jaurin y Cohen, 1985; Hopwood y col., 1986). Los promotores SEP presentan regiones -10 y -35 similares a la secuencia consenso de promotores procariotas y su transcripción depende de factores sigma homólogos al factor σ^{70} de *E. coli*. Se han encontrado promotores SEP tanto en secuencias de genes vegetativos como de genes asociados con el metabolismo secundario.

También se ha comprobado que algunos promotores de *Streptomyces* muestran actividad promotora en *E. coli*, como por ejemplo los promotores *SEP2*, *SEP3*, *SEP6* y *SEP8* aislados de *S. lividans* (Jaurin y Cohen, 1985); el promotor constitutivo p2 del operón de la galactosa (Brawner y col, 1985); los promotores Pc (Deng y col, 1986) y pIJ101A (Buttner y Brown, 1987) del plásmido pIJ101; el promotor del gen *xp55*, que codifica una de las proteínas mayoritariamente secretadas en *S. lividans* (Burnett y col, 1987), tres promotores del plásmido pSLG3 (Petricek y col, 1988) y el promotor del gen *saf* de *S. griseus* (Daza y col, 1991). En la mayoría de ellos la transcripción se inicia en el mismo nucleótido en ambos microorganismos, según se ha demostrado mediante análisis de protección con nucleasa S1, indicando que la interacción de la RNA polimerasa de *E. coli* es muy parecida a la de *Streptomyces*. Igualmente existen promotores de *S. coelicolor* que presentan actividad

en *B. subtilis* (Parro y Mellado, 1990) y el promotor del gen *ampC* de *E. coli* es activo en *S. lividans* (Jaurin y Cohen, 1984).

Los estudios de comparación de secuencias promotoras de estreptomicetos realizadas por Strohl (1992) y por Bourn y Babb (1995) han permitido deducir secuencias consenso para las regiones -10 y -35 de los promotores SEP (Tablas 1.1 y 1.2, respectivamente).

Otro aspecto que parece ser importante en los promotores SEP es el número de bases que se encuentran separando las regiones -10 y -35 de estos promotores, siendo la media calculada por Strohl de 17.3 nucleótidos similar a la de *E. coli* que es de 17 ± 1 (Hawley y McClure, 1983; Harley y Reynolds, 1987). Jaurin y Cohen (1984) encontraron que la inserción de un nucleótido en la zona que separa ambas regiones (-10 y -35) del promotor del gen *ampC* de *E. coli*, cambiando la separación de 16 a 17 nucleótidos (nt), aumentaba la eficiencia de transcripción unas 16 veces en *E. coli* y 30 veces en *S. lividans*.

Tabla 1.1. Secuencias consenso de *E. coli* y *Streptomyces* para la región -10 de los promotores SEP.

	Posición												Referencia	
	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	
<i>E. coli</i>		T		T	G		T	A	T	A	A	T		Hawley y McClure, 1983
<i>Streptomyces</i>							T	A	g	A/G	A/G	T		Strohl, 1992
<i>Streptomyces</i>	C/G	G/C/T	C/G	G/C/T	G	C/G/A	T	A	G/C	G/C/A	G/T	T	G/C	Bourn y Babb, 1995

En *Streptomyces* se han descrito promotores que en la región -10 presentan similitud con la secuencia consenso de promotores SEP, pero no en la región -35. Por ejemplo, los promotores: *gal-p1*, *nshR-p*, *afsB-p*, *gylR-p*, *orfI-p1/p2*, *sph-p*, *afsR -p2* y *nshA-p* se caracterizan por tener una cadena de residuos de guanina en la región -35 (Strohl, 1992). Situaciones similares existen en promotores procariontes regulados positivamente, los cuales son transcritos por la holoenzima mayoritaria de la RNA polimerasa, pero requieren de proteínas activadoras (Raibaud y Schwartz, 1984).

Tabla 1.2. Secuencias consenso de *E. coli* y *Streptomyces* para la región -35 de los promotores SEP.

	Posición											Referencia	
	-41	-40	-39	-38	-37	-36	-35	-34	-33	-32	-31	-30	
<i>E. coli</i>				T	C	T	T	G	A	C	A	T	Hawley y McClure, 1983
<i>Streptomyces</i>						T	T	G	A	C	A/G		Strohl, 1992
<i>Streptomyces</i>	A			G	C	T	T	G	A	C		C	Bourn y Babb, 1995

La existencia de regiones con promotores múltiples y en tándem en *Streptomyces* está muy documentada. Esta situación se da por ejemplo en los promotores de los genes implicados en la utilización de glicerol en *S. coelicolor* (Janssen y col, 1985 ; Smith y Chater, 1987), la producción de -amilasa (Hoshiko y col, 1987) y agarasa (Buttner y col, 1987; Parro y Mellado, 1993), la síntesis de RNA ribosomal (Baylis y Bibb, 1988), el catabolismo de galactosa (Fornwald y col, 1987), la biosíntesis de estreptomycin (Distler y col, 1987), la síntesis del inhibidor de la subtilisina (*ssi*) de *S. albogriseolus* (Taguchi y col, 1989) y los promotores de los genes de resistencia a antibióticos como viomicina (Janssen y Bibb, 1988), tioestreptona (*tsr*) (Janssen y Bibb, 1990) y estreptomycin (*sph*) (Vögtli y Hütter, 1987). La posesión de promotores múltiples proporciona mayores capacidades transcripcionales y reguladoras, ya que un mismo gen puede ser transcrito por diferentes holoenzimas de la RNA polimerasa.

Existen también regiones con promotores múltiples divergentes, como en los genes *sph/orfI* de *S. glaucescens* (Vögtli y Hütter, 1987), *xyIA/xyIB* (Wong y col., 1991), *hrdD/bar* de *S. coelicolor*

(Bedford y col., 1991), *actII(orf1)/actII(orfs 2 y 3)* de *S. coelicolor* (Caballero y col., 1991), *actI/actIII* de *S. coelicolor* (Parro y col., 1991), el gen *redD* de *S. coelicolor* (Narva y Feitelson, 1990).

Se han descrito también en *Streptomyces* promotores cuyo inicio de transcripción coincide con el inicio de traducción, los cuales carecen de secuencia de unión a ribosomas. Los genes *aph* de *S. fradiae* (Jones y col., 1992) y *hutH* de *S. griseus* (Wu y col., 1995) son dos ejemplos.

El promotor del gen *sapA* de *S. coelicolor*, que codifica para una proteína asociada a esporas, es curioso entre los promotores procariotas ya que la zona reconocida por la RNA polimerasa solapa dentro de la región transcrita del propio gen. Secuencias anteriores a la posición -8 no son necesarias para localizar correctamente la iniciación de la transcripción, ni para su regulación (citado en Chater, 1993). Se ha observado una situación similar en el promotor P1a, el cual es activo durante la fase estacionaria del actinomiceto *Micromonospora echinospora* (Baum y col., 1989). Esto podría implicar un mecanismo de transcripción similar al de la RNA polimerasa III de eucariotas, que depende de secuencias posteriores al punto de inicio de la transcripción (Chater, 1993).

1.2.3. Proteínas reguladoras en *Streptomyces*

Aunque la transcripción es una función básicamente asociada a la holoenzima RNA polimerasa y a la secuencia promotora, este proceso puede verse significativamente afectado por la actividad de proteínas reguladoras, también conocidas como proteínas de unión a DNA. En procariotas, estas proteínas suelen presentar un motivo de estructura secundaria formado por dos hélices unidas por un giro (HTH). Su función las ha dividido en represoras o activadoras: las primeras actúan mediante su unión a la región promotora de forma que impiden el posicionamiento correcto de la RNA polimerasa y por lo tanto bloquean la transcripción; mientras que las activadoras se unen cerca del promotor colaborando con la RNA polimerasa y permitiendo la transcripción génica.

En general, la interacción de proteínas reguladoras con el DNA no es tan sencilla como la simple regulación positiva o negativa, pudiendo existir complejos mecanismos con múltiples variantes, como por ejemplo, genes regulados positiva o negativamente por la misma proteína, según exista o no el efector adecuado; o genes regulados positiva o negativamente por proteínas diferentes que compiten por secuencias diana muy similares o idénticas.

La mayoría de los genes reguladores conocidos en *Streptomyces* están relacionados con la biosíntesis de antibióticos, la producción de enzimas extracelulares o con la diferenciación como muestra la recopilación efectuada en la Tabla 1.3.

Proteínas reguladoras homólogas a LysR en *Streptomyces*

La familia de reguladores positivos LysR se encuentra muy extendida en procariotas (Henikoff y col., 1988; Goethals y col., 1992). Los genes que pertenecen a esta familia se encuentran generalmente adyacentes a los genes que activan y son transcritos divergentemente, siendo capaces de modular su propia expresión mediante represión. Estudios recientes en genes de β -lactamasas y proteasas han proporcionado la evidencia de este tipo de regulación en *Streptomyces*.

El gen *bla* de *S. cacaoi* que codifica para una β -lactamasa (Urabe y Ogawara, 1992), el gen *mprA* de *S. coelicolor* que codifica para una metaloproteasa (Dammann y Wohlleben, 1992) y el gen *snpA* que codifica para una proteasa neutra en *S. lividans* (Butler y col., 1992) y en *Streptomyces* sp. C5 (Lampel y col., 1992), son ejemplos de genes que se encuentran situados en el genoma adyacentes a un gen homólogo a *lysR* que se transcribe divergentemente. Se han encontrado posibles cajas LysR cercanas a la posible secuencia de unión al ribosoma del gen homólogo a *lysR*, lo cual es consistente con la noción de que estos genes activan la transcripción del gen adyacente, pero reprimen la suya. En la Tabla 1.4 se muestra la secuencia de las posibles cajas LysR (T-N₁₁-A) de los genes citados previamente, los nucleótidos de estas cajas suelen presentar cierta simetría complementaria.

Tabla 1.3. Genes que codifican para proteínas reguladoras de la transcripción en *Streptomyces*

Gen	Especie	Función	Referencia
<i>strR</i>	<i>S. griseus</i>	Activador de la biosíntesis de estreptomina	Retzlaff y col., 1993
<i>srmR</i>	<i>S. ambofaciens</i>	Activador de la biosíntesis de espiramicina	Geistlich y col., 1992
<i>actIorf4</i>	<i>S. coelicolor</i>	Activador de la biosíntesis de actinorrodina (*)	Fernández-Moreno y col., 1991
<i>redDorf1</i>	<i>S. coelicolor</i>	Activador de la biosíntesis de undecilprodigiosina (*)	Takano y col., 1992
<i>brpA</i>	<i>S. hygroscopicus</i>	Activador de la biosíntesis de bialafos (*)	Raibaud y col., 1991
<i>acyB2</i>	<i>S. thermotolerans</i>	Activador del gen <i>acyB1</i> (acilación de macrólidos)	Arisawa y col., 1993
<i>abaA</i>	<i>S. coelicolor</i>	Regulador pleiotrópico de la biosíntesis de antibióticos	Fernández-Moreno y col., 1992
<i>absA</i>	<i>S. coelicolor</i>	Activador general de biosíntesis de antibióticos	Adamidis y col., 1990
<i>absB</i>	<i>S. coelicolor</i>	Activador general de biosíntesis de antibióticos	Adamidis y Champness, 1992
<i>tcmR</i>	<i>S. glaucescens</i>	Represor del gen de resistencia a tetracenicina C	Guilfoile y Hutchinson, 1992
<i>actIorf1</i>	<i>S. coelicolor</i>	Represor del gen de resistencia de actinorrodina	Caballero y col., 1991
<i>merR</i>	<i>S. lividans</i>	Represor de genes de resistencia a mercurio	Sedlmeier y Altenbuchner, 1992
<i>ramR</i>	<i>S. coelicolor</i>	Activador de formación de micelio aéreo (*)	Ma y Kendall, 1993
<i>amfR</i>	<i>S. griseus</i>	Activador de formación de micelio aéreo (*)	Ueda y col., 1993
<i>whiB</i>	<i>S. coelicolor</i>	Activador de la esporulación	Davis y Chater, 1992
<i>spi</i>	<i>S. azureus</i> pSA1.1	Inhibidor de la esporulación	Tomura y col., 1993
<i>saf</i>	<i>S. griseus</i>	Incrementa la producción de enzimas extracelulares	Daza y col., 1990
<i>blaA</i>	<i>S. cacaoi</i>	Activador -lactamasa	Urabe y Ogawara, 1992
<i>snpR</i>	<i>S. lividans</i>	Activador de proteasa neutra	Butler y col., 1992
<i>snpR</i>	<i>Streptomyces</i> C5	Activador de proteasa neutra	Lampel y col., 1992
<i>mprB</i>	<i>S. lividans</i>	Activador de metaloproteasa	Dammann y Wohlleben, 1992
<i>ORF5/VI</i>	<i>S. antibioticus</i>	Activador transcripcional similar a la familia AraC	Yu y Chen, 1993
<i>glnR</i>	<i>S. coelicolor</i>	Activador de glutamina sintetasa (*)	Wray y Fisher, 1993
<i>gylR</i>	<i>S. griseus</i>	Regulador del operon del glicerol	Bolotín y Biro, 1990
<i>ORF1</i>	<i>S. fradiae</i>	Posible represor de la biosíntesis de actinorrodina	Romero y col., 1992
<i>dnrN</i>	<i>S. peucetius</i>	Activador del gen regulador <i>dnrI</i> (*)	Hutchinson, 1994
<i>afsR2</i>	<i>S. lividans</i>	Activador del gen <i>actII-orf4</i>	Vögtli y col., 1994

Tabla 1.4. Posibles cajas LysR en la región intergénica de los genes homólogos a *lysR* y genes de metaloproteasa o -lactamasa.

Cepa	Gen	Producto	Secuencia de posible caja LysR	Referencia
<i>S. cacaoi</i>	<i>bla</i>	-lactamasa	<u>A T G C C G T T T C C G C A T</u>	Urabe y Ogawara, 1992
<i>S. coelicolor</i>	<i>mprA</i>	Proteasa	<u>A T C G C A G G T T G G C A T</u>	Dammann y Wohlleben, 1992
<i>S. lividans</i>	<i>slpA</i>	Proteasa	<u>A T A G C C C G G C C C T A T</u>	Lichenstein y col., 1992
<i>Streptomyces</i> C5	<i>snp</i>	Proteasa	<u>A T A G G G C G G C C C T A T</u>	Lampel y col., 1992
<i>S. cacaoi</i>	<i>blaA</i>	Activador	<u>G T C G G G G C C A T G G A C</u>	Urabe y Ogawara, 1992
<i>S. coelicolor</i>	<i>mprR</i>	Activador	<u>C T A G C C T C G G T C C A T</u>	Dammann y Wohlleben, 1992
<i>S. lividans</i>	<i>slpR</i>	Activador	<u>G T T C A C C T G G C G C A A</u>	Lichenstein y col., 1992
<i>Streptomyces</i> C5	<i>snpR</i>	Activador	<u>T T A C C C T C C C A G G A C</u>	Lampel y col., 1992
	<i>lysR</i>	Consenso	<u>A T N N N N N N N N N N A T A</u>	Henikoff y col., 1988

Tomado de Baltz, 1995. Las posiciones que muestran simetría complementaria están subrayadas.

Sistemas reguladores de dos componentes en *Streptomyces*

En los últimos años se ha descubierto tanto en *Streptomyces* como en bacterias en general, la regulación mediante modificación post-traduccional de proteínas por fosforilación. Este mecanismo de regulación constituye uno de los mecanismos principales de regulación en eucariotas. El estudio de las funciones de las proteínas quinasas bacterianas tiene paralelismo con los sistemas eucariotas, y algunas de las funciones conocidas son la regulación del metabolismo intermediario, el transporte de carbohidratos, la transcripción génica y la diferenciación celular.

En bacterias se han descrito tres tipos de sistemas reguladores por fosforilación de proteínas que han sido denominados sistemas transducción de señal de dos componentes (revisado por Saier y

col., 1990). En ellos intervienen al menos dos proteínas: un sensor constituido por una proteína quinasa, y un transmisor de señal, que suele ser una proteína activadora de la transcripción de los genes necesarios para la adaptación requerida.

Los primeros ejemplos descritos en *Streptomyces* se ajustan al sistema de fosfotransferencia de aspartato-histidina. En este sistema, existe una proteína quinasa que actúa como sensor de algún cambio ambiental que requiere una respuesta adaptativa. La proteína quinasa se fosforila mediante la transferencia de un grupo fosfato del ATP a un residuo histidina cercano al dominio carboxilo terminal de la proteína. El grupo fosfato es posteriormente transferido de la histidil-proteína quinasa a un residuo aspártico del dominio amino terminal de una segunda proteína, que es el transmisor de la señal. En la mayoría de los casos el transmisor de la señal es una proteína activadora de la transcripción, que tras la fosforilación del extremo amino, es capaz de unirse al DNA mediante un dominio existente en el extremo carboxilo.

Recientemente se han descrito sistemas de dos componentes en *Streptomyces* cuyas quinasas se fosforilan en los residuos serina o treonina, como ocurre en la activación de segundos mensajeros en células eucariotas (Matsumoto y col., 1994; Urabe y Ogawara, 1995).

Los sistemas de transducción de señal descritos en *Streptomyces* se resumen en la Tabla 1.5. Cabe citar el sistema AfsR-AfsK en *S. coelicolor* y *S. lividans*, que aumenta la biosíntesis de antibióticos e incrementa la producción de factor A (Horinouchi y Beppu, 1992; Matsumoto y col., 1994), el par DnrI-DnrJ de *S. peucetius* relacionado con la superproducción de daunorubicina (Stutzman-Engwall y col., 1992), CutR-CutS en *S. lividans*, relacionados con el metabolismo de cobre (Tseng y Chen, 1991) y AfsQ1-AfsQ2 de *S. coelicolor*, que incrementa la producción de actinorrodina, undecilprodigiosina y factor A en *S. lividans* (Ishizuka y col., 1992).

Tabla 1.5. Sistemas de transducción de señal de dos componentes descritos en *Streptomyces*.

Genes	Cepa	Función	Referencia
<i>afsR</i> <i>afsK</i>	<i>S. coelicolor</i>	Activador de la biosíntesis de antibióticos y factor A Sensor (serina/treonina quinasa)	Matsumoto y col., 1994
<i>cutR</i> <i>cutS</i>	<i>S. lividans</i>	Activador de proteína(s) de transporte de cobre Sensor (histidina quinasa)	Tseng y Chen, 1991
<i>afsQ1</i> <i>afsQ2</i>	<i>S. coelicolor</i>	Activador de factor A, actinorrodina y undecilprodigiosina Sensor (histidina quinasa)	Ishizuka y col., 1992
<i>dnrI</i> <i>dnrJ</i>	<i>S. peucetius</i>	Activador de la biosíntesis de daunorubicina Sensor (proteína quinasa)	Stutzman-Engwall y col., 1992
<i>pkaA</i> <i>pkaB</i>	<i>S. coelicolor</i>	Proteína quinasa (Ser/Thr) y factor transcripcional Proteína quinasa (Ser/Thr)	Urabe y Ogawara, 1995

La comparación de la proteína DnrI de *S. peucetius* con otras proteínas de la base de datos ha mostrado similitud con el producto de los genes *actII-orf4* y *redD-orf1* de *S. coelicolor*. En base a la comparación y al hecho de que el gen *dnrI* es capaz de complementar un mutante *actII* de *S. coelicolor*, se ha considerado a los dos genes descritos como posibles efectores de un sistema de este tipo (Stutzman-Engwall y col., 1992). La proteína reguladora de la expresión de los genes biosintéticos de bialafos, BrpA, ha mostrado también similitud en su región carboxilo con transmisores de respuesta (o activadores transcripcionales), aunque no se ha identificado ninguna proteína quinasa (Raibaud y col., 1991).

Estudios realizados por Hong y col. (1993) han demostrado la existencia de múltiples proteínas que pierden la capacidad de fosforilarse en presencia de inhibidores de proteínas quinasas de eucariotas. Se han utilizado como inhibidores la estaurosporina y el radicicol producidos por algunos miembros del género *Streptomyces* y el K-252a producido por *Nocardioopsis*. Los autores han demostrado que concentraciones no letales de estas drogas inhiben la morfogénesis, especialmente la formación de micelio aéreo y la formación de metabolitos secundarios en *S. griseus*, del mismo modo que ocurre con hongos filamentosos. Estos estudios permiten sugerir a los autores que el proceso de diferenciación en *Streptomyces* podría estar regulado mediante este tipo de sistema.

1.3. RNA POLIMERASA

La RNA polimerasa es una enzima fundamental para la transcripción de la información génica de DNA a RNA. Durante el proceso de transcripción la RNA polimerasa interviene en las diferentes etapas: unión al promotor, transición del complejo cerrado al complejo abierto promotor-RNA polimerasa, iniciación de la síntesis de RNA, elongación y terminación del transcrito, liberándose el RNA y la RNA polimerasa del DNA (von Hippel y col., 1984).

La caracterización de distintas enzimas RNA polimerasa ha revelado que la más sencilla es la del bacteriófago T7, capaz de acomodar todas sus funciones en una única subunidad de 110.000 Da. En *E. coli* la holoenzima RNA polimerasa tiene un tamaño de 450.000 Da, unas cuatro veces mayor que las enzimas fágicas. Este incremento de tamaño se atribuye a la necesidad de regular la expresión génica mediante la modulación de reacciones básicas a través de dominios encargados de aceptar e interpretar señales provenientes de numerosos factores reguladores. En eucariotas existen tres RNA polimerasas nucleares y cada una de ellas está formada por 9 a 14 subunidades. La comparación de todas las enzimas RNA polimerasa ha permitido identificar dominios conservados a lo largo de la evolución (Sweetser y col., 1987).

La RNA polimerasa de procariotas se ha purificado en dos formas distintas, el núcleo y la holoenzima. El núcleo de la RNA polimerasa está formado por cuatro subunidades conocidas como α , α' y dos subunidades β , cuyos tamaños para la enzima de *E. coli* son 150.000, 155.000 y 36.500 Da (Chamberlin, 1982). La holoenzima está formada por la asociación del núcleo con un polipéptido denominado factor sigma (σ).

El núcleo ($E=\alpha\alpha'\beta\beta$) puede unirse a distintos factores sigma y cataliza la polimerización de ribonucleótidos en un RNA complementario al DNA molde durante el proceso de elongación. El factor sigma es indispensable para la iniciación de la transcripción ya que le confiere al núcleo la capacidad de reconocer los promotores. Una vez que la holoenzima inicia la transcripción, el factor sigma es liberado y el núcleo elonga el transcrito.

La RNA polimerasa podría asociarse con otras proteínas durante la transcripción. En *E. coli* se ha identificado la proteína omega (ω) que copurifica con el núcleo de la RNA polimerasa (Gentry y Burgess, 1986). En *B. subtilis* se ha identificado la proteína delta (δ) que se une a la RNA polimerasa inhibiendo la transcripción de moldes no específicos (Tjian y col., 1977). Sin embargo, la disrupción de estas dos proteínas no conlleva ningún fenotipo asociado (Lampe y col., 1988).

Otra proteína accesoria es el producto del gen *nusA* de *E. coli*, el cual se asocia con la RNA polimerasa durante la elongación. La proteína NusA induce un cambio conformacional en el núcleo de la enzima que incrementa la interacción entre la subunidad β y el RNA (Zhang y Hanna, 1994). Hay evidencias de que esta proteína provoca pausas en el avance de la RNA polimerasa y participa también en la terminación y antiterminación de la transcripción (Dissinger y Hanna, 1991; Ito y col., 1991; Schmidt y Chamberlin, 1987).

1.3.1. Subunidades del núcleo de la RNA polimerasa: Subunidad

El gen *rpoB* de *E. coli* que codifica para la subunidad β , fue el primer gen identificado para una subunidad de la RNA polimerasa debido a que ciertas mutaciones aportan resistencia a ciertos antibióticos: rifamicinas y estreptovaricinas. Estos antibióticos inhiben la iniciación de la síntesis de RNA por unión directa a la enzima y no al DNA.

La subunidad β posee el sitio catalítico para la formación del enlace fosfodiéster y participa en la mayoría de las actividades conocidas de la RNA polimerasa: interviene en la iniciación, en la elongación, y también actúa en la terminación de la transcripción (Yura e Ishihama, 1979).

La comparación de la secuencia de aminoácidos entre la subunidad β de la RNA polimerasa de *E. coli* y la subunidad de 140.000 Da de la RNA polimerasa II de *Saccharomyces cerevisiae* ha revelado la existencia de nueve dominios conservados. Estos dominios se encuentran separados en la subunidad β por dos zonas no conservadas incluso en especies muy relacionadas, por lo que las zonas

conservadas deben participar en funciones básicas mientras que las no conservadas probablemente actúan en respuestas reguladoras (Sweetser y col., 1987). Estas dos zonas poco conservadas de la subunidad β' se han denominado regiones dispensables I y II (RD-I y RD-II, Figura 1.1), debido a que la delección de estos fragmentos no afecta la actividad polimerasa. La función reguladora de las regiones dispensables se ha demostrado al detectar el sitio de unión del factor *Alc* del bacteriófago T4 en la RD-I. Esta proteína fágica causa la terminación prematura de las cadenas de RNA que tienen como molde el DNA de *E. coli* (Kashlev y col., 1990; Severinov y col., 1994).

Las regiones dispensables dividen la subunidad β' en tres dominios que han sido sobreexpresados independientemente en *E. coli*. La reconstitución enzimática de la RNA polimerasa a partir de las subunidades α , β y β' con los tres dominios purificados de la subunidad β' dan origen a una enzima activa *in vitro*. De estos resultados se ha concluido que la subunidad β' está formada por tres dominios distintos e independientes que no requieren estar unidos covalentemente para su ensamblaje en una RNA polimerasa funcional (Severinov y col., 1995).

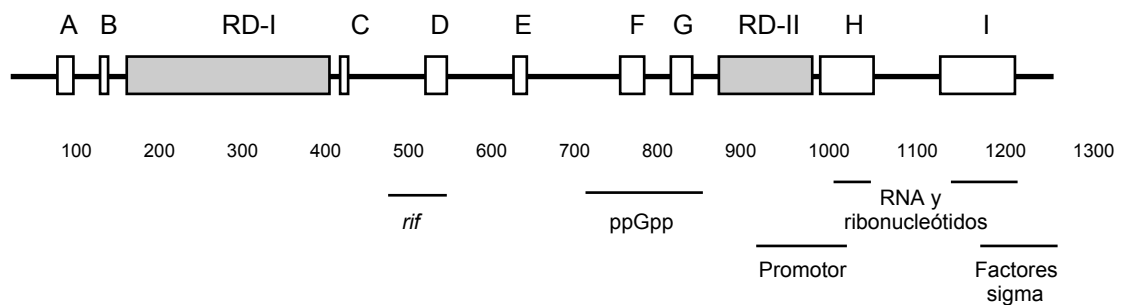


Figura 1.1. Mapa estructural y funcional de la subunidad β' de la RNA polimerasa de *E. coli*. Las cajas blancas (A-I) representan regiones de secuencia altamente conservadas con la RNA polimerasa eucariota (Sweetser y col., 1987). Las cajas grises representan las dos regiones dispensables (RD-I y RD-II). En la parte inferior de la figura se muestra la localización de alteraciones genéticas que afectan la función catalítica de la subunidad β' , lo cual ha permitido identificar los posibles sitios de unión de la rifampicina (*rif*, Lisityn y col., 1988), del efector de respuesta estricta (*ppGpp*; Glass y col., 1986a), de la cadena de RNA que sintetiza la holoenzima y los ribonucleótidos (Lisityn y col., 1988). Se señalan también las zonas propuestas de interacción con promotores y con factores sigma (Glass y col., 1986c).

Algunas funciones de la subunidad β' han sido asociadas con dominios del polipéptido según se muestra en la Figura 1.1. La región comprendida entre los aminoácidos 500 y 575, podría estar relacionada con la unión de rifampicina (Ovchinnikov y col., 1983). La unión de la cadena de RNA en formación y los ribonucleótidos trifosfato correspondería a las zonas comprendidas entre 1063-1112 y 1213-1296 (Lisityn y col., 1988). La región comprendida entre los aa 750-900 es la zona de unión del efector *ppGpp* (Glass y col., 1986a) y los aminoácidos entre 965-1080 podrían colaborar en interacción con promotores (Glass y col., 1986b).

La delección de los últimos 100 aminoácidos de la subunidad β' no altera el ensamblaje de las subunidades que forman el núcleo de la RNA polimerasa, pero afecta la formación de la holoenzima. Estos resultados sugieren que la zona se relaciona con la interacción entre la subunidad β' con factores sigma (Glass y col., 1986c; Glass y col., 1988).

1.3.2. Subunidad β

El gen *rpoC* que codifica para la subunidad β se encuentra adyacente a *rpoB* en el cromosoma de *E. coli* (Nakamura y Yura, 1973). Ambos se encuentran formando parte de un operón con otros genes que codifican para las proteínas ribosómicas de la subunidad 50S: L11, L1, L10 y L7/L12. En *Streptomyces* los genes *rpoB* y *rpoC* no han sido caracterizados; sin embargo, dan señal de hibridación positiva con una región del cromosoma cercana al operón *rrnA* y en esa zona se localiza la mutación *rifA* que confiere resistencia a rifampicina (citado en van Wezel y col., 1995).

σ es la subunidad de carácter más básico de la RNA polimerasa, siendo capaz de unirse a polianiones como heparina. Esta propiedad se ha relacionado con la afinidad inespecífica al DNA que tiene el núcleo de la RNA polimerasa (Fukuda e Ishihama, 1974). Durante la terminación de la transcripción la subunidad σ interacciona con un dominio rico en argininas de la proteína NusA (Ito y col., 1991).

La comparación de las secuencias de aminoácidos de la subunidad σ de *E. coli* y la subunidad de mayor tamaño de la RNA polimerasa de levaduras ha mostrado ocho regiones con similitud, denominadas A-H en la Figura 1.2 (Jokerst y col., 1989; Weilbaecher y col., 1994).

La región A tiene un dominio de tipo *zinc finger* y se ha relacionado con la transcripción a través de secuencias terminadoras (Borukhov y col., 1991a; Clerget y col., 1995).

La región C, comprendida entre los aminoácidos 311 y 386, podría ser la región que contacta con el DNA molde, con el transcrito o con ambos. Esta funcionalidad se deduce de la similitud de esta región con la DNA polimerasa I de *E. coli* (Allison y col., 1985; Weilbaecher y col., 1994).

La región F tiene similitud con una región de la RNA polimerasa II que al ser mutada confiere resistencia a amanitina. En la RNA polimerasa sensible, la amanitina permite la incorporación de 1 a 8 nucleótidos antes de bloquear la elongación de la cadena de RNA. Por ello esta región podría tener alguna función en la traslocación de la enzima a lo largo del DNA (Bartolomei y Corden, 1987).

La región G es una zona de contacto con el extremo 3' del RNA mensajero, según se ha determinado por experimentos de *cross-linking* (Borukhov y col., 1991b).

La zona del polipéptido localizada entre las regiones G y H se encuentra deletcionada en la subunidad σ de *Mycobacterium leprae*, por lo que esta región no debe estar asociada a funciones esenciales (Honore y col., 1993).

Se ha caracterizado también una zona que presenta una inserción en los homólogos de la subunidad σ de cianobacterias y cloroplastos y ha sido denominada región E (Hudson y col., 1988; Xie y col., 1989)

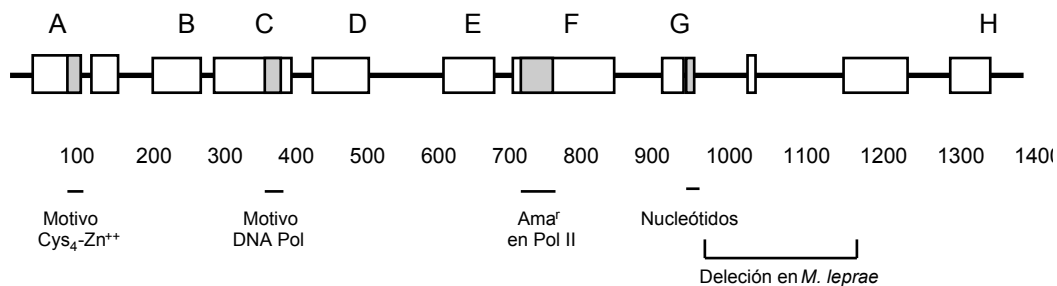


Figura 1.2. Mapa estructural y funcional de la subunidad σ de la RNA polimerasa de *E. coli*. Las cajas blancas (A-H) representan regiones de secuencia conservadas con la subunidad mayor de la RNA Polimerasa II de levaduras (Jokerst y col., 1989). Las cajas grises representan las regiones que tienen una funcionalidad asignada en base a la similitud de secuencia. Las cajas no señaladas con letras son regiones con menor similitud de secuencia descritas por Weilbaecher y col. (1994).

1.3.3. Subunidad

La subunidad σ de la RNA polimerasa está codificada por el gen *rpoA* en *E. coli*, el cual se encuentra separado de los genes *rpoB* y *rpoC* en el genoma. El gen *rpoA* forma parte de un operón con el principal grupo de genes de proteínas ribosomales: S13, S11, S4 y L17 (revisado por Yura e Ishihama, 1979).

La subunidad σ de *E. coli* es una proteína de 329 aminoácidos de longitud y ha sido dividida en dos dominios: el amino terminal (NTD) de 235 aa de longitud, esencial para el ensamblaje del núcleo de la RNA polimerasa y el carboxilo terminal (CTD), esencial para algunas funciones reguladoras.

activación por Fnr, un factor regulador positivo para genes expresados en anaerobiosis (Lombardo y col., 1991). Una mutación en aminoácido 261 del gen *rpoA* de *E. coli* reduce 9 veces la expresión de la β -galactosidasa bajo el promotor del gen *metE*, lo cual sugiere este aminoácido como sitio de contacto del activador MetR (Jafri y col., 1995). Dos mutaciones en los aminoácidos 289 y 290 del gen *rpoA* de *E. coli*, confieren resistencia a la infección por los fagos P2 y P4 debido a la falta de transcripción de los genes tardíos, mediada por las proteínas fágicas Ogr (P2) y (P4) (Sunshine y Sauer, 1975; Ayers y col., 1994).

Otra función de la subunidad σ es el reconocimiento del promotor mediante interacción con secuencias específicas del DNA ricas en adeninas que se extienden aproximadamente unas 20 pb entre las posiciones -40 y -60 y que han sido denominados elementos UP (*upstream*). Esta cadena de adeninas se ha detectado en promotores que se transcriben eficientemente como el *rrnB*-P1 de *E. coli*. Estas regiones funcionan de forma modular, ya que la actividad transcripcional de la RNA polimerasa se incrementa unas 30 veces cuando se inserta en promotores que carecen de ella y disminuye cuando se sustituye por otra secuencia en los promotores que la poseen. La subunidad σ es la proteína de unión específica a esta secuencia, según se ha demostrado mediante ensayos de protección con DNasa I. Además, la función activadora de los elementos UP es independiente de la holoenzima, ya que son activados promotores transcritos por las holoenzimas E^{-70} , E^{-32} y E^{-54} de *E. coli* (Ross y col., 1993).

Estudios de proteólisis parcial de la subunidad σ con endoproteinasas específicas han permitido confirmar que los dos dominios funcionales son también dos dominios estructuralmente separados. El dominio amino terminal (NTD) y el carboxilo (CTD) están unidos mediante una región interdominios que posee entre 13 y 36 amino ácidos. Esta región permite que los dos dominios se encuentren en posiciones diferentes dentro del complejo promotor-RNA polimerasa (Blatter y col., 1994).

1.4. FACTORES SIGMA

El factor sigma es una subunidad de la holoenzima RNA polimerasa que le confiere la capacidad de reconocer los sitios de iniciación de la transcripción (promotores) de un modo específico. Las funciones bioquímicas de los factores sigma incluyen las siguientes actividades: unión al núcleo de la RNA polimerasa, reconocimiento de la secuencia promotora, interacción con proteínas reguladoras y además podrían estar involucrados en la separación de las dos cadenas de DNA para la formación de la burbuja de transcripción. El factor sigma se une al núcleo de la RNA polimerasa durante el proceso de iniciación y es liberado una vez alcanzada la fase de elongación (Hermann y Chamberlin, 1988).

El primer factor sigma descrito fue la subunidad sigma principal en *E. coli* (σ^{-70}) (Burgess y col., 1969). Esta subunidad está codificada por el gen *rpoD* que se encuentra formando parte de un operón con los genes *rpsU* y *dnaG* que codifican para las proteínas iniciadoras de la síntesis de proteínas y DNA. El gen *rpoD* se encuentra separado en el genoma de los genes que codifican para el núcleo de la enzima (Burton y col., 1981; 1983).

La existencia de múltiples factores sigma en bacterias, que actúan como reguladores génicos y fue propuesta por Burgess y col. en 1969, en base a la caracterización de σ^{-70} y a la existencia de secuencias promotoras diversas. Este hecho se confirmó en *B. subtilis* cuando Haldewang y Losick (1980) demostraron que el factor σ^{-37} , ahora denominado σ^B , transcribía el promotor *spoVG* en ausencia del factor sigma principal (σ^A). Actualmente se conocen 10 factores sigma diferentes en *B. subtilis*, que es el microorganismo con mayor número de factores sigma caracterizados (revisado por Haldewang, 1995).

La producción de factores sigma alternativos es un mecanismo para la regulación coordinada de la expresión génica. La sustitución de un factor sigma por otro permite reprogramar la RNA polimerasa hacia la expresión selectiva de un conjunto concreto de genes. Por ejemplo, factores sigma que dirigen el control de la esporulación en *B. subtilis* (Losick y Pero, 1981), la regulación del fago SP01 en *B. subtilis* (Tjian y Pero, 1976), el desarrollo del fago T4 en *E. coli* (Kassavetis y Geiduschek, 1984), utilización de nitrógeno en bacterias entéricas (Hirschman y col., 1985; Hunt y Magasanik, 1985) y la producción de proteínas de choque térmico (*heat-shock*) en *E. coli* (Grossman y col., 1984).

En especies del género *Streptomyces* la diferenciación morfológica a menudo coincide con la biosíntesis de antibióticos (Chater, 1984). La correlación temporal entre la diferenciación morfológica y bioquímica podría indicar la existencia de mecanismos comunes para la regulación de genes necesarios en ambos procesos; de hecho, mutaciones simples o únicas pueden dar lugar a deficiencias en ambos fenotipos (Chater, 1984). La primera evidencia de múltiples factores sigma en *Streptomyces* fue presentada por Westpheling y col. en 1985.

1.4.1. Agrupación de los factores sigma. Familias ⁷⁰ y ⁵⁴

La identificación, caracterización y análisis de secuencias génicas de varios factores sigma han revelado la existencia de dos familias con muy poca similaridad entre ellas: la familia ⁷⁰ y la familia ⁵⁴. La familia ⁷⁰ incluye los polipéptidos que presentan similitud con el factor RpoD ó ⁷⁰ de *E. coli*, cuya estructura se describe en el apartado 1.4.2. Los miembros de esta familia se han clasificado en principales y alternativos. Se denominan factores sigma principales a los encargados de expresar los genes de mantenimiento del metabolismo celular y son responsables de la mayor parte de la síntesis de RNA durante el crecimiento exponencial. Estos son esenciales para la bacteria, ya que su delección es letal.

Los factores sigma principales de diversas bacterias son muy similares en secuencia y presentan al menos un 50 % de aminoácidos idénticos. Las regiones más conservadas coinciden con las zonas de reconocimiento de las cajas -10 y -35 del promotor. La similitud en estas regiones explica que los factores sigma principales reconozcan secuencias promotoras similares a la secuencia consenso de *E. coli* (Lonetto y col., 1992).

Los factores sigma alternativos intervienen en el control de genes que se expresan en respuesta a situaciones ambientales concretas, como los genes expresados en choque térmico, genes flagelares para quimiotaxis, condiciones que provocan la esporulación y otros. Este grupo de factores sigma es ligeramente divergente de los factores sigma principales, ya que mediante alineamiento de secuencias se ha observado que comparten como máximo un 27% de aminoácidos idénticos. Lonetto y col. (1992) han establecido un grupo intermedio en el cual se incluyen factores sigma que presentan una identidad en aminoácidos superior al 50% con los factores sigma principales, pero que son dispensables para el crecimiento.

La familia ⁵⁴ esta constituida por un grupo de factores sigma alternativos que controlan los procesos de asimilación y fijación de nitrógeno, transporte de ácidos dicarboxílicos, algunos procesos de oxidación, utilización de alginato y formato, degradación de compuestos aromáticos y formación de pilus (revisado por Kustu y col., 1989; Thöny y Hennecke, 1989).

Existen diferencias significativas entre las dos familias de factores sigma. Los factores sigma de la familia ⁵⁴ se unen a la secuencia promotora del DNA en ausencia del núcleo de la RNA polimerasa (Buck y Cannon, 1992), mientras que los de la familia ⁷⁰ tienen que estar asociados al núcleo de la RNA polimerasa para unirse al DNA (Hermann y Chamberlin, 1988).

En cuanto a la secuencia de reconocimiento, la holoenzima E ⁵⁴ interacciona con secuencias promotoras que presentan dos cajas muy próximas centradas alrededor de las posiciones -12 y -24 del sitio de inicio de la transcripción, mientras que la holoenzima E ⁷⁰ reconoce cajas centradas en las posiciones -10 y -35 (Cannon y col., 1995; Hawley y McClure, 1983; Harley y Reynolds, 1987).

A diferencia de E ⁷⁰, la holoenzima E ⁵⁴ una vez unida al promotor y formado el complejo cerrado de transcripción, requiere de una proteína activadora que se une entre las posiciones -100 y -200 para su isomerización a complejo abierto. Dicha proteína proporciona la energía necesaria, mediante hidrólisis de ATP, para formar el complejo transcripcionalmente activo (Morett y Segovia, 1995).

Las diferencias funcionales existentes entre ⁷⁰ y ⁵⁴ se reflejan en su estructura primaria, ya que no existe similitud de secuencia entre los factores sigma de las dos familias, lo que indica que tienen un origen diferente. Además, se han encontrado en los factores ⁵⁴ varios dominios comunes en factores de transcripción de eucariotas como *leucine zippers* y regiones ricas en glutaminas (Sasse-Dwight y Gralla, 1990).

1.4.2. Estructura de los factores sigma de la familia ⁷⁰

Mediante la comparación de la secuencia de proteínas de la familia ⁷⁰ se han identificado cuatro regiones conservadas, que han sido divididas a su vez en subregiones (Figura 1.4).

La **región 1** se ha dividido en las subregiones 1.1 y 1.2. La subregión 1.1 se encuentra presente sólo en factores sigma principales y es variable en cuanto a tamaño y a secuencia. La región 1.2 está conservada entre los factores sigma principales y existe en algunos factores sigma alternativos. La región 1 evita la unión del factor sigma libre a los promotores al solapar con las regiones de la proteína que se unen al promotor. Estas regiones quedan expuestas al unirse el factor sigma al núcleo de la RNA polimerasa mediante un cambio conformacional (Dombroski y col.1992;1993).

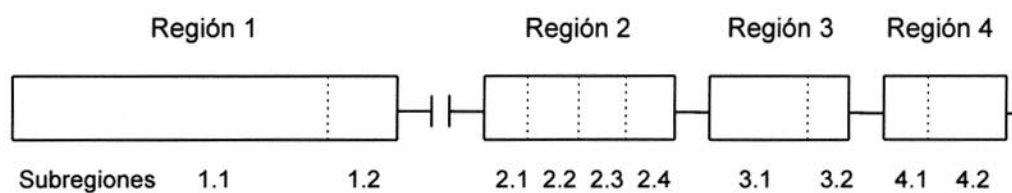


Figura 1.4. Mapa de las regiones y subregiones de los factores sigma pertenecientes a la familia ⁷⁰. Las cajas blancas señaladas con línea continua representan las cuatro regiones principales y las subregiones se presentan separadas por líneas discontinuas. La línea horizontal representa zonas de secuencia que no están conservadas y la zona interrumpida significa que fragmentos de secuencia de mayor o menor tamaño están ausentes en algunos sigmas principales.<

La **región 2** se ha dividido en cuatro subregiones: 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 y es la zona más conservada de todo el polipéptido. La subregión 2.1 contiene principalmente aminoácidos hidrófobos y básicos, estando posiblemente implicada en la unión del factor al núcleo de la RNA polimerasa (Lesley y Burgess, 1989).

La subregión 2.2 es la zona más conservada entre todos los factores sigma pero se desconoce su función. La subregión 2.3 se caracteriza por la presencia de aminoácidos aromáticos. Esta subregión y la 2.1 podrían contribuir a la relajación de las cadenas de DNA. Esta función se ha atribuido al factor sigma debido a que la unión de la holoenzima (pero no del núcleo) provoca la relajación en el DNA permitiendo la separación de las hebras del DNA (Wang y col.,1977; Jones y Moran, 1992; Juang y Helmann, 1994). El mecanismo de relajación puede ser a través de la interacción de los aminoácidos aromáticos con las bases del DNA y de las cadenas laterales de arginina o lisina con la cadena de azúcar-fosfato del DNA (Brayer y McPherson, 1983; Merrill y col., 1984; Helmann y Chamberlin, 1988).

La subregión 2.4 se caracteriza por la presencia de residuos hidrófobos localizados cada cuatro aminoácidos y algunos residuos básicos. La función de la región 2.4 es el reconocimiento de la región -10 de los promotores. Este hecho se ha demostrado en varios estudios genéticos que identifican los aminoácidos de la región 2.4 que interaccionan específicamente con los nucleótidos de la región -10 de promotor (Siegele y col., 1989; Zuber y col., 1989; Waldburger y col., 1990; Daniels y col., 1990). Los factores sigma principales de *E. Coli* y *B. Subtilis* presentan casi un 100% de identidad en esta subregión y reconocen la misma secuencia consenso. Por el contrario, otros factores sigma que reconocen distintas secuencias -10, presentan poca similitud en esta región. La estructura secundaria predicha para la región 2.4 es una α -hélice anfipática que no tiene semejanza con otros dominios de unión a DNA (Gribskov y Burgess, 1986).

La **región 3** se ha dividido en las subregiones 3.1 y 3.2, la primera de ellas comparte una débil semejanza con dominios hélice-giro-hélice de unión a DNA y la segunda se encuentra conservada en los factores sigma principales, pero está ausente en factores sigma alternativos. Todavía no se conoce la función de esta región.

La **región 4** se ha dividido en las subregiones 4.1 y 4.2. La subregión 4.1 parece ser una hélice anfipática, mientras que la región 4.2 tiene una secuencia similar a dominios de unión a DNA hélice-giro-hélice (Helmann y Chamberlin, 1988). La región 4.2 está muy conservada en los factores sigma principales y su función es el reconocimiento de la región -35 de los promotores (Kenney y col., 1989; Siegele y col., 1989; Waldburger y col. 1990)

1.4.3. Factores sigma en *Streptomyces*

Los primeros factores sigma identificados en *Streptomyces* fueron los polipéptidos ³⁵, ³⁷ y el ⁴⁹. (Westphelling y col., 1985). Estos factores se identificaron mediante estudios de transcripción *in vitro* utilizando dos promotores bien caracterizados de *B. Subtilis*: *Pveg* y *Pctc*. Los autores demostraron que la RNA polimerasa con un polipéptido de 35.000. Da transcribía eficientemente el promotor del gen *veg*, que posee la secuencia consenso de promotores principales procariotas y es reconocido por los factores sigma principales de *E. Coli* y de *B. Subtilis*. Las holoenzimas E ³⁷ y E ⁴⁹ transcriben el promotor *ctc*, que es reconocido por E ^B de *B. Subtilis*. La holoenzima E ⁴⁹ reconoce también el promotor del gen *endoH* de *Streptomyces plicatus*.

Estudios de la transcripción del gen *dagA* de *S. Coelicolor*, que codifica para una agarasa extracelular (Kendall y Cullum, 1984), demostraron que este gen está sujeto a una compleja regulación transcripcional, ya que posee cuatro o cinco promotores distintos (Parro y Mellado, 1993). Los promotores *dagAp3* y *dagAp4* son transcritos por las holoenzimas E ⁴⁹ (también descrito en la literatura como E ⁵²) y E ³⁵ previamente descritas por Westpheling. Los estudios con el promotor *dagAp2* permitieron identificar una nueva holoenzima E ²⁸ y la holoenzima que transcribe el promotor *dagAp1* permanece sin caracterizar (Buttner y col., 1988)

El operón de la galatosa de *S. Coelicolor* (Fornwall y col, 1987) también ha sido estudiado desde el punto de vista transcripcional. Este operón está controlado por dos promotores: *galp1* y *galp2*, siendo el primero inducible por galactosa y reprimible por glucosa y el segundo constitutivo. La similitud de secuencia entre el promotor *galp2* y el promotor *dagAp2* sugiere que podría estar controlado por la holoenzima E ²⁸. La holoenzima que transcribe el promotor *galp1* aún no ha sido identificada (Westpheling y Brawner, 1989).

La introducción de la genética en el estudio de los factores sigma comenzó en 1988, cuando el grupo de Takahashi diseñó un oligonucleótido de 29 bases denominado *caja rpoD*. La secuencia fue deducida a partir del subdominio B (equivalente a las subregiones 2.3 y 2.4 descritas por Lonetto y col., 1992) que se encuentra muy conservada en los factores sigma principales de *E. coli* y *B. subtilis* (Figura 1.5). Con este oligonucleótido se encontraron cuatro señales de hibridación positiva en el genoma de *S. coelicolor* (Tanaka y col., 1988), que correspondían a cuatro genes homólogos a *rpoD*, por lo que se denominaron genes *hrdA*, *B*, *C* y *D* (Buttner y col., 1990; Tanaka y col., 1991; Shiina y col., 1991).

Mediante experimentos de interrupción génica se han obtenido mutantes en los genes *hrdA*, *hrdC* y *hrdD*. Estos mutantes no presentaron ningún fenotipo alterado en cuanto a morfología, diferenciación y producción de antibióticos. La imposibilidad de obtener mutantes *hrdB* hizo suponer a los autores que era esencial, por lo que se ha considerado el factor sigma principal de *S. coelicolor* (Buttner y col., 1990). Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que este gen está presente en todas las especies de *Streptomyces* examinadas, mientras que el gen *hrdC* está ausente al menos en *S. griseosporus* y en *S. griseus*. Este último carece también del gen *hrdA* (Takahashi y col., 1988).

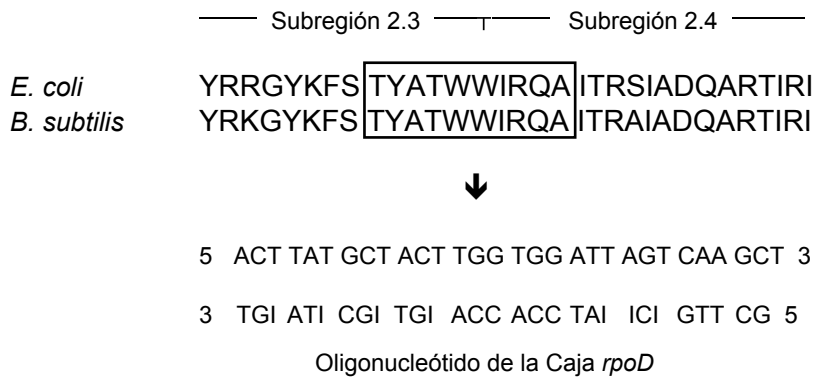


Figura 1.5. Oligonucleótido de la caja *rpoD* diseñado a partir del subdominio B por Tanaka y col., (1988). Los aminoácidos conservados en *E. coli* y *B. subtilis*, a partir de los cuales se diseñó el oligonucleótido se muestran encerrados en un rectángulo. El subdominio B incluye parcialmente las subregiones 2.3 y 2.4 definidas según Lonetto y col. (1992) y se indican en la parte superior de la figura.

La transcripción del promotor *dagAp4* de *S. coelicolor* y la del promotor *veg* de *B. subtilis* fue caracterizada y se asoció a un polipéptido de 66 kDa. La secuenciación del extremo amino terminal de dicha proteína demostró que correspondía al factor sigma codificado en el gen *hrdB*. El polipéptido de 35 kDa responsable de la transcripción de los mismos promotores según Westpheling, podría corresponder al producto de otro gen que se expresa en condiciones diferentes o bien un fragmento generado por proteólisis de la proteína HrdB (Brown y col., 1992).

La purificación del factor ²⁸ de *S. coelicolor* ha permitido clonar el gen *sigE* a partir de un oligonucleótido deducido a partir de la secuencia amino terminal. La proteína SigE comparte similitud de secuencia con el factor ^E de *E. coli*, con la proteína AlgU de *Pseudomonas aeruginosa*, la proteína CarQ de *Myxobacteria xanthus* y otras proteínas que habían sido identificadas previamente como reguladores positivos. La similitud se extiende a lo largo de las cuatro regiones de los factores sigma, siendo las más divergentes la subregión 2.4 y la región 3 (Lonetto y col., 1994).

Las proteínas similares a SigE tienen funciones extracitoplasmáticas y actúan como efectores moleculares que responden a señales generadas fuera de la membrana, recordando a los sistemas de transducción de señal. Las secuencias promotoras reconocidas por las proteínas AlgU, CarQ y SigE de *S. coelicolor* están conservadas en la región -35 y en menor grado en la región -10, lo cual concuerda con la divergencia existente en los alineamientos de la región 2.4. De acuerdo con las semejanzas en la estructura primaria de las proteínas, en la secuencia de reconocimiento y en las funciones, Lonetto y col. (1994) proponen incluir todas estas proteínas en una nueva subfamilia de factores sigma denominada ECL (*Extracytoplasmic function*).

Otro factor sigma perteneciente a la familia ⁷⁰ que se describió en *S. coelicolor* es el codificado por el gen *whiG*. El gen *whiG* interviene en el inicio de la esporulación, pero no parece ser necesario para la expresión de genes de producción de antibióticos. Su sobreexpresión produce una temprana y superabundante esporulación a partir del micelio vegetativo (Chater y col., 1989c).

En cuanto a su secuencia WhiG posee un 38% de identidad en aminoácidos con ^D o ²⁸ de *B. subtilis* y con los factores ^F de *S. typhimurium* y *P. aeruginosa* (Ohnishi y col., 1990; Starnbach y Lory, 1992; Helmann y col., 1988). Las cuatro proteínas poseen 57 aminoácidos idénticos de un total de 278 residuos, los cuales se encuentran muy conservados en las regiones 2.4 y 4.2, que como se ha mencionado anteriormente, interaccionan con las regiones -10 y -35 de los promotores. Las proteínas similares a WhiG dirigen la transcripción de la RNA polimerasa desde el regulón de motilidad y quimiotaxis (Chater y col., 1989c; Buttner, 1989). Se han caracterizado dos promotores dependientes de WhiG, el *PTH4* y el *PTH270*. Estos promotores presentan similitud en la región -10 con los promotores transcritos por ^D de *B. subtilis* y con los de ^F de *S. typhimurium* y de *P. aeruginosa* (Tan y Chater, 1993).

Genes homólogos a *whiG* están presentes en todas las especies de *Streptomyces* examinadas mediante la técnica de *Southern*, así como en otros géneros de actinomicetos que esporulan a partir de micelio aéreo. No se ha obtenido señal de hibridación en actinomicetos que no forman micelio aéreo como *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Actinoplanes* (Soliveri y col., 1993).

Recientemente se ha caracterizado el gen *sigF* de *S. aureofaciens* y de *S. coelicolor*. Este gen se ha clonado mediante hibridación con un oligonucleótido degenerado diseñado a partir del motivo GLI(KDNE)A de la región 2.2 de los factores sigma de la familia ⁷⁰. El producto del gen *sigF* presenta considerable similitud con el factor sigma SigB de *B. subtilis* en las regiones 2.4 y 4.2. La interrupción génica del gen *sigF* ocasiona el fenotipo *whi*, lo que sugiere que este factor sigma controla los estados tardíos de la formación de esporas en *Streptomyces*, así como la producción de pigmentos asociados con esporas codificados por el locus *whiE* (Potuckova y col., 1995).

La expresión del gen *WhiG* precede a la de *SigF*. No se han detectado secuencias promotoras reconocidas por *WhiG* delante del gen *sigF*, por lo que podría existir otro factor sigma aún no identificado que transcriba *sigF* (Potuckova y col., 1995).

Kato y col. (1995) han descrito el gen *crtS* que tiene gran similitud con el ^B de *B. subtilis* y en menor grado con ^F y ^G de *B. subtilis* y *WhiG* de *S. coelicolor*. Este nuevo factor sigma ha sido identificado por su capacidad de inducir la biosíntesis de carotenoides en una cepa de *Streptomyces setonii* no productora de dichos pigmentos.

1.5. ANTI-SIGMAS

La esporulación de *B. subtilis* es el ejemplo más estudiado de la utilización de factores sigma alternativos que permiten la expresión secuencial de genes. Durante la esporulación de *B. subtilis* se sustituye un factor sigma por otro transcribiendo de esta manera el grupo de genes que permiten pasar al siguiente estadio (revisado por Errington, 1993). Para reprogramar la RNA polimerasa es necesario que se sintetice un nuevo factor sigma y que se inactive otro. Para inactivar el factor sigma que ya no es necesario intervienen proteínas capaces de unirse de forma específica al factor sigma impidiendo la transcripción de los genes que están bajo su control y que por su función se han denominado anti-sigmas.

Se ha propuesto un mecanismo molecular en el cual el anti-sigma actuaría mediante su unión al factor sigma respectivo impidiendo que este se asocie con el núcleo de la RNA polimerasa o bien induciendo un cambio conformacional de la holoenzima que no le permita iniciar la transcripción (revisado por Brown y Hughes, 1995).

El primer anti-sigma descrito fue la proteína AsiA del bacteriófago T4 de *E. coli*. Inicialmente AsiA se encontró como un inhibidor de la holoenzima E ⁷⁰ que permitía al factor sigma del fago T4 redirigir a la RNA polimerasa hacia la transcripción de los promotores tardíos del bacteriófago (Kassavetis y Geiduschek, 1984; Orsini y col., 1993).

En *B. subtilis* se han caracterizado dos anti-sigmas, uno de ellos involucrado en el proceso de esporulación, el SpoIIAB, que inhibe a los factores ^F y ^G (Min y col., 1993; Partridge y col., 1991) y el anti-sigma RsbW, que regula negativamente el factor sigma general de estrés ^B (Benson y Haldenwang, 1993). Estos dos anti-sigmas se encuentran a su vez regulados de un modo similar, mediante la presencia de los factores anti anti-sigma SpoIIAA y RsbV que interaccionan con los anti-sigmas respectivos (SpoIIAB y RsbW) evitando su asociación con los factores sigma y permitiendo la transcripción (Margolis y col., 1991; Dufour y Handelwang, 1994).

En *S. typhimurium* se ha descrito un anti-sigma denominado FlgM, que fue identificado como un regulador negativo de la actividad transcripcional del factor sigma específico de flagelos *FliA* (Gillen y Hughes, 1991a; 1991b). Existen evidencias de la existencia de anti-sigmas en la regulación de la expresión de los genes de biosíntesis de alginato en *P. aeruginosa* (Goldberg y col., 1993).

1.6. OBJETIVO DEL PRESENTE TRABAJO

El proyecto de la presente tesis doctoral se enmarcó dentro de una de las líneas de investigación del Area de Microbiología: la caracterización de la expresión génica de promotores regulados por fosfato, cuyo interés básico se centraba en el hecho bien conocido de que la producción de numerosos antibióticos y enzimas extracelulares se encuentra drásticamente inhibida por fosfato (Martín, 1989). Los modelos mejor estudiados en el departamento son la biosíntesis de candicidina y las enzimas extracelulares la α -amilasa y la fosfatasa alcalina de *S. griseus* IMRU 3570. Uno de los genes biosintéticos, el gen *pabS* (actualmente denominado *pabAB*), que codifica para la enzima paba sintasa había sido clonado (Gil y Hopwood, 1983) y se había demostrado su regulación por fosfato a nivel transcripcional (Asturias, 1991). Se disponía también de otras secuencias promotoras reguladas por fosfato: el P₁₁₄ cuyo producto génico se desconoce (Asturias, 1991), el promotor del gen *pabS* y el promotor del gen *saf*, cuyo producto génico estimula la producción de enzimas extracelulares (Daza y col., 1990).

Con el fin de estudiar los mecanismos involucrados en la expresión génica de dichos promotores se planteó como objetivo la caracterización de la holoenzima que dirige su transcripción. Por ello nos planteamos comenzar este trabajo con la purificación de la RNA polimerasa de *S. griseus*, la identificación de holoenzimas y la caracterización de factores sigma que permitiesen llevar a cabo estudios de transcripción *in vitro*.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. REACTIVOS

2.1.1. Reactivos Químicos y Bioquímicos

La mayoría de los reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos a una de las siguientes casas comerciales:

Aldrich Química, Madrid, España.	New England Biolabs, Beverly, USA.
Amersham Ibérica, Madrid, España.	Oxoid, Madrid, España.
BDH Chemicals, Poole, Gran Bretaña.	Panreac, Barcelona, España.
Beecham, Toledo, España.	Pharmacia, Madrid, España.
Biomerieux, Charbonnières-les-bains, Francia.	Probus, Badalona, España.
Bio-Rad Laboratories, Madrid, España.	Promega, Madison, USA.
Boehringer Mannheim, Barcelona, España.	Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania.
Difco, Detroit, USA.	Sigma Química, Madrid, España.
Farmitalia Carlo Erba, Madrid, España.	Stratagene, La Jolla, USA.
Gibco BRL, Eggenstein, Alemania.	Upjohn Farmoquímica, Alcalá de Henares, España.
Merck, Darmstadt, Alemania.	US Biochemicals, Cleveland, USA.

2.1.2 Reactivos Específicos para Biología Molecular

A) Acidos Nucleicos

Marcadores de peso molecular como DNA del bacteriófago Lambda digerido con *Hind* III o DNA del bacteriófago X174 digerido con *Hae* III se adquirieron a Gibco BRL o a Boehringer Mannheim (marcador VI).

Los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por Eurogentec, Bélgica. Sus secuencias fueron las siguientes:

Oligonucleótido	Descripción
5'-CGCCTGCCGGATCCACCAGGT-3'	Sonda para el aislamiento de clones portadores de los genes <i>hrd</i>
5'-TGTCGGCCAGCACATCC-3'	Amplificación por PCR el gen <i>hrdB</i> para su expresión en <i>E. coli</i>
5'-AAGCTTCTAGTCGAGGTAGTC-3'	
5'-TGGCAACCCGTGCCGTC-3'	Amplificación por PCR el gen <i>hrdD</i> para su expresión en <i>E. coli</i>
5'-AAGCTTTCAGGCCGCTGCGTC-3'	
5'-TGCAGACCAGGCCCCCT-3'	Amplificación por PCR el gen <i>hrdT</i> para su expresión en <i>E. coli</i>
5'-AAGCTTTCAGTCCAGATAGCC-3'	

B) Antibióticos

La ampicilina se adquirió como preparado farmacéutico Britapén de Beecham S.A. (Toledo). La tetraciclina y la kanamicina fueron obtenidas de Sigma Química. La espectinomicina se obtuvo como el preparado Kempí de Upjohn Farmoquímica S.A. (Alcalá de Henares). La tioestreptona se obtuvo del Squibb Institute for Medical Research, New Brunswick, USA y la rifampicina, de Boehringer Mannheim.

C) Enzimas

En este apartado se incluyen las enzimas usuales en los protocolos de biología molecular: Enzimas de restricción, DNasa I de páncreas bovino, RNasa A de páncreas bovino, proteinasa K, lisozima, polinucleótido quinasa, DNA polimerasa I de *E. coli*, fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, DNA polimerasa de T7 (Sequenase), nucleasa S1, fosfatasa alcalina de intestino de ternero y DNA ligasa de T4. Los principales proveedores de estas enzimas fueron:

Amersham Ibérica S.A., Madrid.
Boehringer Mannheim, Barcelona España.
Farmacia, Madrid.
Promega, representada por Ingelheim Diagnóstica y Tecnología S.A., Barcelona.
New England Biolabs (USA), representada por Landerdiagnóstico S.A. Madrid

D) Isótopos Radiactivos

Los compuestos marcados isotópicamente utilizados fueron los siguientes nucleótidos:

[^{-32}P]dATP (>5000 Ci/mol; 10 mCi/ml) para marcaje terminal de DNA.
[^{-32}P]dCTP (3000 Ci/mol; 10 mCi/ml) para marcaje uniforme de DNA
[^{-32}P]CTP (3000 Ci/mol; 10 mCi/ml) para ensayos de transcripción *in vitro*.
[^{-35}S]dATP (>1000 Ci/mol; 10 mCi/ml) para secuenciación.

Todos ellos fueron adquiridos a Amersham Ibérica S.A.

E) Kits de Reacción

Se utilizaron conjuntos de reactivos (*kits*) comerciales para las siguientes reacciones:

Marcaje uniforme de DNA por *nick-translation* de Boehringer Mannheim.
Encapsidación *in vitro* de fago lambda, de Amersham.
Deleción unidireccional con Exonucleasa III y S1 *Erase a Base* de Promega.
Secuenciación por SequenaseTM de US Biochemicals, representada por Quimigranel.
Secuenciación con “*Taq Track Sequencing Core System Deaza*” de Promega Co.

2.2. MICROORGANISMOS

2.2.1 Cepas de *Streptomyces*

Streptomyces griseus IMRU 3570, productor de candicidina, procede del Instituto de Microbiología de la Universidad de Rutgers, New Jersey.

Streptomyces lividans JI1326, cepa silvestre procedente del John Innes Institute (Norwich, Gran Bretaña). Se utilizó como huésped en estudios de expresión génica.

Streptomyces acrymicini, *Streptomyces griseus* NRRL 3851, *Streptomyces lipmanii* NRRL 3584 y *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, se utilizaron para aislar el DNA total y utilizarlo como sustrato en ensayos de actividad RNA polimerasa.

2.2.2 Cepas de *Escherichia coli*

Las cepas *E. coli* DH5 y *E. coli* DH5 (Hanahan, 1985) se caracterizan por su elevada eficiencia de transformación, que alcanza en DH5 los 10^9 transformantes por microgramo de DNA monómero de pBR322. *E. coli* DH5 posee una eficiencia algo menor (hasta 5×10^8) pero una delección en el gen *lacZ* la hace susceptible de λ -complementación con plásmidos portadores de dicho gen, pudiendo seleccionarse en ella construcciones recombinantes de estos plásmidos por la pérdida del color azul de las colonias. El genotipo de DH5 es: *RecA*, *endA1*, F^- , *girA96*, *thi-1*, *hsdR17*, (r^- , m^+), *sup44*, Γ , *relA1*, F80d/*lacZ* M15, l(*lacZYA-argF*)U169.

La cepa *E. coli* LE392, F^- , *hsdR514*, (r^- , m^+), *supE44*, *supF58*, *lacY1*, o (*lacIZY*)6, *galk2*, *galT22*, *metB1*, *trp55*, Γ (Murray y col., 1977), es sensible a la infección por el bacteriófago lambda y sus derivados, que provocan su lisis. Se utilizó para el plaqueo de genotecas y para el aislamiento y crecimiento de vectores derivados del fago lambda.

E. coli NM539 es *supF*, *hsdR* (r_k^- , m_k^+) (P2) (Frischauf y col., 1984). La característica fundamental de esta cepa es que permite la selección de fagos recombinantes, ya que se inhibe la replicación del fago cuando éste contiene los genes *red* y *gam* funcionales (presentes en el fragmento de DNA dispensable o *stuffer* de los vectores de sustitución derivados de Lambda). Esta cepa se utilizó como receptora de las reacciones de encapsidación *in vitro* de las mezclas de ligación para la construcción de genotecas.

La cepa *E. coli* WK6, D(*lac-proAB*), *galE*, *strA/F'lac^f*, ZIM15, *proA⁺B⁺* (Kramer y col., 1984) se utilizó para la obtención de DNA de cadena sencilla para secuenciación.

La cepa *E. coli* JM109(DE3), *endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44*, (*lac-proAB*), [F^- , *traD36*, *proAB*, *lac^f* Z M15], (DE3) se utilizó como cepa receptora en los experimentos de expresión de los genes *hrd* en *E. coli*.

2.3. VECTORES DE CLONACION

pBluescript I KS (+) es un vector comercial de la casa Stratagene que deriva de pUC19 mediante una serie de modificaciones que aumentan su utilidad. Posee un sitio de clonación múltiple con cortes únicos para 21 enzimas de restricción diferentes situado entre el promotor y el gen *lacZ*, de modo que la actividad β -galactosidasa es indicadora de la ausencia de insertos; el origen de replicación del fago f1 permite rescatar el plásmido en forma de cadena única o sencilla (DNAss) para secuenciación por el método de terminación de cadena; la disposición de los sitios de clonación con las distintas enzimas a lo largo del policonector facilita la creación de delecciones unidireccionales en

los insertos mediante el uso de Exonucleasa III y nucleasa S1 con el fin de construir clones para secuenciación de zonas internas en insertos grandes.

El origen de replicación de fl y el policonector se presentan en ambas orientaciones. Entre las versiones (+) y (-) varía la orientación del origen de fl de modo que (+) da lugar a la cadena que codifica el gen *lacZ* y (-) a la complementaria; las versiones KS y SK se diferencian en la orientación del policonector respecto del extremo amino terminal del gen de la β -galactosidasa; en la versión KS utilizada la transcripción del gen ocurre desde *KpnI* hacia *SacI* y en SK a la inversa.

pIJ2921: Plásmido derivado de pUC19 tiene un policonector flanqueado por dos sitios *BglII*, lo cual permite recuperar fragmentos de DNA con estos extremos. (cedido por G.R. Janssen).

pULJA31 se utilizó como molde en las reacciones de transcripción *in vitro* para el ensayo de la actividad RNA polimerasa. Contiene los promotores P₁₁₄, los dos promotores del gen de resistencia a tioestreptona y el promotor del gen de resistencia a ampicilina (Asturias, 1991).

pT7-7: Se utilizó para la expresión de los genes *hrd* en *E. coli* bajo el control de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (Tabor y Richardson, 1985).

pIJ702 (Katz y col., 1983) es un plásmido de 5,8 Kb que replica en *Streptomyces* con elevado número de copias. Contiene los genes *tsr* (gen de resistencia a tioestreptona) y *mel* (gen de producción de melanina).

El bacteriófago **M13K07** (Vieira y Messing, 1987) es uno de los fagos auxiliares utilizado para la obtención de DNA de cadena sencilla a partir de DNA de cadena doble de plásmidos portadores del origen de replicación de M13, fl o fd. El gen marcador de resistencia a kanamicina de M13K07 permite una eficaz selección de las células infectadas.

Lambda GEM-12. Vector de sustitución derivado de Lambda que comercializa la casa Promega para la construcción de genotecas genómicas. Sus características son similares a las de EMBL-3 del cual deriva (Frischauf y col. 1984): puede aceptar grandes fragmentos de DNA exógeno (de 9 a 23 kb) eliminando previamente la porción central de DNA dispensable de 13,7 kb. Esta porción dispensable está flanqueada por dos policonectores con sitios de clonaje para las enzimas *SalI*, *SacI*, *NotI*, *XhoI*, *XbaI*, *BamHI* y *EcoRI*, que facilitan la clonación y posterior mapeo y subclonación del inserto.

2.4. MEDIOS DE CULTIVO

2.4.1 Medios de cultivo de *Streptomyces*

Medio YEME con 34% sacarosa (Chater y col., 1982). Su composición es (g/l): extracto de levadura, 3; extracto de malta, 3; bacto-peptona, 5; glucosa, 10; sacarosa, 340. Se esterilizó a 120°C durante 20 min. Para la obtención de protoplastos, una vez estéril, se suplementó con 10 ml de MgCl₂·6H₂O 1M y 24,8 ml de glicina al 20% (p/v).

Medio R2YE (Thompson y col., 1980). Este medio, también conocido como R5, se utiliza para la regeneración de protoplastos. Su composición es (g/l): sacarosa, 103; K₂SO₄, 0,25; MgCl₂·6H₂O, 10,12; glucosa, 10; casaminoácidos, 0,1; solución de elementos traza, 2 ml; extracto de levadura, 5; tampón TES, 5,73; agar, 22. El pH se ajustó a 7,3 con NaOH. Se esterilizó a 120°C durante 20 min y a continuación se añadieron: KH₂PO₄ (0,5% p/v), 10 ml; CaCl₂·2H₂O (5M), 4 ml; L-prolina (20%), 15 ml. La composición de la solución de elementos traza por litro es: ZnCl₂, 40 mg; FeCl₃·6H₂O, 200 mg; CuCl₂·2H₂O, 10 mg; MnCl₂·4H₂O, 10 mg; Na₂B₄O₇·10H₂O, 10 mg; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 10 mg.

Medio YED (Gil y col., 1985). Su composición es (g/l): extracto de levadura, 10; glucosa, 10. El pH se ajustó a 7,2 y se esterilizó a 120°C durante 20 min. Este medio se utilizó para el crecimiento de *Streptomyces griseus*.

Medio SPG (Martín y McDaniel, 1976). Utilizado para la producción de candicidina y fungimicina. Su composición es (g/l): harina de soja (Stanley 4S), 25; glucosa, 60; ZnSO₄, 0,143. El pH se ajustó a 7,5. La glucosa se esterilizó por separado y se añadió posteriormente. Este medio se utilizó para la producción de candicidina.

Medio de esporulación MEY (Hopwood y col., 1985). Su composición es (g/l): maltosa, 10; extracto de levadura, 4; CoCl₂, 0,01; agar, 20. El pH se ajustó a 7,0 y se esterilizó a 120°C durante 20 min. Este medio se utilizó para la esporulación de *S. griseus*.

Medio de esporulación en medio líquido MMT (Daza y col., 1989). Su composición es (g/l): L-asparagina, 0,5 ; K₂HPO₄, 0,5 ; MgSO₄·7H₂O, 0,2 ; FeSO₄·7H₂O, 0,01. El medio se ajustó a pH 7,2 y se esterilizó a 120°C durante 20 min. En condiciones de esterilidad se añade glucosa 50%, 2 ml y tampón TES 5,73% pH 7,2, 10 ml.

2.4.2 Medios de cultivo de *E. coli* y bacteriófagos

Medio Luria Bertani (LB) (Miller, 1972). Su composición es (g/l): Bacto-triptona, 10; extracto de levadura, 5; NaCl, 10. El pH se ajustó a 7,3 con NaOH y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min. Cuando se utilizó como medio sólido se añadieron 7 ó 20 g de agar según su uso.

Medio TB (Maniatis y col., 1982). Su composición es (g/l): bacto-triptona, 12; extracto de levadura, 24; glicerol, 4 ml; KH₂PO₄, 2,5; K₂HPO₄, 12,5. El pH se ajustó a 7,5 con NaOH y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min. Las sales se añadieron por separado después de esterilizar.

Medio 2xTY (Maniatis y col., 1982). Su composición es (g/l): bacto-triptona, 20; extracto de levadura, 10. El pH se ajustó a 7,2 con KOH y se esterilizó a 120°C durante 20 min.

Medio SOB (Hanahan, 1985). Su composición es (g/l): bacto-triptona, 20; extracto de levadura, 5; NaCl, 0,5. El pH se ajustó con KOH a 7,5 y se esterilizó a 120°C durante 20 min. Luego se suplementó con 20 ml de MgSO₄ 1M.

2.4.3. Suplemento de antibióticos en los medios de cultivo

La ampicilina se preparó a una concentración de 200 mg/ml disuelta en agua y se utilizó para la selección de transformantes de *E. coli* a una concentración de 100 µg/ml. La kanamicina se preparó a una concentración de 100 mg/ml y se utilizó a una concentración de 50 µg/ml en medio sólido y 25 µg/ml en medio líquido. La tioestreptona se preparó a una concentración de 50 mg/ml en dimetilsulfóxido y se utilizó a una concentración de 10 µg/ml para la selección de transformantes de *S. lividans*, 25 µg/ml para el crecimiento en medio sólido y 5 µg/ml para el crecimiento en medio líquido.

2.5. CULTIVO Y CONSERVACION DE LOS MICROORGANISMOS

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en placas Petri con medio LB sólido durante 12 h a 37°C. Posteriormente las placas se mantuvieron refrigeradas a 4°C y se sembraron cada dos meses. Alternativamente, para la conservación a medio plazo, las cepas se cultivaron en matraces Erlenmeyer con medio LB líquido durante 16 h a 37°C con agitación orbital a 250 rpm, tras lo cual el cultivo se dividió en alícuotas a las que se añadió un volumen de glicerol al 40% para conservarlas congeladas a -20°C.

Las cepas de *Streptomyces* se sembraron en placas de medio MEY y se incubaron a 30°C durante 5 - 7 días. Las esporas se recogieron añadiendo 5 ml de agua estéril a cada placa y raspando su

superficie con una pipeta de 10 ml. La suspensión así obtenida se filtró a través de algodón hidrófilo estéril (Hopwood y col., 1985). El filtrado se centrifugó durante 10 min a 4500 rpm y el sedimento se lavó dos veces con agua destilada estéril. Finalmente las esporas se resuspendieron en glicerol al 20% y se congelaron a -20°C .

Para conservación mediante liofilización, las cepas de *Streptomyces* se cultivaron en medio R2YE hasta su total esporulación. Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB. Los cultivos se suspendieron en una solución de leche descremada estéril, se dispensaron en viales y se congelaron. Los viales se liofilizaron en un equipo Virtis, a -60°C durante 12-16 horas.

2.6. ENSAYO ENZIMATICO DE LA ACTIVIDAD RNA POLIMERASA

La valoración de la actividad RNA polimerasa se realizó mediante transcripción *in vitro* de un DNA molde midiendo la incorporación de CMP marcado radiactivamente en producto (RNA) precipitable con ácido tricloroacético. En la mayoría de los ensayos se utilizó como molde el vector pULJA31. Para realizar el ensayo de actividad enzimática RNA polimerasa se mezclaron en un volumen total de 50 μl :

Tampón de reacción	25 μl
0,5 pmoles de DNA molde	1 μl
Mezcla de ATP, GTP y UTP cada uno a 10 mg/ml	3 μl
[^{-32}P]CTP (1000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)	1 μl
H ₂ O y preparación a ensayar hasta	50 μl

Esta mezcla se puso a incubar en un baño a 30°C , añadiendo sucesivamente:

- A los 2 minutos, fracción proteica a ensayar (hasta 20 μl)
- A los 4 minutos, 1 μl de solución de heparina (5 mg/ml)
- A los 9 minutos, 5 μl de CTP no radiactivo (15 mg/ml)

La reacción se paró a los 19 minutos introduciéndola en un baño de hielo. Para cuantificar el producto se aplicaron 30 μl de cada reacción a filtros de papel de 2 x 2 cm (Whatman 3MM) y, una vez absorbidas las muestras, se añadieron 500 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 10% a cada filtro para precipitar los ácidos nucleicos. Una vez secos los filtros se realizaron los siguientes lavados:

1. TCA al 10% durante 10 minutos.
2. TCA al 5% durante 5 minutos (2 veces).
3. Etanol al 70% durante 5 minutos.
4. Etanol al 95% durante 5 minutos (2 veces).
5. Acetona durante 5 minutos.

Posteriormente se cuantificó la radiactividad de cada filtro en un contador de centelleo (Phillips, modelo PW4700) y se calculó la actividad enzimática de la muestra. La unidad (*u*) se definió como la cantidad de enzima necesaria para incorporar un pmol de [^{-32}P]CTP en ácidos nucleicos precipitados por mililitro y por minuto.

Tampón de reacción: Para 10 reacciones: 115 μl de tampón 2MM; 30 μl de BSA (libre de RNasa, 10 mg/ml); 6 μl DTT 100 mM; 2 μl EDTA 100 mM; 80 μl glicerol; 17 μl H₂O.

Tampón 2MM: 1,21 g de Tris base; 9,3 mg de Na₂EDTA; 487,2 mg MgCl₂.6H₂O. Se enrasó el volumen a 35 ml con agua, se ajustó el pH a 7,9 con HCl y se añadieron 25 ml de fosfato potásico 4 mM pH 7,5. Se ajustó el pH nuevamente a 7,9 y se llevó a un volumen final de 70 ml. Se filtró, se esterilizó y se guardó congelado a -20°C .

2.7. PURIFICACION DE LA RNA POLIMERASA DE *S. GRISEUS* IMRU 3570

La purificación de la RNA polimerasa se realizó a partir de micelio de *S. griseus* cultivado durante 24 horas en condiciones de fermentación para producción de candidina. Con el fin de obtener micelio suficiente, la fermentación se desarrolló en un fermentador de laboratorio (Bio Flo II, New Brunswick Scientific, N.J.) con 3 litros de medio SPG. Como inóculo del fermentador se utilizaron 300 ml de un cultivo de 24 h en medio YED. La fermentación se mantuvo a 32°C, con una agitación de 250 rpm y un 70% de oxígeno disuelto. Transcurridas 24 horas desde el inóculo, las células se recogieron por centrifugación a 4°C en un rotor GSA (Sorvall, DuPont) a 8.000 rpm durante 15 minutos, y se resuspendieron en tampón de lisis a 4°C (Tris-HCl pH 7.9, 10 mM; glicerol, 10%; EDTA, 1 mM; DTT, 1 mM; KCl, 100 mM; MgCl₂, 10 mM; PMSF, 0,3 mg/ml.).

La lisis se realizó con una prensa de French a una presión de 15.000 psi (libra/pulgada²), clarificando el extracto por centrifugación a 9.000 rpm durante 30 minutos (rotor SS-34). Este sobrenadante o extracto libre de células se utilizó como punto de partida para la purificación enzimática mediante una serie de pasos de fraccionamiento que se describen a continuación, en los que tanto el extracto como las distintas fracciones obtenidas se mantuvieron a 4°C.

2.7.1. Precipitado con Polymin P

La RNA polimerasa se precipitó añadiendo 30 µl de una solución de Polymin P al 10% (BDH Chemicals Ltd, Poole, Gran Bretaña) por mililitro de extracto enzimático (concentración final del 0,3%), se agitó suavemente durante 5 minutos y seguidamente se centrifugó a 9.000 rpm durante 10 minutos en un rotor SS-34 (Sorvall).

El precipitado obtenido se lavó con tampón TGED (Tris-HCl pH 7.9, 10 mM; Glicerol, 10%; EDTA, 1 mM; DTT, 0,3 mM) con 0,3 M de KCl y 0,4 mM PMSF para eluir otras proteínas diferentes de la RNA polimerasa y se centrifugó a 9.000 rpm durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió nuevamente en tampón TGED con 1 M KCl y 0,4 mM PMSF para eluir la actividad RNA polimerasa. La preparación se centrifugó nuevamente a 9.000 rpm durante 10 minutos y se continuó la purificación de la enzima a partir del sobrenadante.

2.7.2. Precipitado con sulfato amónico

Al sobrenadante obtenido en el paso anterior se añadió lentamente un volumen de sulfato amónico disuelto a saturación, cuyo pH fue ajustado a 7,9 con NH₄OH. Se mantuvo la agitación durante 30 minutos y se centrifugó a 9.000 rpm durante 10 min. El precipitado obtenido después de la centrifugación se resuspendió en tampón TGED con 0,1 M KCl.

2.7.3. Cromatografía en columna de filtración en gel

Esta etapa de purificación se realizó utilizando una columna de 100 x 2,6 cm (Pharmacia) que contenía Sephacryl S-300, capaz de separar proteínas en un rango de masa molecular relativa (Mr) comprendido entre 10.000 y 1.500.000 Da. La columna se equilibró previamente con tampón TGED conteniendo 0,1 M KCl. Se aplicaron 3 ml de muestra y se eluyó con el mismo tampón. El flujo fue de 24 ml/h y se recogieron fracciones de 4 ml. La estimación de la proteína eluida se realizó con un detector UV-1 y un registrador REC-1 (Pharmacia). La columna se calibró eluyendo proteínas de peso molecular conocido y estableciendo una relación entre Mr y volumen de elución (Figura 3.4). Las proteínas utilizadas con este fin fueron tiroglobulina (669.000 Da), ferritina (440.000 Da) y catalasa (232.000 Da).

2.7.4. Cromatografía de pseudoafinidad heparina-agarosa

Se utilizó una columna de 20 x 1 cm (Pharmacia) que contenía una matriz de heparina-agarosa (Sigma). La columna se equilibró con tampón TGED con 0,2 M KCl y se aplicó la muestra procedente de la unión de las fracciones con actividad RNA polimerasa procedentes de la columna de Sephacryl S-300. A continuación se lavó con el mismo tampón hasta que se estabilizó la lectura de absorbancia. La enzima se eluyó de la columna con un gradiente lineal del mismo tampón TGED de 0,2 a 0,5 M KCl a un flujo de 18 ml/h.

2.7.5. Cromatografía de afinidad DNA-agarosa

En este paso se utilizó una columna de 4 x 1 cm que contenía una matriz de DNA-agarosa. La columna se equilibró con tampón TGED con 0,1 M KCl y se aplicaron las muestras con actividad procedentes de la columna de heparina-agarosa. A continuación se lavó con el mismo tampón hasta que se estabilizó la lectura de absorbancia y se eluyó la proteína con un gradiente lineal de tampón TGED desde 0,2 M hasta 0,5 M KCl. El flujo de la columna fue de 20 ml/h.

2.8. ESTUDIOS DE TRANSCRIPCION *IN VITRO*

Para la transcripción *in vitro* se sigue el mismo procedimiento descrito para el ensayo de actividad RNA polimerasa con la diferencia de que se realizó una preincubación con la mezcla de reacción, el DNA y la preparación de RNA polimerasa a 30°C durante 5 minutos y que una vez parada la reacción en hielo, se precipitó el RNA dos veces, la primera con 10 µl de la mezcla de precipitación + 60 µl de isopropanol y la segunda con 20 µl de acetato sódico 3M + 200 µl de isopropanol. El precipitado se lavó con etanol 70%, se resuspendió en 10 µl de una solución que contiene 0,5xTBE y urea 10M y se añadieron 2 µl de una solución que contenía: 80% formamida, 0,1% xilencianol, 0,1% azul de bromofenol. La muestra se calentó durante 2 minutos a 90°C y se cargó en un gel de poliacrilamida(8%)-urea 8M. Como marcador de tamaño se utilizó el plásmido pBR322 digerido con *HpaII* marcado radiactivamente mediante rellenado de los extremos con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*.

Mezcla de precipitación: 10 µl de tRNA (10 mg/ml); 40 µl acetato sódico 4 M pH 5; 30 µl de agua

2.9. CUANTIFICACION DE PROTEINAS

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Bradford (1976) con el reactivo *Dye Reagent Concentrate* de Bio-Rad, refiriendo los valores obtenidos a una recta patrón de seroalbúmina preparada para cada valoración.

2.10. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE) se realizó según la técnica descrita por Laemmli en 1970. Se utilizaron cubetas verticales Protean de Bio-Rad. La tinción se realizó con azul brillante de Coomassie (Brilliant blue R-250, Sigma) según el protocolo descrito por Fairbanks y col. (1971) destiñendo posteriormente con una solución de metanol al 20% y ácido acético al 0,7%. Alternativamente se realizó la tinción con plata, siguiendo el procedimiento que se expone a continuación:

Solución	Duración del tratamiento (minutos)
Metanol-TCA-CuCl ₂ (50:12:2)	30
Etanol-Acido acético-H ₂ O (10:5:85)	20
KMnO ₄ (0,01%)	15
Etanol-Acido acético-H ₂ O (10:5:85)	20
Etanol (10%)	30
H ₂ O	15
AgNO ₃ (0,1%)	25
K ₂ CO ₃ (10%)	5
K ₂ CO ₃ , Formaldehído (2:0,01)	1-5
Etanol-Acido acético-H ₂ O (10:5:85)	Conservación

Los valores entre paréntesis corresponden a %p/v o %v/v

2.11. AISLAMIENTO DE DNA

2.11.1. Aislamiento de DNA total de *Streptomyces*

El DNA total de especies del género *Streptomyces* se aisló a partir de 100 ml de cultivo de 36 h de crecimiento en medio YEME suplementado con 34% de sacarosa, utilizando el método de Kirby, citado por Hopwood y col., (1985), pero sustituyendo en la mezcla de Kirby el tri-isopropil naftaleno sulfonato sódico por una cantidad idéntica de SDS. Para la construcción de la librería genómica se utilizó el procedimiento 1, descrito por Hopwood y col., (1985).

2.11.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *Streptomyces*

Se aisló a partir de cultivos líquidos en medio YEME (matraces de 250 ml con 50 ml de medio) con los antibióticos adecuados incubados durante 36-48 horas a 30°C con agitación orbital a 250 rpm. La obtención del plásmido se realizó según el método de Kieser (1984) con las siguientes modificaciones: después del calentamiento a 70°C la preparación se dejó en hielo durante 15 min, se añadieron 0,5 volúmenes de acetato potásico 5 M pH 4,8, se mantuvo en hielo 15 min adicionales y se centrifugó a 15.000 rpm durante 30 min a 4°C.

Acetato potásico 5 M pH 4,8: acetato potásico 5 M, 60 ml, ácido acético glacial, 11,5 ml, agua 28,5 ml.

2.11.3. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Para aislar DNA plasmídico de *E. coli* a gran escala se siguió el método de la lisis alcalina descrito por Maniatis y col., (1982). El DNA en algunos casos se purificó adicionalmente en un gradiente de densidad de CsCl-bromuro de etidio y en otros se trató con RNasa, extrayéndolo posteriormente con fenol neutro, fenol-cloroformo y CIA (Cloroformo con alcohol isoamílico 24:1), y se precipitó con 1/10 de su volumen de acetato sódico 3 M y 2 volúmenes de etanol frío (-20°C).

Para analizar plásmidos de un gran número de colonias se realizaron “minipreparaciones” de DNA a partir de cultivos de 1 ml en microtubos con medio TB incubados durante 10-15 h a 37°C con agitación orbital a 250 rpm, siguiendo el método de lisis por ebullición original de Holmes y Quigley (1981).

2.11.4. Aislamiento de DNA de derivados del fago lambda

Para aislar DNA de fagos se infectaron 1×10^9 células de *E. coli* LE392 con 1×10^7 unidades formadoras de placa (ufp) del fago de interés y se incubaron durante 30 min a 37°C sin agitación. Posteriormente las células infectadas fueron inoculadas en 100 ml de medio LB suplementado con 1 ml de maltosa 20% y 1 ml de $MgSO_4$ 1 M e incubadas a 37°C con agitación fuerte hasta obtenerse la lisis total del cultivo. Se añadieron entonces: 200 μ l de lisozima (10 mg/ml) y 15 μ l de una mezcla de DNasa y RNasa (10 mg/ml cada una) y se incubó a 37°C con agitación suave durante 30 min. Se añadieron 5,84 g de NaCl, mezclando hasta su disolución y se mantuvo a 0°C durante 1-2 horas. Seguidamente se centrifugó a 8000 rpm durante 20 min, se filtró el sobrenadante y se precipitó con 20 ml de una solución de PEG 6000 50%. El fago precipitado se resuspendió en 9 ml de SM (Maniatis y col., 1982), se añadieron 9 ml de solución SDS 4%, mezclando por inversión y se calentó a 70°C durante 20 min. La preparación se llevó a 4°C y se añadieron 9 ml de acetato potásico 2,55 M pH 4.8, se mezcló por inversión y se centrifugó 30 min a 15.000 rpm a 4°C. Los ácidos nucleicos del sobrenadante se precipitaron con isopropanol, se lavaron con etanol 70% y se resuspendieron en TE. La preparación se trató con RNasa durante 60 min a 37°C. Finalmente se realizaron extracciones con fenol, fenol cloroformo y CIA, y el DNA se precipitó con acetato potásico 3 M y con etanol absoluto, se centrifugó, se lavó el precipitado con etanol 70% y se resuspendió en TE.

2.11.5. Aislamiento de DNA de simple cadena

Se utilizó la cepa de *E. coli* WK6 transformada con el plásmido de interés. La cepa se creció en 4 ml de medio 2 x TY suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) hasta alcanzar una $D.O_{600} = 1$, y se mezcló 1 ml (8×10^8 células) con 100 μ l de solución del fago ayudante M13K07 ($1,6 \times 10^{10}$ partículas de fago) manteniendo una relación fagos/células de 20. El cultivo se incubó 1 hora a 37°C sin agitación, se añadieron 20 ml de medio 2xTY suplementado con ampicilina (50 μ g/ml) y kanamicina (25 μ g/ml) y se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm durante 12-16 horas. El cultivo se centrifugó a 4500 rpm para eliminar las células y las partículas fágicas presentes en el sobrenadante se precipitaron con 0,25 volúmenes de PEG 6000 (25%) y NaCl 2,5 M, tras una incubación a 0°C durante 30 min. Los fagos precipitados se resuspendieron en 500 μ l de TE, se trataron con CIA para eliminar el PEG, se trataron con fenol neutro para eliminar la cápsida del fago, luego con fenol-cloroformo y finalmente con CIA. A continuación se precipitó el DNA con 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M y tres volúmenes de etanol, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 40 μ l de agua.

2.12. AISLAMIENTO DE RNA TOTAL

El protocolo utilizado para el aislamiento de RNA fue el descrito por Wu y Roy, (1993), excepto en que el RNA se precipitó con LiCl, como se describe a continuación.

Las cepas de interés se cultivaron en las condiciones deseadas en matraces con 100 ml de medio, y se enfriaron bruscamente para bloquear el metabolismo añadiendo 1 volumen de NaCl 0,9% a 0°C en un baño de hielo. Seguidamente se centrifugó durante 5 min a 8.000 rpm y el sedimento se resuspendió en 5 ml de solución de Kirby. El micelio se trituró en un mortero con nitrógeno líquido en presencia de alúmina (Sigma), para luego ser extraído 4 veces con una mezcla de fenol-cloroformo. El RNA fue posteriormente precipitado con 1/3 de volumen de LiCl 8M dos veces consecutivas, resuspendiéndolo en agua tratada con DEPC y se mantuvo a -20°C precipitándolo con 1/10 de volumen de acetato sódico 3M y 2,5 volúmenes de etanol.

Solución de Kirby: tri-isopropil naftaleno sulfonato sódico o SDS , 1%; 4-amino salicilato sódico, 6%, fenol ácido, 6%.

TLE: Tris 0,2 M; LiCl 0,1M, EDTA 5 mM, pH 8,2.

Fenol neutro: 100 ml de fenol ácido equilibrado primero con un volumen de TLE y 0,2 ml de NaOH 15 M. Se dejaron separar las dos fases, se eliminó la fase acuosa y se equilibró nuevamente con un volumen de TLE.

Fenol-cloroformo: Fenol neutro-cloroformo-alcohol isoamílico (50:50:1).

2.13. CONSTRUCCION DE UNA GENOTECA DE *S. GRISEUS*

Para la construcción de la genoteca de *S. griseus* se seleccionó como vector de clonación el derivado del fago lambda: GEM12, debido principalmente a su capacidad para aceptar fragmentos de DNA exógeno de gran tamaño y a la facilidad de obtención de un gran número de recombinantes gracias a la eficiencia del proceso de encapsidación *in vitro*.

Los brazos del fago se prepararon mediante digestión total de 50 µg de vector con la endonucleasa *Bam*HI. La mezcla de digestión una vez fenolizada y precipitada, se incubó en una solución de MgCl₂ 10 mM a 42°C durante 60 min, lo cual favorece la unión espontánea de los brazos del vector por sus extremos cohesivos, permitiendo así su separación del fragmento central dispensable mediante un gradiente de sacarosa. Las fracciones que sólo portaban los brazos fueron fenolizadas, precipitadas y resuspendidas en tampón TE a una concentración de 100 ng/µl.

El DNA total de *S. griseus* se purificó por el procedimiento 1, descrito por Hopwood y col. (1985). Para determinar las concentraciones óptimas de digestión se mezcló el DNA (1 µg/µl), el tampón de digestión y el agua con diluciones seriadas de la endonucleasa *Sau*3AI y se incubaron a 37°C durante 30 min, transcurridos los cuales se paró la reacción con EDTA a una concentración final de 25 mM. Mediante un gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio, se determinó que una concentración de *Sau*3AI de 0.00039 u/µg DNA originaba la máxima fluorescencia del DNA en un rango comprendido entre las 17 y las 23 kb. Con estos datos y considerando que el número máximo de moléculas para los tamaños comprendidos entre 17 y 23 kb se obtendría para una concentración de enzima dos veces inferior, según el criterio de Kaiser y Murray (1986), se realizó una digestión a gran escala con 200 µg de DNA que fue sometida a un gradiente de sacarosa (10-40%), que se centrifugó durante 16 horas a 35.000 rpm en el rotor SW41 (Beckman). El gradiente se recogió en fracciones de 500 µl, de los cuales se analizaron 20 µl en un gel de agarosa de 0.4%.

Las tres primeras fracciones se utilizaron en las reacciones de ligación, que se realizaron en un volumen de 15 µl con 500 ng de vector y 250 ng de DNA genómico parcialmente digerido con *Sau*3AI. Las reacciones de ligación se incubaron a 15°C durante 6 horas. Tras comprobar en un gel de agarosa (0.4%) la aparición de fragmentos de DNA de tamaño superior al del vector o inserto, se precipitaron con etanol y se resuspendieron en 7 µl de tampón TE.

La encapsidación de las moléculas recombinantes de DNA, obtenidas en las reacciones de ligación, se realizó utilizando el *kit* de empaquetamiento *in vitro* de la casa comercial Amersham siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el producto de la reacción de empaquetamiento se infectó la cepa *E. coli* NM539, para seleccionar directamente los fagos recombinantes portadores de un inserto de DNA genómico, puesto que esta cepa es lisógena del fago P2, y sólo origina placas de lisis cuando el fago que la infecta carece de la región central dispensable.

2.14. MANIPULACIONES ENZIMATICAS DE DNA

2.14.1. Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA con enzimas de restricción se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante: tampón adecuado (suministrado con la enzima), temperatura y cantidad de enzima: 1 unidad por µg de DNA.

2.14.2. Desfosforilación del DNA

Para hidrolizar los residuos 5'-fosfato del DNA se utilizó la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl; se incubó a 37°C durante 30 min y posteriormente se extrajo dos veces con fenol para eliminar la enzima.

2.14.3. Obtención de DNA con extremos romos

El fragmento mayor de la DNA polimerasa I de *E. coli* obtenido por digestión con subtilisina (fragmento Klenow) retiene las actividades polimerasa en sentido 5' 3' y exonucleasa 3' 5' de la enzima intacta, mientras que pierde la exonucleasa 5' 3'. Es por ello la enzima de elección para rellenar extremos 3'-entrantes del DNA, manteniendo los extremos 5'-salientes. También resultó de utilidad para obtener extremos romos a partir de los 3'-salientes gracias a su actividad exonucleasa 3' 5'. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl en presencia de los cuatro dNTP a 1 mM, se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se eliminó la enzima por extracción con fenol, precipitando el DNA con etanol.

2.14.4. Ligación de DNA

La unión covalente de moléculas de DNA se realizó empleando DNA ligasa del fago T4. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl utilizando el tampón concentrado (10x) suministrado con la enzima, que contiene además ATP y ditiotreitól necesarios para la actividad. Para ligar extremos cohesivos la reacción se incubó un mínimo de 4 horas a 15-20°C, reduciendo la temperatura a 8-12°C para ligar extremos romos.

2.14.5. Fosforilación de DNA

Se llevó a cabo con la enzima polinucleótido quinasa, que es capaz de transferir el grupo fosfato terminal del ATP a un extremo 5'-OH de una molécula de DNA o RNA. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl y se incubó durante 60 minutos a 37°C. Para el marcaje radiactivo se utilizaron 50 µCi de [³²P]ATP.

2.14.6. Marcaje uniforme de DNA

El marcaje uniforme de DNA se realizó por *nick translation*, utilizando la mezcla de DNasa I y DNA polimerasa I suministrada en los *kits* de marcaje comerciales. La DNasa I rompe al azar enlaces fosfodiéster de las dos cadenas del DNA, liberando extremos 3'-OH sobre los que actúa la DNA polimerasa con sus actividades exonucleasa y polimerasa 5' 3'. Estas actividades eliminan nucleótidos a partir del enlace roto (*nick*) e introducen dNTPs formando una nueva cadena de DNA que incluye dCTP marcado radiactivamente. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl y se incubó durante 45 minutos a 15°C.

2.14.7. Generación de deleciones unidireccionales

La construcción de clones de secuenciación con solapamiento sucesivo se llevó a cabo con ayuda del *kit* comercial *Erase-a-base* de Promega. Este sistema se basa en las propiedades de digestión selectiva de la exonucleasa III que actúa sobre extremos 5'-protuberantes o romos, dejando intactos los extremos 3'-protuberantes o extremos rellenados con nucleótidos modificados (Henikoff, 1984). La tasa de digestión de la enzima depende de la temperatura y permite controlar el grado de deleción y obtener a tiempos sucesivos clones de tamaño decreciente.

2.15. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS EN GELES DE AGAROSA

2.15.1. Electroforesis de DNA

Los geles se prepararon en tampón TAE (o TBE) con concentraciones de agarosa (Sigma, tipo II) que oscilaron entre 0,5 y 1,5% según los tamaños de DNA que se quisieran separar. La electroforesis se realizó siguiendo las instrucciones de Maniatis y col., 1982 y una vez finalizada el DNA se visualizó mediante tinción con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) en un transiluminador de luz ultravioleta. Los geles se fotografiaron con una máquina Polaroid CU-5 con películas 667 (para positivos) y 655 (para positivo y negativo).

Tampón de carga: glicerol, 10%; sacarosa, 7%; xilencianol, 0,25%; azul de bromofenol, 0,25%.

Tampón TAE: Tris-acetato pH 8, 40 mM; EDTA 2 mM.

Tampón TBE: Tris-borato pH 8, 89 mM; ácido bórico, 89 mM; EDTA, 2 mM.

2.15.2. Electroforesis de RNA

Para la electroforesis de RNA se utilizaron geles desnaturizantes de agarosa-formaldehído según Sambrook y col. (1989). El RNA se visualizó mediante tinción con una solución de bromuro de etidio (5 µg/ml) durante 5 min, excepto cuando el RNA iba a ser transferido a un filtro (*Northern*).

2.16. RECUPERACION DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA

Para la recuperación de fragmentos de DNA de geles de agarosa se utilizó el método de formación de sales cuaternarias DNA-amonio (CTAB) descrito por Langridge y col. (1980) o el método de centrifugación a través de lana de vidrio (Polman y Larkin, 1989): Una vez realizada la electroforesis, se cortó la agarosa con el fragmento de interés que se introdujo en un microtubo al que previamente se le había practicado un pequeño orificio en el fondo que se había obturado con lana de vidrio. El tubo se congeló durante 20 min a -20°C y luego se introdujo en otro microtubo y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min. En el tubo exterior se recogió el tampón con el DNA, que se extrajo con fenol-cloroformo, con CIA y se precipitó con etanol.

2.17. HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

2.17.1. Hibridación de DNA transferido a filtros (*Southern*).

Se utilizó el procedimiento tradicional de transferencia por capilaridad (Southern, 1975). El DNA fragmentado con enzimas de restricción se separó por electroforesis en gel de agarosa, se tiñó con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) y se fotografió. Cuando los fragmentos de DNA obtenidos fueron mayores de 10 kb se hidrolizaron parcialmente durante 15 min con HCl 0,25 M. Luego se mantuvo con agitación suave durante 60 min en solución desnaturizante y posteriormente otro tanto en solución neutralizante. A continuación el DNA se transfirió a un filtro de nitrocelulosa BA85 (0,45 µm) (Schleicher y Schuell) o nailon Hybond-N (Amersham) por la técnica de *Southern* descrita por Ausubel y col. (1987). La transferencia tuvo lugar durante 10-24 horas, mediante una solución de SSC 20x. El DNA se fijó posteriormente al filtro según las instrucciones del fabricante. A continuación el filtro se prehibridó durante 4 horas en solución de prehibridación y luego se hibridó en la misma solución conteniendo la sonda radiactiva, previamente desnaturizada, durante 14-16 horas. Posteriormente se lavó con soluciones de lavado durante 15 min a temperatura ambiente, 15 min. a la

temperatura de hibridación y cuando fue necesario a temperaturas superiores (65°C). Finalmente se dejó secar el filtro y se expuso con Hyperfilm-MP, Amersham, bajo pantallas amplificadoras a -70°C.

SSC x1: citrato sódico pH 7.0, 15 mM; NaCl, 150 mM.

Denhardt's x 1: BSA (Fracción V, Sigma), 20 mg; ficoll, 20 mg; polivinil-pirrolidona, 20 mg; agua hasta 100 ml.

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

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

Solución de prehibridación e hibridación: formamida 40-50% (según su uso); 5x SSC; tampón fosfato sódico pH 6, 50 mM; 10x Denhardt's. DNA de esperma de salmón, 250 µg/ml para la solución de prehibridación y 50 µg/ml para la solución de hibridación.

Soluciones de lavado: 2x SSC, 0,1% SDS y 0,1x SSC, 0,1% SDS.

2.17.2. Hibridación de RNA (*Northern*)

El RNA total fue fraccionado en geles de agarosa desnaturalizante con formaldehído 2,2 M, como describe Sambrook y col., 1989. Antes de la transferencia, se lavó el gel varias veces con agua tratada con DEPC para eliminar el formaldehído y se incubó 60 min. en una solución de SSC 10x. La transferencia a la membrana se realizó de la misma manera descrita para el DNA y la hibridación se llevó a cabo en condiciones más restrictivas, con el tampón de hibridación de Northern que contiene 50% de formamida.

2.17.3. Hibridación *in situ* de placas de lisis

En el caso de hibridación *in situ* con placas de lisis producidas por bacteriófagos la transferencia se realizó poniendo el filtro de nitrocelulosa en contacto con las placas de lisis durante 1-3 min, transcurridos los cuales se realizaron marcas en forma asimétrica para determinar la posición del filtro sobre la placa. Posteriormente se pasaron por las siguientes soluciones: 3 min en solución desnaturalizante, 5 min en solución neutralizante (dos veces), 10 min en SSC 2x. Se dejaron secar y se fijaron a 80°C con vacío durante 2 horas. El resto del procedimiento fue el descrito para la hibridación de filtros de *Southern*.

2.17.4. Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA y su purificación

Para un marcaje homogéneo se utilizó el método conocido como *Nick Translation* con un *kit* de Boehringer Mannheim, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 20 µCi de [³²P] dCTP (Amersham) por marcaje.

Para marcar radiactivamente los oligonucleótidos se utilizó marcaje del extremo 5' con la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 y 50 µCi de [³²P]ATP. Para la purificación del oligonucleótido marcado, se utilizó una minicolumna Elutip-D (Sigma), a la cual se unió el DNA en presencia de baja sal y se eluyó en presencia de alta sal. El proceso se realizó según las instrucciones del fabricante.

Alta sal: Tris-HCl pH 7,5, 20 mM; EDTA, 1 mM y NaCl, 1 M.

Baja sal: Tris-HCl pH 7,5, 20 mM; EDTA, 1 mM y NaCl, 200 mM.

2.18. SECUENCIACION DE DNA

La secuenciación del DNA se llevó a cabo por el método de los didesoxinucleótidos (Sanger y col., 1977) utilizando DNA de cadena sencilla como molde. Se emplearon dos sistemas comerciales, el kit “*Sequenase*” de US Biochemicals y el kit “*Taq Track Sequencing Core System Deaza*” de Promega Co. El primero produce bandas mejor definidas y las reacciones permiten leer más bases por clon. El segundo sistema, que utiliza la DNA polimerasa *Thermus aquaticus* y el análogo 7-deaza-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato como sustituto del dGTP, se empleó para clones que presentaban fuertes compresiones. Las reacciones se llevaron a cabo según las instrucciones de los fabricantes.

Cada reacción se sometió a electroforesis en dos geles desnaturalizantes de poli(acrilamida-urea) 8 M, un gel corto del 8% durante 4 h y un gel largo del 6% durante 10 h aproximadamente. Se utilizó tampón TBE (1x) y las cubetas de 38x50 cm (modelo *Sequigen*) de Bio-Rad. Una vez concluida la electroforesis, se fijó el gel durante 20 minutos en una solución de ácido acético-metanol (ambos al 10%), se secó mediante calentamiento a 80°C al vacío en un secador de geles Bio-Rad y se sometió a autorradiografía a temperatura ambiente con película Hyperfilm-MP (Amersham).

Geles de acrilamida:	6 %	8 %
Acrilamida	5,7 g	7,6 g
Bisacrilamida	0,3 g	0,4 g
Urea	48,0 g	48,0 g
TBE 10X	10,0 ml	10,0 ml
Agua destilada	40,0 ml	40,0 ml
Persulfato amónico 10%	500 µl	500 µl
TEMED	50 µl	50 µl
volumen final	100 ml	100 ml

Las lecturas de la autorradiografía se introdujeron en un PC mediante el programa Editseq de DNASTar. Para su ensamblaje y posterior análisis se utilizaron los programas Seqman, Mapseq, Geneplot y Trans del mismo sistema DNASTar.

2.19. TRANSFORMACION DE *E. COLI*

La transformación de *E. coli* se realizó con células competentes congeladas, preparadas por el procedimiento descrito por Hanahan (1985): Las células de un cultivo crecido hasta $DO_{600} = 0,4$ se lavaron sucesivamente con las soluciones RF1 y RF2 portadoras de RbCl y CaCl₂ y se congelaron en un baño de hielo seco-etanol, conservándose a -70°C. Para transformar las células competentes se siguió el método descrito por el mismo autor.

Tampón RF1: RbCl, 12 g; MnCl₂·4H₂O, 9,9 g; acetato potásico 1M pH 7,0, 30 ml; CaCl₂·2H₂O, 1,5 g; glicerol, 150 g; agua hasta 1 litro. El pH se ajustó a 5,8 con ácido acético 0,2 M.

Tampón RF2: MOPS 0,5 M pH 6,8, 2 ml; RbCl, 1,2 g; CaCl₂·2H₂O, 11 g; glicerol, 150 g; agua hasta 1 litro. El pH se ajustó a 6,8 con NaOH. Ambos se esterilizaron por filtración.

2.20. TRANSFORMACION DE *STREPTOMYCES LIVIDANS*

Para la transformación de *S. lividans* se siguió el método descrito por Hopwood y col. (1985): las células de un cultivo de 36 h crecido en medio YEME suplementado con 34% sacarosa, glicina y MgCl₂, se resuspendieron en tampón P y se trataron con lisozima para obtener protoplastos y se transformaron en presencia de PEG 1000.

Tampón P: sacarosa, 10,3 g; K₂SO₄, 25 mg; MgCl₂·6H₂O, 0,2 g; solución de elementos traza, 0,2 ml; agua hasta 80 ml. Se esterilizó a 120°C durante 20 minutos y se añade: KH₂PO₄ 0,5%, 1ml; CaCl₂·2H₂O 3,68%, 10 ml; tampón TES 0,25 M pH 7,2, 10 ml. La solución de elementos traza es la misma descrita en el medio R2YE.

Solución de lisozima: Se preparó una solución de lisozima (20 mg/ml) en agua, esterilizada por filtración.

Solución de PEG 1000: Se pesa 1 g de PEG 1000 (Koch-Light), que se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Luego se añadieron 3 ml de medio P, quedando el PEG al 25% (p/v).

2.21. EXPRESION DE LOS GENES CLONADOS EN *E. COLI*

2.21.1. Amplificación de los genes mediante la técnica de PCR

Los genes *hrdB*, *hrdD* y *hrdT* fueron amplificados mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para subclonarlos en el vector pT7-7. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación se describen en el apartado 2.1.2. Para la amplificación se utilizó la enzima *Taq* polimerasa y los reactivos de la casa comercial Perkin Elmer en condiciones estándar. El protocolo de amplificación utilizado fue:

	Desnaturalización	94°C durante 3 minutos
	Anillamiento	52°C durante 2 minutos
20 ciclos:	Extensión	72°C (1,5 min)
	Desnaturalización	94°C (1 min)
	Anillamiento	50°C (1 min)

2.21.2. Condiciones de cultivo para la expresión de los genes en *E. coli*.

Para la expresión de los genes clonados en *E. coli* se utilizó una modificación del método descrito por Tabor y Richardson (1985). Se subclonaron los fragmentos de DNA en el plásmido pT7-7 y se transformaron en la cepa de *E. coli* JM109 (DE3). Los transformantes se crecieron en medio 2xTY suplementado con ampicilina hasta una $DO_{600} = 0,5$ y se indujo la RNA polimerasa del fago T7 mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. Se tomaron muestras antes y después de 3 h de la inducción con IPTG.

2.22. DETERMINACION DE CANDICIDINA

Para la valoración del antibiótico se tomaron muestras de 0,5 ml del caldo de fermentación, se extrajeron con 2 ml de butanol, se homogeneizaron en un agitador durante 30 segundos y se centrifugaron a 4000 rpm a temperatura ambiente para separar la fase butanólica (superior) de la fase acuosa. La fase butanólica se diluyó convenientemente con butanol saturado con agua. Se midió el espectro de absorción entre 450 y 350 nm. La candicidina tiene tres máximos de absorción característicos (358, 381, 402 nm), siendo el de 381 nm el de mayor absorbancia. La concentración de candicidina se calculó de acuerdo con el valor de la absorción de una solución al 1% de candicidina pura: $E_{381\text{ nm}} = 1000$.

3. RESULTADOS Y ANALISIS

3.1. PURIFICACION DE LA ENZIMA RNA POLIMERASA

3.1.1. Ensayo de la actividad RNA polimerasa

La actividad RNA polimerasa en una preparación enzimática se cuantifica experimentalmente por su capacidad de catalizar la incorporación de un ribonucleótido marcado en forma de material precipitable por ácido tricloroacético (RNA) de forma dependiente de DNA. Debido a la complejidad del proceso de transcripción, en el que intervienen múltiples factores proteicos a lo largo de una serie de etapas diferenciadas, la incorporación de ribonucleótidos no mantiene una relación simple con la concentración de moléculas activas de RNA polimerasa en la preparación. Por ello existe un consenso general sobre la dificultad de comparar resultados obtenidos con distintas preparaciones de RNA polimerasa (Chamberlin y col., 1979).

Para el desarrollo de un ensayo cuantitativo de RNA polimerasas bacterianas, Chamberlin y col. (1979) utilizando DNA del fago T7 como molde han separado el proceso en cuatro fases (Figura. 3.1):

En la Fase I tiene lugar la unión de la enzima RNA polimerasa al promotor y la iniciación de la síntesis de la cadena de RNA. Este proceso es completado en menos de un segundo por la RNA polimerasa de *E. coli* y requiere unos dos minutos cuando se ensaya la actividad RNA polimerasa de *B. subtilis*. La Fase II consiste en la elongación del transcrito, y su duración depende de la tasa de elongación media de la RNA polimerasa. Esta tasa es característica de cada enzima y así, por ejemplo, es de 18,6 nucleótidos por segundo para la RNA polimerasa de *E. coli* y de 11,4 nucleótidos por segundo para la enzima de *Mycobacterium smegmatis*. En la Fase III tiene lugar la terminación, con la liberación de la enzima y del RNA cuando se añaden en el ensayo heparina o rifampicina para bloquear la reiniciación de la transcripción, y la Fase IV representa una segunda etapa lineal de síntesis de RNA debida a que un 20% de las moléculas de la RNA polimerasa de *E. coli* sobrepasan el terminador de los genes tempranos del fago T7 y continúan incorporando ribonucleótidos.

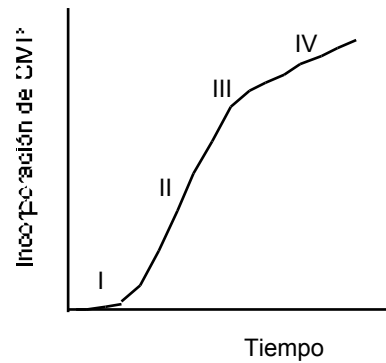


Figura 3.1. Cinética de la síntesis de RNA del fago T7 por la holoenzima RNA polimerasa de *E. coli*.

Para medir la actividad RNA polimerasa de *S. griseus* se preparó una mezcla de reacción que contenía el DNA molde, los ribonucleótidos ATP, GTP y UTP y como nucleótido marcado [^{-32}P]CTP. Esta mezcla se incubó a 30°C durante 2 minutos para estabilizar la temperatura, y la reacción se inició añadiendo la preparación enzimática. A los 4 minutos (dentro de la fase lineal de incorporación de ribonucleótidos) se añadió la solución de heparina con el fin de bloquear la iniciación de nuevas cadenas de RNA por parte de la RNA polimerasa. La reacción se continuó durante 5 minutos, y se añadió CTP frío para que la enzima pudiese completar la elongación de las cadenas de RNA ya iniciadas. Después de parar la reacción en hielo, se precipitaron los ácidos nucleicos con TCA al 10% sobre papel de filtro y se cuantificó la radiactividad incorporada en el RNA precipitado. Una unidad (*u*) de RNA polimerasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para incorporar 1 pmol de [^{-32}P] CMP en un minuto a 30°C con una concentración de DNA de 0,5 pmoles por ml.

Para los ensayos de actividad de la RNA polimerasa, se utilizó como DNA molde el plásmido bifuncional *E. coli* - *Streptomyces* pULJA31 (Figura 3.2). La elección de este plásmido como DNA molde se debió principalmente a que contiene el gen *neo* bajo el control de la secuencia promotora regulada por fosfato P_{114} (Asturias, 1991). Este plásmido porta igualmente los genes *tsr* y *bla*, que confieren resistencia a los antibióticos tioestreptona y ampicilina, ambos transcritos a partir de sus propios promotores. La secuencia de estos promotores se muestra en la Tabla 3.1.

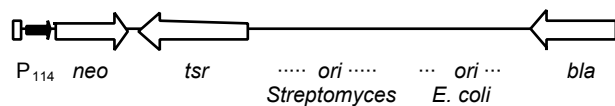


Figura 3.2. Representación lineal del plásmido pULJA31. El gen *neo* es transcrito desde el promotor P_{114} , mientras que los genes *tsr* y *bla* son transcritos desde su propio promotor.

La regulación por fosfato del promotor P_{114} ha sido demostrada por Asturias (1991) mediante su subclonación delante de diferentes genes marcadores de la expresión génica (*neo*, *lac* y *xylE*): concentraciones superiores a 1 mM de fosfato producen una disminución superior al 90% en la actividad β -galactosidasa en medio SPG. La regulación por fosfato puede ser atribuida a una secuencia situada entre los nucleótidos -9 y +5, que presenta un 66% de similitud con la *caja de fosfato* de los promotores de genes pertenecientes al regulón de fosfato en *E. coli*. El P_{114} conserva un 50% de la actividad promotora cuando se delecta su región -35, y en *S. lividans* se ha detectado una proteína de unión específica mediante la técnica de retraso en gel. La secuencia P_{114} no es reconocida por la RNA polimerasa de *E. coli*, ya que la introducción del plásmido pULJA31 no confiere resistencia a kanamicina.

El gen de resistencia a tioestreptona de *S. azureus* se transcribe a partir de dos promotores en tándem, *tsr-p1* y *tsr-p2*. Las regiones -10 de ambos promotores muestran similitud con la secuencia consenso de la clase principal de promotores procariotas (Janssen y Bibb, 1990), siendo sin embargo,

totalmente diferentes del consenso en la región -35, como suele ser el caso de promotores procariotas regulados positivamente. El hecho de que presenten similaridad entre ellos en esta región podría apoyar la hipótesis de su regulación positiva (Janssen y Bibb, 1990).

Tabla 3.1. Secuencias promotoras descritas en el plásmido pULJA31.

Promotor	Secuencia *	Referencia
P ₁₁₄	CGGGGGGCATGGTACCCCCACATCTATTGAATCCGCAACGCGCAGTATCATG	Asturias, 1991
<i>tsr</i> -p1	TGGTGATTGCCGGTCAGGGCAGCCATCCGCCATCGTCGCGTAGGGTGTACA	Janssen y Bibb, 1990
<i>tsr</i> -p2	AGATTGGCTCGACGCAGCCAGAAATGTATGATCAAGGCGAATACTTCATAT	Janssen y Bibb, 1990
<i>bla</i> -p3	TATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTG	Brosius y col., 1982

(*) El sitio de inicio de la transcripción corresponde al último nucleótido de la secuencia mostrada (resaltado en negrilla) y las regiones -10 y -35 de los promotores se encuentran subrayadas y corresponden a las descritas por los autores que han determinado el sitio de inicio de la transcripción.

El gen de resistencia a ampicilina (*bla*) proviene del vector pBR322 y el sitio de inicio de la transcripción ha sido determinado en *E. coli* mediante experimentos de protección frente a la digestión con nucleasa S1 y transcripción *in vitro*, siendo su expresión independiente de la adición de antibiótico (Brosius y col., 1982).

3.1.2. Condiciones del cultivo

La purificación de la actividad RNA polimerasa de *S. griseus* IMRU 3570 se realizó a partir de micelio crecido en condiciones de fermentación para producción de candicidina. La fermentación se inoculó con 300 ml de un cultivo en medio YED incubado en agitación orbital durante 24 horas a 32°C. El inóculo se preparó en matraces indentados de 500 ml con 100 ml de medio que se sembraron con suspensiones de esporas obtenidas en medio sólido. Los 300 ml de inóculo se añadieron a un fermentador Bio Flo II (New Brunswick, N.J., USA) que contenía 3 litros de medio SPG (medio de producción de candicidina). La fermentación se desarrolló a 32°C y 250 rpm, en presencia de un 70% de oxígeno disuelto durante 24 horas antes de proceder a recoger el micelio.

3.1.3. Obtención del extracto crudo

El micelio fue recogido por centrifugación. El extracto crudo se preparó a partir de 50 g de micelio que se resuspendió en 50 ml de tampón de lisis, se lisó en la prensa de French y se centrifugó a 9000 rpm durante 30 min. a 4°C. Se recogieron 70 ml de sobrenadante o extracto crudo con 11,69 mg de proteína por mililitro y una actividad específica RNA polimerasa de 0,34 u/mg de proteína. La preparación contenía un total de 279 Unidades (Tabla 3.2).

3.1.4. Precipitación con Polymin P

El Polymin P es una polietilenimina muy básica utilizada para precipitar los ácidos nucleicos y las proteínas asociadas, entre ellas la RNA polimerasa. Se ha descrito su uso en la purificación de la RNA polimerasa de *E. coli* (Burgess y Jendrisak, 1975), así como en la purificación de la RNA polimerasa II de germen de trigo (Jendrisak y Burgess, 1975). Además, la precipitación con Polymin P elimina totalmente los ácidos nucleicos bacterianos de la preparación, evitando su interferencia con los ensayos de actividad de la RNA polimerasa.

La cantidad óptima de Polymin P para precipitar la RNA polimerasa depende de la concentración de sales, así como de la cantidad de ácidos nucleicos y proteína presentes en el extracto, por ello es necesario ajustar las cantidades para cada caso (Jendrisak y Burgess, 1975). Para optimizar las condiciones de precipitación con Polymin P se añadieron cantidades variables (desde 0 hasta 100

µl en intervalos de 10 µl) de una solución de Polymin P al 10% a alícuotas de 1 ml de extracto crudo, manteniendo en agitación durante 5 minutos a 4°C y centrifugando a 9000 rpm durante 10 minutos. Finalmente se analizó una muestra de cada uno de los sobrenadantes mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) al 8% para comprobar la presencia de las subunidades α y β de la RNA polimerasa. La concentración de Polymin P mínima necesaria para precipitar la RNA polimerasa de *S. griseus* resultó ser del 0,3%. A partir del 0,5% de Polymin P no se detectaron bandas superiores a 70.000 Da en geles de poliacrilamida-SDS, lo cual podría sugerir que un exceso de Polymin P precipitaría todas las proteínas de alto peso molecular de un modo inespecífico, disminuyendo la eficiencia de este paso de purificación.

Una vez precipitada la RNA polimerasa, fue necesario un estudio similar para su solubilización. Para ello se precipitaron alícuotas de 1 ml de extracto crudo con 0,3% de Polymin P y se resuspendieron en el mismo volumen de tampón TGED con concentraciones crecientes de KCl desde 0,1 hasta 1 M. Posteriormente, se centrifugaron a 9000 rpm durante 10 minutos y se analizaron los sobrenadantes en geles de poliacrilamida-SDS al 8%. Las bandas correspondientes a α y β comenzaron a aparecer en la fracción extraída con 0,4 M de KCl y su intensidad se fue incrementando gradualmente, con respecto al resto de las proteínas, hasta la fracción solubilizada con 1 M de KCl. Esta observación permitió aumentar la eficiencia de este paso de purificación, mediante una solubilización intermedia con 0,3 M de KCl para eliminar las proteínas que se extraen del precipitado con esta concentración de sal.

En base a la optimización descrita, el procedimiento de precipitación con Polymin P se realizó del siguiente modo: se añadió Polymin P al extracto crudo hasta una concentración final del 0,3% para precipitar la RNA polimerasa. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió en un volumen de tampón TGED que contenía 0,3 M de KCl y 0,4 mM de PMSF (como inhibidor de proteasas para evitar la degradación de la enzima), se centrifugó a 9000 rpm durante 10 minutos y nuevamente se desechó el sobrenadante. El precipitado se solubilizó nuevamente con TGED que contenía 1 M KCl y 0,4 mM PMSF para recuperar en el sobrenadante la RNA polimerasa. En este paso se obtuvieron 61,5 ml de sobrenadante con 5,4 mg/ml de proteína con incremento de la actividad específica (0,98 u/mg de proteína). Se consiguió así purificar la enzima 2,9 veces con un rendimiento del 116,5%. La obtención de un rendimiento superior al del extracto crudo podría tener al menos dos explicaciones: la primera es que en el extracto crudo están presentes el DNA y los ribonucleótidos bacterianos, por lo que la medida de actividad RNA polimerasa detectada en el ensayo es probablemente una medida parcial, y segunda, la degradación del RNA sintetizado por parte de RNasas que probablemente están presentes en el extracto. Ambos factores reflejarían un valor inicial de actividad específica inferior al real.

3.1.5. Precipitación con sulfato amónico

El uso de sulfato amónico para precipitar las proteínas eluidas en el sobrenadante del paso de precipitación con Polymin P, además de suponer un paso adicional de purificación, permite la concentración de la enzima y elimina el Polymin P residual que podría interferir con pasos posteriores de cromatografía de afinidad como heparina-agarosa o DNA-agarosa (Burgess y Jendrisak, 1975).

La RNA polimerasa se precipitó con sulfato amónico a una concentración final del 50% de saturación, se agitó suavemente durante 30 minutos a 4°C, se centrifugó a 9000 rpm durante 15 minutos a 4°C y el precipitado obtenido se resuspendió en 3 ml de tampón TGED con 0,1 M KCl. Como resultado de esta etapa se obtuvo una pequeña disminución en la actividad específica (0,90 u/mg de proteína) y del grado de purificación (2,6 veces), disminuyendo también el porcentaje de rendimiento (27,6%), lo cual se debe probablemente al efecto de la elevada fuerza iónica sobre la actividad RNA polimerasa (ver apartado 3.1.11), que no permite detectar la actividad enzimática real presente en el extracto. De hecho, la actividad se incrementó considerablemente en la siguiente etapa de purificación.

3.1.6. Cromatografía de filtración en gel Sephacryl S-300

La preparación de la RNA polimerasa concentrada con sulfato amónico se sometió a cromatografía de filtración en gel a través de la columna de Sephacryl S-300 descrita en el apartado

8.3 de Materiales y Métodos. Esta columna sirvió como paso de purificación y permitió eliminar el sulfato amónico sin necesidad de dializar la muestra. La columna fue primeramente equilibrada con tampón TGED que contenía 0,1 M de KCl, tras lo cual se aplicaron los 3 ml obtenidos en la etapa anterior y se recogieron fracciones con un volumen de 4 ml. En la Figura 3.3 se muestra el perfil de elución de las proteínas, derivado de la medida de absorbancia a 280 nm, y la curva de la actividad RNA polimerasa. Considerando las fracciones activas, se obtuvo un volumen de 60 ml, con 1,1 mg/ml de proteína y una actividad específica de 5,59 u/mg de proteína (6,2 veces mayor que la detectada en la fracción de sulfato amónico y 16,4 veces mayor que la inicial).

El amplio rango de fracciones activas podría deberse por un lado al fenómeno bien conocido de dilución de muestras que ocurre al utilizar las columnas de filtración en gel y, por otra parte, a que la RNA polimerasa sea un complejo que puede estar presente en diversos grados y formas de asociación, probablemente en forma de una mezcla de varias holoenzimas y núcleos no asociados a factores sigma.

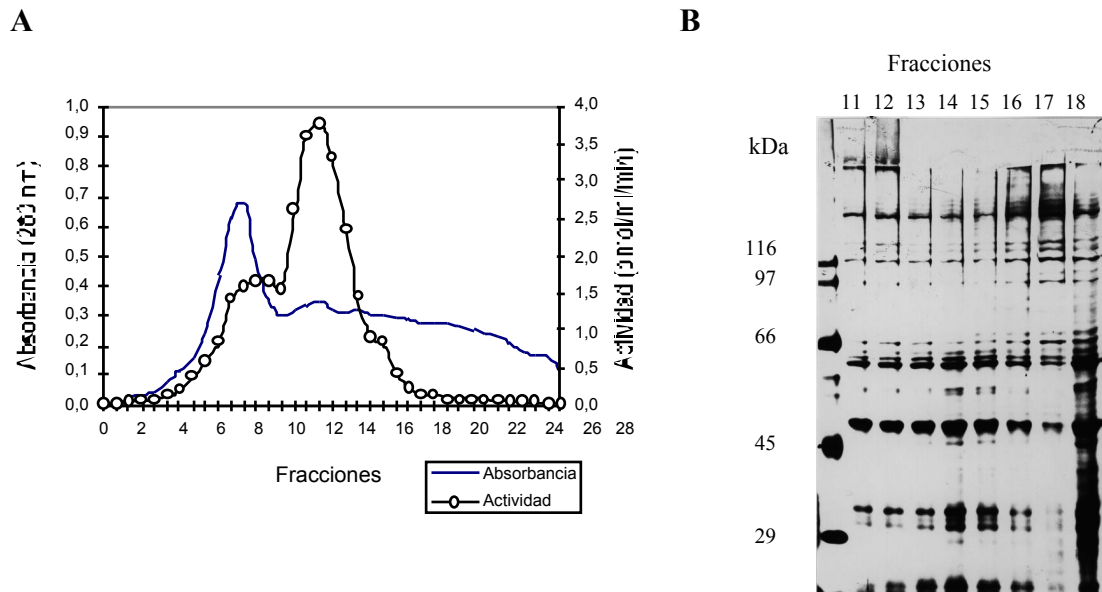


Figura 3.3. Filtración en gel Sephacryl S-300 de la actividad RNA polimerasa de *S. griseus*. **A.** El perfil de actividad enzimática y de elución de las proteínas de la columna se muestran mediante líneas continuas (con círculos y sin ellos, respectivamente) según se indica en la leyenda. **B.** Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 8% de las fracciones 11 a 18 según se muestra en la parte superior de la Figura y en la parte inferior del cromatograma. El gel se visualizó mediante tinción con plata y cada carril contiene 20 µg de proteína. El carril 1 corresponde a proteínas de tamaño conocido indicado a la izquierda.

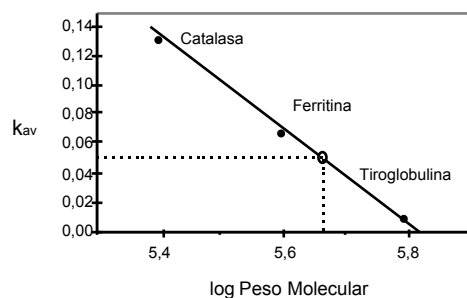


Figura 3.4. Determinación del peso molecular de la actividad RNA polimerasa correspondiente a la fracción 17 de la columna de filtración en gel Sephacryl S-300 (Figura 3.3) a partir de una recta de calibrado realizada con catalasa (Mr 232.000 Da), ferritina (Mr 440.000 Da) y tiroglobulina (Mr 669.000 Da).

El tamaño aproximado se determinó para la holoenzima presente en la fracción 17, que poseía la máxima actividad RNA polimerasa (Figura 3.3). Para ello se llevó a cabo una calibración de la columna Sephacryl S-300 utilizando proteínas de masa relativa (Mr) conocida y se obtuvo la recta de calibrado que se muestra en la Figura 3.4. Con el volumen de elución correspondiente a la fracción 17 se calculó una k_{av} = 0,052, que al interpolar corresponde a una masa relativa de 470.880 Da. Este valor se ajusta al esperado para la holoenzima RNA polimerasa, si se considera que la holoenzima de *E. coli*, E⁷⁰, tiene un peso molecular de 450.000. De acuerdo con el tamaño determinado para la actividad presente en la fracción 17, las fracciones activas anteriores cuyo tamaño excedería del esperado, podrían contener holoenzimas asociadas a diversos factores de transcripción o proteínas accesorias.

3.1.7. Cromatografía de pseudoafinidad en heparina-agarosa

La RNA polimerasa fue purificada adicionalmente mediante una columna de pseudoafinidad de heparina-agarosa. La heparina es un mucopolisacárido de naturaleza polianiónica similar a la del DNA, que interacciona con polimerasas de ácidos nucleicos y ha sido ampliamente utilizada para la purificación de proteínas de unión a DNA, entre ellas la RNA polimerasa (Davison y col., 1979; Westpheling y col., 1985).

La columna de heparina-agarosa (descrita en el apartado 2.7.4 de Materiales y Métodos), se equilibró con tampón TGED con 0,2 M KCl; posteriormente se aplicó la muestra proveniente de la mezcla de las fracciones 8 a 22 de la columna de filtración en gel S-300 y se lavó la columna con el mismo tampón hasta que la absorbancia medida con el detector de ultravioleta alcanzó de nuevo la línea base. En este momento se aplicó un gradiente lineal, de 50 ml totales, desde 0,2 M hasta 0,5 M KCl en tampón TGED, ya que previamente se había determinado la ausencia de actividad RNA polimerasa por debajo de 0,2 M y por encima de 0,5 M de KCl. El ensayo de las fracciones obtenidas del gradiente, con un volumen de 2 ml cada una, mostró dos máximos de actividad RNA polimerasa, el primero de ellos a 0,37 M KCl y el segundo a 0,44 M KCl (Figura 3.5). La aparición de estos dos máximos podría deberse a la separación de dos o más holoenzimas de la RNA polimerasa, según sugieren Westpheling y col. (1985) que describen un resultado análogo después de someter a cromatografía de heparina-agarosa una preparación similar durante la purificación de la misma enzima de *S. coelicolor*.

A

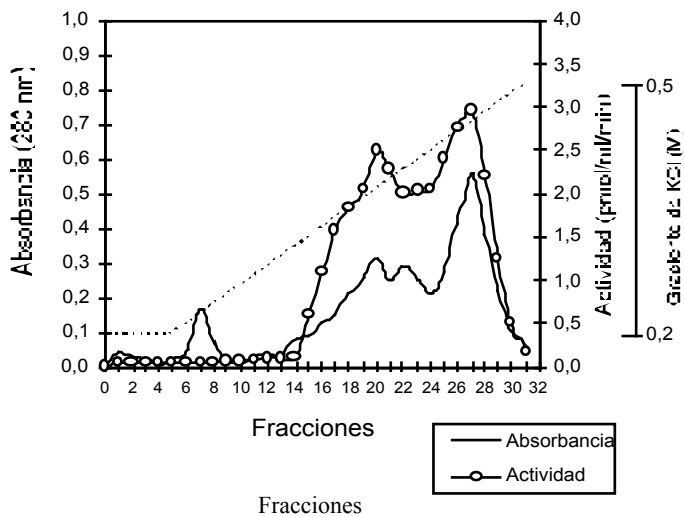
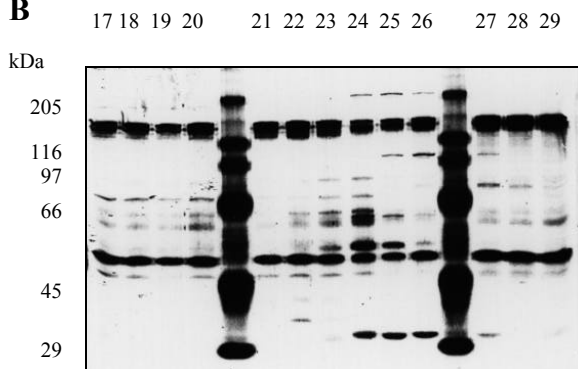


Figura 3.5. Cromatografía en heparina-agarosa de la RNA polimerasa de *S. griseus*. **A.** El perfil de la actividad enzimática y de la elución de proteínas se muestra mediante líneas continuas con círculos blancos y sin ellos, respectivamente y el gradiente lineal de elución desde 0,2 hasta 0,5 M de KCl se indica mediante la línea discontinua.

B



B. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las fracciones 17 a 29 eluidas de la columna de heparina-agarosa, según se indica en la parte superior y que corresponden con las del cromatograma descrito en A. Cada carril contiene 15 μ g de proteína visualizada mediante tinción con plata. Los carriles 5 y 12 contienen proteínas de tamaño conocido indicado a la izquierda en kDa. A la derecha de la Figura se señalan las bandas cuyo tamaño corresponde a las subunidades α y β del núcleo de RNA polimerasa.

En esta etapa del proceso se purificó la actividad RNA polimerasa 424 veces con un rendimiento del 62% y se consiguió un aumento de la actividad específica de 25,8 veces con respecto a la etapa anterior (Tabla 3.2).

3.1.8. Cromatografía de afinidad DNA-agarosa

Con la finalidad de purificar el núcleo de la RNA polimerasa de *S. griseus*, mediante su separación de la(s) holoenzima(s), se mezclaron las fracciones 15 a 30 de la columna de heparina-agarosa y se sometieron a una cromatografía de afinidad DNA-agarosa (descrita en el apartado 8.5 de Materiales y Métodos). El uso de columnas de DNA-agarosa con este fin había sido previamente descrito por Davison y col. (1979). Estos autores conseguían una separación parcial del núcleo y la holoenzima RNA polimerasa de *B. subtilis*.

La columna se equilibró en tampón TGED con 0,2 M de KCl, se aplicó la muestra y se esperó a que la medida de absorbancia estuviese estabilizada en la línea base. La elución de las proteínas se llevó a cabo mediante un gradiente lineal del mismo tampón desde 0,2 hasta 0,5 M de KCl.

El ensayo de actividad RNA polimerasa de las fracciones obtenidas de la columna de DNA-agarosa no permitió detectar ningún máximo de actividad (Figura 3.6) lo cual encaja con el hecho de que el núcleo de la enzima carezca prácticamente de actividad al separarse de factores de transcripción y otros componentes de la holoenzima. El análisis de las fracciones en geles de poliacrilamida-SDS mostró la presencia de los polipéptidos mayoritarios correspondientes a las subunidades del núcleo de la RNA polimerasa pero en mucho mayor grado de pureza que en las fracciones de heparina-agarosa, lo cual indicaba que se había conseguido purificar el núcleo de la enzima.

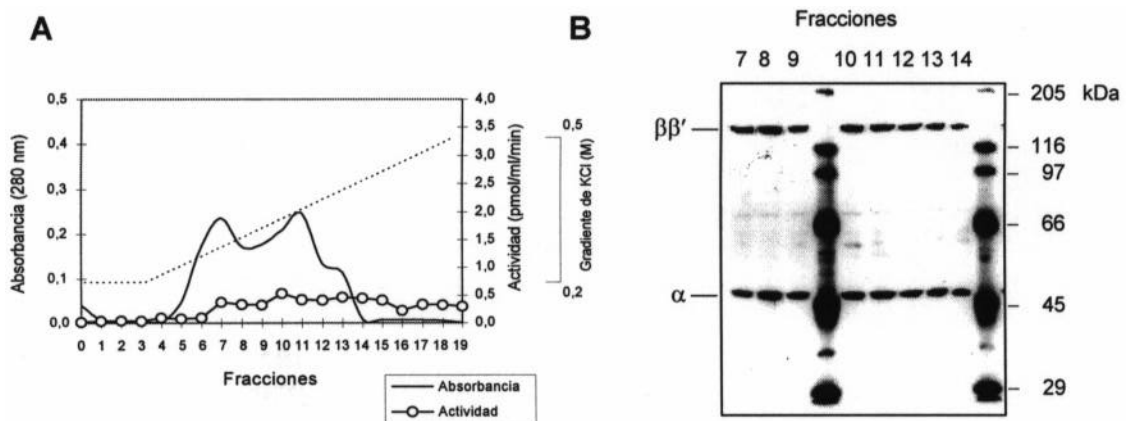


Figura 3.6. Cromatografía de afinidad DNA-agarosa de la RNA polimerasa de *S. griseus*. **A.** El perfil de actividad enzimática y el perfil de elución de proteínas se muestran mediante líneas continuas y el gradiente lineal de KCl desde 0,2 hasta 0,5 M se muestra mediante la línea discontinua. En la parte inferior de la Figura se enumeran las fracciones obtenidas. **B.** Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 8% de las fracciones 7 a 14 obtenidas de la columna de afinidad DNA-agarosa. Cada carril contiene 5 μ g de proteína y se visualizó mediante tinción con plata. Las subunidades β , β' y α del núcleo de la RNA polimerasa se indican a la derecha de la Figura.

3.1.9. Resumen de la purificación de la actividad RNA polimerasa

En la Tabla 3.2 se presenta un resumen de las etapas de purificación y los valores obtenidos a partir del ensayo de actividad de la RNA polimerasa y la cuantificación de proteínas. Al finalizar la etapa de cromatografía en heparina-agarosa, se obtuvo una preparación de RNA polimerasa que se había purificado 424 veces con respecto al extracto crudo, con un rendimiento teórico del 62% y 1,2 mg de enzima parcialmente purificada, diluida en 32 ml totales (fracciones 15-30 de la Figura 3.5). La actividad RNA polimerasa resultó estable durante al menos 6 meses cuando se conservó a -20°C en tampón de almacenamiento.

Tabla 3.2. Purificación de la actividad RNA polimerasa de *S. griseus*.

Paso de Purificación	Actividad (Unidades) *	Proteína (mg)	Actividad específica (u/mg proteína)	Rendimiento (%)	Purificación (Nº de veces)
1. Extracto crudo	279	824.2	0.34	-	1.0
2. Polymix P	325	332.1	0.98	116.5	2.9
3. Sulfato amónico	77	86.0	0.90	27.6	2.6
4. Sephacryl S-300	369	66.0	5.59	132.3	16.4
5. Heparina-agarosa	173	1.2	144.17	62.0	424.0

(*) Unidades (u): pmoles de [³²P]CMP incorporados/min/ml a 30°C utilizando como DNA molde 0,5 pmoles del plásmido pULJA31 (plásmido bifuncional *E. coli* y *Streptomyces* mostrado en la Figura 3.2).

La disminución de la actividad observada al precipitar con sulfato amónico se debe muy probablemente al efecto de la elevada fuerza iónica sobre la actividad RNA polimerasa, ya que al eliminar el sulfato amónico mediante filtración en gel se recupera notablemente la actividad enzimática.

Los rendimientos de purificación superiores al 100% que se observan en las etapas 2 y 4 de la tabla de purificación han sido también descritos en la purificación de la RNA polimerasa de *S. antibioticus* y otros microorganismos, en los cuales la purificación de la enzima va acompañada de un incremento de actividad en los pasos intermedios (Jones, 1979).

La actividad específica obtenida para la RNA polimerasa de *S. griseus* fue de 144.17 u/mg de proteína. Burgess y Jendrisak (1975) obtuvieron una preparación de la RNA polimerasa de *E. coli* con una actividad específica de 810 u/mg de proteína, Buttner y Brown (1985) han obtenido una preparación de *S. coelicolor* con 25 u/mg de proteína y Jones (1979) obtuvo una actividad específica de 19,6 u/mg de proteína para *S. antibioticus*. Estos datos, sin embargo, no son comparables dado que en cada caso se utiliza un DNA molde diferente en el ensayo de actividad RNA polimerasa.

3.2. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD RNA POLIMERASA DE *S. griseus*

3.2.1. Actividad sobre distintos moldes de DNA

Con el fin de estudiar la actividad de la RNA polimerasa purificada de *S. griseus* sobre distintos DNAs molde (Tabla 3.3) se realizaron ensayos utilizando la preparación obtenida de la cromatografía S-300. Los ensayos se realizaron en las condiciones descritas pero utilizando 3 µg de cada DNA molde.

Tabla 3.3. Actividad RNA polimerasa de *S. griseus* utilizando distintos moldes de DNA.

	Tipo y Origen del DNA	Actividad (Unidades)
Plásmidos	pBR322	450,5
	pBluescript KS+	246,3
Fagos	Fago Lambda	244,8
DNA monocatenario	Obtenido de pBluescript KS+	258,0
DNA total de miembros del género <i>Streptomyces</i>	<i>S. griseus</i> IMRU 3570	239,8
	<i>S. acrymicini</i>	196,8
	<i>S. griseus</i> NRRL 3851	187,7
	<i>S. lipmanii</i>	171,9
	<i>S. clavuligerus</i>	138,1
DNA total de otras bacterias	<i>Escherichia coli</i>	109,3
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	97,7
	<i>Brevibacterium amoniagenes</i>	90,0
DNA sintético	Poli IC	154,5
	Poli AT	51,5

A partir de los resultados de actividad mostrados en la Tabla 3.3. se pueden deducir algunas características sobre la preferencia de moldes de la RNA polimerasa de *S. griseus*:

1. La RNA polimerasa transcribe con la misma eficiencia el DNA en forma de cadena simple (DNA monocatenario obtenido a partir del pBluescript KS+) o doble (pBluescript KS+ en forma circular covalentemente cerrada).
2. Al comparar la actividad RNA polimerasa frente a distintos moldes bacterianos, los DNAs transcritos de un modo más eficiente son los que pertenecen a su propio género. El DNA de *E. coli* se transcribe con un 45,6% de eficiencia respecto a la transcripción del DNA total propio y el DNA total de las corinebacterias *C. glutamicum* y *B. amoniagenes* es transcrito casi con la misma eficiencia que el de *E. coli*. Una característica común es que los últimos tres géneros tienen un contenido de G+C cercano al 50%.
3. Si se comparan los DNAs sintéticos, la transcripción de Poli AT es un 33% de la de Poli IC, lo que muestra una preferencia clara por Poli IC que podría estar relacionado con el alto contenido de G+C presente en el género *Streptomyces*.
4. La mayor actividad RNA polimerasa fue obtenida con el plásmido pBR322, casi el doble de la obtenida con el pBluescript KS+, lo cual podría indicar que existe en el primero alguna secuencia promotora muy afín para la RNA polimerasa de *S. griseus*.

3.2.2. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad RNA polimerasa

El efecto de la concentración de sales sobre la actividad RNA polimerasa se estudió utilizando como DNA molde 0,5 pmoles del plásmido pULJA31 y diferentes concentraciones de KCl. El extracto enzimático procedente de la columna de Sephacryl S-300, fue dializado con tampón TGED sin KCl antes de realizar el ensayo. De los resultados presentados en la Tabla 3.4 se deduce que la concentración óptima de sales en las condiciones utilizadas se encuentra entre 80 y 120 mM de KCl .

Tabla 3.4. Efecto de la fuerza iónica sobre la transcripción del plásmido pULJA31 por la RNA polimerasa de *S. griseus*.

Concentración de KCl (mM)	Actividad RNA Polimerasa (unidades)
20	60,8
40	72,4
80	162,5
120	154,3
160	96,5
200	91,3
240	22,5

El principal efecto del incremento de la concentración salina sobre la transcripción es la disminución de la afinidad del factor sigma por el DNA (Shorenstein y Losick, 1973). Sin embargo, la concentración mínima inhibitoria de sales depende del DNA molde y de la holoenzima estudiada. Para la RNA polimerasa de *Pseudomonas* BAL-31 se ha descrito una actividad óptima a concentraciones que oscilan entre 160 y 240 mM de KCl (Zimer y Millette, 1975). En *B. subtilis* cuando el DNA molde corresponde a los fagos SP50 o SP01 no se detectan diferencias entre 2 y 160 mM de KCl; sin embargo, para los fagos T4 y T7 una concentración de 160 mM de KCl resulta inhibitoria para la actividad RNA polimerasa.

Se ha descrito también que la concentración salina afecta a la terminación de la transcripción: La concentración óptima de sales para la actividad RNA polimerasa de *B. subtilis* cuando se utiliza como DNA molde el fago 29 se encuentra entre 160 y 180 mM. Cuando se disminuye la fuerza iónica se detectan transcritos de mayor tamaño debido a que la RNA polimerasa es capaz de leer a través de los terminadores del fago, mientras que si se incrementa la concentración de sales se favorece la terminación específica (Davison y col., 1979).

3.2.3. Estudios de transcripción *in vitro* con RNA polimerasa de *S. griseus*

Los ensayos de actividad RNA polimerasa descritos hasta el momento fueron de utilidad para cuantificar la actividad de las preparaciones pero no permitían comprobar la especificidad de la enzima sobre diferentes promotores. Con esta finalidad se realizaron los ensayos de transcripción *in vitro* denominados *run-off* (transcripción hasta salir fuera del fragmento) que incluyen la cuantificación de los productos de transcripción específicos para diferentes promotores o DNAs molde. Esto se logró mediante análisis de la cantidad y tamaño de los transcritos formados en geles desnaturizantes de poliacrilamida-urea.

El DNA molde utilizado para los estudios de transcripción *in vitro* se preparó a partir de un fragmento de DNA que contenía el promotor que se deseaba estudiar y el gen correspondiente (Fig. 3.7 A). Mediante digestión con endonucleasas de restricción se obtuvo un fragmento de DNA de tamaño conocido con el promotor y parte del gen, lo cual permitió calcular el tamaño esperado para el RNA sintetizado *in vitro* (Fig. 3.7 B).

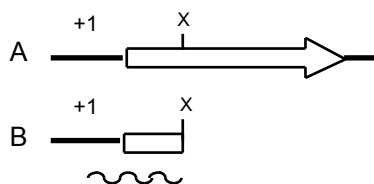


Figura 3.7. Obtención del DNA molde para estudios de transcripción *in vitro*: A partir de un molde (A), se obtiene mediante digestión con la endonucleasa X un fragmento de DNA que contiene el promotor y parte del gen (B), de forma que la actividad RNA polimerasa sintetiza un RNA de tamaño discreto que puede ser fácilmente separado en geles de poliacrilamida desnaturizantes. La línea ondulada representa el RNA sintetizado desde el sitio +1 hasta el final del molde.

Para los estudios de transcripción *in vitro* se utilizaron cinco promotores, dos de ellos pertenecientes a *B. subtilis* y los tres restantes de *S. griseus*. Entre estos últimos, P_{saf} y P_{pab} son promotores regulados por fosfato. Las secuencias de los promotores utilizados se muestran en la Tabla 3.5.

El promotor *veg* es un promotor de metabolismo primario de *B. subtilis* (LeGrice y Sonenshein, 1982), cuya secuencia se ajusta al consenso de promotores principales de eubacterias y es reconocido por el factor sigma principal de *B. subtilis* (σ^A). Este promotor ha sido estudiado previamente como sustrato de la RNA polimerasa de *S. coelicolor* (Westpheling y col., 1985) y lo empleamos en este estudio como control positivo del ensayo de transcripción *in vitro*. El DNA molde se preparó a partir del plásmido pMS500 (Moran y col., 1982), del cual se aisló un fragmento de 600 pb mediante una digestión *Bam*HI, que originaría un transcrito de 90 bases, cuya migración corresponde a la de un DNA de aproximadamente 105 pb (Westpheling, comunicación personal).

El promotor *ctc* corresponde a un gen de *B. subtilis* de función desconocida (Tatti y Moran, 1984). Es reconocido por un factor sigma alternativo (σ^B) que participa en respuestas de *estrés* general como choque térmico, choque osmótico y entrada en fase estacionaria. Este promotor es también sustrato de la RNA polimerasa de *S. coelicolor* (Westpheling y col., 1985) y se utilizó en este trabajo como control positivo. El DNA molde se preparó a partir de una digestión doble *Hind*III - *Sal*I del plásmido pMI1851 (Igo y col., 1987), del cual se aisló un fragmento de 330 pb que originaría un transcrito de 105 bases, que migra paralelo a un DNA de 125 pb aproximadamente (Westpheling, comunicación personal).

El promotor *amy* corresponde al gen de α -amilasa de *S. griseus* (Vigal y col., 1991) y posee semejanza con la secuencia consenso de promotores principales de eubacterias descrita por Strohl (1992). El DNA molde se preparó mediante una digestión doble *Hind*III - *Bam*HI del plásmido pULTV40 (Vigal y col., 1991), del que se aisló un fragmento de 430 pb, a partir del cual se esperaría la formación de un transcrito de 160 bases, que migraría a una altura superior con respecto al DNA utilizado como control de tamaño.

Tabla 3.5. Características de los promotores utilizados para los estudios de transcripción *in vitro* y plásmidos de donde fueron obtenidos los fragmentos de restricción.

Promotor	Microorganismo	Factor sigma	Secuencia*	Plásmido
<i>Pveg</i>	<i>B. subtilis</i>	A	AATTTAAATTTTATTTGACAAAAATGGGCTCGTGTGTACAATAAATGTA	pMS500
<i>Pctc</i>	<i>B. subtilis</i>	B	CCATTTTTCGAGGTTTAAATCCTTATCGTTATGGGTATTGTTTGAATAAG	pMI1851
<i>Pamy</i>	<i>S. griseus</i>	?	TGTCCAAAGGGTTGACCGCGGGTACCCTCGCTTACGGTCTGCTTCGCG	pULTV41
<i>Psaf</i>	<i>S. griseus</i>	?	GAAACGGTGGTCCGTTTCCCGCCCTGCCCGTAGGCCGTGCGCGTCCCGC	pULAD60
<i>Ppab</i>	<i>S. griseus</i>	?	CGGACGGCGATCCCGTCCGACCGCCTCCCGTCACTTCCGCTCACGGC	pULPAB

(*) El sitio de inicio de la transcripción corresponde a los nucleótidos que se encuentran en negrilla al final de la secuencia mostrada y las regiones -10 y -35 descritas por los autores que han determinado el sitio de inicio de la transcripción se encuentran subrayadas.

El promotor *saf* pertenece a un gen que incrementa la producción de enzimas extracelulares en *S. griseus* probablemente debido a la presencia de un dominio de unión a DNA (Daza y col., 1990, 1991). Este promotor está fuertemente regulado por fosfato, lo cual podría ser debido a una secuencia semejante a una caja de fosfato situada en la región -35. El DNA molde se preparó mediante una digestión doble *Xba*I - *Eco*RI del plásmido pULAD60 (Daza y col., 1991), del que se aisló un fragmento de 271 pb, cuyo transcrito desde el sitio de inicio de la transcripción sería de 69 bases.

El promotor *pab* corresponde a la secuencia que se encuentra en posición 5' del gen que codifica la actividad PABA sintasa en *S. griseus* (Criado y col., 1993), de la ruta biosintética de candicina. Este promotor también se encuentra regulado por fosfato a nivel de transcripción según estudios de *Northern* (Asturias, 1991). Aunque se desconoce el sitio de inicio de la transcripción, su actividad promotora se comprobó al subclonarlo delante de gen *xylE*, que se utilizó como marcador de la expresión génica (Marcos, A.T., resultados no publicados). Para los estudios de transcripción *in*

in vitro se aisló un fragmento de restricción *XhoI-XbaI* de 300 pb del plásmido pULPAB, construido a partir del plásmido pIJ814 (Gil y Hopwood, 1983).

Se realizaron estudios de transcripción *in vitro* con 5 preparaciones enzimáticas correspondientes a diferentes pasos de purificación de la actividad RNA polimerasa de *S. griseus*: extracto crudo, sulfato amónico, filtración en gel (con una mezcla de las fracciones 8 a 22 mostradas en la Figura 3.3) y las dos fracciones correspondientes a máximos de actividad de la columna de heparina-agarosa (fracciones 20 y 27 de la Figura 3.5).

Los resultados de los estudios de transcripción *in vitro* se muestran en la Figura 3.8. A la izquierda de cada panel se indican los tamaños de los fragmentos de DNA obtenidos al digerir el plásmido pBR322 con la endonucleasa *HpaII*, habitualmente utilizado como control de tamaño en este tipo de estudios.

Al analizar los resultados se observó en primer lugar la ausencia de productos de transcripción con el extracto crudo (carriles señalados con el número 1). Esto coincidía con el hecho de que la actividad RNA polimerasa detectada en el extracto crudo fuera inferior a la obtenida con fracciones más purificadas. Este fenómeno puede deberse a la presencia de DNA molde y ribonucleótidos bacterianos en la preparación o también a la presencia de ribonucleasas que hidrolizasen el transcrito formado, ya que con fracciones más purificadas de las mismas preparaciones se obtuvo el producto de transcripción esperado.

En el panel A de la Figura 3.8 puede observarse que con el promotor *veg* se obtiene un transcrito que migra ligeramente por debajo del fragmento de 110 pb del marcador (indicado con una flecha), de acuerdo con lo descrito previamente (Westpheling y col., 1985). El transcrito con mayor intensidad se obtuvo con la fracción de sulfato amónico, mientras que en las fracciones de filtración en gel y la fracción 27 de heparina-agarosa, que están más diluidas, solo se detectó ligeramente.

El promotor *veg* es reconocido por el factor sigma principal HrdB en *S. coelicolor* A3(2) (Brown y col., 1992) y probablemente sea transcrito por el mismo factor sigma en *S. griseus*. Al examinar en el gel de proteínas de las fracciones de la columna de heparina-agarosa el carril correspondiente a la fracción 27, se detectó un polipéptido que migraba a la altura de 65 kDa que podría corresponder al producto del gen *hrdB* de *S. griseus* (Figura 3.5). También podría suceder que debido a que la expresión de los factores sigma principales tiene lugar mayoritariamente durante el crecimiento exponencial en medios sin limitación de nutrientes, la cantidad relativa del factor sigma principal fuese baja, haciéndose en la práctica indetectable en geles, y aumentase la presencia de otros factores sigma (véase la transcripción del promotor *ctc*).

En la síntesis de RNA realizada con el promotor *ctc* (panel B, Figura 3.8) se obtuvo un transcrito que, según lo esperado, migraba por encima del fragmento de 110 pb del marcador (Brown y col., 1992). Con este promotor no se obtuvo transcripción con la fracción de sulfato amónico, pero sí con la preparación eluida de la columna de filtración en gel y con la fracción 27 de la columna de heparina-agarosa, por lo que el resultado negativo de la fracción de sulfato amónico se interpretó como efecto inhibitorio de la fuerza iónica en la actividad RNA polimerasa sobre el molde *ctc*. En relación con el efecto de la fuerza iónica sobre los ensayos de transcripción se pueden observar los tres casos descritos en el apartado 3.2.2: en el ensayo de la fracción de sulfato amónico sobre el promotor *veg* (panel A, carril 2) la posible presencia de sales no afecta la transcripción. Sin embargo, como acaba de mencionarse, en el ensayo del promotor *ctc* con la misma preparación enzimática sí parece haber un efecto inhibitorio (panel B, carril 2) poniendo de relieve la dependencia del molde utilizado en el efecto de la fuerza iónica. En el ensayo del promotor *amy* la utilización de la fracción de sulfato amónico (panel C, carril 2) parece afectar a la terminación de la transcripción ya que con esta preparación se detectan numerosos transcritos de tamaño inferior al esperado y obtenido con otras preparaciones (carriles 3 y 5).

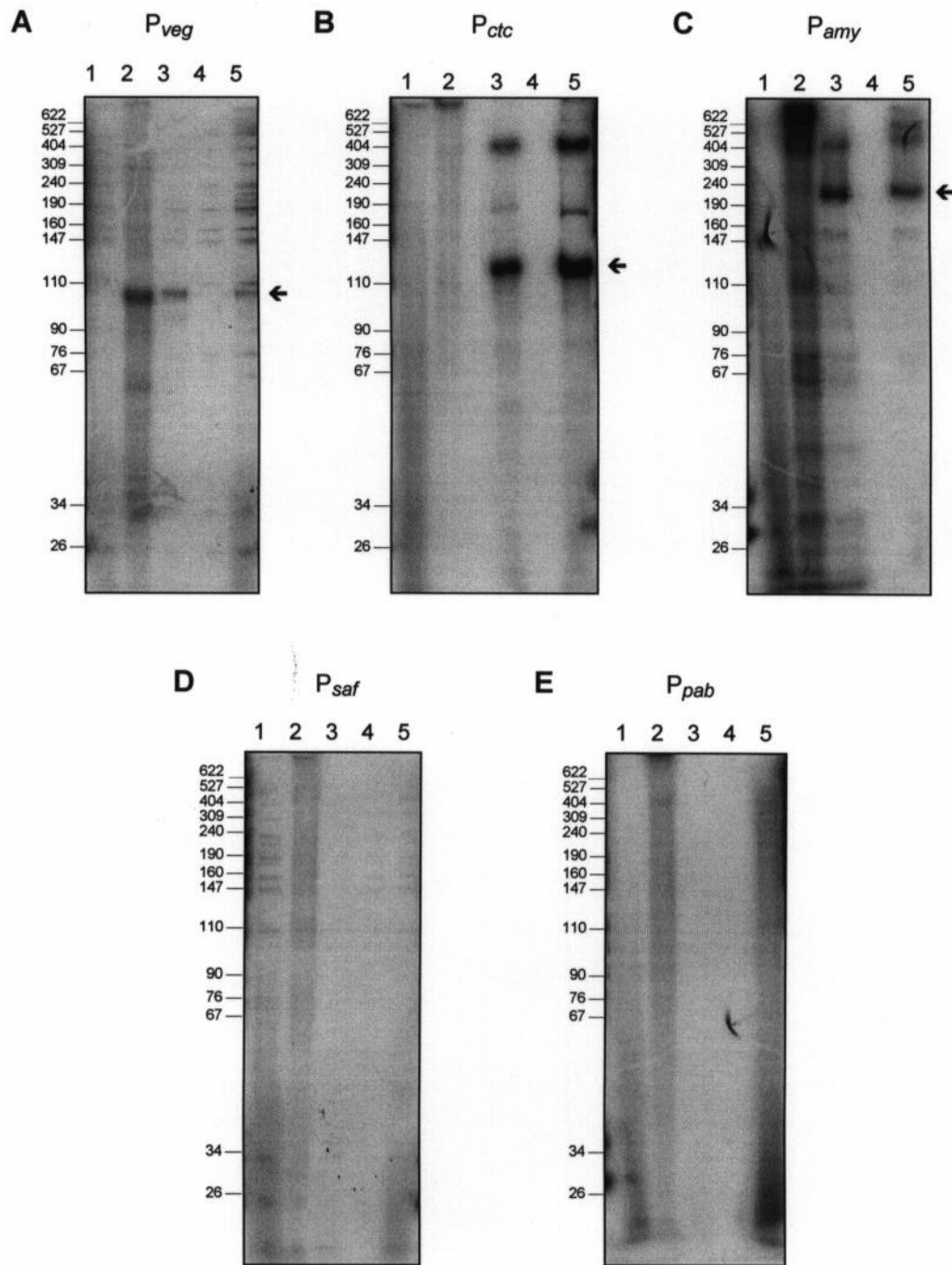


Figura 3.8. Estudios de transcripción *in vitro* con distintas preparaciones de RNA polimerasa de *S. griseus* y distintos moldes de DNA: *Pveg* (A), *Pctc* (B), *Pamy* (C), *Psaf* (D) y *Ppab* (E). Las preparaciones de RNA polimerasa utilizadas fueron: extracto crudo (carril 1), sulfato amónico (carril 2), una mezcla de las fracciones 8 a 22 obtenidas de la columna de filtración en gel S-300 (carril 3), fracciones 20 y 27 eluidas de la columna de heparina-agarosa (carriles 4 y 5, respectivamente). En los estudios de transcripción *in vitro* se ha descrito la aparición de dos bandas, la inferior que corresponde al transcrito iniciado desde el promotor y una banda superior que tiene la longitud total del molde, debido a que la RNA polimerasa se une a un extremo y desde allí inicia la transcripción, denominándose transcrito de inicio a fin. A la izquierda en cada figura se muestran los tamaños del vector pBR322 digeridos con la endonucleasa *HpaII*, que fueron marcados radiactivamente mediante relleno de los extremos con [^{32}P]dCTP utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Este marcador se utiliza habitualmente en los estudios de transcripción *in vitro* como indicador de tamaño y se observa como bandas tenues en el panel A.

Los transcritos obtenidos utilizando como molde el promotor *ctc* con la preparación de filtración en gel y con la fracción 27 de heparina-agarosa sugieren la existencia en *S. griseus* de un factor sigma con la misma especificidad que σ^B de *B. subtilis* y homólogo al ya descrito *S. coelicolor* (Westpheling y col., 1985). Estos autores han identificado en *S. coelicolor* dos polipéptidos capaces de transcribir el promotor *ctc*, uno de ellos de 49.000 Da (σ^{49}) y otro de 37.000 Da (σ^{37}) que suponen que podría ser un fragmento proteolítico del primero. Coincidiendo con estos resultados, en la electroforesis de la fracción 27 de heparina-agarosa (Figura 3.5) se observa un polipéptido que migra ligeramente por debajo de la subunidad σ^{49} , cuyo tamaño corresponde aproximadamente a 49.000 Da y, dado el grado de pureza de esta preparación, podría corresponder a un factor sigma homólogo al descrito en *S. coelicolor* y responsable de la transcripción del promotor *ctc*.

La transcripción del promotor *amy* produjo un transcrito que migraba a la altura de un fragmento de DNA de aproximadamente 230 pb. Las fracciones que permitían detectar el transcrito del promotor *amy*, coincidían con las que expresaban el promotor *ctc*, pero la diferencia entre las secuencias promotoras (Tabla 3.5) sugiere que su reconocimiento se realizaría por factores sigma diferentes. Como se mencionó previamente el promotor *amy* tiene una secuencia similar al consenso de promotores reconocidos por σ^{70} , por lo que se esperaría que fuese el factor sigma principal de *Streptomyces* u otro factor sigma que reconozca el mismo tipo de secuencia promotora el responsable de su transcripción. Dada la diferencia en la intensidad del transcrito entre los promotores *veg* y *amy*, ambas situaciones serían posibles:

1. Si la transcripción fuese debida al factor sigma principal, la diferencia en cuanto a la cantidad de transcrito detectado podría deberse a una mayor afinidad por el promotor *amy* que por el promotor *veg*, lo cual sería lógico dado que el primero es un promotor del mismo microorganismo, mientras que el segundo es un promotor de *B. subtilis* rico en A+T.
2. Otra posibilidad es que ambos promotores fueran transcritos por factores sigma diferentes que reconociesen el mismo tipo de secuencia promotora como los factores sigma homólogos a *rhoD* de *E. coli* (*hrd*). En *S. coelicolor* se han descrito cuatro genes *hrd* (Tanaka y col., 1991; Shiina y col., 1991), otros cuatro en *S. aureofaciens* (Kormanec y col., 1992) y tres en *S. griseus* (Marcos y col., 1995). Si este fuese el caso, la diferencia en la intensidad del transcrito se explicaría por una representación desigual de ambos factores en las preparaciones de la RNA polimerasa.

El promotor *amy* de *Streptomyces limosus* está sometido a regulación catabólica por carbono (Virolle y Gagnat, 1994), por lo que es posible que se requieran proteínas auxiliares para modular la transcripción de este promotor en *S. griseus*.

Los experimentos de transcripción *in vitro* con promotores regulados por fosfato: P_{saf} y P_{pab} (Figura 3.8, paneles D y E) o con la secuencia promotora P_{114} (datos no mostrados) no produjeron una cantidad detectable de transcrito con ninguno de los extractos enzimáticos utilizados. Para interpretar este resultado es necesario considerar algunos aspectos de la regulación por fosfato a nivel de transcripción que se han descrito en otros microorganismos considerados como modelo.

Así por ejemplo, en *E. coli* se ha caracterizado el regulón de fosfato, formado por los genes *phoA*, *pstS*, *phoE* y *ugpB*, que están involucrados en el transporte y la asimilación de fosfato. El estudio de los promotores del regulón de fosfato ha demostrado que se encuentran regulados positivamente por el producto del gen *phoB*. Experimentos de transcripción *in vitro* con los promotores de los genes *pstS* y *phoB* han puesto en evidencia que además de la holoenzima σ^{70} es necesaria la proteína PhoB para obtener transcripción, ya que la holoenzima por sí sola no es capaz de unirse al promotor (Makino y col., 1988).

El mecanismo de activación de los promotores regulados por fosfato en *E. coli* tiene lugar mediante el sistema de regulación de transducción de señal de dos componentes, formado por los productos de los genes *phoR* y *phoB* (Makino y col., 1989). El producto de *phoR* posee actividad quinasa capaz activar por fosforilación a la proteína PhoB. Esta en forma activa actúa como activador transcripcional al unirse a las "cajas de fosfato" de los promotores de los genes *pstS* y del mismo *phoB* (Makino y col., 1988).

Por otra parte, la expresión de la fosfatasa alcalina de *B. subtilis* en condiciones limitadas de fosfato, requiere de las proteínas PhoR y PhoP, que constituyen igualmente un sistema de transducción de señal de dos componentes. La secuencia de aminoácidos de PhoP posee un 40% de identidad al compararla con el activador transcripcional PhoB de *E. coli* y la proteína PhoR de *B. subtilis* presenta similitud significativa con la quinasa PhoR de *E. coli* (Seki y col., 1987; Seki y col., 1988). La región -10 de los promotores regulados por fosfato en *B. subtilis* contiene la secuencia de reconocimiento del factor sigma principal SigA, pero la región -35 no posee similaridad con ninguna secuencia consenso descrita para otros factores sigma, así como tampoco se han encontrado secuencias similares a las “cajas de fosfato” como las descritas en *E. coli* (Chesnut y col., 1991).

Dentro del marco de la homología existente entre los mecanismos moleculares de regulación por fosfato descritos en *E. coli* y *B. subtilis* sería lógico esperar que sistemas similares existiesen en actinomicetos. De aquí se dedujo una posible explicación para la ausencia de transcripción obtenida con promotores regulados por fosfato en *S. griseus*: la transcripción de estos promotores probablemente requiere una proteína activadora similar a PhoB de *E. coli* o a PhoP de *B. subtilis*, probablemente ausente en las fracciones más purificadas con las que se realizaron los estudios de transcripción *in vitro*.

Con el fin de comprobar esta hipótesis se realizaron experimentos de retraso en geles con los promotores regulados por fosfato P₁₁₄ y P_{saf}. Asturias (1991) había descrito en *S. lividans* la existencia de proteínas de unión a ambos promotores. En *S. griseus* se ha detectado una proteína de unión al promotor del gen *saf* en condiciones limitantes de fosfato. La formación del complejo DNA-proteína se mantiene incluso cuando se añade a la mezcla cantidades del orden de 3 µg de DNA competidor y existen datos preliminares que sugieren modificaciones en la proteína que se une a la secuencia promotora (Alicia Martín, comunicación personal). Estos resultados concuerdan con la existencia en *Streptomyces* de un mecanismo de regulación por fosfato similar al encontrado en *E. coli* y *B. subtilis*, aunque la prueba definitiva sería la purificación de la proteína homóloga a PhoB de *E. coli* demostrando su capacidad de activar los ensayos de transcripción *in vitro* y la clonación del gen correspondiente de *Streptomyces*.

3.3. CLONACION Y ANALISIS DEL GEN *hrdB* DE *S. griseus*

3.3.1. Aislamiento de clones de *S. griseus* homólogos al gen *hrdB* de *S. coelicolor*

El aislamiento del gen *hrdB* de *S. griseus* IMRU 3570 se abordó mediante hibridación heteróloga de una genoteca de *S. griseus* con un fragmento del gen *hrdB* de *S. coelicolor* A3 (2) (Shiina y col., 1991) cedido por el Dr. Hideo Takahashi de la Universidad de Tokio. Para la construcción de la genoteca de *S. griseus* se utilizó el vector GEM-12, derivado comercial de los vectores de sustitución fágicos EMBL-3 y 4 (Frischauf y col., 1984). Este tipo de vectores sigue siendo ampliamente utilizado en base a dos ventajas fundamentales: Por un lado aprovechan la elevada eficiencia del proceso de encapsidación *in vitro* del DNA de Lambda para la obtención de un elevado número de recombinantes y además admiten tamaños de inserto considerables (12 a 15 kb), que permiten la obtención de genotecas representativas con facilidad.

Utilizando las técnicas recomendadas por los proveedores del vector GEM-12 y del *kit* de encapsidación *in vitro* así como los procedimientos descritos para la construcción de este tipo de genotecas (Maniatis y col., 1982; ver apartado 2.13 de Métodos) se obtuvieron 9.000 fagos recombinantes en la cepa de *E. coli* NM539. Asumiendo un tamaño de genoma de 8.000 kb para *Streptomyces* (Kieser y col., 1992) y aplicando la ecuación descrita por Clarke y Carbon (1976): $N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$; en la cual P es la probabilidad de que cualquier secuencia de DNA esté representada en la genoteca, f la fracción del genoma contenido en cada clon y N el número de clones necesarios para lograr una probabilidad P, la genoteca construida tendría una probabilidad del 99,99999% de ser representativa del genoma de *S. griseus*.

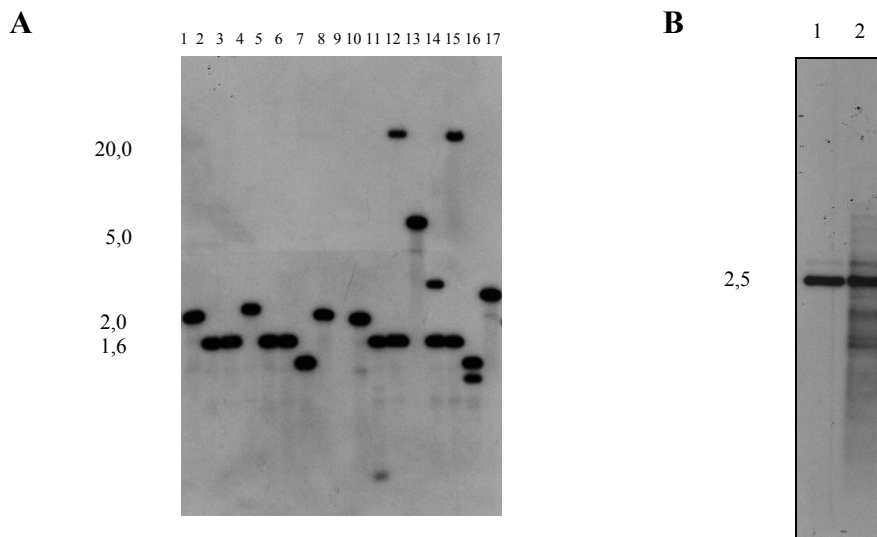


Figura 3.9. A. Hibridación del DNA de los fagos GEM-B5 (carriles 1-8) y GEM-B6 (carriles 10-17) con la sonda *SacI* de 450 pb del gen *hrdB* de *S. coelicolor*. El DNA de los fagos fue digerido con *PvuII* (carriles 1 y 10), *BamHI* (carriles 3, 6, 12 y 15), *SacI* (carriles 4 y 13), *SmaI* (carriles 8 y 17), *PvuII-BamHI* (carriles 2 y 11), *SacI-BamHI* (carriles 5 y 14) y *SmaI-BamHI* (carriles 7 y 16). B. Hibridación de digestiones *SmaI* del DNA del fago GEM-B6 y del DNA total de *S. griseus* con la misma sonda que en A.

Para la identificación de clones portadores del gen *hrdB* de *S. griseus* se utilizó como sonda un fragmento *SacI* de 450 pb interno del mismo gen de *S. coelicolor*. Esta sonda se hibridó con 20.000 placas de lisis de la genoteca transferidas por duplicado a filtros de nitrocelulosa a partir de una placa de Petri de 150 mm de diámetro. La hibridación produjo 7 señales positivas coincidentes en ambos filtros, que permitieron el aislamiento de 7 fagos recombinantes mediante tres rondas sucesivas de hibridación y purificación. Una vez purificados a homogeneidad, los 7 fagos recombinantes se amplificaron a partir de placas de lisis aisladas y se obtuvo para cada uno de ellos una suspensión con un título aproximado de 10^{10} ufp/ml. Estos 7 fagos positivos se denominaron GEM-B1 a GEM-B7.

Con el fin de determinar el mapa de los fagos aislados y delimitar la región de hibridación con la sonda del gen *hrdB* de *S. coelicolor*, se extrajo su DNA a partir de lisados en medio líquido y se sometió a digestión con endonucleasas de restricción, analizando los fragmentos obtenidos por hibridación de *Southern*. En la Figura 3.9 se muestra el resultado de la hibridación de digestiones del DNA de los fagos GEM-B5 y B6 con la sonda del gen *hrdB* de *S. coelicolor*, así como el patrón de hibridación obtenido con la misma sonda para una digestión *SmaI* del fago GEM-B6 y del DNA total de *S. griseus*.

El análisis de la hibridación de digestiones del DNA de los fagos con las endonucleasas *BamHI*, *Sall*, *SmaI*, *PvuII*, *SacI* y *EcoRI* puso de manifiesto que los 7 fagos pertenecían a una misma región genómica. Los fagos GEM-B2, B3, B4 y B5 eran indistinguibles por su mapa de restricción, teniendo probablemente un mismo origen clonal, mientras que los tres restantes poseían mapas desplazados dentro de la misma región de DNA. En la Figura 3.10 se muestra el mapa físico de la región genómica de *S. griseus* que hibrida con la sonda del gen *hrdB* de *S. coelicolor*.

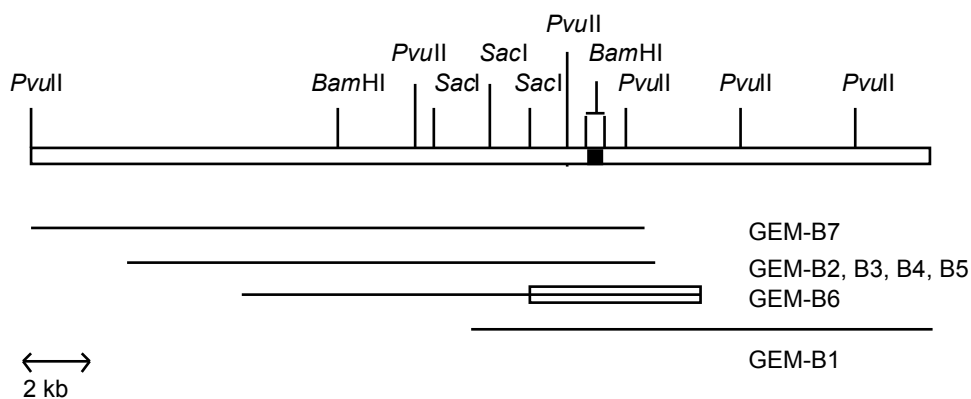


Figura 3.10. Mapa físico de la región del genoma de *S. griseus* que hibrida con la sonda del gen *hrdB* de *S. coelicolor*. Las líneas horizontales debajo del mapa de restricción representan los fragmentos de DNA contenidos en los fagos aislados de la genoteca. El cuadrado negro indica el fragmento *BamHI* que delimita la zona de hibridación y el rectángulo sobre el fago GEM-B6 representa el fragmento *SacI* subclonado para su secuenciación.

3.3.2. Determinación y análisis de la secuencia del fragmento que contiene el gen *hrdB*

Con el fin de obtener la secuencia nucleotídica de la región que producía hibridación positiva con la sonda del gen *hrdB* se subclonó en el vector pBluescript KS+ un fragmento *SacI* de 5 kb del fago recombinante GEM-B6 (Figura 3.10). Los plásmidos obtenidos con el fragmento en las dos orientaciones se denominaron pULAM116 y pULAM119. La secuenciación de un fragmento de tamaño superior al del gen esperado permitiría comprobar si el gen *hrdB* se encuentra formando parte de un operón con otros genes para la biosíntesis de macromoléculas como ocurre con los factores sigma principales de *E. coli* y *B. subtilis*.

Para la secuenciación del fragmento *SacI* se generaron deleciones unidireccionales sucesivas mediante el sistema comercial *Erase a base* (Promega). Con este procedimiento se construyeron 20 clones de secuencia a partir de cada plásmido, que permitieron obtener la secuencia completa del fragmento en ambas orientaciones. El fragmento contenía 4796 pb desde el sitio *SacI* hasta *Sau3AI* del extremo del inserto de GEM-B6, ya que el segundo sitio *SacI* del fragmento subclonado resultó pertenecer al vector GEM-12 (Figura 3.10).

La búsqueda de marcos de lectura abiertos potenciales (ORFs) se realizó con el algoritmo de Gribskov y col. (1984) del programa Geneplot de DNASTAR, detectándose 4 posibles zonas codificantes: la primera, denominada ORF1B, se extendería desde el inicio hasta la posición 410,

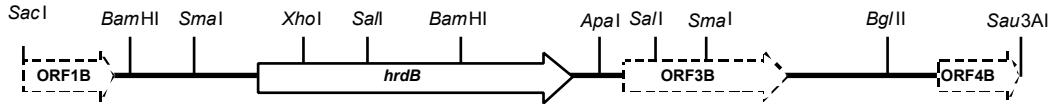
estando truncada la región anterior al sitio *SacI*; la segunda, denominada ORF2B, comprendería desde el nucleótido 1126 hasta el 2655; la tercera (ORF3B) desde la posición 2897 hasta la 3709 y la última, también incompleta y denominada ORF4B, desde la posición 4617 hasta el final del fragmento secuenciado. En la Figura 3.11 se muestra la secuencia de nucleótidos completa así como las secuencias de aminoácidos deducidas para las ORFs mencionadas.

La ORF1B es un marco de lectura abierto cuya secuencia se conoce a partir del sitio *SacI* y se extiende por delante del fragmento secuenciado, por lo que carecemos de la secuencia de la zona amino terminal. La ORF1B termina en el codón TGA ubicado entre los nucleótidos 411-413 y a 58 pb de dicho codón se encuentra una secuencia repetida e invertida con una energía libre estimada $G_{(25^{\circ}\text{C})} = -56,9$ kcal/mol, pudiendo actuar como terminador transcripcional. Una comparación de la secuencia de aminoácidos deducida con las secuencias de proteínas en las bases de datos no permitió identificar similitud significativa con ninguna proteína conocida.

A partir de la ORF2B se dedujo una proteína de 510 aminoácidos con un tamaño de 55.768 y un punto isoelectrónico estimado de 6,13. El contenido en G+C de la ORF resultó ser del 67,84%. Precediendo el triplete inicial GTG se detectó la secuencia GAGAGG rica en purinas, que podría actuar como sitio de unión al ribosoma (RBS) (Bibb y Cohen, 1982). La búsqueda de posibles estructuras secundarias en el RNA mensajero que pudieran actuar como terminador transcripcional, permitió detectar la presencia de una secuencia repetida e invertida situada 27 pb después del codón de terminación TGA. Dicha estructura se encuentra señalada en la Figura 3.11 y posee una energía libre estimada $G_{(25^{\circ}\text{C})} = -56,9$ kcal/mol.

La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida para la ORF2B con las bases de datos de proteínas NBRF-PIR, Swiss-Prot y GBTran reveló una considerable similitud con factores sigma de RNA polimerasa, presentando la mayor identidad en secuencia de aminoácidos con la proteína HrdB de *S. coelicolor* A3(2) (90,5%). Un alineamiento optimizado de las proteínas HrdB descritas en *Streptomyces* se muestra en la Figura 3.15 y en el apartado 3.5 se hace un análisis detallado de la secuencia de aminoácidos.

A



B

SacI

```

GAGCTCGCTGGACGATCGAGCCGCTCGCCGCCCGCTCGCCGGGGCCACGGCCGTGAGGACGCCAGCAGCGGCTCGCGGACATGGTGGAGATCATGGG
a r w t i e p l a a r l a a g h g r e d a q q r l a d m v e i m g
CCAGCCCTGGGCCAGGGCGACCTGATGACCTTCTCCCGCCGACGCCGAATTCCACGGACTGCTGATCCAGCTCGCCGGCAACCGCATGCTGGAGCAC
h a l g q q g d l m t f s r a d a e f h g l l i q l a g n r m l e h
CTCTCCGGCATCGTCTCGCCGCCCTCCAGGTCCTCGCCGGCCCGGCCACCGGCTGCGACCGGCCAACGAGACCTCTCTCGCACACCACCGCCGCATCA
l s g i v s a a l q v s g g p a t g c d r p n e t s l a h h a r i i
TCGACACCTTCGCCGAGGGCGACGGCCGCCCGCCGAGCAGCCATGCCCGAGCTCCTGACCGCCACCCCGAGGTGGAGCGGGTCTCCCGGACCGCG
d t l a e g d g a a a e h a m r q l l t a h p e v e r v v p g p r
CGAGCAGCACTGACCTCGCCGCCACGGCCGCCCTCCGCCGCTTCGGTCGCCGCGAGTGTGCCCCCGCTCTGCCGGCCACCCCGGGATCCCG
e q h
CGAGCGGGGAGGCCGCGCGCCGCCGCCGCCACCCGCCCGGACGCCCGCCGACCCGGAGCCGACCCGGGAAACGTTCCCTCCCGCCCGCCCGGG
CGACACGACGGCCCTGACAGCCCGGCAAGCCCGCTCAGGGGCCCATGTTTGGCCGCCGGGCGGTATGCGCGTGAGCGGTAAGAGGAAACGTGG
GCGCGTAAGGGGAAGGGGAGGAAGCCGTGCGTCCGACCGGACGGAGCCGAGTACGGTCCGGAACCCGGTGGCTCCTTCCCGCCCGGGCCGTACCGCGCA
CCGTGCTCGGGGCTCCCGTGACCGGAGTCCGGGCTCCGGAGCTTCACGGCATCTTTATGTCGCCCTCTGTGCTATTCCGGAGAATTTGACCGATATA
GGGGTGTGACTCGGGCCACGTGGATTGGGCGTAACGCTCGACCGGGCAGCCGATGACCTAAGAGGTGATAGCCGAAGAGGGAATGCGTCTGCTTCGT
GGCGCTTACCCTCCCGGTCGCCGCAACGTCGCCGTCCTCCCGTCCCAATCCACCGCTGGGTCGTCGCCCTCCCGTCTTACCAGGACAGGGGCCGAAGCCGT
TATTCAACGTTCCGAGAGGTGTGTCGGTCCGGCAGCACATCCCGTACGCTCCCGCCGGAGATCGCCGAGTCCCGTCTGTGATGGCGTGTATCGAGCGG
v s a s t s r t l p p e l a e s q s v m a l i e r
GGAAAGGCTGATGGGCAGATCGCCGGCGACGAGTGGCTCGGGCCCTTCGAAGTGACAGATCCCGGCCACTCAGTGGAAAGACGTTCTGCGCAGCCTCA
g k a d g q i a g d d v r r a f e a d g i p a t q w k n v l r s l n
ATCAGATCCTCGAGGAAGAGGTGTGACGCTGATGGTCACTGCGCGGGAGCCCAAGCGCACCCGAAAGAGCGTTCGACGGAAGAGCCCGGCAAGCGCAC
q i l e e e g v t l m v s a a e p k r t r k s v a a k s p a k r t
CGCCACCACAGGACGGTGGCCCAAGGGCCCGCCGTCGAAGAGAGGCCCGCCCGCCGCGCCACGGACGAGGAGTCCGAGGCGCCCGTGAAGAAG
a t t r t v a a k a a p v k k s a p a a a p t d e e s e a p v k k
GCCCGGCCAAGAACACCACCGCAAGAACGGGGAAGGCGAGCGGCAAGAACCGCCGCAAGAACCCGCGCCAAAGAACGTCGTCGACGAGC
a a a k k t t a k k t a k k a t a k k t a a k k t a a k n v v d e l
TGCTCGACGACGAGGCCGAGGAGAGCCACCCCGCAAGCCGGGCGAGGAGGCCCGCCGAGGGAACCCGGCGGAGAGCCAGGCTTCGTCCTGTG
l d d e a e e k p t t g k p g e e g a p e g t g g e s q g f v l s
CGACGACGACGAGGACGACGCCGCCCGCCAGGTCGCGGCCCGGTCGCCACCGCCGACCCCGTCAAGGACTACCTCAAGCAGATCGGCAAGTCCCC
d d d e d d a p a q q v a a a g a t a d p v k d y l k q i g k v p
CTCCTCAAGCCGAGCAGGAGTGAAGTCCGCAAGCGCATCGAGGCCGGCTCTTCGCCGAGGACAAGCTCGCCAACCGGCAAGATCGCCCAAGC
l l n a e q e v e l a k r i e a g l f a e d k l a n a d k i a p k l
TCAAGCGGAGCTGGAGATCATCGCCGAGGACGGCCCGCCGCAAGAACCACCTGCTGGAGGCCAACCTCCGCTCGTGGTCTCGTGGCCAAAGCGTA
k r e l e i i a e d g r r a k n h l l e a n l r l v v s l a k r y
CACCAGCCGCGGATGCTCTTCTGGACCTGATCCAGGAGGGCAACCTCGGTCTGATCCGCGCGGTCGAGAAGTTCGACTACACCAAGGGCTACAAGTTC
t g r g m l f l d l i q e g n l g l i r a v e k f d y t k g y k f
TCCACGTACGCCACCTGGTGGATCCGGCAGGATCACCCCGCCATGGCCGACAGGCCCGCCACCATCCGATCCCGGTGCACATGGTCGAGGTCATCA
s t y a t w w i r q a i t r a m a d q a r t i r i p v h m v e v i n
ACAAGCTGGCCCGCTCCAGCGTCAGATGCTCCAGGACCTGGCCCGGAGCCACCCCGGAGGAGCTGGCCAAAGGAATCGACATGACCCCGGAGAAGGT
k l a r v q r q m l q d l g r e p t p e e l a k e l d m t p e k v
CATCGAGGTCGCAAGTACGGCCCGGAGCCATCTCCCTGCACACCCCGCTCGGCGAGGACGGCGACAGCGAGTTCGGTGACCTCATCGAGGACTCCGAG
i e v q k y q r e p i s l h t p l g e d g d s e f g d l i e d s e

```

ORF1B

ORF2B

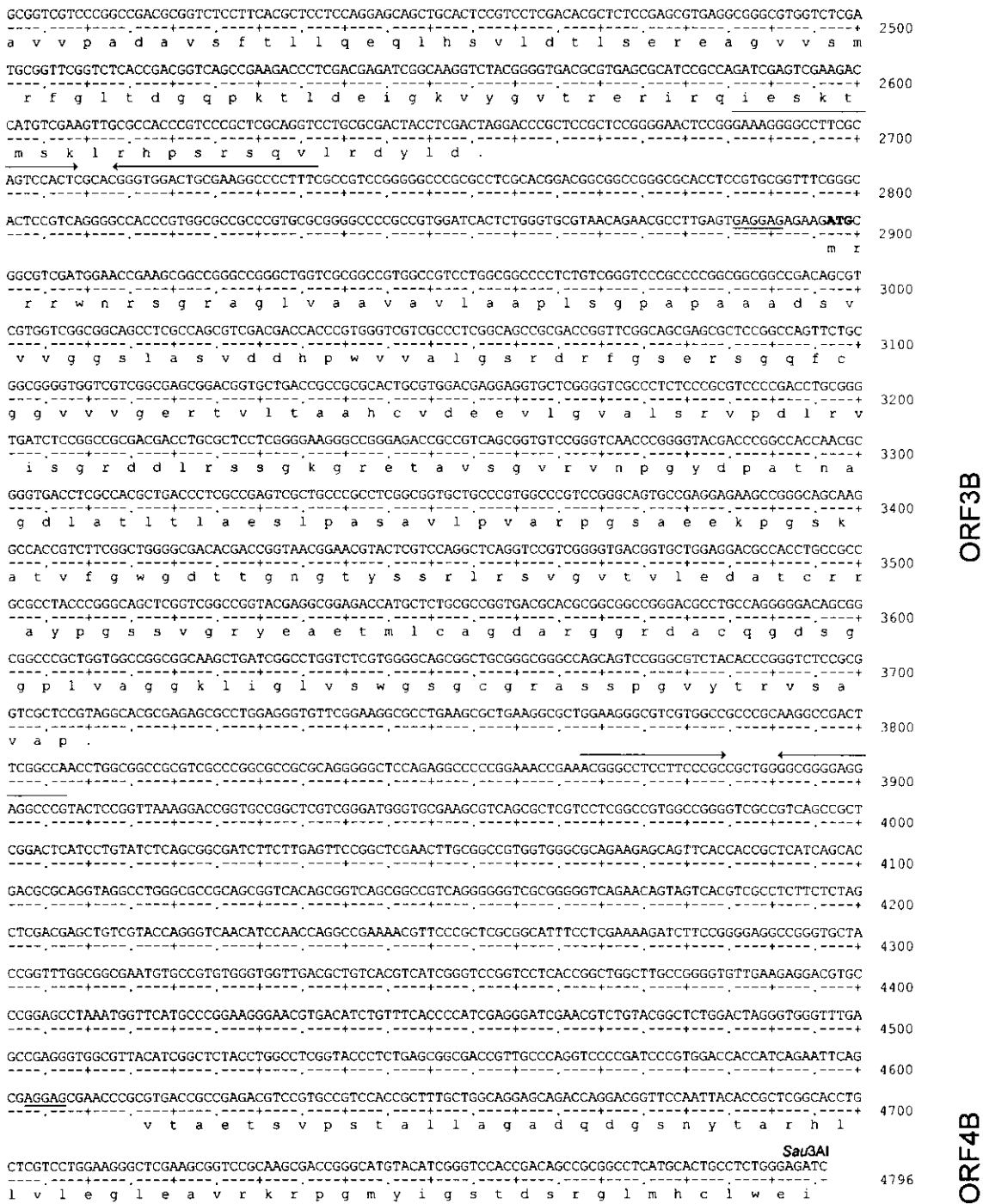


Figura 3.11. A. Mapa de restricción del fragmento *SacI* - *Sau3AI* de 4.796 pb que contiene el gen *hrdB*. Las flechas indican la posición y orientación de las cuatro ORFs identificadas mediante el programa Geneplot de DNastar. **B.** Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de las cuatro ORFs. Las flechas horizontales convergentes representan posibles regiones terminadoras de la transcripción. Las posibles secuencias de unión al ribosoma se encuentran subrayadas y la secuencia correspondiente a la *caja rpoD* del gen *hrdB* se muestra encerrada en un rectángulo

La proteína deducida de la ORF3B estaba formada por 271 aminoácidos, con una masa molecular de 27.410 Da, siendo su punto isoeléctrico deducido de 8,27. El contenido G+C de la ORF alcanzaba el 76,11%. Precediendo el triplete inicial ATG se detectó la secuencia GAGGAG rica en purinas, que podría actuar como secuencia de unión al ribosoma (RBS) (Bibb y Cohen, 1982). La búsqueda de posibles estructuras secundarias en el RNA mensajero determinó la existencia de una secuencia repetida e invertida 155 bases después del codón de terminación TAG, con una energía libre estimada $G_{(25^{\circ}C)}$ de -54,1 kcal/mol, que podría actuar como un terminador de la transcripción independiente del factor rho. La comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida

de la ORF3B con las bases datos de secuencias de proteínas, puso de manifiesto la existencia de una elevada identidad en ciertas regiones de la secuencia de aminoácidos con los centros activos de proteasas de serina según se describe en el apartado 3.9.1. La proteína codificada en la ORF3B se denominó SprC (*serine protease C*).

La secuencia de la ORF4B tiene dos posibles codones de inicio GTG: el primero en las posiciones 4617-4619 y el segundo en las posiciones 4635-4637 del fragmento secuenciado. Debido a que en la secuencia de nucleótidos no está incluido todo el presunto gen, se han podido deducir sólo 60 aminoácidos desde el primer triplete GTG. La búsqueda de secuencias homólogas en las bases de datos de proteínas Swiss-Prot, NBRF-PIR y GBTran reveló la existencia de similitud significativa con DNA girasas, como se muestra en el apartado 3.9.2.

3.4. CLONACION Y ANALISIS DE LOS GENES *hrdD* Y *hrdT*

3.4.1. Aislamiento de clones homólogos a la caja *rpoD*

Aislado el gen *hrdB* de *S. griseus*, correspondiente al factor sigma principal, se consideró la posibilidad de analizar la existencia de genes homólogos que codificasen para otros factores sigma. En *S. coelicolor* se había descrito la existencia de cuatro genes para factores sigma de la familia σ^{70} de *E. coli* y se identificaron mediante el uso de una sonda sintética correspondiente a la caja *rpoD* (Tanaka y col., 1988). Esta sonda presentaba una clara ventaja frente a fragmentos mayores debido a la total conservación de la secuencia en la región correspondiente de los genes *hrd*. Con el fin de analizar la presencia de otros genes *hrd* en *S. griseus* se utilizó la misma sonda oligonucleotídica para la caja *rpoD* descrita por Tanaka y col. (1988) para identificar los genes *hrd* de *S. coelicolor*. La hibridación de digestiones *Sma*I del DNA total de *S. griseus* con esta sonda puso en evidencia la existencia de dos fragmentos *Sma*I de 1,4 y 2,9 kb que producían una clara señal de hibridación, además del ya esperado para *hrdB*, de 2,5 kb. El aislamiento de clones portadores de estos fragmentos se realizó a partir de la genoteca de *S. griseus* construida en el vector GEM12. Utilizando el oligonucleótido correspondiente a la caja *rpoD* y las técnicas descritas para el aislamiento del gen *hrdB* se purificaron 22 fagos positivos. La hibridación de digestiones *Sma*I del DNA de los fagos permitió diferenciar los portadores de cada uno de los dos fragmentos *Sma*I identificados en el DNA total (Figura 3.12).

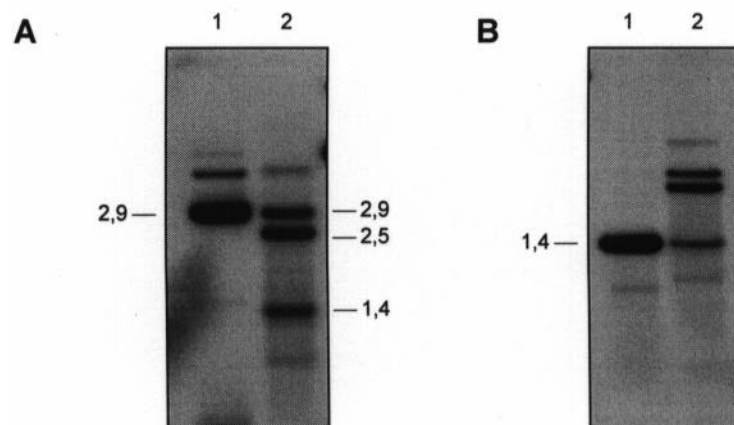


Figura 3.12. Hibridación con el oligonucleótido correspondiente a la *caja rpoD* del DNA de dos fagos aislados de la genoteca (carril 1) y el DNA total (carril 2) digeridos con la endonucleasa de restricción *Sma*I. En el panel **A** se muestra la señal de hibridación de 2,9 kb del fago GEM101 y en el panel **B** se muestra la señal de hibridación de 1,4 kb correspondiente al fago GEM117. La señal de 2,5 kb que aparece en el DNA total entre las bandas de 2,9 y 1,4 kb corresponde al gen *hrdB*.

3.4.2. Secuencia de la región portadora del gen *hrdD*

El fragmento *SmaI* de 2,9 kb se subclonó en pBluescript KS+ a partir del fago GEM101, obteniéndose los plásmidos pULAM101 y pULAM1011 portadores del inserto en ambas orientaciones. Para la obtención de clones de secuenciación se utilizó el sistema comercial de delección unidireccional *Erase-a-base* (Promega). Los 24 clones obtenidos se secuenciaron con el sistema comercial Sequenase (USB) y el ensamblaje de las secuencias obtenidas cubría la extensión del fragmento en ambas orientaciones, con un total de 2896 nucleótidos.

El análisis de la secuencia con el programa Geneplot (DNASTar) reveló la existencia de 3 marcos de lectura abiertos. El primero se denominó ORF1D se extendía desde el nucleótido 160 al 919, el segundo, ORF2D, se transcribía en sentido opuesto desde el nucleótido 1510 al 928 y por último la ORF3D se localizó entre las posiciones 1684 y 2680. En la Figura 3.13 se muestra la secuencia nucleótidos del fragmento, así como la secuencia de aminoácidos deducida para las ORFs identificadas.

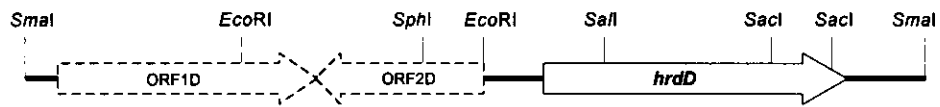
La comparación de las proteínas deducidas de las ORFs con las bases de datos reveló que sólo el producto de la ORF3D tenía semejanza con proteínas Hrd, siendo particularmente elevada la similitud con las proteínas HrdD de *S. coelicolor* y *S. aureofaciens* (87.7 y 85.5% de aminoácidos idénticos, respectivamente). La elevada identidad parecía indicar que la ORF3D correspondía al gen *hrdD* de *S. griseus*.

Este gen codificaba para un polipéptido de 332 aa con un tamaño esperado de 36.772 Da. Una posible secuencia de unión al ribosoma (AAGGGAG) se encontró cinco bases antes del codón de inicio ATG y una secuencia repetida invertida se identificó 27 pb después del codón de fin TGA. La energía libre de dicha estructura sería $G_{(25^{\circ}\text{C})} = -34$ kcal/mol. En el apartado 3.5 se analiza detalladamente la secuencia deducida para la proteína HrdD de *S. griseus* así como su similitud con otras proteínas homólogas. Un alineamiento optimizado con otras proteínas HrdD descritas en *Streptomyces* se muestra en la Figura 3.15.

Al secuenciar el fragmento *SmaI* de 2.9 kb que contiene el gen *hrdD* se localizaron dos ORFs situadas en la región 5' del gen (Figura 3.13). Al realizar una comparación contra las bases de datos de proteínas Swiss-Prot/PIR/GBTran, la proteína deducida de la ORF1D mostró un 40.9% de identidad en aminoácidos con una proteína hipotética de 28.3 kDa, traducida de la ORFC del grupo de genes *tolC-ribB-htrP* de la región ECOLUXH de *E. coli*. La función de dicha proteína en *E. coli* es desconocida. El único aspecto significativo que puede destacarse es la proximidad de esta región al gen *rpoD* de *E. coli*, cuya separación es aproximadamente medio minuto del cromosoma, que corresponde a unas 24 kb (Bachmann, 1990).

Adyacente al inicio de la ORF2D, codificada en la cadena complementaria a la del gen *hrdD*, se encontró una posible secuencia de unión al ribosoma (GGAGGA) separada 8 pb del codón ATG. La secuencia de aminoácidos deducida para esta ORF mostró un 67.4% de identidad con la ORFX localizada en la misma posición con respecto al gen *hrdD* de *S. coelicolor* A3(2) (Buttner y col., 1990), un 26.8% de identidad con el producto del gen *bar* de *S. hygrosopicus* (Thompson y col., 1987) y un 27.5% de identidad con el producto del gen *pat* de *S. viridochromogenes* (Wohllenben y col., 1988). Un análisis más detallado se presenta en el apartado 3.9.3.

A



B

SmaI
 CCGGGCCGGTCGCCGGGATAGGTGGTCATGTTCATCCACTCTACGGAAGCTTCCTTGAAGTGAACAAAACGGCGGTACGGTCGGCGTAGAACTTGAGA

 GTTCAAGTATCGGGTTTCAGTATCCAGGAGTGGAGTCGCCATGAACAGCACCCGCGAGCGATGCCCGCCCTCTACCTCAGCCACGGCGCCCGCCCTCGC

 m p a l y l s h g a p p l a

 CGACGACCCCGTCTGCGCCCGCCAGCTCGCCGCTGGTCCGCGGAGCTGCCCGCCCGCCAGCGATCCTCATGGTCTCGCCCACTGGGAGGAGGCCCCG

 d d p v w p g q l a a w s a e l p r p t a i l m v s a h w e e a p

 CTGCGCTCGGGCGGTCGCGACCCCTCCCGTGGTCTACGACTTCGCGGCTTCCCGAGCACTACTACCGGTCCAGTACGCGCCCGCCCGCGCCCGC

 l a l g a v r t l p l v y d f w g f p e h y y r v q y a a p g a p a

 CCCTCGCGACTCGGTCCGCAAACCTCTGCGCCCGCCCGCACCCCGTCCAGGACATCCCGACCGCGCCCTGGACACGGCGCCTACGTCCCGCTCGT

 l a d s v r k l l a a p g t p v q d i p d r g l d h g a y v p l v

 AGAGATGTACCCGGACCGGACATCCCGCTCTCCAGATGTGGTGCACCCCTCGACCCCGCCGCTCATGGACATCGGCGCAAACCTGGCCCGCTG

 e m y p d a d i p v l q m s l p t l d p r r l m d i g r k l a p l

 CGGACGAGGGCGTCTGATCGTCCGCTCCGCTCTTCACCCCAACCTGGCCGCTGCGGAGGGCGGACCCCTCTGGTCCGCGCAATTGACG

 r d e g v l i v g s g f f t h n l a a l r q g g t p s w s a e f d d

 ACTGGGCGCGCGCCCTCGACGCGGGGACATCGACACCCCTTCGACTTCGCGCACCGCCCGCCCGCGCACCCCTTGCCACCCCGCACCGAACA

 w g r a a l d g g d i d t l l d f r h a a p a g t l a h p r t e h

 CTTGCCCCCTCTTCGTACCCCTCGGCGCGGAGCCACCGCGGACCTCGCCACCCAGCGCAGCATCATCGAGGGCTTCGGATGGGGTTCGCGAAG

 f a p l f v t l g a a d a t g d l a t q r s i i d g f w m g l a k

 CGATCGGTGCAGTTCGGCTAGGGCTCACATGCGGCGGCTCTGATGAGGGCGCCCGCCCGCTCAGCGCGCCCGCCAGCTCCTTCTCGTACCA

 r s v q f g . A G T G T A C G C G G C C A G A C T A C G T C C G G G C C G G G G G C A G T C G C G G G G G T G G T C G A G A A G A G C A T G G T

 . m r g t q h l r g a g g d a g g g g l e k e y w

 GGCGTGCAGGGTCATGGCGGGCTTGAACGCGGGTGGACCGGCATGCAGGGCTAGCCCGCTTCAGCTTCGCCACACGTCCGCCACCCCTCCGACGCAAC

 r v d w y r g f k r g v q g y t g i p r f d f r t h l r h s a d n

 CCGACCCACTCGGCGCATCGCGCCACGTCCAGGAGCGCCGGTCCCGCAGCTTCCCGGCACATGTCCCGCACGGGTGCGGCGCGGGCGGGCGCA

 p q t v g a y a r h l d e g a l a d f l a t y l a t g v g r g a a

 GGCCCGCGTTCATCGCACTGGAGCCGGCTCCAGCGCATCGCGGGAAGCCCGCTCCCGCTCGACCGCATCGGCTCGTCCGCGAGCCCGCGCT

 d p a c y v s v e a s t a y a a k p r l p s s t a y g l l r e p g s

 GCCCGCCCGAGGCGCCTTSGTAGTCCGCGCACGCCGCGAGGAGCCACCCCTCCTTGGTGCAGTACGAGGAGGCCCATTCGCCGTGCGACAGC

 p a p e a a v m l r h p g d k p h s l f w q m r g e p t l p v t d

 TTCCTAGCCTCAGGCCTCTTCATCACCACATCTCCAAGCACTCCGGGCACTCCAGGAGCGATAGGACCGGACTGGACGCCAAGGGCGGAGGGG

 f t i p t r l v y h n y l n t l g t l d e a i g p r v q p e a t g

 GCGGTGTTCATCCGATCATCTCCCGCCTGTGGCCGACAGGGTACTGCATGATCCGGAAAAACAATGAGCAGGTGGGAATCTGTCCGATTGCAAT

 CGCCACAGTAAGGCTAGTAGGAGGGCGGGACCGGCTTCCCATGACGACTAGGCTTTTGTACTCGTCCACCCCTTAAGACAGGCCTAACGTTA

 r p t m

 CGTGTATCCTACGGATGCGCAACCGGGCCCGGATGTGGAGTCCGCGAGTCCACCACTCATCGCAAGGGAGCACGCATGCAACCCGTCGCGT

 m a t r a v

 CGCCCGTTCGTCAGCCCGCCCTCCGCGGAGACCGGCGGCGAGGCGTCCGCGGACCGGCGAGATCGCGACCCGACCTTGTTGGCATGTATCTC

 a r r q p a a s g e t g a a g s v r a t g e i a d r d l v g m y l

 GACGAGATCGCCCGCACCCGCTGCTGACGCGCGGAGGAAGTGGAGCTGCCAGACCATCGAGGCGGGTCTACGCGGGAAGATCTCGACGGCG

 d e i a r t p l l d a a k e v e l s q t i e a g v y a g k i l d g e

 AGTTCGACAGGACTCCGCGGAGCTTCCCGGAGGACTGGAAGCCCTCGTCGCGGAGGGGAGCGGCGCAAGGACGCTTCATCCGGTCCAACCTCCG

 v d s d s a g a s r e e l e a l v a e g e r a k d v f i r s n l r

 CCTGTCGTCGCGTGGCCCGCTACCCACGACGGCCCTCCCGTGTCTGACCTCATCCAGGAGGGAAACCGCGCCCTGGTCCGCGAGTCGAGAA

 l v v a v a r r y p r s g l p l l d l i q e g n a g l v r a v e k

 TTCGACTAGCCCAAGGGCTTCAAGTTCACCACTACGCGCCTGGTGGATCAGGAGGCATCACCCCGCTCCATCGCGGACAGTCCCGCACCATCCGGC

 f d y a k g f k f s t y a t w w i r q a i t r s i a d q s r t i r l

ORF1D

ORF2D

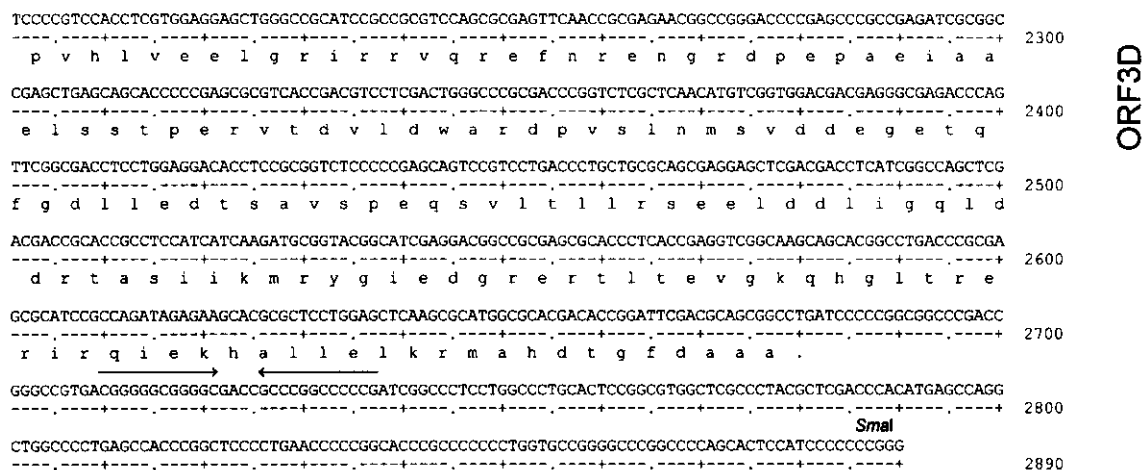


Figura 3.13. A. Mapa de restricción del fragmento *SmaI* de 2890 pb que contiene el gen *hrdD*. Las flechas indican la posición y orientación de las tres ORFs identificadas mediante el programa Geneplot de DNASTar. **B.** Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de las tres ORFs. Las posibles secuencias de unión a ribosoma se encuentran subrayadas. Las flechas horizontales convergentes representan posibles regiones terminadoras de la transcripción y la secuencia correspondiente a la caja *rpoD* del gen *hrdD* se muestra encerrada en un rectángulo.

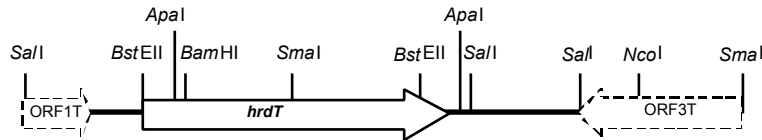
3.4.3. Secuenciación y análisis del gen *hrdT* de *S. griseus*

El fragmento *SmaI* de 1,4 kb homólogo a la sonda de la caja *rpoD* fue subclonado en ambas orientaciones en el vector pBluescript KS(+) a partir del fago GEM-117 dando origen a los plásmidos pULAM26 y pULAM29. La secuenciación del fragmento mostró que la ORF homóloga a genes *hrd* estaba incompleta y por ello se subclonó una banda *SaII* solapante de 1.5 kb en ambas orientaciones dando origen a los plásmidos pULAM1174 y pULAM11710. De este modo se obtuvo la secuencia de un total de 2329 nucleótidos del genoma de *S. griseus* que contenían tres marcos de lectura abiertos: el primero (ORF1T) se extendía desde el nucleótido 1 hasta el 201 estando truncado en su extremo 5'; el segundo, denominado ORF2T, abarcaba desde la posición 399 hasta la 1472 y finalmente un tercer marco truncado que se transcribiría en sentido opuesto desde el final del fragmento secuenciado hasta el nucleótido 1794 se denominó ORF3T.

La región que hibridaba con el oligonucleótido se detectó en la ORF2T, cuyo inicio más probable sería en la posición 399 de la secuencia donde se había detectado un triplete GTG precedido de una posible secuencia de unión a ribosomas (GGGAGG). A una distancia de 32 pb después del codón de fin TGA se identificó una secuencia repetida e invertida que puede formar una estructura de terminación con una energía libre $G_{(25^{\circ}\text{C})}$ de -26 kcal/mol. Esta ORF codificaba un polipéptido de 357 aa con una masa relativa de 38.764 Da. La comparación con las bases de datos de proteínas Swiss-Prot/PIR/GBTran mostró similitud con proteínas HrdA del género *Streptomyces*, pero el porcentaje de identidad era, en el mejor de los casos, un 10% inferior (70.9% con HrdA de *S. coelicolor*) al obtenido al comparar las proteínas HrdB y HrdD de *S. griseus* con sus homólogas en otros *Streptomyces*. Por esta razón el polipéptido codificado en la ORF2T no podía incluirse en ninguno de los grupos de proteínas Hrd descritas hasta el momento y para diferenciarlo se denominó HrdT.

A partir de la ORF1T se dedujo una secuencia polipeptídica de 66 aminoácidos que correspondería al extremo carboxilo terminal de una posible proteína. La comparación con las bases de datos de proteínas no identificó similitud significativa con otras proteínas. De la ORF3T se obtuvo una secuencia de 177 aminoácidos presuntamente correspondientes al extremo carboxilo terminal de otra proteína. En este caso la comparación con las bases de datos permitió identificar una serie de proteínas homólogas. Se encontró hasta un 50% de identidad con el extremo carboxilo de las proteínas MsbA de *E. coli*, con unas 20 Glicoproteínas P, también denominadas proteínas de Resistencia a Multidrogas, como la Pgp2 o mdr2 de *Cricetulus griseus*, con proteínas de secreción de hemolisinas de *E. coli* y de *Proteus vulgaris*, con la proteína Pdm1 de *Schizosaccharomyces pombe* que confiere resistencia a leptomicina B y otros antifúngicos, y con otras proteínas que al igual que las mencionadas pertenecen a la familia de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Estas proteínas intervienen en el transporte activo de moléculas a través de la membrana citoplasmática (apartado 3.9.4).

A



B

Sall

```

GTCGACGAGGCTACGCCGGGAGCAGCTGGTCAAGGTCGGCCTGCGCGCCGTCEAACGCCGATCCGCGACCTCCAGGGCACCTTCACCCGCGTCGCCG
v d e v y a g e q l v k v r l r a v e r r i r d l q g t f t r v a a 100
CCCAGGGCGACACAGCGCAACTCGCCTCGGTACAGAACAGTTGGTGGTCTCCAGCAGTACGACCCGGAGCCTGCGCAACAACGGCGCCAGGCCCTGTA
q g d q t q l a s v q n e l w v l q q y d r s l r n n g a q a l . 200
GACGCCACGCCCCGCTCGCCGCGCCGGGCGAGGCCCTCCGGAAAAGTCCGGACGCACTCTCGTGGTTAAGGCGGGTGTGCCGCACACTGGTCCGGCC
CCTCGSCCCCGGGCTGTCTCCCCCGCACCGCCGACCTCGCACGTCTGACGCACCATCCCCCGATCCGCCACGGGATCACC CGGAGGTCACCCCCCGT
v
GCAGACCAGSCCCCTCGCTCCGCCCCACCGCTCCGCCCGCGTCTCGCCCCGGCGTCCCCACCCCGCGCAGGTCGCCCCAGCGGGCCCGCCGGCCGC
q t r p p r s a p t a p p a v l a p a v p t p r r s p q r a p a g 500
GGAGCCGGGACCGGGCCGAGGGCGCGGGCGGGGTACCGCCGGATCCGAGCAGGGGGGGCGCCGCCCGACCTCTCCGGCAGTACCTCCGGG
g a g t g p q g a g g r v p a g s e q a g a a a p d l f r q y l r e
AGATCGGGCGCATCCCGTGTCTCGCCCGCCGACGAGGTGGAGCTGGCCCGCGCGTCCGAGGCGGGCGTGTTCGCCCGCGGAAGCTCGCCGGGGCTG
i g r i p l l s a a d e v e l a r r v e a g v f a a a k l a g g c
CGCGGACGCGGCTCTCGCCCGGACCTCGCGCGGCTGGTGGTCTCGGGGAGCGGGCAAAGGGCGGCTCATCGAGGCCAACCTCGCGCTCGTCTCG
a d a g l a r d l r r l v v l g e r a k g r l i e a n l r l v v s
GTCGCCAAGCGGTACAGGGCCGCGGCTGACCATGCTCGACCTGGTGCAGGAGGGCAATCTCGGGCTGATCCGCGCGTGGAGAAGTTCGACTACACCC
v a k r y t g r g l t m l d l v q e g n l g l i r a v e k f d y t r
GGGGCTTCAAGTCTCCACGTACCGGACCTGGTGGATACGGCAGGGGATGTCCCGCCCGTGGCCGACCGCCCGACCATCCGGGTCCGGGTGCACGT
g f k f s t y a t w w i r q a m s r a l a d q a r t i r v p v h v
CGTGGAGCTGATCAACCGGGTCTGCGCCACCCAGCGCCCTGCTCCAGGAGCGGGGCGCGAGCCGGCCCGAGGAGGTCGGTGAAGCGCTCGGGCTG
v e l i n r v v r t q r a l l q e a g r e p a a e e v g e r l g l
AGCCCGGAGAAGGTCGAGGAGTGTCTCGCGTGGCCCGCAACCCATCTCCCTGCACGCGCGGTCGGCGGGAGGACGACGTCTTCTCGGCGACCTCA
s a e k v e e v i r l a r e p i s l h a p v g g e d d v f l g d l i
TCGAGGACGCCGACCGCCCTCCCCCGGAGAGCGCGCCCTGCTCCCTGCTCCGCCAGCACCTCGACCGGTCCTCGCCACCTCGGCGACCGGAAAG
e d a d a a s p a e s a a l l l l r q h l d a v l a t l g d r e r
CCAGTGGTGCAGTTGCGGTACGGTTCGACGACGGGCGCGCGCACCCCTGGAGGAGATCGGCCGGCTCTTCGGGGTCACCCGGAACGGGTCCGCCAG
q v v q l r y g f d d g r p r t l e e i g r l f g v t r e r v r q
ATCGAGTCGAAGACGCTGCCCGGCTCCGGGAGCACCGCGCGGGCGAGTTGCGGGCTATCTGGAGTGAGCGGGGCGGGCCCGGCTCACTCTGGCC
i e s k t l r l r e h t a a g q l r g y l e .
GGCCCGCTGGCGTCCGACGACCGCGCGGAGCGCGGAGCGGAGCGGAGCGGATCCCGACGCGGAGGTTGTCGAGGAGCAGGCCGCGCCACCC
CGAGGCACATCCCGACCGCGAGGTACAGGGCGATCGCCGACGCTGCTCGCCACCCCGCCCGCCCTCGTTCCGGCGGTTCTCCGCAACTCCGC
CACCCGTTCTCTGTCGTCGCGCCCTTGCTCTGTACAGGGCGGCGTTCACAGCATGCCAGGGGCGCCCGGGCCCGGTCGGCCGCCCTCAGTCG
AGTCAGC
d
TGGAGTSCCGCGGAGCCGCTTGACCCCGGCATCTCCGCCCGCATCGGGGGAGCCCGCTCTCAAGCCACAGGCTCGGGACGAGTCTGTACCGGG
v e v a a e a f q a a y l r a y a g e a a l l e t h s g q e v i a
GCAAGAGGTAGTGGTCTAGCACAGCCGAGGCTTAGCACCTCTCCGCCACCGCTACTGCTTCTCCAGGCGGACGCGATCGGCCCGGTACCGGAC
g n e m v l i t d a d r i t s l r h a i v f s t r g h a l r a m a q
GACCTAGTGTGGAGCCATGCCACAGTGGCTCGACCACCGAGCAGGTCCTGCTCTAGTGGCCAGCCTCTCTCCGGGCGCGTACCACCTGCTCG
q i l v e t r t d v s s t a e d l v l i v p d s l f a r a i t v l
ACGAAGAGGGCCGACTGGGGGACGGGAGCAGGCTCTGCCACAGCATCGGCAGCCCTCGCACGCTGCTTCGCCAGCGCACCCGCGCGGCC
q k e g a s v g s g e d d l v t d y g d p l t r v f r d a h a a r
GGCGGAGGAGTGGAGGAGCGCCACTGGAGCCCTCCCGGCATCCGTCACAAGAGGCGTACACGGCGGCTGTGCGTCCACAGGACCTCTGGTA
a a e e v e e r s y e r s a g y a i n e a i t g g f l w t d q l v m
SmaI 2329
CGGCTAGGCCCTCGCTCCAGGAGGGCCC
g i r s r l d e r
    
```

ORF1T

ORF2T

ORF3T

Figura 3.14. A. Mapa de restricción del fragmento *Sall* - *SmaI* de 2329 pb que contiene el gen *hrdT*. Las flechas indican la posición y orientación de las tres ORFs identificadas mediante el programa Geneplot de DNASTar. **B.** Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de las tres ORFs. Las posibles secuencias de unión al ribosoma se encuentran subrayadas y el triplete que codifica para la primera metionina se muestra en negrilla. Las flechas horizontales convergentes representan posibles regiones terminadoras de la transcripción y la secuencia correspondiente a la “caja *rhoD*” del gen *hrdT* se muestra encerrada en un rectángulo.

3.5. DOMINIOS FUNCIONALES EN LAS PROTEINAS Hrd

En la Figura 3.15 se muestra un alineamiento de las secuencias de las proteínas Hrd publicadas en *Streptomyces* con la proteína RpoD de *E. coli* como referencia. Este alineamiento puso en evidencia la similitud existente en las secuencias de las proteínas HrdB y HrdD de *S. griseus* con sus homólogas en otros *Streptomyces*. El menor parecido se encontró entre HrdT y otras proteínas Hrd, por lo que en la Figura 3.15, se alineó con las proteínas HrdC de *S. coelicolor* y HrdE de *S. aureofaciens* que tampoco pertenecen a ninguno de los otros grupos.

Los factores sigma Hrd pertenecen a la familia σ^{70} y sus secuencias han sido estructuradas distinguiendo cuatro regiones principales descritas en el apartado 1.4.2. (Helmann y Chamberlin, 1988; Lonetto y col., 1992).

La región amino terminal (región 1) es heterogénea en longitud y secuencia entre los distintos grupos de proteínas Hrd pero se encuentra bastante conservada entre los miembros del mismo grupo, lo cual sugiere alguna funcionalidad asociada con el grupo al que pertenece. La región 1 se ha subdividido en dos subregiones: 1.1 y 1.2. Recientemente Dombroski y col. (1993) han demostrado que la unión del factor sigma σ^{70} al DNA, que normalmente requiere la asociación previa con el núcleo de la RNA polimerasa, se consigue también al deletar los primeros 50 aminoácidos del polipéptido. Esto sugiere que la región 1.1 pudiera interactuar con la región carboxilo-terminal que posee el dominio de unión a DNA (región 4). De acuerdo con el modelo propuesto por Dombroski, los factores sigma parecen ser proteínas autoreguladas por su extremo amino terminal, capaz de modular su actividad de unión al DNA: En ausencia del núcleo de la RNA polimerasa, el extremo amino libre de σ^{70} se encontraría bloqueando su propia región de reconocimiento de la zona -35 de los promotores. La interacción con el núcleo de la RNA polimerasa provocaría un cambio conformacional en el factor σ^{70} liberando los dominios de unión a DNA para el reconocimiento de secuencias promotoras específicas, permitiendo el inicio de la transcripción. La autoregulación del extremo amino terminal de los factores σ^{70} podría actuar también sobre la región 2.4, encargada del reconocimiento de la zona -10 de los promotores. Dicha interacción podría ocurrir entre la Val⁵⁵ y el Trp⁴³⁴ (Gopal y col., 1994).

La región 2 es la más conservada de todo el polipéptido y ha sido profundamente estudiada. Dentro de ella la zona denominada subregión 2.4 está involucrada en el reconocimiento de la región -10 de los promotores y ha sido caracterizada genéticamente mediante mutagénesis y alteración de la especificidad de reconocimiento en σ^{70} de *E. coli* y en σ^A y σ^H de *B. subtilis*. Como puede observarse en la Figura 3.15, esta subregión está muy conservada en las proteínas Hrd del género *Streptomyces* siendo todos los cambios que ocurren excepto uno sustituciones conservadas. Los residuos de glutamina de las proteínas de *S. griseus*: Gln³³⁵ (HrdB), la Gln¹⁵⁸ (HrdD) y la Gln¹⁸² (HrdT) se encuentran totalmente conservadas en todas las proteínas Hrd de *Streptomyces* y son homólogas en posición a la Gln⁴³⁷ de σ^{70} y a la Gln¹⁹⁶ de σ^A , las cuales interactúan directamente con la timina localizada en la primera posición del hexámero -10 TATAAT (Waldburger y col., 1990; Kenney y col., 1989); la timina (T) en esta posición está conservada en la secuencia consenso de la región -10 para promotores de *Streptomyces* similares a E σ^{70} (Strohl, 1992; Bourn y Babb, 1995).

Otro aminoácido que interactúa con el hexámero -10 de los promotores es la Thr¹⁹⁹ en σ^A y la Thr⁴⁴⁰ en σ^{70} (Siegele y col., 1989). Dicho aminoácido se encuentra conservado en HrdB (Thr³³⁸) y en HrdD (Thr¹⁶¹) de *S. griseus* y sus proteínas homólogas en *Streptomyces*, así como en HrdE. Sin embargo, este residuo de Thr cambia por Ser en las proteínas HrdA y HrdT, mientras que la proteína HrdC tiene una Glu en la misma posición. Este es el único cambio significativo a lo largo de la subregión 2.4 y podría ser responsable de alguna diferencia en la especificidad por el promotor entre las proteínas Hrd.

El dominio 3 de los factores sigma se ha dividido en dos subregiones, pero su función no ha sido claramente asignada. Se ha propuesto que la subregión 3.2 podría participar en la unión del factor sigma al núcleo de la RNA polimerasa, pero esta función no sería común a todos los sigmas (Lonetto y col., 1992). Las proteínas Hrd muestran una elevada conservación entre los miembros del mismo grupo, pero sólo 8 residuos de 67 están conservados en todas ellas.

El dominio 4 contiene dos subregiones que se han denominado 4.1 y 4.2. La última participa en el reconocimiento de la región -35 de los promotores mediante un dominio de unión a DNA del

tipo hélice-giro-hélice (HTH). De la comparación entre la región 4.2 de distintas proteínas Hrd en *Streptomyces* se deduce una similitud muy elevada a lo largo de toda la región 4 entre los miembros del mismo grupo; sin embargo, las semejanzas entre todas las proteínas se restringen al dominio HTH.

La Arg⁴⁸² y la Arg⁴⁸⁶ de la proteína HrdB de *S. griseus*, la Arg³⁰⁵ y la Arg³⁰⁹ de HrdD y las Arg³²⁹ y Arg³⁵³ de HrdT, localizadas en la segunda hélice o hélice de reconocimiento, se encuentran conservadas en todas las proteínas Hrd y son homólogas en posición a las Arg⁵⁸⁴ y Arg⁵⁸⁸ del dominio HTH de ⁷⁰, las cuales interactúan con los dos residuos de guanina (G) presentes en la doble cadena de la región -35: 5'-TTGACA (Gardella y col., 1989; Siegele y col., 1989; Minchin y Busby, 1993). El hecho de que las proteínas Hrd tengan en la hélice de reconocimiento una secuencia de aminoácidos casi idéntica a la de ⁷⁰ y ^A, sugiere la misma especificidad de reconocimiento en la región -35. La secuencia consenso de la región -35 para promotores SEP de *Streptomyces* reconocidos por la familia E ⁷⁰ es también consistente con este hecho: 5' T-T-G-A-C-R (Strohl, 1992; Bourn y Babb, 1995).

Las homologías funcionales deducidas del alineamiento de las secuencias de proteínas sugiere que las proteínas Hrd de *Streptomyces* deberían reconocer promotores con la secuencia consenso SEP, lo cual es apoyado por el hecho de que la proteína HrdB de *S. coelicolor* sea capaz de transcribir *in vitro* los promotores tipo E ⁷⁰ *dagAp4* y *veg* (Brown y col., 1992). El promotor *veg* es transcrito también por un factor sigma de 35 kDa en *S. coelicolor* (Westpheling y col., 1985), aunque no se ha probado que este último sea una proteína Hrd.

3.6. ANALISIS TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *hrd*

La presencia en bacterias de distintos factores sigma es un mecanismo de control de la expresión génica, ya que la variación en su abundancia relativa en distintos momentos del ciclo de vida permite reprogramar la RNA polimerasa para transcribir diversos conjuntos de genes. La diversidad de factores sigma homólogos a *rpoD* ha sido analizada en una serie de microorganismos por Tanaka y col. (1988). Estos autores llevaron a cabo hibridaciones de *Southern* utilizando como sonda el oligonucleótido correspondiente a la caja *rpoD* que se encuentra muy conservado en los factores sigma principales de *E. coli* y *B. subtilis*, y encontraron una única señal positiva en el DNA total *E. coli*, *B. subtilis* y *Staphylococcus aureus* pero múltiples señales en *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. coelicolor*. La clonación de genes homólogos a *rpoD* en *Streptomyces* ha revelado la existencia de 4 genes *hrd* en *S. coelicolor* (Buttner y col., 1990; Shiina y col., 1991; Tanaka y col., 1991), 4 en *S. aureofaciens* (Kormanec y col., 1992) y 3 en *S. griseus* (Marcos y col., 1995). Esta diversidad parece ser una característica común en actinomicetos, pues se han descrito al menos dos en *Mycobacterium smegmatis* (Predich y col., 1995) y al menos dos en *Brevibacterium lactofermentum* (Oguiza y col., 1996).

La elevada conservación de la secuencia de aminoácidos de estas proteínas en las regiones de reconocimiento de los promotores, ha permitido aceptar que sus secuencias diana sean promotores acordes con la secuencia consenso de E ⁷⁰. No parece sin embargo razonable la existencia en estos microorganismos de varios factores sigma para reconocer un mismo tipo de promotores. Con el fin de analizar si los genes *hrd* se expresaban simultáneamente o de modo diferencial en distintas etapas del ciclo de vida o en distintas condiciones ambientales, se realizó un análisis transcripcional de la expresión de los genes *hrd* en *S. griseus* mediante la técnica de *Northern*.

Para llevar a cabo el análisis de expresión se obtuvo micelio de *S. griseus* cultivado en dos medios diferentes: por un lado en medio complejo YED, en el que la presencia de nutrientes de fácil asimilación y especialmente fosfato favorece el metabolismo primario y limita la producción de candicidina, y por otra parte, en medio mínimo suplementado con tampón TES (MMT), desarrollado por Daza y col. (1989), que favorece la esporulación en medio líquido. En este medio el microorganismo crece durante las primeras 36 horas pasando posteriormente a fase estacionaria y a partir de las 72 horas comienza a esporular, con abundante producción de esporas a los 5 días. Ambos medios se inocularon con un cultivo de *S. griseus* crecido durante 24 horas en medio YED.

Alternativamente, cultivos en medio YED fueron sometidos a condiciones de choque térmico durante 5 o 10 minutos a 42°C. Se aisló RNA total en todas las condiciones descritas a las 24, 48 y 72 h. Una vez purificado el RNA, 50 µg del mismo fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa desnaturante con formaldehído (2,2 M), para ser transferidos a membranas de nailon e hibridados con sondas internas a los genes *hrdB* (*XhoI-BamHI* Figura 3.11.A), *hrdD* (*SalI-SacI*, Figura 3.13.A) y *hrdT* (*BstEII-BamHI*, Figura 3.14.A).

Los resultados de las hibridaciones de *Northern* mostraron una serie de variaciones en el patrón de expresión de los tres genes *hrd* de *S. griseus* (Figura 3.16). El gen *hrdB* se expresaba abundantemente en condiciones de crecimiento en medio YED hasta las 72 h (transcrito de 1.9 kb), mientras que en MMT sólo se expresaba abundantemente a las 24 h, cuando el microorganismo estaba creciendo, y a partir de las 48 h se veía reducida su expresión apareciendo tres transcritos de menor intensidad (1.9, 1.2 y 0.7 kb). Después de someter un cultivo de YED con 24 h de crecimiento a choque térmico durante 5 ó 10 minutos a 42°C, se observó una drástica disminución del transcrito del gen *hrdB*. Siendo el tamaño esperado para el transcrito del gen *hrdB* de 1.9 kb, la obtención de otros transcritos de menor tamaño podría explicarse bien por el uso de promotores alternativos o por procesamiento del transcrito de 1.9 kb.

Para el mismo gen de *S. aureofaciens* también han sido observados cuatro tamaños de transcrito (Kormanec y col., 1992). Los resultados obtenidos en el análisis del transcrito del gen *hrdB* de *S. griseus* coincidían con el comportamiento esperado para un factor sigma principal, encargado de transcribir los genes de mantenimiento y por lo tanto abundante en condiciones de crecimiento.

La hibridación del RNA total de *S. griseus* con la sonda correspondiente al gen *hrdD* mostró un único transcrito de 1.1 kb que se expresaba eficientemente después de pasar de un medio rico (YED) a un medio mínimo (MMT) manteniendo su expresión incluso en ausencia de crecimiento del microorganismo (72 h en medio MMT). En medio YED su expresión era baja durante las primeras horas, pero aumentaba a las 72 h cuando los nutrientes del medio se estaban agotando.

En condiciones de choque térmico no se detectó transcripción del gen *hrdD*. Estos resultados indicaban que a diferencia del gen *hrdB*, el *hrD* parecía expresarse en condiciones de limitación de nutrientes.

La hibridación del RNA total de *S. griseus* con una sonda interna al gen *hrdT*, mostró que este gen se expresaba débilmente en todas las condiciones probadas, siendo el transcrito ligeramente más abundante al iniciarse el crecimiento. El tamaño del transcrito obtenido con este gen tenía un tamaño aproximado de 1,5 kb. Otra conclusión que se obtuvo del análisis transcripcional fue que los genes *hrd* de *S. griseus* se expresaban como transcritos monocistronicos, como ocurre con los genes *hrd* de *S. aureofaciens* (Kormanec y col., 1992) y con los de *Brevibacterium lactofermentum* (Oguiza y col., 1996). Esto sugiere un mecanismo de regulación diferente al existente en bacterias Gram negativas, en las que los factores sigma principales se encuentran agrupados en el Operón de Síntesis Macromolecular que incluye los genes *rpsU*, *dnaG* y *rpoD* (Versalovic y col., 1993). En el bacilo Gram positivo *B. subtilis*, el factor sigma principal forma parte también de un operón con los genes *dnaG* y *P23* (Wang y Doi, 1986).

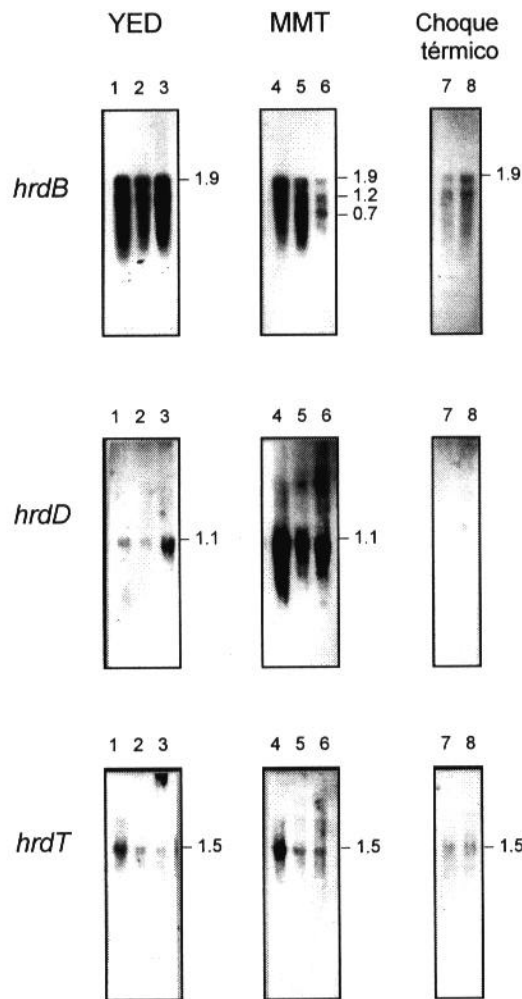


Figura 3.16. Análisis transcripcional mediante la técnica de Northern de los genes *hrdB* (panel superior) *hrdD* (panel central) y *hrdT* (panel inferior). El RNA total fue extraído de cultivos de *S. griseus* crecidos en medio YED (carriles 1, 2 y 3, a las 24, 48 y 72 h, (respectivamente), en medio mínimo de esporulación suplementado con tampón TES (carriles 4, 5 y 6, a las 24, 48 y 72 h, respectivamente). Los carriles 7 y 8 contienen RNA obtenido a partir de medio YED a las 24 h de fermentación y sometido a un choque térmico a 42°C durante 5 o 10 minutos respectivamente. Para la hibridación se utilizaron sondas internas a los genes: un fragmento *XhoI-BamHI* de 811 pb para *hrdB*, un fragmento *SaI-SacI* de 566 pb para *hrdD* y un fragmento *BstEII-BamHI* de 158 pb para el gen *hrdT*.

3.7. EXPRESION DE LOS GENES *hrdB* Y *sprC* EN *S. lividans*

Con el fin de estudiar el efecto de la dosis génica del gen *hrdB* identificado en *S. griseus* se procedió su expresión en *S. lividans*. Para expresar el gen *hrdB* se subclonó un fragmento *SmaI - ApaI* de 1966 pb (Figura 3.11) que contiene el gen *hrdB* con su promotor en el vector pIJ2921, dando lugar al plásmido denominado p2921CSB. A partir de este plásmido se recuperó el mismo fragmento con extremos *BglII* para introducirlo en el sitio de corte único para esta enzima que posee el vector pIJ702.

La expresión del gen *sprC* de *S. griseus* se realizó subclonando el fragmento *ApaI - BglII* de 1520 pb que contiene el gen *sprC* con su promotor en el vector p2921CSB dando origen al vector p2921CSBP, portador de genes *hrdB* y *sprC*. Esta construcción se realizó con el fin de examinar si la expresión conjunta de ambos genes mostraba alguna diferencia con respecto a la expresión del gen *hrdB* solo o con respecto al control (pIJ702). El fragmento que contiene los genes *hrdB* y *sprC* fue recuperado mediante digestión *BglII* y ligado en el mismo sitio en el vector pIJ702.

El producto de las ligaciones del vector pIJ702 con los genes *hrdB* y *hrdB-sprC* se transformó en *S. lividans* analizando el DNA plasmídico de seis transformantes de cada ligación. Todos los plásmidos analizados de la ligación con el gen *hrdB* poseían el inserto orientado en el mismo sentido que el gen *mel*. Para los estudios de expresión se seleccionó solo uno de ellos, que se denominó p702B1 (Figura 3.17). Entre los transformantes con el fragmento que contiene los genes *hrdB-sprC* se obtuvieron plásmidos con el inserto en las dos orientaciones y se seleccionó el plásmido p702BP4 (en el que los genes *hrdB* y *sprC* se transcriben en sentido opuesto al gen *mel*).

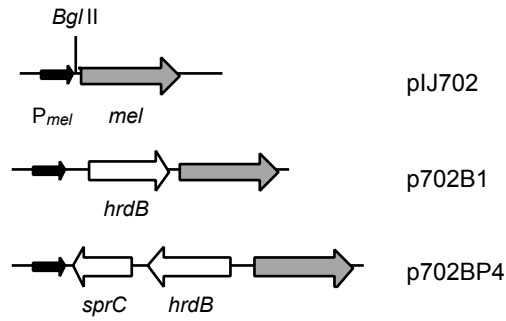


Figura 3.17. Esquema de la posición y orientación de los genes *hrdB* y *sprC* con respecto al promotor y al gen *mel* en los plásmidos p702B1 y p702BP4.

Con los transformantes de *S. lividans* que contenían los plásmidos p702B1, p702BP4, y pIJ702 sin inserto se realizó una fermentación en medio YEME con 34% de sacarosa. A las 36 h se recogieron muestras de micelio y se lisaron por sonicación. El análisis en geles de poliácridamida al 10% de los extractos obtenidos (Figura 3.18) no permitió detectar polipéptidos sobreexpresados que migrasen en el rango de 66 kDa, tamaño esperado para la proteína HrdB, pero sí se detectó la presencia de un polipéptido de aproximadamente 29 kDa en todas las construcciones con inserto, que no era producto del gen *sprC*, ya que también se encontraba en el extracto del transformante con la construcción p702B1, portadora del gen *hrdB* aislado.

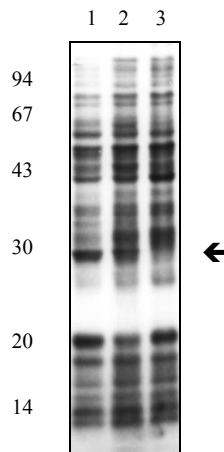


Figura 3.18. Electroforesis en gel de poliácridamida-SDS al 10% de los extractos crudos de *S. lividans* transformado con los plásmidos p702B1 (carril 1), p702BP4 (carril 2) y pIJ702 (carril 3). Con la flecha se indica la posición de una proteína de 29 kDa expresada en los transformantes portadores de plásmidos con inserto y ausente en el control (carril 3) y a la izquierda se muestra la migración de proteínas de tamaño conocido.

Para determinar si la expresión del factor sigma *hrdB* estaba sometida a un control transcripcional, se realizó un análisis de *Northern* con RNA total de transformantes de *S. lividans* portadores de los plásmidos pIJ702, p702B1 y p702BP4 crecidos en las mismas condiciones. Como se puede observar en la Figura 3.19, el gen *hrdB* se transcribe eficientemente con un tamaño estimado de 1,9 kb en las dos construcciones con inserto y el gen *sprC* es transcrito eficientemente con un tamaño de 1,1 kb en la construcción que contiene dicho gen. Un transcrito adicional de 2,2 kb se detecta en el transformante que contiene el plásmido p702B1 al hibridar con la sonda *hrdB*, que podría corresponder a un segundo inicio de transcripción desde el promotor del gen *mel*. La posibilidad de una terminación inadecuada se descartó al no obtener hibridación positiva utilizando como sonda un fragmento interno al gen *mel* (Figura 3.19, panel C, carril 2).

La ausencia de transcrito detectable para los genes *hrdB* y *sprC* endógenos de *S. lividans* en el transformante portador del plásmido pIJ702 se debe probablemente a la saturación de la membrana con el RNA mensajero del gen *mel*.

Debido a que el aumento de la transcripción en los transformantes no pudo ser cuantificado con respecto a la expresión del gen *hrdB* endógeno, no puede excluirse la posibilidad de una regulación transcripcional. La detección de un polipéptido de 29 kDa en los extractos de los transformantes portadores de los plásmidos p702B y p702BP podría estar relacionado con algún mecanismo de regulación post-transcripcional.

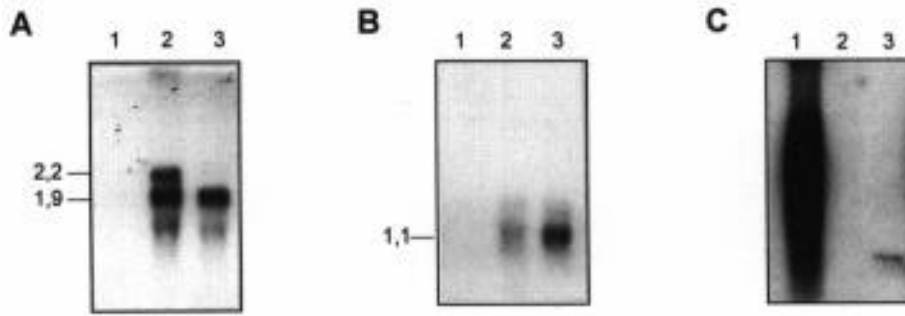


Figura 3.19. Análisis de Northern de los transformantes de *S. lividans* que contienen los plásmidos pIJ702 (carril 1), p702B1 (carril 2) y p702BP4 (carril 3). Panel A: filtro hibridado con la sonda *XhoI-BamHI* de 811 pb interna al gen *hrdB*. Panel B: filtro hibridado con la sonda *SalI-SmaI* de 250 pb interna al gen *sprC* y Panel C: filtro hibridado con la sonda *SacI-BclI* de 890 pb interna al gen *mel* (Katz y col., 1983).

3.8. ESTUDIOS DE EXPRESION DE LOS GENES *hrd* EN *E. coli*

Una característica común a los factores sigma es que su migración en geles de poliacrilamida-SDS no coincide con la deducida a partir de la secuencia. Por ejemplo, el factor σ^{70} de *E. coli* migra como una proteína de 87 kDa. La expresión de los genes *hrd* de *S. griseus* en *E. coli*, permitiría determinar la migración de los productos génicos y compararlos con los tamaños deducidos a partir de la secuencia 55.768, 36.772 y 38.764 para los genes *hrdB*, *hrdD* y *hrdT*, respectivamente.

Como sistema de expresión en *E. coli* se utilizó el basado en la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (Tabor y Richardson, 1985). Este método es ampliamente utilizado por una serie de ventajas: En primer lugar, la tasa de síntesis de RNA por la polimerasa de T7 es varias veces superior a la de la enzima de *E. coli* y la terminación inespecífica de la transcripción es menos frecuente. Además, la RNA polimerasa del bacteriófago T7 es altamente selectiva para iniciar la transcripción desde su secuencia promotora y no de otras secuencias del DNA de *E. coli*. Por último, la enzima de T7 es resistente a antibióticos como rifampicina, que inhibe la RNA polimerasa de *E. coli*, por lo que la adición de este antibiótico a las células permite que sólo sean transcritos los genes que se encuentran bajo el control del promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7.

Para la expresión de los genes *hrd* en *E. coli* se utilizó el vector pT7-7. Dicho vector contiene el promotor reconocido por la RNA polimerasa del bacteriófago T7 seguido de la secuencia de unión al ribosoma de *E. coli* y un policonector que permite subclonar el gen que se desea expresar en marco con el codón de iniciación de la traducción ATG.

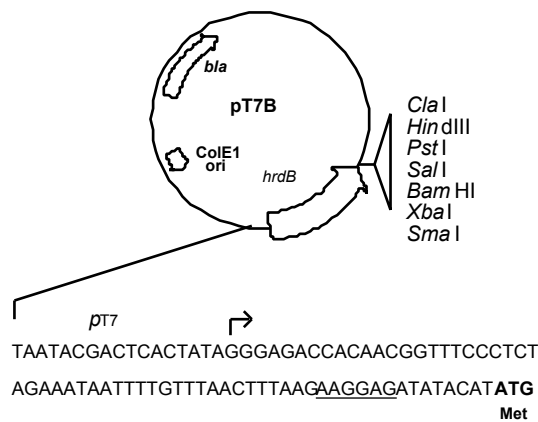


Figura 3.20. Plásmido pT7B (4,8 kb) formado por inserción del gen *hrdB* de *S. griseus* obtenido mediante PCR sustituyendo el codón de inicio GTG del gen por el codón de inicio ATG del vector, que se muestra en negrilla. Los nucleótidos subrayados corresponden a la secuencia de unión al ribosoma de *E. coli*.

Los genes *hrdB*, *hrdD* y *hrdT* se amplificaron mediante la técnica de PCR desde el codón de inicio descrito en la secuencia y se insertaron coincidiendo con el ATG del vector pT7-7. Los plásmidos obtenidos se denominaron pT7B (Figura 3.20), pT7D y pT7T con los genes *hrdB*, *hrdD* y *hrdT* respectivamente. Los tres plásmidos que contenían los genes *hrd* fueron introducidos por transformación en *E. coli* JM109(DE3). Esta cepa de *E. coli* contiene integrado en el cromosoma de forma estable el fago recombinante DE3 que porta el gen de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, lo que permite inducir expresión de la enzima con IPTG.

Los transformantes que contenían los plásmidos pT7B, pT7D y pT7T se cultivaron en medio 2xTY suplementado con 0,4% de glucosa y ampicilina hasta una $DO_{600} = 0,5$ antes de añadir IPTG a una concentración final de 0,5 mM para inducir la RNA polimerasa del bacteriófago T7 y se mantuvieron en agitación a 37°C durante 3 horas. Las células de las muestras tomadas antes y después de la inducción con IPTG se recogieron por centrifugación, se lisaron y aproximadamente 50 µg de proteína total fueron sometidos a electroforesis en un gel del 10% de acrilamida con SDS.

En la Figura 3.21 se muestra el resultado de la expresión de los genes *hrdB*, *hrdD* y *hrdT*. En los carriles correspondientes a los transformantes portadores de los genes *hrdB* y *hrdD* después de la inducción con IPTG se detectaron dos polipéptidos de aproximadamente 66 kDa y 46 kDa, respectivamente, que no estaban presentes en la muestra previa a la inducción. Estos polipéptidos tampoco se observaron en la cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pT7-7 sin inserto. No se detectaron diferencias entre las muestras correspondientes a los transformantes portadores del gen *hrdT* antes y después de la inducción. De estos gels se concluyó que las proteínas HrdB y HrdD se expresaban eficientemente en *E. coli* y la proteína HrdT no se expresaba en cantidades que permitieran ser detectadas mediante esta técnica.

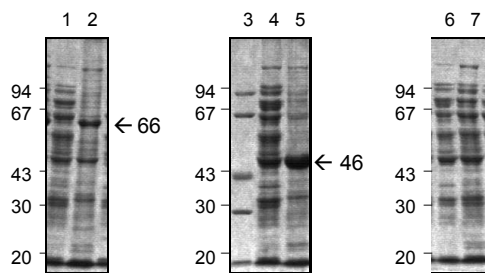


Figura 3.21. Electroforesis en gels de poliacrilamida-SDS de extractos crudos de los transformantes de *E. coli* que contienen los plásmidos pT7B (carriles 1 y 2), pT7D (carriles 4 y 5) y pT7T (carriles 6 y 7). Los carriles 1, 4 y 6 corresponden a extractos previos a la inducción con IPTG y los carriles 2, 5 y 7 corresponden a extractos tomados 3 h después de la inducción. Mediante flechas se indican las proteínas HrdB y HrdD que se expresan eficientemente en *E. coli*.

La migración de la proteína HrdB de *S. griseus* corresponde a la de un polipéptido de 66 kDa. Esta migración coincide con la descrita para la misma proteína en *S. coelicolor* (Brown y col., 1992). La proteína HrdD migra como un polipéptido de 46 kDa y su migración no ha sido descrita en otros *Streptomyces*.

La expresión muy eficiente de proteínas en *E. coli* conduce a la acumulación de las mismas en gránulos citoplásmicos denominados cuerpos de inclusión. La presencia de la proteína expresada en cuerpos de inclusión facilita su purificación, pero es necesario solubilizarla y renaturalizarla. Con el fin de comprobar si las proteínas HrdB y HrdD se encontraban en cuerpos de inclusión, se lisaron las células mediante sonicación y el extracto crudo se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Esta centrifugación permite sedimentar los cuerpos de inclusión separándolos de las proteínas solubles.

En la Figura 3.22 se muestra el fraccionamiento en un gel de acrilamida de muestras del extracto crudo, del sedimento de centrifugación que contendría los cuerpos de inclusión y del sobrenadante que contiene las proteínas solubles de los transformantes que expresan las proteínas HrdB y HrdD. El hecho de que las dos proteínas Hrd se encuentren en la fracción de cuerpos de inclusión facilitaría su purificación utilizando la misma metodología.

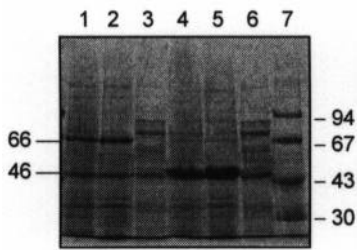


Figura 3.22. Fraccionamiento de los cuerpos de inclusión de los extractos proteicos de los transformantes de *E. coli* que expresaban las proteínas HrdB y HrdD. Los extractos crudos se muestran en los carriles 1 y 4, el sedimento que contenía los cuerpos de inclusión se muestra en los carriles 2 y 5 y el sobrenadante en los carriles 3 y 6, para HrdB y HrdD, respectivamente. El carril 7 contiene proteínas de tamaño conocido indicado a la derecha en kDa.

3.9. ANALISIS DE ORFs CONTIGUAS A LOS GENES *hrd*

3.9.1. Análisis de la proteína codificada por la ORF3B: SprC

La comparación de la proteína deducida de la ORF3B con las bases de datos de secuencias de proteínas, puso de manifiesto la existencia de una elevada identidad en ciertas regiones de la secuencia de aminoácidos con los centros activos de triptasas, tripsinas y calicreínas, aunque la identidad considerando la secuencia de la proteína completa resultaba más baja (Figura 3.23). Las proteínas con mayor similitud encontradas fueron la tripsina de *S. erythraea* y la tripsina 7 de *Anopheles gambiae* con las que compartía un 40,9% de aminoácidos idénticos, pero también poseía un 37,4% de aminoácidos idénticos con el precursor de triptasa humana y el mismo porcentaje de identidad con la tripsina de *S. griseus* (conocida comercialmente como pronasa). El porcentaje de identidad se reducía al 31,6 y 35,4% con precursores de tripsina bovinos y humanos y al 34,2% con una proteína de unión al factor de crecimiento epidérmico. Todas las proteínas con las que existía similitud significativa resultaron ser miembros de la familia de peptidasas de serina, por lo que la proteína codificada en la ORF3B se denominó SprC (*serine protease C*).

Se conocen unas 20 familias de peptidasas de serina que pueden ser agrupadas en 6 clanes, término introducido por Rawlings y Barret (1994) para un grupo de familias que tienen un ancestro común. Se ha observado similitud en el mecanismo de reacción de varias peptidasas con orígenes evolutivos diferentes: Las peptidasas de los clanes de quimiotripsina, subtilisina y carboxipeptidasa C tienen en común una tríada catalítica de aminoácidos: serina (nucleófilo), aspartato (electrófilo) e histidina (base), que tienen una orientación geométrica muy similar, aunque el plegamiento de la proteína es diferente. El mecanismo catalítico de los clanes SE (*Escherichia* D-Ala-D-Ala peptidasa A) y SF (represor LexA) es diferente ya que no poseen la clásica tríada catalítica Ser, His, Asp, según se muestra en la Tabla 3.6.

La proteína SprC presenta la tríada catalítica His-Asp-Ser en el orden correspondiente a la familia de la quimiotripsina (Tabla 3.6). Los aminoácidos His⁸³, Asp¹³⁷ y Ser²³⁴ de SprC corresponden a la His⁵⁷, Asp¹⁰² y Ser¹⁹⁵ del quimiotripsinógeno, que son los residuos esenciales para la actividad proteasa de serina. El Asp²²⁸ de la proteína SprC es homólogo en posición al Asp¹⁸⁹ de la tripsina, el cual confiere la especificidad necesaria para la hidrólisis de aminoácidos básicos (arginina y lisina) (Krieger y col., 1974).

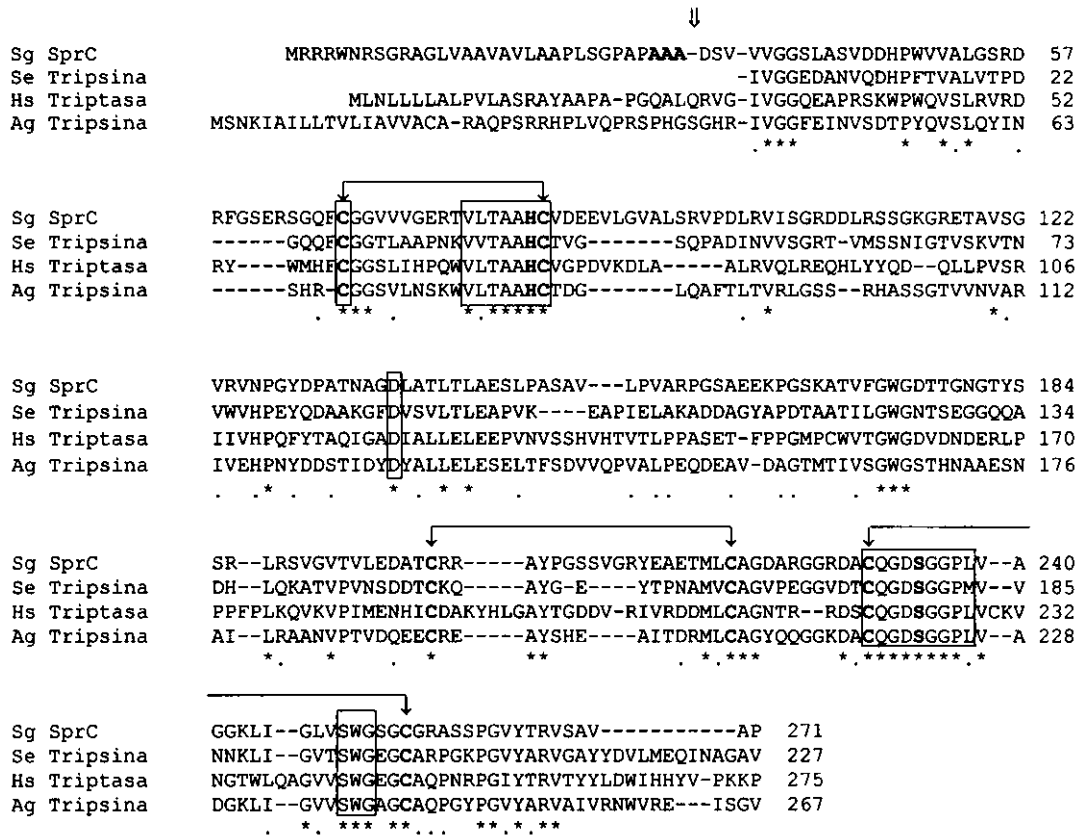


Figura 3.23. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida para la proteína SprC con la tripsina de *Saccharopolyspora erythraea* (Se), con la triptasa humana (Hs) y con la tripsina de *Anopheles gambiae* (Ag). Los números de identificación en la base de datos NBRF-PIR son M33491, P24664 y P35041, respectivamente. Las secuencias encerradas en cajas indican las regiones que forman parte del centro activo según se describe en el texto. Mediante flechas se señalan las cisteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro en el plegamiento de la proteína. Los asteriscos indican aminoácidos idénticos y los puntos sustituciones conservadas. Las tres alaninas señaladas en negrilla indican el posible sitio de procesamiento de la proteasa de serina (flecha doble vertical) con liberación de un péptido líder de 32 aminoácidos.

La secuencia VLTA AHC que se encuentra en todas las proteasas de serina, está totalmente conservada en el lazo de histidina de la proteína SprC, así como la secuencia CXGDSGGPL alrededor de la serina del centro activo (Figura 3.23). El sitio de unión secundario determinado por la secuencia SWG (posiciones 214-216 en la tripsina) se encuentra localizado en las posiciones 249-251 de la proteína SprC.

Para lograr el pliegue adecuado y la funcionalidad de la proteína es necesaria la formación de puentes disulfuro que orienten correctamente los aminoácidos del centro activo. Para ello la Cys⁶⁸ formaría un enlace con la Cys⁸⁴ formando el lazo de histidina (como ocurre con los residuos de cisteína ubicados en las posiciones 31 y 47 de la tripsina). Del mismo modo, la Cys²⁰⁰ y la Cys²¹⁹ (posiciones 154 y 168 de la tripsina) se unirían formando el lazo de metionina y la Cys²³⁰ con la Cys²⁵⁴ (posiciones 179 y 203 de la tripsina) formarían un lazo que mantiene juntos los sitios de unión primario y secundario en el centro activo de la proteasa de serina.

Todas las proteínas similares a SprC son miembros de la familia representada por la quimioproteasa, la cual está casi enteramente confinada a animales excepto las enzimas similares a tripsina presentes en actinomicetos del género *Streptomyces* y *Saccharopolyspora*, así como una recientemente descrita del hongo *Fusarium oxysporum*. Todas ellas son proteínas secretadas, por lo que son sintetizadas con un péptido señal que les conduce a la ruta de secreción en forma de proenzima. Esta proenzima es activada extracelularmente mediante un proceso proteolítico del extremo amino terminal que genera un nuevo polipéptido.

Tabla 3.6. Organización de las familias de peptidasas de serina en clanes.

Clan	Enzima representativa	Orden de los residuos catalíticos en el polipéptido *
SA	Quimiotripsina	---H---D---S---
SB	Subtilisina	---D---H---S---
SC	Carboxipeptidasa C	---S---D---H---
SE	<i>Escherichia</i> D-Ala-D-Ala peptidasa A	---SK---
SF	Represor LexA	---S---K---
SG	Clp endopeptidasa	---S---H---

(*) Cuando los residuos que forman parte del centro activo están separados en la proteína se indica mediante guiones y la ausencia de estos indica que están contiguos en la proteína. Tomado de Rawlings y Barret (1994).

El péptido señal de varias enzimas extracelulares de *Streptomyces* tiene un tamaño de 28 a 50 aminoácidos, según se ha identificado mediante la secuenciación del extremo amino terminal de las enzimas extracelulares secretadas (Vigal y col., 1991). El péptido señal se caracteriza por presentar una región amino terminal cargada positivamente (5-8 aa), seguida de una región central hidrófoba (8-12 aa) y una región carboxilo terminal polar (6 aa) que termina en el sitio de procesamiento (von Heijne, 1985), el cual posee la secuencia consenso ASA o AAA, que es el sitio de reconocimiento de la peptidasa de señal (Pearlman y Halvorson, 1983). El péptido líder de la proteína SprC consta de 32 aminoácidos, incluyendo la secuencia consenso AAA.

Inmediatamente después del péptido líder se encuentra una secuencia denominada propéptido, que en bacterias tiene como función el plegamiento y la maduración de la enzima (Silen y Agard, 1989). Este propéptido en mamíferos tiene una función diferente, que consiste en bloquear el extremo amino de la proteasa manteniendo la enzima en estado inactivo hasta que el propéptido es liberado del zimógeno, y no parece estar involucrado en el proceso de plegamiento.

El tamaño del propéptido se ha utilizado como criterio para la clasificación de las proteínas que pertenecen a la familia de la quimiotripsina, siendo las enzimas bacterianas las que poseen propéptidos más largos, mientras que las de mamíferos poseen propéptidos con unos pocos residuos. La proteína SprC parece tener un propéptido de 3 aminoácidos (DSV, posiciones 33-35), por lo que junto con la tripsina de *S. griseus*, conocida comercialmente como pronasa, que posee un propéptido de 4 aminoácidos, constituye una excepción.

El hecho de que la familia de la quimiotripsina esté formada por enzimas de procedencia procariota y eucariota ha sido utilizado como un apoyo a la hipótesis endosimbiótica, ya que se ha estimado que la divergencia entre las enzimas de ambos grupos ocurrió hace unos 1300 millones de años coincidiendo con la introducción de la mitocondria en eucariotas, quienes la adquirieron mediante una transferencia génica horizontal (Rawlings y Barret, 1994). Otra evidencia que apoya esta hipótesis es la homología del péptido líder de la proteína SGPD de *S. griseus*, cuya región amino terminal tiene una longitud significativamente mayor que la de otras proteasas bacterianas (62 aminoácidos) y ha sido dividida en dos dominios: el primero es homólogo a la secuencia de importación mitocondrial, mientras que el segundo es homólogo a secuencias señales de secreción procariotas (Sidhu y col., 1994).

En cuanto a las funciones de las proteasas de serina de la familia de la quimiotripsina se observa que son un grupo muy divergente de enzimas. Las proteasas de mamíferos están implicadas en cascadas de coagulación sanguínea, enzimas digestivas del páncreas, enzimas involucradas en la regulación del ciclo celular y enzimas de maduración y secreción de otras proteínas (Sidhu y col., 1994). Las proteasas extracelulares producidas en actinomicetos participan en la asimilación de fuentes nitrogenadas a partir de proteínas extracelulares (Shapiro, 1989). Las proteasas de serina expresadas durante la fase estacionaria en cultivos de *S. peucetius* regulan el recambio celular asociado con el metabolismo secundario y la morfogénesis (Gibb y Strohl, 1988) y se ha descrito recientemente una proteasa similar a tripsina (TLP) producida por *Streptomyces exfoliatus* que podría actuar en la hidrólisis de proteínas del micelio sustrato para la formación del micelio aéreo (Kim y Lee, 1995).

3.9.2. Análisis de la proteína codificada por la ORF4B: GyrB

La secuencia de la ORF4B tiene dos posibles codones de inicio GTG: el primero en las posiciones 4617-4619 y el segundo en las posiciones 4635-4637 del fragmento secuenciado. Debido a que en la secuencia de nucleótidos no está incluido todo el presunto gen, se han podido deducir sólo 60 aminoácidos desde el primer triplete GTG. La búsqueda de secuencias homólogas en las bases de datos de proteínas Swiss-Prot, NBRF-PIR y GBTran reveló la existencia de similitud significativa con DNA girasas, tal como se muestra en el alineamiento de la Tabla 3.7.

La DNA girasa es una topoisomerasa de tipo II que utiliza ATP para producir un superenrollamiento negativo en el DNA. Esta enzima presenta una estructura tetramérica (A_2B_2) formada por dos subunidades diferentes codificadas en los genes *gyrA* y *gyrB* (Mizuuchi y col., 1978).

En *E. coli* se han encontrado cuatro topoisomerasas de DNA de las cuales dos son de tipo I y dos de tipo II. Las de tipo I son la topoisomerasa I, involucrada en la transcripción y la topoisomerasa III, mientras que la topoisomerasa IV y la DNA girasa son de tipo II. De las cuatro topoisomerasas, sólo la DNA girasa parece ser vital para la célula, ya que es la única capaz de producir un superenrollamiento negativo necesario para la transcripción, para la replicación del DNA y para la segregación del cromosoma (Luttinger, 1995).

La búsqueda en las bases de datos permitió también observar la existencia de una identidad del 50% entre la proteína codificada en la ORF4B y los productos de los genes *parE* de *E. coli* y *S. typhimurium*, que a su vez poseen un 40% de identidad con GyrB y constituyen una subunidad de la topoisomerasa IV. No se detectó similitud con ninguna otra proteína de la base de datos.

Tabla 3.7. Comparación de la secuencia de aminoácidos deducidos de la ORF4 con el extremo amino terminal de las proteínas GyrB.

Proteína	Secuencia amino terminal de las proteínas GyrB	% de identidad con la ORF4
Sg ORF4B	MTAETSSVPSTALLAGADQDGSNYTARHLLVLEGLEAVRKRPGMYIGSTDS-RGLMHCLWEI	
Sa GyrB	MVTALSDVNTDNYGAGQIQVLEGLEAVRKRPGMYIGSTQ--RELHLSVEIV	68,8
Sr GyrB	MTTYDTRTATDTRGSEQPHVGRASYDANAITVLDGLDAVRKRPGMYIGSTGE-RGLHHLVQEL	68,3
Hx GyrB	MSQDNEYGAGQIQVLEGLEAVRKRPPAMYIGSTDS-RGLHHLVVEV	64,3
Bs GyrB	MEQQNSYDENQIQVLEGLEAVRKRPGMYIGSTNS-KGLHHLVWEI	63,6
Sc GyrB	MGDNYNSESIQIQVLEGLEAVRKRPGMYIGATNA-RGLHHLVWEI	63,4
Bb GyrB	MEGLLNYSVNIQVLEGLEAVRKRPGMYIGSVSI-NGLHHLVVEV	61,5
Ss GyrB	MADSGNPENNTPSVATGENGEVT-GSYNASAITVLEGLDAVRKRPGMYIGSTGE-RGLHHLVTEV	59,4
Mp GyrB	MEDNNTQAYDSSSIKIQVLEGLEAVRKRPGMYIGSTGE-EGLHHLVWEI	56,8
Ba GyrB	MIDTYDSSKIKILRGLDAVRKRPGMYIGTDDGSGLHHMVFEI	56,4
Ng GyrB	MTEQKHEEYGADSIQVLEGLEAVRKRPGMYIGTQDGSGLHHMVFEV	54,3
Pm GyrB	MSNTYDSSSIKVLKGLDAVRKRPGMYIGTDDGTGLHHMVFEV	52,4
Ec GyrB	SNSYDSSSIKVLKGLDAVRKRPGMYIGTDDGTGLHHMVFEV	52,4
Pp GyrB	MSENQTYDSSSIKVLKGLDAVRKRPGMYIGTDDGSGLHHMVFEV	51,2
St GyrB	MADSGNPENNPSTDTGVNDVAVSTSHGDASASYDASAITVLEGLDAVRKRPGMYIGSTGE-RGLHHLVQEV	50,0
	* AS I V*E**E*VR***G****ST RG*HH V EV	

Las proteínas GyrB que se muestran en el alineamiento corresponden a *Staphylococcus aureus* (Sa, P20832), *Streptomyces sphaeroides gyrB^S* (Sr, Z17304), *Haloferax* sp. (Hx, P21558), *B. subtilis* (Bs, P05652), *Spiroplasma citri* (Sc), *Borrelia burgdorferi* (Bb, P33769), *S. sphaeroides gyrB^S* (Ss, Z17305), *Mycoplasma pneumoniae* (Mp, P22447), *Buchnera aphidicola* (Ba, P29435), *Neisseria gonorrhoeae* (Ng, P22118), *Proteus mirabilis* (Pm, P22840), *E. coli* (Ec, P06982), *Pseudomonas putida* (Pp, P13364), *S. coelicolor* (St, P35886). Los números de identificación en la base de datos se muestran entre paréntesis. Los asteriscos indican aminoácidos idénticos. Los aminoácidos marcados en negrilla indican su presencia en al menos la mitad de las proteínas mostradas en la tabla.

En *S. coelicolor* los genes se han localizado agrupados y contiguos al origen de replicación del DNA (*oriC*). Esta región está ligada a su vez al gen *dnaA* que codifica para la proteína iniciadora de la replicación (Caltutt, 1994). Como consecuencia, los genes *gyrA* y *gyrB* se ubican dentro del mapa cromosómico alejados del gen *hrdB* (van Wezel y col., 1995). Por otro lado, se ha demostrado que *Streptomyces sphaeroides* y *Streptomyces niveus*, productores de novobiocina, cuya diana es la proteína GyrB, poseen dos genes *gyrB* diferentes. Uno de ellos da origen a una proteína GyrB sensible a novobiocina mientras que el producto del segundo gen es resistente al antibiótico. El gen *gyrB* que codifica para la proteína sensible a novobiocina es adyacente a *gyrA* en el cromosoma, con disposición similar a la descrita que en *S. coelicolor*, mientras que el segundo gen *gyrB* que aporta resistencia a novobiocina se encuentra en otra región del genoma hasta el momento no identificada (Thiara y

Cundliffe, 1993). El hecho de que la identidad de secuencia de la ORF4B sea mayor con la proteína GyrB resistente a novobiocina que con la proteína GyrB sensible de *S.phaeroides* y que con la proteína GyrB de *S. coelicolor* (Tabla 3.7) sugieren que *S. griseus* podría tener como ocurre en *S.phaeroides* y en *S. niveus*, una segunda topoisomerasa homóloga a la resistente a novobiocina además de la homóloga a GyrB de *S. coelicolor* cuyo gen es adyacente a *gyrA* y al origen de replicación. Esto supondría además la localización del gen *gyrB* adicional junto al gen *hrdD* del factor sigma principal, cuya ubicación cromosómica es ya conocida.

3.9.3. Análisis de la proteína codificada por la ORF2D: Nat

La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida para la ORF2D mostró un 67,4% de identidad con la ORFX localizada en la misma posición con respecto al gen *hrdD* de *S. coelicolor* A3(2) (Buttner y col., 1990), un 26,8% de identidad con el producto del gen *bar* de *S. hygroscopicus* (Thompson y col., 1987) y un 27,5% de identidad con el producto del gen *pat* de *S. viridochromogenes* (Wohllenben y col., 1988).

Los genes *pat* y *bar* codifican la enzima fosfinotricina (PTT) N-acetiltransferasa y están relacionados con la ruta biosintética del antibiótico bialafos, aunque probablemente también funcionen como genes de resistencia en los organismos productores. La ORFX de *S. coelicolor* fue también denominada *bar* (*bialaphos resistance*) debido a que confería resistencia a dicho antibiótico cuando se clonó en un vector de alto número de copias (Bedford y col., 1991). Sin embargo su relación con las acetiltransferasas de fosfinotricina no está clara: Primero, la K_m de la enzima de *S. coelicolor* para la fosfinotricina es de 1 mM (Bedford y col., 1991), muy alta si se compara con la de *S. hygroscopicus* ($K_m = 0,06$ mM ; Thompson y col., 1987). Segundo, la copia cromosómica de *S. coelicolor* no confiere resistencia a bialafos (Bedford y col., 1991). Tercero, los genes que confieren resistencia a un mismo antibiótico en distintas especies de *Streptomyces* presentan al menos un 70% de aminoácidos idénticos y la identidad entre la ORFX de *S. coelicolor* y la ORF2D de *S. griseus* con las acetiltransferasas de fosfinotricina no supera el 30%. El resultado de la comparación de aminoácidos es una evidencia clara de que los genes de acetiltransferasas adyacentes al *hrdD*, están lejanamente relacionadas con los genes *bar* y *pat*. En la Figura 3.24 se muestra un árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos. La ORF2D de *S. griseus* se denominó *nat* (por *n*-acetiltransferasa). El agrupamiento de los genes *nat-hrdD* no está presente en *S. aureofaciens* (Kormanec y col., 1992).

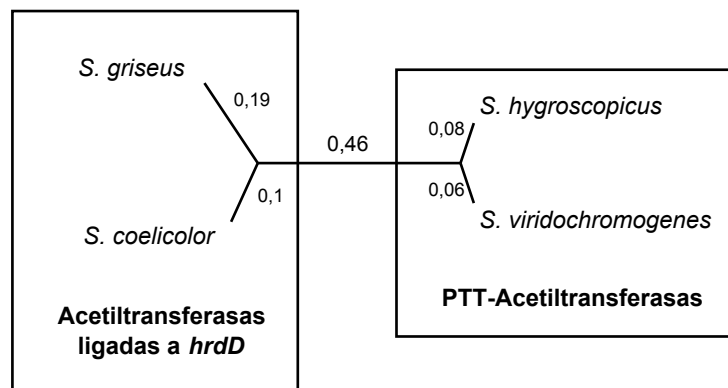


Figura 3.24. Árbol filogenético sin raíz obtenido a partir de las secuencias de aminoácidos de las proteínas traducidas de los genes *bar* de *S. hygroscopicus*, *pat* de *S. viridochromogenes*, ORFX de *S. coelicolor* y ORF2D (*nat*) de *S. griseus*. El árbol filogenético se ha realizado utilizando el programa CLUSTALV (Higgins y Sharp, 1989)

3.9.4. Análisis de la proteína codificada por la ORF3T: Mdr

A partir de la ORF3T se ha deducido una secuencia polipeptídica de 177 aminoácidos correspondiente al extremo carboxilo terminal de la proteína. La comparación con la base de datos de proteínas reveló entre 45 y 50% de aminoácidos idénticos con el extremo carboxilo terminal de Glicoproteínas P (Pgp) de mamíferos. Estas proteínas se encuentran sobreexpresadas en células que han sido sometidas a diversos tratamientos con agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento del cáncer. La sobreexpresión de dichas proteínas confiere resistencia a compuestos muy diversos que no presentan relación estructural ni funcional, por ello también han sido denominadas proteínas de resistencia a multidroga (Mdr, *multidrug resistance*). Las proteínas Mdr (o Pgp) tienen una función de defensa contra toxinas vegetales, fúngicas, bacterianas y carcinógenos (Schinkel y col., 1994).

La ORF3T presentaba también similitud con proteínas bacterianas que transportan activamente hemolisinas a través de la membrana: MsbA y HlyB de *E. coli* (50% y 45,8% de aminoácidos idénticos, respectivamente), HlyB de *Proteus vulgaris* (44,6%), LktB de *Pasteurella haemolytica* (46,1%), CyaB de *Bordetella pertusis* (48,8%) y otras proteínas que pertenecen a la subfamilia HlyB. En la Figura 3.25 se muestra un alineamiento de la ORF3T con el extremo carboxilo terminal de las proteínas MsbA de *E. coli* y Pgp2 de *Cricetulus griseus*.

Todas las proteínas similares a la ORF3T pertenecen a la familia de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Esta familia de proteínas está relacionada con distintos procesos biológicos en procariontes y eucariontes y comparten en su estructura primaria un dominio de unos 200 aminoácidos conservados que incluye el sitio de unión a ATP. Además de las funciones citadas previamente, en bacterias se han descrito transportadores ABC como componentes de sistemas de transporte activo, por ejemplo para la maltosa (MalK) y para fosfato (PstB) en *E. coli*.

Ec MsbA	412	LASLRNQVALVSNVHLFNDTVANNIAYAR-TEQYSREQIEEAARMAYAMDFINKMDNG	469
		: : : : : : : : : : : : :	
Sg ORF3T	1	REDLRSRIGMVLQDTWLFGGTIAENIAYGA-SREVSREEVEEAARAHAHADRFRVRLPDG	59
		: : : : : : : :	
Cg Pgp2	1103	VQWLR AHLGIVSQEPI LFDCSI AENIAYG DNSRVVSQDEIERAAKEANI HQFI ESLPDK	1161
Ec MsbA		LDTVIGENGVLLSGGQ RORIAIARALLR DSPILILDEATSALDTE SERAIQAALDELQKNR TSLV	534
		: : : : : : : : : :	
Sg ORF3T		YDTVLDDEGGV SAGEKQLVTIARAFLSDP VILVLD EATSSVDTRTEVLIQQAMARLAHGR TSVFV	123
		: : : : : : : : : : : : :	
Cg Pgp2		YNTRVGD KGTQLSGGQK RORIAIARALVR QPHILLLDEATSALDTESEKVVQ EALDKAREGR TCIV	1226
Ec MsbA		IAHRLSTIEKADEI VVVEDGVIVERG THNDLLEHRGVYAQLHKMQFGQ-----	582
		: : :	
Sg ORF3T		IAHRLSTIRDADTILVMENGAIVEQGSHT ELLAEGAYARLYAAQFAEAAVEVD	177
		: : : : : : :	
Cg Pgp2		IAHRLSTIQNADLIVVIQNGKVKHEGTHQQLLAQKGIYFSM-----VQAGAKRL	1276

Figura 3.25. Comparación de la secuencia de aminoácidos disponible de la ORF3T de *S. griseus* con las secuencias carboxilo terminal de la proteína MsbA de *E. coli* (parte superior del alineamiento) y con la proteína Pgp2 de *Cricetulus griseus* (parte inferior del alineamiento). Los números de identificación en la base de datos son P27299 y P21449, respectivamente. Las rayas verticales representan aminoácidos idénticos y los dos puntos sustituciones conservadas.

En *Streptomyces* se han identificado varios transportadores ABC involucrados en mecanismos de resistencia a antibióticos de tipo macrólido en los organismos productores: la proteína de resistencia a tilosina (TlrC) en *S. fradiae*, la proteína de resistencia a carbomicina (CarA) en *S. thermotolerans*, la proteína de resistencia a espiramicina (SrmB) en *S. ambofaciens* y recientemente se ha publicado la proteína de resistencia a oleandomicina (OleB) de *S. antibioticus* (citadas en Olano y col., 1995). Simultáneamente, Blanc y col. (1995) han caracterizado el gen de resistencia a multidroga *ptr* de *Streptomyces pristinaespiralis*. La proteína deducida de dicho gen ha mostrado homología con otras proteínas de membrana que transportan activamente antibióticos en *Streptomyces*: ActVA.1, ActII.2 y Mmr de *S. coelicolor*, LmrA de *S. lincolnensis*, TcmA de *S. glaucescens*, Pur8 de *S. alboniger* y CmcT del actinomiceto *Nocardia lactamdurans*. La ORF3T no muestra similitud significativa con los transportadores tipo ABC descritos en *Streptomyces*.

4. DISCUSION

Los miembros del género *Streptomyces* han sido objeto de numerosos estudios debido a su importancia como modelo biológico, ya que poseen complejos mecanismos de diferenciación a lo largo de su ciclo de vida. Además, los estreptomicetos tienen relevancia industrial debido a la diversidad de metabolitos secundarios que producen, en particular numerosos antibióticos de interés clínico.

La expresión de los genes necesarios para la diferenciación y la síntesis de metabolitos secundarios depende de la holoenzima RNA polimerasa y sus proteínas accesorias. Los factores sigma, que confieren al núcleo de la RNA polimerasa la propiedad de reconocer los promotores, constituyen el principal mecanismo de regulación celular a nivel de transcripción. De ello se deriva la importancia de la caracterización de estos polipéptidos que dirigen la expresión génica y permiten el desarrollo del ciclo celular.

4.1. PURIFICACION DE LA ACTIVIDAD RNA POLIMERASA

En la primera parte de este trabajo se desarrolló un procedimiento que permite purificar el núcleo (E) y una o varias holoenzimas (E) correspondientes a la actividad RNA polimerasa de *Streptomyces griseus*. La pureza de las fracciones obtenidas por este método permitió realizar estudios de transcripción *in vitro* y puede permitir caracterizar mediante reconstitución enzimática la actividad responsable de la transcripción de un determinado promotor.

Al comenzar los estudios sobre la RNA polimerasa se tomaron como base los sistemas de purificación de la misma actividad utilizados en otras bacterias, principalmente *E. coli* (Burgess y Jendrisak, 1975), *B. subtilis* (Davison y col., 1979), *S. antibioticus* (Jones, 1979) y *S. coelicolor* (Westpheling y col., 1985). Para la purificación de la actividad RNA polimerasa de *E. coli* y de *S. antibioticus* las etapas más eficientes del proceso fueron la cromatografía en DNA-celulosa y una filtración en gel como último paso de purificación. Para la purificación de la enzima de *B. subtilis* la etapa más eficiente del proceso fue la cromatografía en heparina-agarosa.

Dado que en los procedimientos descritos para *E. coli* y *S. antibioticus* se utilizaba una filtración en gel que resultaba de alta eficiencia en la purificación de la RNA polimerasa, se comenzó el método de purificación precipitando la enzima a partir de un extracto crudo con Polymix P y sulfato amónico con la finalidad de concentrar la enzima para someterla a este tipo de cromatografía. En este paso se requería una matriz que permitiera separar proteínas de gran tamaño, por lo que se utilizó Sephacryl S-300, recomendada para separar proteínas en un rango de masa molecular relativa comprendida entre 10 y 1.500 kDa. La cromatografía a través de la columna de Sephacryl S-300 permitió purificar la enzima 16,4 veces con una actividad específica de 5,59 u/mg proteína. Aunque los resultados obtenidos no eran los esperados, debido a que la actividad se encontraba diluida en muchas fracciones, se disponía de esta forma de preparaciones que podían ser sometidas directamente a cromatografía de pseudoafinidad.

La cromatografía de heparina-agarosa se había utilizado con elevado rendimiento para la purificación de la actividad RNA polimerasa de *B. subtilis*, *S. coelicolor* y *S. aureofaciens* (Davison y col., 1979; Wiggs y col., 1981; Westpheling y col., 1985; Simúth y col., 1987). Las fracciones con actividad RNA polimerasa eluidas de la columna de filtración en gel se sometieron a cromatografía en heparina-agarosa y se eluyeron con un gradiente lineal desde 0,2 a 0,5 M de KCl. Con esta cromatografía se consiguió purificar la enzima 424 veces con una actividad específica de 144,2 *u*/mg proteína, por lo que constituyó sin duda en la etapa más eficiente de todo el proceso. De esta columna eluían fracciones altamente purificadas, ya que los polipéptidos mayoritarios eran las subunidades del núcleo de la RNA polimerasa α , β y γ , según se mostró en la Figura 3.5. Junto con ellas eluía también una serie de proteínas minoritarias que podrían corresponder a factores sigma, a proteínas accesorias de la holoenzima o a proteínas no relacionadas que copurificasen con la actividad RNA polimerasa.

Un paso adicional de cromatografía a través de una columna de DNA-agarosa permitió purificar el núcleo de la RNA polimerasa. Estas fracciones, que carecían de actividad RNA polimerasa, eran adecuadas para ser suplementadas con factores sigma purificados y determinar la especificidad de la holoenzima sobre promotores naturales o sintéticos.

La comparación de diferentes métodos de purificación para la actividad RNA polimerasa se puede realizar en base a datos comparativos como el número de veces que se purifica la actividad, el rendimiento y el volumen final en que se obtiene la preparación enzimática. En la Tabla 4.1 se muestran los valores descritos para la actividad RNA polimerasa en distintos microorganismos. Para todos los parámetros descritos, el método descrito en este trabajo refleja valores intermedios con respecto a otras purificaciones.

Tabla 4.1. Comparación de la purificación de la actividad RNA polimerasa en distintos microorganismos.

Microorganismo	Purificación (número de veces)	Rendimiento (%)	Volumen final (ml)	Referencia
<i>S. griseus</i> (*)	424	62	32	
<i>S. antibioticus</i> (12 h)	760	32	5,6	Jones, 1979
<i>S. antibioticus</i> (48 h)	392	92	16,6	Jones, 1979
<i>E. coli</i>	810	45	75	Burgess y Jendrisak, 1975
<i>B. subtilis</i>	300	78	100	Davison y col., 1979

(*) La purificación de la RNA polimerasa de *S. griseus* se llevó a cabo a partir de células crecidas durante 24 h.

La RNA polimerasa de *S. griseus* resultó similar en tamaño a las descritas para otros *Streptomyces*. Se calculó el tamaño de las subunidades de la RNA polimerasa a partir de una recta de regresión que relacionaba la migración de proteínas de tamaño conocido en un gel de poliacrilamida-SDS con el logaritmo de su masa relativa. Para la subunidad de mayor tamaño de la RNA polimerasa de *S. griseus*, α , se estimó una masa relativa de 152 kDa; para β , de 140 kDa y para la subunidad γ , de 50 kDa. En *S. coelicolor* se había descrito que las subunidades α , β y γ tenían un tamaño de 150, 140 y 47, respectivamente (Buttner y Brown, 1985) y para *S. aureofaciens* las mismas subunidades eran de 145 kDa, 136 kDa y 44 kDa (Simúth y col., 1987).

Si se comparan las masas relativas estimadas para las subunidades α y β con las descritas para la RNA polimerasa de *E. coli* (155 y 150 kDa; Chamberlin, 1982), las subunidades de *E. coli* son ligeramente superiores a las descritas en *Streptomyces*. Sin embargo, la mayor diferencia en proporción al tamaño total del polipéptido es en la subunidad γ , siendo la de *Streptomyces* aproximadamente un 25% mayor que la de *E. coli* (36,5 kDa). De acuerdo con las funciones reguladoras descritas para la subunidad γ , esta diferencia podría atribuirse, en relación con el mayor desarrollo evolutivo de los mecanismos de diferenciación en el género *Streptomyces*, al requerimiento de una subunidad γ con capacidad para interactuar con un mayor número de activadores transcripcionales, necesarios para una regulación más compleja de la expresión génica.

4.2. ESTUDIOS DE TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO*

Con el fin de analizar la posible presencia de factores de transcripción asociados a las preparaciones más purificadas con actividad RNA polimerasa, se calculó el tamaño de los polipéptidos que copurificaban con la actividad en las fracciones 23 y 27 de la columna de heparina-agarosa tal como se muestra en la Figura 4.1. En este análisis debe de tenerse en cuenta que aunque las preparaciones obtenidas correspondían a cultivos crecidos en medio de producción de candicidina recogidos una vez iniciada la biosíntesis del antibiótico, debido al crecimiento miceliar de los estreptomicetos, era difícil que todas las células del cultivo se encontrasen en el mismo estado de crecimiento, por lo que podía esperarse una cierta heterogeneidad en la presencia de posibles factores de transcripción.

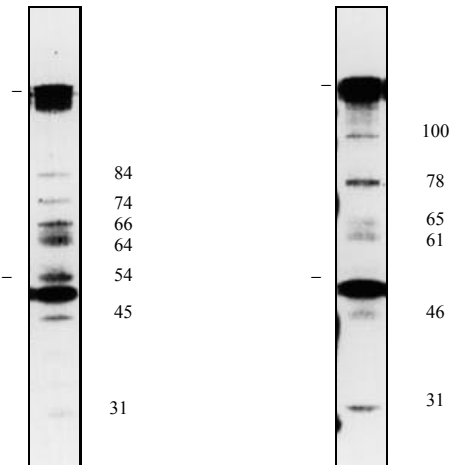


Figura 4.1. Tamaño estimado de los polipéptidos que copurifican con el núcleo de la RNA polimerasa de *S. griseus* en las fracciones 23 y 27 columna de heparina-agarosa.

Transcripción *in vitro* con los promotores *veg* y *amy*

Los promotores *veg* y *amy* poseen la secuencia consenso principal de promotores bacterianos, por lo que cabría esperar que en *S. griseus* fueran transcritos por los productos génicos de *hrdB*, *hrdD* y/o *hrdT*. De hecho, la holoenzima E^{HrdB} de *S. coelicolor* es capaz de transcribir el promotor *veg* (Brown y col., 1992). Según se demostró en este trabajo mediante su expresión en *E. coli*, el factor sigma HrdB de *S. griseus* migra en geles de poliacrilamida-SDS como un polipéptido de 66 kDa, coincidiendo con la migración descrita para la proteína homóloga de *S. coelicolor* (Brown y col., 1992) y con el hecho de que la secuencia de ambos polipéptidos tenga idéntica longitud, 510 aminoácidos. Al analizar las fracciones de la columna de heparina-agarosa se detectaron proteínas con este tamaño (64 y 66 kDa) en las fracciones 20 a 26 y un polipéptido cuyo tamaño se estimó en 65 kDa, en las fracciones 27 a 29. Si se considera que la fracción 20 no presentó actividad de transcripción *in vitro* del promotor *veg* en condiciones en que la fracción 27 sí la mostraba, se esperaría que el factor HrdB coincidiera con el polipéptido de 65 kDa.

La expresión en *E. coli* del gen *hrdD* de *S. griseus* mostró que este factor sigma migraba como un polipéptido de 46 kDa en geles de poliacrilamida-SDS. En las fracciones 17 a 24 de la columna de heparina-agarosa se detectó un polipéptido de 45 kDa y en las fracciones 27 a 29 otro de 46 kDa. Un polipéptido de 45 kDa que copurifica con la RNA polimerasa ha sido descrito para *S. antibioticus* y para *S. coelicolor*, aunque no se ha relacionado con factores sigma (Jones, 1979; Buttner, 1985).

La diferencia de intensidad de los transcritos obtenidos con los promotores *veg* y *amy* cuando se utilizó la fracción 27 (Figura 3.8) no pudo explicarse con los datos disponibles, ya que la presencia de polipéptidos con tamaños de 65 y 46 kDa en dicha fracción no permitió concluir cuál era el factor sigma responsable de la transcripción, en caso de que fuese sólo uno de ellos. Tampoco puede excluirse la presencia del producto del gen *hrdT*, cuya migración se desconoce.

Para determinar si los tres factores sigma Hrd son capaces de reconocer los promotores *veg* y *amy* sería necesaria su purificación y su adición a las fracciones del núcleo obtenidas de la columna de DNA-agarosa, para realizar ensayos de transcripción *in vitro*. Además, la separación de los factores

HrdB, HrdD y HrdT permitiría estudiar si existen diferencias de reconocimiento entre distintos promotores SEP.

El polipéptido de 35 kDa descrito por Westpheling y col. (1985) como responsable de la transcripción del promotor *veg* no se detectó en la fracción 27. Aunque se observó un polipéptido de este tamaño en la fracción 22, no se dispone de estudios de transcripción *in vitro* con la misma.

Transcripción *in vitro* con el promotor *ctc*

Westpheling y col. (1985) habían identificado dos posibles polipéptidos ⁴⁹ y ³⁷ que transcribían el promotor *ctc in vitro*. El factor ⁴⁹, redefinido más tarde como ⁵² debido a su migración con respecto a la subunidad σ , transcribía eficientemente los promotores *ctc* y *dagAp3* (Buttner y col., 1988). Un polipéptido con una migración similar con respecto a la subunidad σ , con un tamaño estimado de 54 kDa, se encontraba bien representado en las fracciones 22 a 26, por lo que podría también estar presente en la fracción 27, activa en la transcripción del promotor *ctc*, aunque la cantidad no sería suficiente para su visualización en los geles.

La fracción 27 contiene otros tres polipéptidos que copurifican con la RNA polimerasa de *S. griseus*, cuyos tamaños corresponden a 100, 78, 61 y 31 kDa. El primero de ellos podría corresponder con el de 110 kDa que copurifica con la RNA polimerasa de *S. aureofaciens* (Simúth y col., 1987).

Transcripción *in vitro* con promotores *saf* y *pab*

La ausencia de transcrito *in vitro* cuando se utilizaban como molde promotores regulados por fosfato se atribuyó a la pérdida de una proteína activadora durante el proceso de purificación de la RNA polimerasa de *S. griseus*. Esta hipótesis se basó en la comparación de los mecanismos moleculares de regulación por fosfato descritos en *E. coli* y *B. subtilis* (véase Resultados y Análisis; Makino y col., 1989; Seki y col., 1988) y en la identificación de una proteína de unión a DNA que interactuaba de modo específico con el promotor del gen *saf* en extractos acelulares de *S. lividans* y de *S. griseus*. La movilidad del complejo DNA-proteína variaba dependiendo de si el medio de cultivo había sido suplementado o no con fosfato 10 mM y además, en medio suplementado disminuía notablemente la proporción de moléculas retrasadas. Estos datos apoyaban la hipótesis de que en medios limitados en fosfato, la proteína sufriese una modificación que aumentara su afinidad por el promotor del gen *saf* (Alicia Martín, comunicación personal; Martín y col., 1994). Para demostrar si la ausencia de transcrito en los estudios de transcripción *in vitro* se debía a la falta de la proteína activadora, se requeriría la purificación de la proteína y la realización de estudios de transcripción *in vitro* adicionales.

En relación con los promotores regulados por fosfato en *S. griseus*, el mejor caracterizado es el promotor del gen *saf* descrito por Daza y col. (1991). El promotor *saf* posee similitud en la región -10 con la secuencia consenso reconocida por los factores sigma principales de *Streptomyces* recopiladas por Strohl (1992) y Bourn y Babb (1995). En la región -35 se ha encontrado una secuencia repetida e invertida de 46 pb y otras de menor tamaño, así como una homología parcial (8 de 18 nucleótidos) con la secuencia consenso de la caja de fosfato descrita en *E. coli* por Makino y col. (1986). El promotor *saf* se expresa eficientemente en *E. coli*, pero no está regulado por fosfato en este microorganismo (Daza y col., 1991). Estos resultados sugieren que la similitud encontrada con la caja de fosfato no es funcional y que en *Streptomyces*, al igual que en *B. subtilis*, la regulación por fosfato podría estar regulada por secuencias distintas a la caja de fosfato descrita en *E. coli*.

En *E. coli* se han descrito dos tipos de activadores transcripcionales denominados de clase I y de clase II, según la localización del sitio de unión en el promotor (Figura 4.2). Los activadores de clase I se unen al promotor por encima de la región -35 y requieren de la interacción con la subunidad σ de la RNA polimerasa. Los activadores de clase II tienen su sitio de unión en la región -35 del promotor e interactúan con la subunidad σ de la RNA polimerasa (Igarashi y col., 1993; Busby y Ebright, 1994). En promotores regulados por activadores de clase II la región -35 no tiene semejanza con la secuencia consenso.

La proteína PhoB de *E. coli* funciona como un activador de clase II, ya que una holoenzima reconstituida con la subunidad σ troncada en su extremo carboxilo terminal, que no transcribe genes dependientes de OmpR (activador de clase I), es activa en la transcripción de los genes del regulón de fosfato dependientes de PhoB (Igarashi y col., 1991). Adicionalmente, se han caracterizado dos

mutantes con alteraciones en la primera hélice del dominio HTH del factor ⁷⁰ que son defectivos en transcripción de genes dependientes de PhoB, lo que indica que ésta es la proteína que interacciona con PhoB (Makino y col., 1993).

Sería interesante confirmar mediante experimentos de protección con DNasa I el sitio de unión de la proteína reguladora de fosfato al promotor *saf* con el fin de determinar su posible interacción con alguna subunidad ^{Hrd} de *Streptomyces*, una vez que se haya demostrado que su presencia permite la obtención de transcritos *in vitro*.

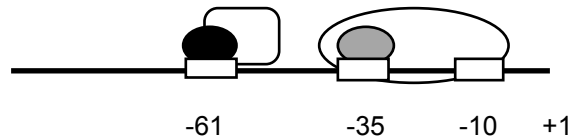


Figura 4.2. Modelo de interacción de los activadores de clase I (círculo negro) y de clase II (círculo gris) con los promotores en *E. coli*. El sitio de unión de los activadores de clase I está localizado arriba (*upstream*) de -35 en la región promotora y el activador contacta con esta región y con la subunidad de la RNA polimerasa. El sitio de unión de los activadores de clase II se localiza sustituyendo a la región -35 y el activador contacta con esta región y con la subunidad de la RNA polimerasa.

4.3. GENES *HRD* DE *S. GRISEUS*

S. griseus posee tres genes homólogos a *rpoD*, los cuales se han denominado *hrdB*, *hrdD* y *hrdT*. La presencia de múltiples genes *hrd* es un fenómeno común en actinomicetos: en *S. coelicolor* se han descrito cuatro, denominados *hrdA*, *hrdB*, *hrdC* y *hrdD* (Shiina y col., 1991; Tanaka y col., 1991), otros cuatro en *S. aureofaciens*, en este caso *hrdA*, *hrdB*, *hrdD* y *hrdE* (Kormanec y col., 1992), también existen al menos dos genes *hrd* denominados *mysA* y *mysB* en *Mycobacterium smegmatis*, *M. tuberculosis* y *M. leprae* (Predich y col., 1995) y otros dos *sigA* y *sigB* en *Brevibacterium lactofermentum* (Oguiza y col., 1996).

En *Streptomyces* se han descrito los genes *hrdB* y *hrdD* en todas las especies estudiadas hasta el momento. Sin embargo, el gen *hrdC* se encuentra sólo en *S. coelicolor*, el gen *hrdE* en *S. aureofaciens* y el gen *hrdT* en *S. griseus* (Shiina y col., 1991; Kormanec y col., 1992; Marcos y col., 1995). Curiosamente el gen *hrdD* de *S. griseus* no presentó hibridación con el DNA total de *B. lactofermentum*, mientras que los genes *hrdB* y *hrdT* sí hibridan con los genes *sigA* y *sigB* (Oguiza y col., 1996).

La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de los genes *hrdB*, *hrdD* y *hrdT* de *S. griseus* mostró similitud con las cuatro regiones de los factores sigma de la familia ⁷⁰. La región 1 es la más variable tanto en longitud como en secuencia, siendo las proteínas HrdB y HrdE las que tienen mayor longitud y las proteínas HrdD, HrdC y HrdT las que tienen menor número de aminoácidos en esta región. La delección de los primeros 50 aminoácidos de la proteína RpoD de *E. coli* permite la unión del factor sigma libre a la secuencia promotora. Por ello se ha propuesto que esta subregión podría plegarse sobre las regiones 2.4 y 4.2 impidiendo que el factor sigma libre se una a los promotores (Dombroski y col., 1992; 1993; 1995).

La región 2 es la más conservada de todo el polipéptido entre las distintas proteínas Hrd de *Streptomyces* y la subregión 2.4 es la mejor caracterizada debido a que es la zona de reconocimiento de la caja -10 de los promotores. En esta subregión no se encontró ningún dominio característico de unión a DNA, pero se ha predicho que su estructura secundaria es una α -hélice (Helmann y Chamberlin, 1988). La predicción de α -hélice es válida también para las proteínas HrdB, HrdD y HrdT de *S. griseus*, las cuales poseen un elevado momento hidrófobo según se deriva del análisis con el algoritmo de Eisenberg (Eisenberg y col., 1982).

Las mutaciones en la región 2.4 que alteran las propiedades de reconocimiento de la región -10 del promotor, se han encontrado situadas en posiciones separadas por tres residuos en la proteína RpoD de *E. coli* y por cuatro residuos en la proteína SigH de *B. subtilis*, sugiriendo que los determinantes de reconocimiento están agrupados en una cara de la α -hélice, que está orientada con su extremo amino próximo al sitio de inicio de la transcripción (Daniels y col., 1990; Waldburger y col., 1990).

La secuencia de aminoácidos de este dominio en las proteínas Hrd de *Streptomyces* se muestra representada en forma de α -hélice en la Figura 4.3, mostrando la ubicación de los aminoácidos conservados con 100% de identidad en la misma cara y las sustituciones conservadas en la cara opuesta. La glutamina (Q) [Gln³³⁵ (HrdB), Gln¹⁵⁸ (HrdD), Gln¹⁸² (HrdT)] se encuentra totalmente conservada en las proteínas Hrd de *Streptomyces* y es homóloga en posición a la Gln⁴³⁷ de α ⁷⁰ y Gln¹⁹⁶ de α ^A, las cuales interactúan directamente con la timina localizada en la primera posición del hexámero -10, TATAAT (Waldburger y col., 1990; Kenney y col., 1989).

Otro aminoácido que podría estar implicado en el reconocimiento del hexámero -10 es la Thr¹⁹⁹ de α ^A y la Thr⁴⁴⁰ de α ⁷⁰ (Siegele y col., 1989). Dicho aminoácido se encuentra conservado en las proteínas HrdB, HrdD y HrdE de *Streptomyces*, pero cambia por Ser en HrdA y HrdT, mientras que HrdC tiene Glu en la misma posición. Este es el único cambio que no corresponde a una sustitución conservada en las proteínas Hrd, por lo que podría tener alguna relación con el reconocimiento de una secuencia promotora parcialmente modificada con respecto al consenso. Estas dos posiciones se indican mediante una flecha bifurcada en la Figura 4.3.

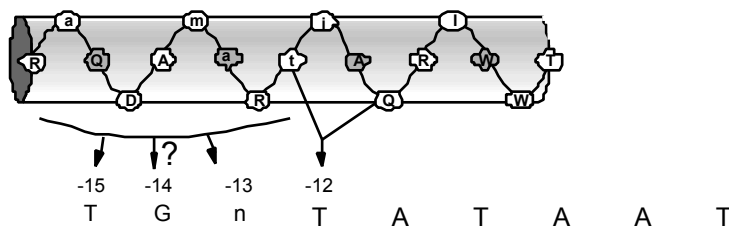


Figura 4.3. α -hélice predicha para la subregión 2.4 de las proteínas Hrd de *Streptomyces*. Las letras mayúsculas indican los aminoácidos que están presentes en al menos 11 de las 12 proteínas Hrd. La Q y la t que interactúan con la región -10 de los promotores en *E. coli* y *B. subtilis* se indican con una flecha bifurcada y mediante un signo de interrogación se indican aquellos aminoácidos que podrían interactuar con promotores extendidos. La orientación de la hélice es la descrita por Daniels y col. (1990).

La región de la α -hélice situada a la izquierda de los dos aminoácidos antes descritos (Q y t) en la Figura 4.3, mantiene la conformación de α -hélice anfipática y podría tener alguna función en el reconocimiento de las bases adyacentes en la región 5' de la caja -10, como por ejemplo en los promotores con la *región -10 extendida* (TGnTATAAT) descritos en *E. coli* por Keilty y Rosenberg (1987). Este tipo de promotores no posee conservada la región -35 y además, son eficientemente transcritos por un factor α ⁷⁰ que carece del dominio 4, lo que sugiere que la zona de reconocimiento podría ubicarse en la subregión 2.4 (Kumar y col., 1994). Este tipo de promotores ha sido descrito también en *S. erythraeus* para el gen que confiere resistencia a eritromicina (*ermEp1*); en el cual la delección de la región -35 no altera el sitio de inicio de la transcripción (Bibb y col., 1994). Otros promotores de *Streptomyces* que presentan el dominio TGn aunque no se ha demostrado su funcionalidad, se han obtenido a partir de las secuencias recopiladas por Strohl (1992) y se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Promotores de *Streptomyces* que presentan similitud con la secuencia consenso de regiones -10 extendidas

Promotor	Secuencia
<i>ermEp1</i>	TGCTGTTG TGGGCT GGACAATCGTGCCGGTT TGGTAGGAT
<i>redDp1</i>	GAGAAGAAGAG TGGTGT AAGCCGTGCACAT TGTCATCAT GGGCTGC
<i>SEP6</i>	ATGGAATATAT TGGACAG CGCGTTCATTT CGTGGTTATAT GAACGTG
<i>rrnDp1</i>	GCCGCCTGAT TGTGCAT CCACCCCTGCGAGCT GCTAGTGT CCCTCTTC
<i>kilBp1</i>	GGCTACCAT TGCGCA ACCTGACACGTGCG TGTCAGACT GATACACG

En la región situada a la derecha de los aminoácidos Q y t en la Figura 4.3, se ha sugerido que el triptófano situado en la posición 434 de la proteína RpoD (que corresponde al tercer residuo comenzando por la derecha), también podría interactuar con la región -10 de los promotores (Gopal y col., 1994).

La región 3 está casi totalmente conservada en las proteínas del mismo grupo, pero difieren entre los distintos grupos según se muestra en la Figura 3.15 (apartado 3.5).

La región 4, al igual que la región 3, muestra casi total conservación de aminoácidos entre los miembros del mismo grupo, pero existen claras diferencias en el alineamiento global de todas las proteínas Hrd. Resulta sorprendente que a pesar de las variaciones, la mayor similaridad se encuentra en la hélice de reconocimiento del dominio HTH, incluyendo las argininas que participan en la interacción con la región -35 en ⁷⁰ y en ^A (véase apartado 3.5). La conservación de secuencia en esta zona sugiere que todas las proteínas Hrd reconocen la misma secuencia consenso en -35.

La diferencias observadas en la subregión 4.1, en la primera hélice del dominio HTH y en la región carboxilo podrían indicar que estas zonas interactúan con distintos reguladores transcripcionales como se ha descrito previamente para la proteína PhoB de *E. coli* (Figura 4.2).

Organización genómica

Los genes *hrd* de *S. griseus* se encuentran separados en el cromosoma. Este hecho se deduce de que se clonaron en distintos fagos recombinantes que no tenían en común ningún fragmento de restricción. Este resultado coincide con la localización de los genes *hrd* en el cromosoma de *S. coelicolor*, donde se han detectado en regiones diferentes (van Wezel y col., 1995). Sin embargo en *M. smegmatis* los genes *mysA* y *mysB* se encuentran separados en el genoma por 3,5 kb (Predich y col., 1995) y en *B. lactofermentum* la distancia entre los genes *sigA* y *sigB* es menor de 20 kb (Oguiza y col., 1996).

La situación en otros microorganismos es totalmente diferente. En un estudio comparativo con 11 bacterias Gram negativas se ha observado que el gen *rpoD* se encuentra formando parte de un operón de síntesis macromolecular debido a la presencia de los genes *rpsU*, *dnaG* y *rpoD*, cuyos productos son la proteína ribosómica S21, la DNA primasa y el factor sigma principal, los cuales son necesarios para el inicio de la síntesis de proteínas, DNA y RNA, respectivamente. La presencia de estos genes en un solo operón sugiere la necesidad de una regulación coordinada de la síntesis macromolecular (Versalovic y col., 1993). En la bacteria Gram positiva *B. subtilis*, sólo se conservan ligados en el operón los genes *dnaG* y *rpoD*, y en lugar del gen *rpsU* se ha encontrado un gen de función desconocida denominado P23 (Wang y Doi, 1986). Una situación similar a la de *B. subtilis* se ha descrito en las bacterias *Lactococcus lactis* y *Clostridium acetobutylicum* (Araya y col., 1993; Sauer y col., 1994).

4.4. ANALISIS TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES *HRD*

El análisis transcripcional mediante la técnica de *Northern* puso de manifiesto que los tres genes *hrd* de *S. griseus* son transcritos monocistrónicos. Igualmente sucede en *S. aureofaciens* y en el actinomiceto *B. lactofermentum* (Kormanec y col., 1992; Oguiza, J.A., comunicación personal). La presencia de múltiples genes *hrd* en actinomicetos y su transcripción monocistrónica sugiere un

mecanismo de regulación diferente al del operón de síntesis macromolecular encontrada en otros microorganismos.

Los estudios transcripcionales mostraron que el gen *hrdB* de *S. griseus* se expresaba en todas las condiciones probadas. La mayor abundancia de transcrito tenía lugar durante el crecimiento exponencial en medio sin limitación de nutrientes (YED), tal como se esperaría para el factor sigma principal en *Streptomyces* (Buttner y col., 1990; Brown y col., 1992). En medio mínimo se observó una disminución del transcrito a lo largo del tiempo de fermentación y además del transcrito original aparecían otros mensajeros de menor tamaño que podrían corresponder al uso de promotores alternativos o al procesamiento del transcrito de 1,9 kb. Cuatro tamaños de transcrito han sido observados también para el mismo gen en *S. aureofaciens*, así como un promotor interno al gen *hrdB* (Kormanec y col., 1992; 1993).

El gen *hrdD* manifestó abundante transcripción al pasar el micelio a medio mínimo después de 24 h de crecimiento sin limitación de nutrientes. Su expresión en medio YED es reducida y tras un choque térmico, nula. Una situación similar ha sido descrita en la bacteria *Anabaena*, en la cual los genes *sigB* y *sigC* han sido detectados sólo en condiciones limitadas de nitrógeno que provocan la diferenciación en este microorganismo (Brahamsa y Haselkorn, 1992). En *S. aureofaciens* la expresión del gen *hrdD* parece estar confinada al micelio vegetativo o sustrato (Kormanec y col., 1993).

El gen *hrdT* mostró una limitada expresión en todas las condiciones probadas, siendo el transcrito ligeramente más abundante durante las primeras horas de crecimiento, coincidiendo con la expresión del gen *hrdB*, con la diferencia de que éste último se expresaba durante más tiempo y con mayor abundancia. Los dos genes *hrd* descritos en *B. lactofermentum* (*sigA* y *sigB*, que hibridan con los genes *hrdB* y *hrdT* de *S. griseus*) se expresan paralelamente durante el crecimiento exponencial (Oguiza, J.A., comunicación personal). La expresión simultánea de genes *hrd* podría sugerir alguna diferencia en el reconocimiento de promotores SEP, relacionada con las regiones no homólogas entre ambos polipéptidos o con la sustitución de la treonina (HrdB) por serina (HrdT) en la α -hélice que interacciona con la región -10 de los promotores (Figura 4.3).

4.5. EXPRESION DEL GEN *HRDB* EN *S. LIVIDANS*

Al transformar *S. lividans* con el vector pIJ702 portando el factor sigma *hrdB* de *S. griseus*, se detectó un incremento de la transcripción mediante la aparición de dos mensajeros diferentes, uno de ellos de 1,9 kb que se iniciaba desde el promotor del gen *hrdB* y otro de 2,2 kb que comenzaría probablemente desde el promotor del gen *mel*. Sin embargo, el aumento de la transcripción detectado no era fácilmente cuantificable, debido a que el carril utilizado como control estaba saturado con el mensajero del gen *mel* y no permitía detectar el transcrito del gen *hrdB* endógeno en la hibridación, por lo tanto no pudo excluirse la posibilidad de una regulación transcripcional (Figura 3.19).

Además del incremento en la transcripción, se observó la sobreexpresión de una proteína de 29 kDa, pero no un aumento de la proteína de 66 kDa codificada por el gen *hrdB*. La presencia de una proteína de menor tamaño podría reflejar un mecanismo de regulación post-traducciona, como por ejemplo la hidrólisis de la proteína HrdB. Un mecanismo de regulación de los factores sigma descrito en otros microorganismos es la presencia de proteínas denominadas anti-sigmas, las cuales presumiblemente actúan mediante unión al factor sigma impidiendo su unión al núcleo de la RNA polimerasa, sin embargo en este caso cabría esperar un incremento en la expresión de ambas proteínas. Quizá la purificación de la proteína sobreexpresada y la clonación del gen correspondiente podría arrojar luz sobre los mecanismos de regulación a que está sujeto el gen *hrdB*.

4.6. EXPRESION DE LOS GENES *HRD* EN *E. COLI*

La expresión de los genes *hrdB*, *hrdD* y *hrdT* en *E. coli* tenía dos propósitos principales, por un lado permitiría la obtención de estas proteínas aisladas para la realización de estudios de transcripción *in vitro* con distintos promotores SEP, con el fin de identificar si existen diferencias en la especificidad de reconocimiento entre estos promotores; y por otro lado, permitiría determinar la

migración de dichas proteínas en geles de poliacrilamida-SDS, que normalmente no coincide con el tamaño deducido a partir de la secuencia de aminoácidos.

La expresión en *E. coli* del gen *hrdB* permitió concluir que este factor sigma cuya masa molecular es de 55.768 Da según se deduce a partir de la secuencia de aminoácidos, migraba como un polipéptido de 66 kDa. El producto del gen *hrdD* que tiene una Mr deducida de 36.772 Da, migraba como una proteína de 46 kDa al ser expresado en *E. coli* y la migración del gen *hrdT* se no pudo establecerse al no detectarse su expresión.

La migración anormal de los factores sigma se ha relacionado con la funcionalidad del Trp⁴³⁴ de la proteína RpoD de *E. coli*, que forma parte de la σ -hélice mostrada en la Figura 4.3. La mutación W434G en el factor σ^{70} de *E. coli* permite que la proteína mutada migre según su tamaño que es de 70 kDa. Los autores de este trabajo sugieren que este triptófano participa directamente en el reconocimiento de la región -10 de los promotores, en la apertura de las dos hebras del DNA para la transcripción y confiere estabilidad a la interacción de la región 1.1 cuando se pliega sobre la región 2.4, aportando a esta estructura resistencia a las condiciones desnaturalizantes de los geles de poliacrilamida y alterando su migración. Una evidencia adicional de este hecho es que la mutación V55G, en la región 1.1, da como resultado un factor sigma mutante con las mismas características que W434G (Gopal y col., 1994).

5. CONCLUSIONES

1. La actividad enzimática RNA polimerasa de *S. griseus* se ha purificado 424 veces con un rendimiento estimado del 62% mediante precipitación con Polymix P, precipitación con sulfato amónico, y posteriormente mediante cromatografía de filtración en gel y heparina-agarosa.
2. El núcleo de la RNA polimerasa de *S. griseus* se ha purificado mediante cromatografía de afinidad DNA-agarosa.
3. Las holoenzimas purificadas mediante cromatografía de heparina-agarosa son activas en la transcripción de los promotores de los genes *veg* y *ctc* de *B. subtilis* y *amy* de *S. griseus*.
4. El microorganismo *S. griseus* posee tres genes *hrd*, homólogos al gen *rpoD* de *E. coli*.
5. Los genes *hrdB* y *hrdD* de *S. griseus* son homólogos a los genes *hrdB* y *hrdD* de *S. coelicolor* y de *S. aureofaciens*. El gen, *hrdT*, no pertenece a ninguno de los grupos de genes *hrd* conocidos.
6. El análisis funcional de las proteínas codificadas en los genes *hrd* demuestra que están formados por los cuatro dominios descritos en la familia ⁷⁰.
7. Los estudios de transcripción de los genes *hrd* revelan que el gen *hrdB* de *S. griseus* se expresa activamente en medio sin limitación de nutrientes y se reduce su expresión en medio mínimo o después de un choque térmico.
8. Mediante la técnica de *Northern* se ha detectado heterogeneidad en la transcripción del gen *hrdB*, observándose tres mensajeros de 1.9, 1.2, y 0.7 kb.
9. El transcrito del gen *hrdD* tiene 1.1 kb y es abundante en medio mínimo, aunque también se expresa en medio sin limitación de nutrientes.
10. El gen *hrdT* es un gen de *S. griseus* que está ausente en todos los *Streptomyces* estudiados hasta el momento. Su expresión es baja en todas las condiciones probadas.
11. La expresión del gen *hrdB* de *S. griseus* en *S. lividans* provoca la sobreexpresión de un polipéptido de 29 kDa.
12. El producto del gen *hrdB* expresado en *E. coli* migra como un polipéptido de 66 kDa y el producto del gen *hrdD* migra como un polipéptido de 46 kDa. El gen *hrdT* no se consiguió expresar en *E. coli*.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adamidis, T., Riggle, P., Champness, W.** (1990). Mutations in a new *Streptomyces coelicolor* locus which globally blocks antibiotic biosynthesis but not sporulation. *J. Bacteriol.* **172**: 2962-2969.
- Adamidis, T. , Champness, W.** (1992). Genetic analysis of *absB*, a *Streptomyces coelicolor* locus involved in global antibiotic regulation. *J. Bacteriol.* **174**: 4622-4628.
- Allan, E.J., Prosser, J.I.** (1983). Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor* A3(2) on solid medium. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 2029-2036.
- Allison, L., Moyle, M., Shales, M., Ingles, C.** (1985). Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell* **42**: 599-610.
- Araya, T., Ishibashi, N., Shimamura, S., Tanaka, K., Takahashi, H.** (1993). Genetic and molecular analysis of the *rpoD* gene from *Lactococcus lactis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **50**: 88-92.
- Arisawa, A., Kawamura, N., Tsunekawa, H., Okamura, K., Tone, H., Okamoto, R.** (1993). Cloning and nucleotide sequences of two genes involved in the 4"-O-Acylation of Macrolide Antibiotics from *Streptomyces thermotolerans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 2020-2025.
- Asturias, J.A.** (1991). Mecanismos moleculares de la regulación por fosfato. Tesis doctoral. Universidad de León.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D., Smith, J.A., Seidman, J.G., Struhl, K.** (1987). Current protocols in molecular biology. Wiley, New York.
- Ayers, D.J., Sunshine, M.G., Six, E.W., Christie, G.E.** (1994). Mutations affecting two adjacent amino acid residues in the alpha subunit of RNA polymerase block transcriptional activation by the bacteriophage P2 Ogr protein. *J. Bacteriol.* **176**: 7430-7438.
- Babcock, M.J., Kendrick, K.E.** (1990). Transcriptional and translational features of a sporulation gene of *Streptomyces griseus*. *Gene* **95**: 57-63.
- Bachmann, B.J.** (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8. *Microbiological Rev.* **54**: 130-197.
- Baltz, R.H., Seno, E.T.** (1988). Genetics of *Streptomyces fradiae* and tylosin biosynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**: 547-574.
- Baltz, R.H.** (1995). Gene Expression in Recombinant *Streptomyces*. En: Gene Expression in Recombinant Microorganisms (Smith, A., ed.). Marcel Dekker, Inc., N.Y. pp. 309-381.
- Bartolomei, M., Corden, J.** (1987). Localization of an alpha-amanitin resistance mutation in the gene encoding the largest subunit of mouse RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 586-594.

- Baum, E.Z., Buttner, M.J., Lin, L.-S., Rothstein, D.M.** (1989). Transcription from de P1 promoters of *Micromonospora echinospora* in the absence of native upstream DNA sequences. *J. Bacteriol.* **171**: 6503-6510.
- Baylis, H.A., Bibb, M.J.** (1988). Transcriptional analysis of the 16S rRNA gene of the *rrnD* gene set of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **2**: 569-579.
- Bedford, D.J., Lewis, C.G., Buttner, M.J.** (1991). Characterization of a gene conferring bialaphos resistance in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **104**: 39-45.
- Benson, A.K., Haldenwang, W.G.** (1993). *Bacillus subtilis*^B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2330-2334.
- Bibb, M.J., Cohen, S.N.** (1982). Gene expression in *Streptomyces*: construction and application of promoter-probe plasmid vector in *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* **187**: 265-277.
- Bibb, M.J., White, J., Ward, J.M., Janssen, G.R.** (1994). The mRNA for the 23S rRNA methylase encoded by the *ermE* gene of *Saccharopolyspora erythraea* is translated in the absence of a conventional ribosome-binding site. *Mol. Microbiol.* **14**: 533-545.
- Blanc, V., Salah-Bey, K., Folcher, M., Thompson, C.J.** (1995). Molecular characterization and transcriptional analysis of a multidrug resistance gene cloned from the pristinamycin-producing organism *Streptomyces pristinaespiralis*. *Mol. Microbiol.* **17**: 989-999.
- Blatter, E.E., Ross, W., Tang, H., Gourse, R.L., Ebright, R.H.** (1994). Domain organization of RNA polymerase subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell* **78**: 889-896.
- Bolotin, A., Biro, S.** (1990). Nucleotide sequence of the putative regulatory gene and major promoter region of the *Streptomyces griseus* glycerol operon. *Gene* **87**: 151-152.
- Borukhov, S., Lee, J., Goldfarb, A.** (1991a). Mapping of a contact for the RNA 3' terminus in the largest subunit of RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **266**: 23932-23935.
- Borukhov, S., Severinov, K., Kashlev, M., Lebedev, A., Bass, I., Rowland, G.C., Lim, P.P., Glass, R.E., Nikiforov, V., Goldfarb, A.** (1991b). Mapping of trypsin cleavage and antibody-binding sites and delineation of a dispensable domain in the beta subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **266**: 23921-23926.
- Bourn, W. R., Babb, B.** (1995). Computer assisted identification and classification of streptomycete promoters. *Nucl. Acids Res.* **23**: 3696-3703.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brahamsha, B., Haselkorn, R.** (1992). Identification of multiple RNA polymerase sigma factor homologs in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: cloning, expression and inactivation of the *sigB* and *sigC* genes. *J. Bacteriol.* **174**: 7273-7282.
- Braña, A.F., Manzanal, M.B., Hardisson, C.** (1982). Mode of cell wall growth of *Streptomyces antibioticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**: 231-235.
- Braña, A.F., Méndez, C., Diaz, L.A., Manzanal, M.B., Hardisson, C.** (1986). Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1319-1326.
- Brawner, M.E., Auerbach, J.I., Fronwasa, J.A., Rosenberg, M, Taylor, A.P.** (1985). Characterization of *Streptomyces* promoter sequences using the *Escherichia coli* galactokinase gene. *Gene* **40**: 191-201.

- Brayer, G.D., McPherson, A.** (1983). Refined structure of the gene 5 DNA binding protein from bacteriophage fd. *J. Mol. Biol.* **169**: 565-596.
- Brosius, J., Cate, R.L., Perlmutter, A.P.** (1982). Precise location of two promoters for the β -lactamase gene of pBR322. S1 mapping of ribonucleic acid isolated from *Escherichia coli* or synthesized *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **257**: 9205-9210.
- Brown, K.L., Wood, S., Buttner, M.J.** (1992). Isolation and characterization of the major vegetative RNA polymerase of *Streptomyces coelicolor* A3(2); renaturation of a sigma subunit using GroEL. *Mol. Microbiol.* **6**: 1133-1139.
- Brown, K.L., Hughes, K.T.** (1995). The role of anti-sigma factors in gene regulation. *Mol. Microbiol.* **16**: 397-404.
- Buck, M., Cannon, W.** (1992). Specific binding of the transcription factor sigma-54 to promoter DNA. *Nature* **358**: 422-424.
- Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J., Bautz, E.K.F.** (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* **221**: 43-46.
- Burgess, R.R., Jendrisak, J.J.** (1975). A procedure for the rapid large-scale purification of *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase involving polymin-P precipitation and DNA-cellulose chromatography. *Biochemistry* **14**: 4634-4638.
- Burnett, W.V., Henner, J., Eckhardt, T.** (1987). The nucleotide sequence of the gene coding for XP55, a major secreted protein from *Streptomyces lividans*. *Nucl. Acids Res.* **15**: 3926.
- Burton, Z., Burgess, R.R., Lin, J., Moore, D., Holder, S., Gross, C.A.** (1981). The nucleotide sequence of the cloned *rpoD* gene for the RNA polymerase sigma subunit from *E. coli* K12. *Nucl. Acids Res.* **9**: 2889-2903.
- Burton, Z.F., Gross, C.A., Watanabe, K.F., Burgess, R.R.** (1983). The operon that encodes the sigma subunit of RNA polymerase also encodes ribosomal protein S21 and DNA primase in *E. coli* K12. *Cell* **32**: 335-349.
- Busby, S., Ebright, R.H.** (1994). Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* **79**: 743-746.
- Butler, M.J., Davey, C.C., Krygsman, P., Walczyk, E., Malek, L.T.** (1992). Cloning of genetic loci involved in endoprotease activity in *Streptomyces lividans* 66: A novel neutral protease gene with an adjacent divergent putative regulatory gene. *Can. J. Microbiol.* **38**: 912-920.
- Buttner, M.J., Brown, N.L.** (1985). RNA polymerase-DNA interaction in *Streptomyces in vitro* studies of a *Streptomyces lividans* plasmid-promoter with *Streptomyces coelicolor* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **185**: 177-188.
- Buttner, M.J., Brown, N.L.** (1987). Two promoters from *Streptomyces lividans* pIJ101 and their expression in *Escherichia coli*. *Gene* **51**: 179-186.
- Buttner, M.J., Fearnley, I.M., Bibb, M.J.** (1987). The agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): nucleotide sequence and transcriptional analysis. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 101-109.
- Buttner, M.J., Smith, A.M., Bibb, M.J.** (1988). At least three different RNA polymerase holoenzymes direct transcription of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Cell* **52**: 599-607.
- Buttner, M.J.** (1989). RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **3**: 1613-1659.

- Buttner, M.J., Chater, K.F., Bibb, M.J.** (1990). Cloning, disruption and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 172: 3367-3378.
- Caballero, J.L., Malpartida, F., Hopwood, D.A.** (1991). Transcriptional organization and regulation of an antibiotic export complex in the producing *Streptomyces* culture. *Mol. Gen. Genet.* 228: 372-380.
- Calcutt, M.J.** (1994). Gene organization in the *dnaA-gyrA* region of the *Streptomyces coelicolor* chromosome. *Gene* 151: 23-28.
- Cannon, W., Austin, S., Moore, M., Buck, M.** (1995). Identification of close contacts between the N (54) protein and promoter DNA in closed promoter complexes. *Nucl. Acids Res.* 23: 351-356.
- Chamberlin, M., Nierman, W.C., Wiggs, J., Neff, N.** (1979). A quantitative assay for bacterial RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 254: 10061-10069.
- Chamberlin, M.** (1982). Bacterial DNA-dependent RNA polymerases. En: *The Enzymes*, vol 15, part B, (Boyer P., ed). Academic Press, NY. p 61.
- Chamberlin, M.** (1994). New models for the mechanism of transcription elongation and its regulation. *Harvey Lect.* 88: 1-21.
- Chan, C., Landick, R.** (1994). New perspectives on RNA elongation and termination by *E. coli* RNA polymerase. En: *Transcription: Mechanism and Regulation* (Conaway, R., Conaway, J., eds.). Raven Press, N.Y. pp. 297-320.
- Chater, K.F.** (1972). A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 72: 9-28.
- Chater, K.F.** (1980). Actinophage DNA. *Devel. Ind. Microbiol.* 21: 65-74.
- Chater, K.F., Hopwood, D.A., Kieser, T., Thompson, C.J.** (1982). Gene cloning in *Streptomyces*. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 97: 69-95.
- Chater, K.F.** (1984). Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. En: *Microbial Development* (R. Losick and L. Shapiro, eds). CSH Laboratory, N.Y. pp. 89-115.
- Chater, K.F., Bruton, C.J., Foster, S.G., Tobek, I.** (1985). Physical and genetic analysis of IS110, a transposable element of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.* 200: 235-239.
- Chater, K.F., Henderson, D.J., Bibb, M.J., Hopwood, D.A.** (1988). Genome flux in *Streptomyces coelicolor* and other streptomycetes and its possible relevance to the evolution of mobile antibiotic resistance determinants. En: *Transposition* (Kingsman, A.J., Chater, K.F., Kingsman, S.M., eds). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 7-42.
- Chater, K.F., Hopwood** (1989). Diversity of bacterial genetics. En: *Genetics of Bacterial Diversity* (Hopwood, D.A., Chater, K.F., eds). Academic Press, NY. pp. 24-46.
- Chater, K.F.** (1989a). Sporulation in *Streptomyces*. En: *Regulation of procaryotic development* (Smith, I., Slepecky, R., Setlow, P., eds). American Society for Microbiology. Washington, D.C. pp.277-299.
- Chater, K.F.** (1989b). Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Trends Genet.* 5: 372-376.
- Chater, K.F., Bruton, C.J., Plaskitt, K.A., Buttner, M.J., Méndez, C., Helmann, J.** (1989c). The developmental late of *S. coelicolor* hyphae depends crucially on a gene product homologous with the motility factor of *B. subtilis*. *Cell* 59: 133-143.

- Chater, K.F.** (1990). The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing streptomycetes. *Bio/Technology* **8**: 115-121.
- Chater, K.F.** (1991). Saps, hydrophobins, and aerial growth. *Curr. Biol.* **1**: 318-320.
- Chater, K.F.** (1993). Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 685-713.
- Chen, C.W., Yu, T.-W., Chung, H.-M., Chou, C.-F.** (1992). Discovery and characterization of a new transposable element, Tn4811, in *Streptomyces lividans* 66. *J. Bacteriol.* **174**: 7762-7769.
- Chen, C.W., Yu, T.-W., Lin, Y.-S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A.** (1993). The conjugative plasmid SLP2 of *Streptomyces lividans* is a 50 kb linear molecule. *Mol. Microbiol.* **7**: 925-932.
- Chen, Y., Ebright, Y., Ebright, R.** (1994). Identification of the target of a transcription activator protein by protein-protein photocrosslinking. *Science* **265**: 90-92.
- Chesnut, R.S., Bookstein, C., Hulett, F.M.** (1991). Separate promoters direct expression of *phoAIII*, a member of the *Bacillus subtilis* multigene family, during phosphate starvation and sporulation. *Mol. Microbiol.* **5**: 2181-2190.
- Chung, S.T.** (1987). Tn4556, a 6.8-kilobase-pair transposable element of *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* **169**: 4436-4441.
- Clarke, L., Carbon, J.** (1976). A colony bank containing synthetic *ColE1* hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**:91.
- Clerget, M., Jin, D.J., Weisberg, R.A.** (1995). A zinc-binding region in the σ subunit of RNA polymerase is involved in antitermination of early transcription of phage HK022. *J. Mol. Biol.* **248**: 768-780.
- Criado, L.M., Martín, J.F., Gil, J.A.** (1993). The *pab* gene of *Streptomyces griseus*, encoding p-aminobenzoic acid synthase is located between genes possibly involved in candidicin biosynthesis. *Gene* **126**: 135-139.
- Cullum, J., Altenbuchner, J., Flett, F., Piendl, W.** (1986). DNA amplification and genetic instability in *Streptomyces*. *Biotech. Gen. Engin. Rev.* **4**: 59-78.
- Dammann, T., Wohlleben, W.** (1992). A metalloprotease gene from *Streptomyces coelicolor* 'Muller' and its transcriptional activator, a member of the LysR family. *Mol. Microbiol.* **6**: 2267-2278.
- Daniels, D., Zuber, P., Losick, R.** (1990). Two amino acids in an RNA polymerase σ factor involved in the recognition of adjacent base pairs in the -10 region of a cognate promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8075-8079.
- Das, A.** (1993). Control of transcription termination by RNA binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 893-930.
- Davis, N.K., Chater, K.F.** (1990). Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. *Mol. Microbiol.* **4**: 1679-1691.
- Davis, N.K., Chater, K.F.** (1992). The *Streptomyces coelicolor whiB* gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation. *Mol. Gen. Genet.* **232**: 351-358.
- Davison, B.L., Leighton, T., Rabinowitz, J.C.** (1979). Purification of *Bacillus subtilis* RNA polymerase with heparin-agarose, *in vitro* transcription of λ 29 DNA. *J. Biol. Chem.* **264**:9220-9226.
- Daza, A., Martín, J.F., Dominguez, A., Gil, J.A.** (1989). Sporulation of several species of *Streptomyces* in submerged cultures after nutritional downshift. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2483-2491.

- Daza, A., Gil, J.A., Vigal, T., Martín, J.F.** (1990). Cloning and characterization of a gene of *Streptomyces griseus* that increases production of extracellular enzymes in several species of *Streptomyces*. *Mol. Gen. Genet.* **222**: 384-392.
- Daza, A., Martín, J.F., Vigal, T., Gil, J.A.** (1991). Functional and regulatory analysis of the promoter region of the *saf* gene, a *Streptomyces griseus* gene that increases the production of several extracellular enzymes. *Gene* **108**: 63-71.
- Deng, Z., Kieser, T., Hopwood, D.A.** (1986). Expression of a *Streptomyces* plasmid promoter in *Escherichia coli*. *Gene* **43**: 295-300.
- Deng, Z., Kieser, T., Hopwood, D.A.** (1987). Activity of *Streptomyces* transcriptional terminator in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* **15**: 2665-2675.
- Dissinger, S., Hanna, M.M.** (1991). RNA-protein interactions in a NusA-containing *Escherichia coli* transcription complex paused at an RNA hairpin. *J. Mol. Biol.* **219**: 11-25.
- Distler, J., Ebert, A., Mansouri, K., Pissowotzki, K., Stockmann, M., Piepersberg, W.** (1987). Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: Nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucl. Acids Res.* **15**: 8041-8056.
- Distler, J., Mansouri, K., Mayer, G., Piepersberg, W.** (1990). Regulation of biosynthesis of streptomycin. En: Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms (Heslot, H., Davies, J., Florent, J., Bobichon, L. Durand, G., Penasse, L., eds). Société Française de Microbiologie, Paris. Vol I, pp. 379-392
- Dombroski, A.J., Walter, W.A., Thomas Record, M., Jr., Siegele, D.A., Gross, C.A.** (1992). Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor σ^{70} exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell* **70**: 501-512.
- Dombroski, A.J., Walter, W.A., Gross, C.A.** (1993). Amino-terminal amino acids modulate σ -factor DNA-binding activity. *Genes & Dev.* **7**: 2446-2455.
- Dufour, A., Handelwang, W.G.** (1994). Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J. Bacteriol.* **176**: 1813-1820.
- Ebright, R.** (1993). Transcription activation at class I CAP-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* **8**: 797-802.
- Eisenberg, D., Weiss, R.M., Terwilliger, T.C.** (1982). The helical hydrophobic moment: A measure of the amphipathicity of α helix. *Nature* **299**: 371-374.
- Enquist, J.W., Bradley, J.G.** (1971). Characterization of deoxyribonucleic acid from *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **169**: 4249-4256.
- Ensign, J.E.** (1978). Formation, properties and germination of actinomycete spores. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**: 185-219.
- Errington, J.** (1993). *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**: 1-33.
- Evans, M., Kaczmarek, F.S., Stutzman-Engwall, K., Dyson, P.** (1994). Characterization of a *Streptomyces-lividans*-type site-specific DNA modification system in the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* permits investigation of two novel giant linear plasmids, pSA1 and pSA2. *Microbiology* **140**: 1367-1371.
- Fernández-Moreno, M.A., Caballero, J.L., Hopwood, D.A. and Malpartida, F.** (1991). The actinorhodin gene cluster contains regulatory and antibiotic export genes that are direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces coelicolor*. *Cell* **66**: 769-780.

- Fernández-Moreno, M.A., Martín-Triana, A.J., Martínez, E., Niemi, J., Keiser, H.M., Hopwood, D.A., Malpartida, F.** (1992). *abaA*, a new pleiotropic regulatory locus for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **174**: 2958-2967.
- Fornwald, J.R., Schmidt, F.J., Adams, C.W., Rosenberg, M., Brawner, M.E.** (1987). Two promoters, one induced and one constitutive, control transcription of the *Streptomyces lividans* galactose operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2130-2134.
- Friedman, D.I., Imperiale, M.J., Adhya, S.L.** (1987). RNA 3' end formation in the control of gene expression. *Annu. Rev. Genet.* **21**: 453-488.
- Frischauf, A.M., Lehrach, H., Poustka, A., Murray, N.** (1984). Replacement vectors carrying polylinkers sequences. *J. Mol. Biol.* **170**: 827-842.
- Fukuda, R., Ishihama, A.** (1974). Subunits of RNA polymerase in function and structure. V. Maturation *in vitro* of core enzyme from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **87**: 523-540.
- Gardella, T., Moyle, H., Susskind, M.M.** (1989). A mutant *Escherichia coli* ⁷⁰ subunit of RNA polymerase with altered promoter specificity. *J. Mol. Biol.* **206**: 579-590.
- Geistlich, M., Losick, R., Turner, J.R., Rao, E.N.** (1992). Characterization of a novel regulatory gene governing the expression of a polypeptide synthase gene in *Streptomyces ambofaciens*. *Mol. Microbiol.* **6**: 2019-2029.
- Gentry, D.R., Burgess, R.R.** (1986). The cloning and sequence of the gene encoding the omega subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Gene* **48**: 33-40.
- Gibb, G.D., Strohl, W.R.** (1988). Physiological regulation of protease activity in *Streptomyces peucetius*. *Can. J. Microbiol.* **34**: 187-190.
- Gil, J.A., Hopwood, D.A.** (1983). Cloning and expression of a p-aminobenzoic acid synthetase gene of the candidicin producing *Streptomyces griseus*. *Gene* **25**: 119-132.
- Gil, J.A., Naharro, G., Villanueva, J.R., Martín, J.F.** (1985). Characterization and regulation of p-aminobenzoic acid synthase from *Streptomyces griseus*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1279-1287.
- Gillen, K.L., Hughes, K.T.** (1991a). Negative regulatory loci coupling flagellin synthesis to flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**: 2301-2310
- Gillen, K.L., Hughes, K.T.** (1991b). Molecular characterization of *flgM*, a gen regulator of flagellin synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173** : 6453-6459
- Glass, R.E., Jones, S.T., Ishihama, A.** (1986a). Genetic studies on the ω -subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. VII. RNA polymerase is a target for ppGpp. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 265-268.
- Glass, R.E., Jones, S.T., Nene, V., Nomura, T., Fujita, N., Ishihama, A.** (1986b). Genetic studies on the ω -subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. VIII. Localization of a region involved in promotor selectivity. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 487-491.
- Glass, R.E., Honda, A., Ishihama, A.** (1986c). Genetic studies on the ω -subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. IX. The role of the carboxy-terminus in enzyme assembly. *Mol. Gen. Genet.* **203**:492-495.
- Glass, R.E., Ralphs, N.T., Fujita, N., Ishihama, A.** (1988). Assembly of amber fragments of the ω -subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Eur. J. Biochem.* **176**: 403-407.
- Glazenbrook, M.A., Doull, J.L., Stuttard, C., Vining, L.C.** (1990). Sporulation of *Streptomyces venezuelae* in submerged cultures. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 581-588.

- Goethals, K., Van Montagu, M., Holsters, M.** (1992). Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1646-1650.
- Goldberg, J.B., Gorman, W.L., Flynn, J.L., Ohman, D.E.** (1993). A mutation in *algN* permits transactivation of alginate production by *algT* in *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* **175**: 1303-1308.
- Goodfellow, M.** (1989). Suprageneric classification of the actinomycetes. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Williams, S.T., Sharpe M.E., Holt, J.G., eds.). Williams & Wilkins, Baltimore. Vol 4, pp. 2333-2339.
- Gopal, V., Ma, H.W., Kumaran, M.K., Chatterji, D.** (1994). A point mutation at the junction of domain 2.3/2.4 of transcription factor σ^{70} abrogates productive transcription and restores its expected mobility on a denaturing gel. *J. Mol. Biol.* **242**: 9-22.
- Granozzi, C., Billeta, R., Passantino, R., Sollazzo, M., Puglia, A.M.** (1990). A breakdown in macromolecular synthesis preceding differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* **136**: 713-718.
- Gribnikov, M., Devereux, J., Burgess, R.R.** (1984). The codon preference plot: graphic analysis of protein coding sequences and prediction of gene expression. *Nucl. Acids Res.* **12**: 539-549.
- Gribnikov, M., Burgess, R.R.** (1986). Sigma factors from *E. coli*, *B. subtilis*, phage SP01, and phage T4 are homologous proteins. *Nucl. Acids Res.* **14**: 6745-6763.
- Grossman, A.D., Erickson, J.W., Gross, C.A.** (1984). The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat-shock promoters. *Cell* **38**: 383-390.
- Guijarro, J., Santamaría, R., Schauer, A., Losick, R.** (1988). Promoter determining the trimming and spacial localization of transcription of a cloned *Streptomyces coelicolor* gene encoding a spore-associated polypeptide. *J. Bacteriol.* **170**: 1895-1901.
- Guilfoile, P.G., Hutchinson, C.R.** (1992). The *Streptomyces glaucescens* TcmR protein represses transcription of the divergently oriented *tcmR* and *tcmA* genes by binding to an intergeneric operator region. *J. Bacteriol.* **174**: 3659-3666.
- Haldenwang, W.G., Losick, R.** (1980). A novel RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7000-7004.
- Haldenwang, W.G.** (1995). The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* **59**: 1-30.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. En: *DNA cloning: A Practical Approach* (Glover D.M., ed). IRL Press, Virginia. Vol I, p. 109.
- Hara, O., Horinouchi, S., Uozumi, T., Beppu, T.** (1983). Genetic analysis of A-factor synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces griseus*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 2939-2944.
- Hardisson, C., Manzanal, M.B.** (1976). Ultrastructural studies of sporulation in *Streptomyces*. *J. Bacteriol.* **127**: 1443-1454.
- Hardisson, C., Manzanal, M.B., Salas, J.A., Suárez, J.E.** (1978). The structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.* **105**: 203-214.
- Harley, C.B., Reynolds, R.P.** (1987). Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucl. Acids Res.* **15**: 2343-2361.
- Hartley, N.M., Murphy, G.J.P., Bruton, C.J., Chater, K.F.** (1994). Sequence of the essential early region of C31, a temperate phage of *Streptomyces* spp. with usual features in its lytic development. *Gene* **147**: 29-40.

- Hawley, D.K., McClure, W.R.** (1983). Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucl. Acids Res.* **11**: 2237-2255.
- Hayward, R.S., Igarashi, K., Ishihama, A.** (1991). Functional specialization within the σ -subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **221**: 23-29.
- Helmann, J.D., Chamberlin, M.J.** (1988). Structure and function of bacterial sigma factors. *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 839-872.
- Helmann, J.D., Marquez, L.M., Chamberlin, M.J.** (1988). Cloning, sequencing and disruption of the *Bacillus subtilis* σ^{28} gene. *J. Bacteriol.* **170**: 1568-1574.
- Henderson, K.J., Brolle, D.F., Kieser, T., Melton, R.E., Hopwood, D.A.** (1990). Transposition of IS117 (the *Streptomyces coelicolor* A3(2) mini-circle) to and from a cloned target site and into secondary chromosomal sites. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 65-71.
- Henikoff, S.** (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**: 351-359.
- Henikoff, S., Haughh, G.W., Calvo, J., Wallace, J.C.** (1988). A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6602-6606.
- Higgins, D.G., Sharp, P.M.** (1989). Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci.* **5**: 151-153.
- Hirschman, J., Wong, P.k., Sei, K., Keener, J., Kustu, S.** (1985). Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription *in vitro*: evidence that the *ntrA* product is a sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7525-7529.
- Holmes, D.S., Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- Hong, S-K., Matsumoto, A., Horinouchi, S., Beppu, T.** (1993). Effects of protein kinase inhibitors on *in vitro* protein phosphorylation and cellular differentiation of *Streptomyces griseus*. *Mol. Gen. Genet.* **236**: 347-354.
- Honore, N.T., Bergh, S., Chanteau, S., Doucet-Populaire, F., Eiglmeier, K., Garnier, T., Georges, C., Lanois, P., Limpaipoon, T., Newton, S., Niang, K., Del Portillo, P., Ramesh, G.R., Reddi, P., Ridet, P.R., Sittisombut, N., Wu-Hunter, S., Cole, S.T.** (1993). Nucleotide sequence of the first cosmid from the *Mycobacterium leprae* genome project: Structure and function of the Rif-Str regions. *Mol. Microbiol.* **7**: 207-214.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Dydiate, D.Y., Smith, C.P., Ward, J.M., Schremg, H.** (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. F. Crowe & Sons Ltd, Gran Bretaña.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Janssen, G.R., Malpartida, F., Smith, P.** (1986). Regulation of gene expression in antibiotic-producing *Streptomyces*. En: Regulation of Gene Expression, 25 Years On. Symp. Soc. Gen. Microbiol. (Booth, O.R., Higgins, C.F., eds). Cambridge University Press, Gran Bretaña, pp.251-276.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T.** (1987). Plasmid and phage vectors for cloning and gene analysis in *Streptomyces*. *Methods in Enzymology.* **153**: 116-165.
- Horinouchi, S., Kumada, Y., Beppu, T.** (1984). Unstable genetic determinant of A-factor biosynthesis in streptomycin producing organisms: cloning and characterization. *J. Bacteriol.* **158**: 481-487.
- Horinouchi, S., Suzuki, H., Beppu, T.** (1986). Nucleotide sequence of *afsB*, a pleiotropic gene involved in secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **168**: 257-269.

- Horinouchi, S., Suzuki, H., Nishiyama, M., Beppu, T.** (1989). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *Streptomyces griseus* gene (*afsA*) responsible for A-factor biosynthesis. *J. Bacteriol.* **171**: 1206-1210.
- Horinouchi, S., Morikazu, K., Nishiyama, M., Furuya, K., Hong, S-K., Miyake, K., Beppu, T.** (1990). Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **95**: 49-56.
- Horinouchi, S., Beppu, T.** (1992). Regulation of secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces*: A-factor as a microbial hormone and the AfsR protein as a component of a two-component regulatory system. *Gene* **115**: 167-172.
- Hornemann, U., Otto, C.J., Zhang, Z.Y.** (1989). DNA amplification in *Streptomyces achromogenes* subsp. *rubrans* is accompanied by a deletion and the amplified sequences are conditionally stable and can be eliminated by two pathways. *J. Bacteriol.* **171**: 5817-5822.
- Hoshiko, S., Makabe, O., Nojiri, C., Katsumata, K., Satoh, E., Wagaska, K.** (1987). Molecular cloning and characterization of the *Streptomyces hygroscopicus* α -amylase gene. *J. Bacteriol.* **169**: 1029-1036.
- Hudson, G., Holton, T.A., Whitfield, P.R., Bottomley, W.** (1988). Spinach chloroplast *rpoBC* genes encode three subunits of the chloroplast RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **200**: 639-654.
- Hunt, T.P., Magasanik, B.** (1985). Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, *glnL*. *Proc. Natl Acad. Sci USA* **82**: 8453-8457.
- Hutchinson, R.C.** (1994). Drug synthesis by genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology* **12**: 375-379.
- Hütter, R.A., Eckhardt, T.** (1988). Genetic manipulation. En: Actinomycetes in Biotechnology. (Goodfellow, M., Williams, S.T., Mordarski, M, eds). Academic Press, N.Y. pp. 89-185.
- Igarashi, K., Fujita, N., Ishihama, A.** (1991). Identification of α subunit assembly domain in the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **218**: 1-6.
- Igarashi, K., Ishihama, A.** (1991). Bipartite functional map of the *E. coli* RNA polymerase subunit: Involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP. *Cell* **65**: 1015-1022.
- Igo, M., Lampe, M., Ray, C., Schafer, W., Moran, C.P., Losick, R.** (1987). Genetic studies of a secondary RNA polymerase sigma factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 3464-3469.
- Ingham, C.J., Hunter, I.S., Smith, M.C.M.** (1995). Rho-independent terminators without 3' poly-U tails from the early region of actinophage ϕ C31. *Nucl. Acids Res.* **23**: 370-376.
- Ishihama, A.** (1992). Role of the RNA polymerase alpha subunit in transcription activation. *Mol. Microbiol.* **6**: 3283-3288.
- Ishizuca, H., Horinouchi, S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., Beppu, T.** (1992). A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.* **174**: 7585-7594.
- Ito, K., Egawa, K., Nakamura, Y.** (1991). Genetic interaction between the α '-subunit of RNA polymerase and the Arginine-Rich domain of *Escherichia coli* *nusA* protein. *J. Bacteriol.* **173**: 1492-1501.
- Jafri, S., Urbanowski, M.L., Stauffer, G.V.** (1995). A mutation in the *rpoA* gene encoding the α subunit of RNA polymerase that affects *metE-metR* transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 524-529.

- Janssen, G.R., Bibb, M.J., Smith, C.P., Ward, J.M., Kieser, T., Bibb, M.J.** (1985). Isolation and analysis of *Streptomyces* promoters. En: Microbiology (Leive, L, ed.). American Society of Microbiology, Washington, D.C. pp. 392-396.
- Janssen, G.R., Bibb, M.J.** (1988). Tandem promoters transcribe the thiostrepton resistance gene from *Streptomyces azureus* and the viomycin resistance gene from *Streptomyces vivaceus*. En: Biology of Actinomycetes 88 (Okami, Y., Beppu, T., Ogawara, H, eds). Japan Scientific Societies Press, Tokio. pp. 374-379.
- Janssen, G.R., Bibb, M.J.** (1990). Tandem promoters, *tsrp1* and *tsrp2*, direct transcription of the thiostrepton resistance gene (*tsr*) of *Streptomyces azureus*. Transcriptional interactions from *tsrp2* occurs after deletion of the -35 region. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 339-346.
- Jaurin, B., Cohen, S.N.** (1984). *Streptomyces lividans* RNA polymerase recognizes and uses *Escherichia coli* transcriptional signals. *Gene* **28**: 83-91.
- Jaurin G., Cohen, S.N.** (1985) *Streptomyces* contain *Escherichia coli*-type A+T-rich promoters having novel structural features. *Gene* **39**: 191-201.
- Jendrisak, J.J., Burgess, R.R.** (1975). A New method for the large-scale purification of wheat germ DNA-dependent RNA polymerase II. *Biochemistry* **14**: 4639-4645.
- Jokerst, R.S., Weeks, J.R., Zehring, W.A., Greenleaf, A.L.** (1989). Analysis of the gene encoding the largest subunit of RNA polymerase II in *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.* **215**: 266-275.
- Jones, G.H.** (1979) Purification of RNA polymerase from actinomycin producing and nonproducing cells of *Streptomyces antibioticus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **198**: 195-204.
- Jones, C.H., Moran, C.P, Jr.** (1992). Mutant factor blocks transition between promoter binding and initiation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1958-1962.
- Jones, R.L., Jaskula, J.C., Janssen, G.R.** (1992). In vivo translational start site selection on leaderless mRNA transcribed from the *Streptomyces fradiae aph* gene. *J. Bacteriol.* **174**: 4753-4760.
- Juang, Y.-L., Helmann, J.D.** (1994). A promoter melting region in the primary factor of *Bacillus subtilis*. Identification of functionally important aromatic amino acids. *J. Mol. Biol.* **235**: 1470-1488.
- Kaiser, K., Murray, N.E.** (1986). DNA Cloning: a practical approach. (Glover, D.M., ed.). IRL Press, Oxford, Inglaterra. Vol. 1, pp. 1-47.
- Kalakoutsikii, L.V., Agre, M.** (1974). Comparative aspects of development and differentiation in Actinomycetes. *Bacteriol. Rev.* **40**: 465-524.
- Kamimiya, S., Weisblum, B.** (1988). Translational attenuation control of *ermSF*, an inducible resistance determinant encoding rRNA N-methyltransferase from *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* **170**: 1800-1811.
- Kashlev, M., Lee, J., Zalenskaya, K., Nikiforov, V., Goldfarb, A.** (1990). Blocking of the initiation-to-elongation transition by a transdominant RNA polymerase mutation. *Science* **248**:1996-1009.
- Kassavetis, G.A., Geiduschek, E.P.** (1984). Defining a bacteriophage T4 late promoter: Bacteriophage T4 gene 55 protein suffices for directing late promoter recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **8**: 5101-5105.
- Kato, F., Hino, T., Nakaji, A., Tanaka, M., Koyama, Y.** (1995). Carotenoid synthesis in *Streptomyces setonii* ISP5395 is induced by the gene *crtS*, whose product is similar to a sigma factor. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 387-390.

- Katz, E., Thompson, C.J., Hopwood, D.A.** (1983). Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 2703-2714.
- Keilty S., Rosenberg, M.** (1987). Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. *J. Biol. Chem.* **262**: 6389-6395.
- Kelemen, G.H., Zalacain, M., Culebras, E., Seno, E.T., Cundliffe, E.** (1994). Transcriptional attenuation control of the tylosin-resistance gene *tlrA* in *Streptomyces fradiae*. *Mol. Microbiol.* **14**: 833-842.
- Kendall, K., Cullum, J.** (1984). Cloning and expression of an extracellular agarase gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) in *Streptomyces lividans* 66. *Gene* **29**: 315-321.
- Kendrick, K.E., Ensign, J.C.** (1983). Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *J. Bacteriol.* **155**: 357-366.
- Kenney, T.J., York, K., Youngman, P., Moran Jr., C.P.** (1989). Genetic evidence that RNA polymerase associated with σ^A uses a sporulation-specific promoter in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9109-9113.
- Kieser, T.** (1984) Factors affecting the isolation of cccDNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**: 19-36.
- Kieser, T., Hopwood, D.A.** (1991). Genetic Manipulation of *Streptomyces*: Integrating vectors and gene replacement. *Methods in Enzymology.* **204**: 430-458.
- Kieser, H.M., Kieser, T., Hopwood, D.A.** (1992). A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *J. Bacteriol.* **174**:5496-5507.
- Kim, I.S., Lee, K.J.** (1995). Physiological roles of leupeptin and extracellular proteases in mycelium development of *Streptomyces exfoliatus* SMF13. *Microbiol.* **141**: 1017-1025.
- Kimura, M., Fujita, N., Ishihama, A.** (1994). Functional map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. Deletion analysis of the amino-terminal assembly domain. *J. Mol. Biol.* **242**:107.115.
- Kinashi, H., Shimaji-Murayama, T., Skai, A.** (1987). Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes. *Nature* **328**: 454-456.
- Kinashi, H.** (1988). Giant linear plasmids in *Streptomyces* and antibiotic production. En: *Biology of Actinomycetes* 88 (Okami, Y., Beppu, T., Ogawara, H, eds). Japan Scientific Societies Press, Tokio. pp. 117-122.
- Kinashi, H., Shimaji-Murayama, T.** (1991). Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid for *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **173**: 1523-1529.
- Kormanec, J., Farkasovsky, M., Potuckova, L.** (1992). Four genes in *Streptomyces aureofaciens* containing a domain characteristic of principal sigma factors. *Gene* **122**: 63-70.
- Kormanec, J., Farkasovsky, M.** (1993). Differential expression of principal sigma factor homologues of *Streptomyces aureofaciens* correlates with the developmental stage. *Nucl. Acids Res.***21**: 3647-3652.
- Kramer, W., Druetsa, V. Jansen, H.W., Kramer, B., Pflugfelder, M., Fritz, H.J.** (1984). The gapped duplex method DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucl. Acids Res.* **12**: 9441-9456.
- Krieger, M., Kay, L.M., Stroud, R.M.** (1974). Structure and specific binding of trypsin: comparison of inhibited derivatives and a model for substrate binding. *J. Mol. Biol.* **83**: 1784-1788.

- Kumar, A., Grimes, B., Fujita, N., Makino, K., Malloch, R.A., Hayward, R.S., Isahihama, A.** (1994). Role of sigma⁷⁰ subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase in transcription activation. *J. Mol. Biol.* **235**: 405-413.
- Kustu, S., Santero, E., Popham, D., Keener, J.** (1989). Expression of ⁵⁴ (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.* **53**: 367-376.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lampe, M., Binnie, C., Schmidt, R., Losick, R.** (1988). Cloned gene encoding the delta subunit of *Bacillus subtilis* RNA polymerase. *Gene* **67**: 13-19.
- Lampel, J.S., Aphale, J.S., Lampel, K.S., Strohl, W.R.** (1992). Cloning and sequencing of a gene encoding a novel extracellular neutral proteinase from *Streptomyces* sp. strain C5 and expression of a gene in *Streptomyces lividans* 1326. *J. Bacteriol.* **174**: 2797-2808.
- Landridge, J., Landridge, P., Bergquist, P.L.** (1980). Extraction of nucleic acids from agarose gels. *Anal. Biochem.* **103**: 264-271.
- Larionov, O.A., Gragerov, A.I., Kalyaeva, E.S., Nikiforov, W.G.** (1979). A cold-sensitive subunit mutant RNA polymerase from *Escherichia coli* with defects in promoter opening *in vitro*. *Mol. Gen. Genet.* **176**: 105-111.
- Lawlor, E.J., Baylis, H.A., Chater, K.F.** (1987). Pleiotropic morphological and antibiotic deficiency results from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genes & Dev.* **1**: 1305-1310.
- Leblond, P., Francou, F.X., Simonet, J.-M., Decaris, B.** (1990). Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of *Streptomyces ambofaciens* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**: 79-88.
- Leblond, P., Redenbach, M., Cullum, J.** (1993). Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **175**: 3422-3429.
- LeGrice, S.F.J., Sonenshein, A.L.** (1982). Interaction of *Bacillus subtilis* RNA polymerase with a chromosomal promoter. *J. Mol. Biol.* **162**: 551-564.
- Leskiw, B.K., Mevarech, M., Barritt, L.S., Jensen, S.E., Herderson, D.J., Hopwood, D.A., Brutton, C.J., Chater, K.F.** (1990). Discovery of an insertion sequence, *IS116*, from *Streptomyces clavuligerus* and its relatedness to other transposable elements from actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1251-1258.
- Lesley, S.A., Burgess, R.R.** (1989). Characterization of the *Escherichia coli* transcription factor ⁷⁰: localization of a region involved in the interaction with core RNA polymerase. *Biochemistry* **28**: 7728-7734.
- Li, Y., Dosch, D.C., Strohl, W.R., Floss, H.G.** (1990). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the nosiheptide-resistance gene from *Streptomyces actuosus*. *Gene* **91**: 9-17.
- Li, J., Horwitz, R., McCracken, S., Greenblatt, J.** (1992). NusG, a new *Escherichia coli* elongation factor involved in transcriptional antitermination by the N protein of phage λ . *J. Biol. Chem.* **267**: 6012-6019.
- Lichenstein, H.S., Busse, L.A., Smith, G.A., Narhi, L.O., McGinley, M.O., Rohde, M.F., Katzowitz, J.L., Zukowski, M.M.** (1992). Cloning and characterization of a gene encoding extracellular metalloprotease from *Streptomyces lividans*. *Gene* **111**: 125-130.
- Lin, Y.S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., Chen, C.W.** (1993). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.* **10**: 923-933. *Corrigendum* **14**: 1103-1105.

- Lisityn, N.A., Monastyrskaya, G.A., Sverdlov, E.D.** (1988). Genes coding for RNA polymerase σ subunit: structure/function analysis. *Eur. J. Biochem.* **177**: 363-369.
- Locci, R., Sharples, G.P.** (1983). Morphology. En: *The Biology of Actinomycetes* (Goodfellow, M., Mordarski, M., Williams, S.T., eds.). London: Academic, Londres. pp. 165-199.
- Lombardo, M.S., Bagga, D., Miller, C.G.** (1991). Mutations in *rpoA* affect expression of anaerobically regulated genes in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **173**: 7511-7518.
- Lonetto, M., Grisbikov, M., Gross, C.A.** (1992). The σ^{70} family: Sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* **174**: 3843-3849.
- Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.E., Buttner, M.J.** (1994). Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7573-7577.
- Losick, R., Pero, J.** (1981). Cascades of sigma factors. *Cell* **25**:582-584.
- Luttinger, A.** (1995). The twisted "life" of DNA in the cell: bacterial topoisomerases. *Mol. Microbiol.* **15**: 601-606.
- Lydiate, D.J., Ikeda, H., Hopwood, D.A.** (1986). A 2.6 kb DNA sequence of *Streptomyces coelicolor* A3(2) which functions as a transposable element. *Mol. Gen. Genet.* **201**: 79-88.
- Ma, H., Kendall, K.J.** (1993). Cloning and analysis of a gene cluster from *Streptomyces coelicolor* that causes accelerated aerial micelium formation in *Streptomyces lividans*. *GenBank*, Accession number U03771.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kimura, K., Nakata, A.** (1988). Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*. Activation of *pstS* transcription by PhoB protein *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **203**: 85-95.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M., Nakata, A.** (1989). Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J. Mol. Biol.* **210**: 551-559.
- Makino, K., Amemura, M., Kim, S.K., Nakata, A., Shinagawa, H.** (1993). Role of the σ^{70} subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. *Genes & Dev.* **7**: 149-160.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.** (1982). Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Marcos, A.T., Gutiérrez, S., Díez, B., Fernández, F.J., Oguiza, J.A., Martín, J.F.** (1995). Three genes *hrdB*, *hrdD* and *hrdT* of *Streptomyces griseus* IMRU 3570, encoding sigma factor-like proteins, are differentially expressed under specific nutritional conditions. *Gene* **153**: 41-48.
- Margolis, P., Driks, A., Losick, R.** (1991). Establishment of cell type by compartmentalized activation of a transcription factor. *Science* **254**: 562-565.
- Martín, J.F., McDaniel, L.E.** (1976). Biosynthesis of candidicin by phosphate-limited resting cells of *Streptomyces griseus*. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **3**: 135-144.
- Martín, J.F.** (1989). Molecular mechanisms for the control by phosphate of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. En: *Regulation of Secondary Metabolism in Streptomyces* (Shapiro, S., ed.). CRC Press, Florida. pp. 213-237.
- Martín, J.F., Liras, P.** (1989) Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Ann. Rev. Microbiol.* **43**: 173-206.

- Martín, J.F., Marcos, A.T., Martín, A., Asturias, J.A., Liras, P.** (1994). Phosphate control of antibiotic biosynthesis at the transcriptional level. En: Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology (Torriani-Gorini, A., Yagil, E., Silver, S., eds). ASM Press, Washington, D.C. pp 140-147.
- Matsumoto, A., Hong, S.K., Ishizuka, H., Horinouchi, S., Beppu, T.** (1994). Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. *Gene* **146**: 47-56.
- Méndez, C., Braña, A.F., Manzanal, M.B., Hardisson, C.** (1985). Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can. J. Microbiol.* **31**: 446-450.
- Merrick, M.J.** (1976). A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **96**: 299-315.
- Merrill, B.M., Williams, K.R., Chase, J.W., Konigsberg, W.H.** (1984). Photochemical cross-linking of the *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein to oligodeoxynucleotides. *J. Biol. Chem.* **259**: 10850-10856.
- Miller, J.H.** (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Min, K.T., Hilditch, C.M., Diederich, B., Errington, J., Yudkin, M.D.** (1993). σ^F , the first compartment-specific transcription factor of *B. subtilis*, is regulated by an anti- σ factor that is also a protein kinase. *Cell* **74**:735-742.
- Minchin, S., Busby, S.** (1993). Location of close contacts between *Escherichia coli* RNA polymerase and guanine residues at promoters either with or without consensus -35 region sequences. *Biochem. J.* **289**: 771-775.
- Miyake, K., Kuzuyama, T., Horinouchi, S., Beppu, T.** (1990). The A-factor-binding protein of *Streptomyces griseus* negatively controls streptomycin production and sporulation. *J. Bacteriol.* **172**: 3003-3008.
- Miyoshi, Y.K., Ogata, S., Hayashida, S.** (1986). Multicopy derivative of pock-forming plasmid pSA1 in *Streptomyces azureus*. *J. Bacteriol.* **168**: 452-454.
- Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Gellert, M.** (1978). DNA gyrase: subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **75**: 5960-5963.
- Moran, C.P. Jr., Lang, N., LeGrice, S.F.J., Lee, G., Stephens, M., Sonenshein, A.L., Pero, J., Losick, R.** (1982). Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **186**: 339-346.
- Morett, E., Segovia, L.** (1993). The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: Mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains (Minireview). *J. Bacteriol.* **175**: 6067-6074.
- Murray, N.E., Brammer, W.J., Murray, K.** (1977). Lamboid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.* **205**:42.
- Nakamura, Y., Yura, T.** (1973). Localization of the structural gene for the σ subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **53**: 645-652.
- Narva, K.E., Feitelson, J.S.** (1990). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *redD* locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **172**: 326-333.
- Nomura, M., Morgan, E.A., Jaskunas, S.R.** (1977). Genetics of bacterial ribosomes. *Ann. Rev. Genet.* **11**: 297-347.
- Nudler, E., Goldfarb, A., Kashlev, M.** (1994). Discontinuous mechanism of transcription elongation. *Science* **265**: 793-796.

- Nudler, E., Kashlev, M., Nikiforov, V., Goldfarb, A.** (1995). Coupling between transcription termination and RNA polymerase inchworming. *Cell* **81**: 351-357.
- Oguiza, J.A., Marcos, A.T., Malumbres, M., Martín, J.F.** (1996). Multiple sigma factor genes in *Brevibacterium lactofermentum*: Characterization of *sigA* and *sigB*. *J. Bacteriol.* (en prensa).
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H., Iino, T.** (1990). Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 139-147.
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H., Iino, T.** (1992). A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an anti-sigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, σ^F . *Mol. Microbiol.* **6**: 3149-3157.
- Okamoto, S., Nihira, T., Kataoka, H., Suzuki, A., Yamada, Y.** (1992). Purification and molecular cloning of a butyrolactone autoregulator receptor from *Streptomyces virginiae*. *J. Biol. Chem.* **267**: 1093-1098.
- Olano, C., Rodríguez, A.M., Méndez, C., Salas, J.A.** (1995). A second ABC transporter is involved in oleandomycin resistance and its secretion by *Streptomyces antibioticus*. *Mol. Microbiol.* **16**: 333-343.
- Orsini, G., Ouhammouch, M., Le Caer, J.P., Brody, E.N.** (1993). The *asiA* gene of bacteriophage T4 codes for the Anti- σ^{70} protein. *J. Bacteriol.* **175**: 85-93.
- Ovchinnicov, Y.A., Monastyrskaya, G.S., Guriev, S.O., Kalinina, N.F., Sverdlov, E.D., Gragerow, I.A., Bass, I.A., Kiver, I.F., Moiseyeva, E.P., Igumnov, V.N., Mindlin, S.Z., Nikiforov, V.G., Khesin, R.B.** (1983). RNA polymerase rifampicin resistance mutations in *Escherichia coli*: sequence changes and dominance. *Mol. Gen. Genet.* **190**: 344-347.
- Parro, V., Mellado, R.P.** (1990). Heterologous control of procaryotic gene expression. En: Proceedings of the 3rd Spanish Congress of Biotechnology, Murcia. pp. 3-8.
- Parro, V., Hopwood, D.A., Malpartida, F., Mellado, R.P.** (1991). Transcription of genes involved in the earliest steps of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Nucl. Acids Res.* **19**: 2623-2627.
- Parro, V., Mellado, R.P.** (1993). Heterologous recognition *in vivo* of promoter sequences from the *Streptomyces coelicolor* *dagA* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**: 347-356.
- Partridge, S.R., Foulger, D., Errington, J.** (1991). The role of σ^F in prespore-specific transcription in *B. subtilis*. *Mol. Microbiol.* **5**: 757-767.
- Pearlman, D., Halvorson, H.O.** (1983). A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J. Mol. Biol.* **167**: 391-409.
- Petricek, M., Stajner, K., Felsberg, J., Rysavy, P., Spizek, J., Tichy, P.** (1988). Transcription promoted by different promoters of a *Streptomyces* plasmid pSLG3. En: Abstracts of the Symposium of Overproduction of Microbial Products. Checoslovaquia. p. 143.
- Platt, T.** (1986). Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 339-372.
- Polman, J.K., Larkin, J.M.** (1989). Purification of DNA from agarose gels. *Biotechnol. Tech.* **3**: 329-332.
- Potuckova, L., Kelemen, G.H., Findlay, K.C., Lonetto, M.A., Buttner, M.J., Kormanec, J.** (1995). A new RNA polymerase sigma factor, σ^F , is required for the late stages of morphological differentiation in *Streptomyces* spp. *Mol. Microbiol.* **17**: 37-48.

- Predich, M., Doukhan, L., Nair, G., Smith, I.** (1995). Characterization of RNA polymerase and two sigma-factor genes from *Mycogacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **15**: 355-366.
- Pulido, D., Jimenez, A., Salas, M., Mellado, R.P.** (1987). A *Bacillus subtilis* phage 29 transcription terminator is efficiently recognized in *Streptomyces lividans*. *Gene* **56**: 277-282.
- Puttikhunt, C., Okamoto, S., Nakamura, T., Nihira, T., Yamada, Y.** (1993). Distribution in genus *Streptomyces* of a homolog to *nusG*, a gene encoding a transcriptional antiterminator. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**: 243-248.
- Puttikhunt, C., Nihira, T., Yamada, Y.** (1995). Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis of the *nusG* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2), which encodes a putative transcriptional antiterminator. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 118-122.
- Raibaud, C., Schwartz, M.** (1984). Positive control of transcription initiation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* **18**: 187-206.
- Raibaud, A., Zalacain, M., Holt, T.G., Tizard, R., Thompson, C.J.** (1991). Nucleotide sequence analysis reveals linked N-acetyl hydrolase, thioesterase, transport, and regulatory genes encoded by the bialaphos biosynthetic gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Bacteriol.* **173**: 4454-4463.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J.** (1994). Families of serine peptidases. *Methods in Enzymology* **244**: 19-60.
- Ray, T., Weaden, J., Dyson, P.** (1992). Tris-dependent site-specific cleavage of *Streptomyces lividans* DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**: 247-252.
- Redenbach, M., Flett, F., Piendl, W., Glocker, I., Rauland, U., Wafzig, O., Kliem, R., Leblond, P., Cullum, J.** (1993). The *Streptomyces lividans* 66 chromosome contains a 1 Mb deletogenic region flanked by two amplifiable regions. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 255-262.
- Retzlaff, I., Mayer, G., Beyer, S., Ahlert, J., Werseck, S., Distler, J., Piepersberg, W.** (1993). Streptomycin production in streptomycetes: a progress report. En: Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms. (Baltz, R.H., Hegeman, G., Skatrud, P.L., eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Reznikoff, W.S., Siegele, D.A., Cowing, D.W., Gross, C.A.** (1985). The regulation of transcription initiation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.* **19**: 355-387.
- Romero, N.M., Parro, V., Malpartida, F., Mellado, R.P.** (1992). Heterologous activation of the actinorhodin biosynthetic pathway in *Streptomyces lividans*. *Nucl. Acids Res.* **20**: 2767-2772.
- Ross, W., Gosink, K.K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K., Gourse, R.L.** (1993). A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the subunit of RNA polymerase. *Science* **262**: 1407-1413.
- Russo, F., Silhavy, T.** (1992). Alpha: the cinderella subunit of RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **267**: 14515-14518.
- Saier, M.H., Wu, L-F., Reizer, J.** (1990). Regulation of bacterial physiological processes by three types of protein phosphorylating systems. *TIBS* **15**: 391-395.
- Salas, M.** (1988). Phages with protein attached to the DNA ends. En: *The Bacteriophages* (Calendar, R., ed.). Plenum Press, N.Y. Vol. 1, pp.169-191.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulston, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sasse-Dwight, S., Gralla, J.D.** (1990). Role of eukaryotic-type domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor⁵⁴. *Cell* **62**: 945-950.
- Sauer, U., Treuner, A., Buchholz, M., Santangelo, J.D., Durre, P.** (1994). Sporulation and primary sigma factor homologous genes in *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **176**: 6572-6582.
- Schinkel, A.H., Smit, J.J.M., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A.A.M., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., Le Riele, H.R.J., Berns, A.J.M., Borst, P.** (1994). Disruption of the mouse *mdr1* a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* **77**:491-502.
- Schmidt, M.C., Chamberlin, M.J.** (1984). Amplification and isolation of *E. coli nusA* protein and studies of its effects on *in vitro* RNA chain elongation. *Biochemistry* **23**: 197-203.
- Schmidt, M.C., Chamberlin, M.J.** (1987). NusA protein of *Escherichia coli* is an efficient transcription termination factor for certain terminator sites. *J. Mol. Biol.* **195**: 809-818.
- Sedlmeier, R., Altenbuchner, J.** (1992). Cloning and DNA sequence analysis of the mercury resistance genes of *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* **236**: 76-85.
- Seki, T., Yoshikawa, H., Takahashi, H., Saito, H.** (1987). Cloning and nucleotide sequence of *phoP*, the regulatory gene for alkaline phosphatase and phosphodiesterase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 2913-2916.
- Seki, T., Yoshikawa, H., Takahashi, H., Saito, H.** (1988). Nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis phoR* gene. *J. Bacteriol.* **170**: 5935-5938.
- Seno, E.T., Baltz, R.H.** (1989). Structural organization and regulation of antibiotic biosynthesis and resistance in actinomycetes. En: Regulation of secondary metabolism in actinomycetes (Shapiro S., ed). CRC Press, Gran Bretaña. pp. 1-48.
- Severinov, K., Kashlev, M., Severinova, E., Bass, I., McWilliams, K., Nikiforov, V., Snyder, L., Goldfarb, A.** (1994). A non-essential domain of *Escherichia coli* RNA polymerase required for the action of the termination factor Alc. *J. Biol. Chem.* **269**: 14254-14259.
- Severinov, K., Mustaev, A., Severinova, E., Bass, I., Kashlev, M., Landick, R., Nikiforov, V., Goldfarb, A., Darst, S.A.** (1995). Assembly of functional *Escherichia coli* RNA polymerase containing subunit fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4591-4595.
- Shapiro, S.** (1989). Nitrogen assimilation in actinomycetes and the influence of nitrogen nutrition on actinomycete secondary metabolism. En: Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes (Shapiro, S., ed.). CRC Press, Gran Bretaña. pp. 149-153.
- Shiina, T., Tanaka, K., Takahashi, H.** (1991). Sequence of *hrdB*, an essential gene encoding sigma-like transcription factor of *Streptomyces coelicolor* A3(2): homology to principal sigma factors. *Gene* **107**: 145-148.
- Shorenstein, R.G., Losick, R.** (1973). Purification and properties of the sigma subunit of ribonucleic acid polymerase from vegetative *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **248**: 6163-6169.
- Sidhu, S.S., Kalmar, G.B., Willis, L.G., Borgford, T.J.** (1995). Protease evolution in *Streptomyces griseus*. *J. Biol. Chem.* **270**: 7594-7600.
- Siegele, D.A., Hu, J.C., Walter, W.A., Gross, C.A.** (1989). Altered promoter recognition by mutant forms of the⁷⁰ subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **206**: 591-603.
- Silen, J.L., Agard, D.A.** (1989). The -lytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain *in vivo*. *Nature* **341**: 462-464.

- Simúth, J., Sternbach, H., Zelinka, J., Chomutov, R.M., Nedospasov, A.A.** (1987). DNA-dependent RNA polymerase from the chlorotetracycline producing strain of *Streptomyces aureofaciens*. *FEBS Lett.* **218**: 163-166.
- Slauch, J.M., Russo, F.D., Silhavy, T.J.** (1991). Suppressor mutations in *rpoA* suggest that OmpR controls transcription by direct interaction with the σ subunit of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **173**: 7501-7510.
- Smith, C.P., Chater, K.F.** (1987). Physiology, genetics and molecular biology of glycerol utilization in *Streptomyces coelicolor*. En: Genetics of Industrial Microorganisms (Alacevic, M., Hrameli, D. and Toman, Z. eds.). Pliva, Zagreb. Parte B, pp. 7-15.
- Solenberg, P., Burgett, S.G.** (1989). Method for selection of transposable DNA and characterization of a new insertion sequence, IS493, from *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **171**: 4807-4813.
- Soliveri, J., Vijgenboom, E., Granozzi, C., Plaskitt, K.A., Chater, K.F.** (1993). Functional and evolutionary implications of a survey of various actinomycetes for homologues of two *Streptomyces coelicolor* sporulation genes. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2569-2578.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Starnbach, M.N., Lory, S.** (1992). The *fliA* (*rpoF*) gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an alternative sigma factor required for flagellin synthesis. *Mol. Microbiol.* **6**: 459-469.
- Stein, D., Cohen, S.** (1989). A cloned regulatory gene of *Streptomyces lividans* can suppress the pigment deficiency phenotype of different developmental mutants. *J. Bacteriol.* **171**: 2258-2261.
- Strohl, W.R.** (1992). Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucl. Acids Res.* **20**: 961-974.
- Stutzman-Engwall, K.J., Otten, S.L., Hutchinson, C.R.** (1992). Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* spp. and overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius*. *J. Bacteriol.* **174**: 144-154.
- Sunshine, M. and Sauer, B.** (1975). A bacterial mutation blocking P2 late gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 2770-2774.
- Sweetser, D., Nonet, M., Young, R.A.** (1987). Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1192-1196.
- Tabor, S., Richardson, C.C.** (1985). A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 1074-1078.
- Tagushi, S., Nichiyama, K., Kumagai, I., Miura, K.** (1989) Analysis of transcriptional control regions in the *Streptomyces* subtilisin-inhibitor-encoding gene. *Gene* **34**: 279-286.
- Takahashi, H., Tanaka, K., Shiina, T.** (1988). Genetic constituent of *rpoD* gene homologues in *Streptomyces* strains. En: Biology of Actinomycetes 88 (Okami, Y., Beppu, T., Ogawara, H, eds). Japan Scientific Societies Press, Tokio. pp. 58-63.
- Takano, E., Gramajo, H.C., Strauch, E., Andres, N., White, J., Bibb, M.J.** (1992). Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **6**: 2797-2804.
- Tan, H., Chater, K.F.** (1993). Two developmentally controlled promoters of *Streptomyces coelicolor* A3(2) that resemble the major class of motility-related promoters in other bacteria. *J. Bacteriol.* **175**: 933-940.

- Tanaka, k., Shiina, T., Takahashi, H.** (1988). Multiple principle sigma factor homologs in eubacteria: identification of the "rpoD box". *Science* **242**: 1040-1042.
- Tanaka, K., Shiina, T., Takahashi, H.** (1991). Nucleotide sequence of genes *hrdA*, *hrdC*, and *hrdD* from *Streptomyces coelicolor* A3(2) having similarity to *rpoD* genes. *Mol. Gen. Genet.* **229**: 334-340.
- Tatti, K.M., Moran, C.P.** (1984). Promoter recognition by sigma-37 RNA polymerase from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **175**: 285-297.
- Thiara, A.S., Cundliffe, E.** (1993). Expression and analysis of two *gyrB* genes from the novobiocin producer, *Streptomyces sphaeroides*. *Mol. Microbiol.* **8**: 495-506.
- Thompson, C.J., Ward, J.M., Hopwood, D.A.** (1980). DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes for antibiotic-producing species. *Nature* **286**: 525-527.
- Thompson, C.J., Movva, R.N., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., Botterman, J.** (1987). Characterisation of the herbicide gene *bar* from *Streptomyces hygrosopicus*. *EMBO J.* **9**: 2519-2523.
- Thöny, B., Hennecke, H.** (1989). The -24 -12 promoter comes of age. *FEMS Microbiol. Rev.* **63**: 341-358.
- Tjian, R., Pero, J.** (1976). Bacteriophage SP01 regulatory proteins directing late gene transcription *in vitro*. *Nature* **262**: 753-757.
- Tjian, R., Losick, R., Pero, J., Hinnenbush, A.** (1977). Purification and comparative properties of the delta and sigma subunits of RNA polymerase from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **74**: 149-154.
- Tomick, P.K.** (1988). *Streptomyces* cloning: useful recombinant DNA systems and a summation of cloned genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 1465-1471.
- Tomura, T., Kishino, H., Doi, K., Hara, T., Kuhara, S., Ogata, S.** (1993). Sporulation-inhibitory gene in pock-forming plasmid pSA1.1 of *Streptomyces azureus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 438-443.
- Tseng, H.C., Chen, C.W.** (1991). A cloned *ompR*-like gene of *Streptomyces lividans* 66 suppresses defective *melCI*, a putative copper-transfer gene. *Mol. Microbiol.* **5**: 1187-1196.
- Ueda, K., Miyake, K., Horinouchi, S., Beppu, T.** (1993). A gene cluster involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus* encodes proteins similar to the response regulators of two-component regulatory systems and membrane translocators. *J. Bacteriol.* **175**: 2006-2016.
- Urabe, H., Ogawara, H.** (1992). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of activator-regulator proteins for β -lactamase in *Streptomyces cacaoi*. *J. Bacteriol.* **174**: 2834-2842.
- Urabe, H., Ogawara, H.** (1995). Cloning, sequencing and expression of serine/threonine kinase-encoding genes from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **153**: 99-104.
- Usdin, K., Kirby, R.** (1988). Cloning of repeated DNA sequences from *Streptomyces cattleya*. *FEMS Microbiol. Lett.* **50**: 201-205.
- van Wezel, G.P., Buttner, M.J., Vijgenboom, E., Bosch, L., Hopwood, D.A., Kieser, H.M.** (1995). Mapping of genes involved in macromolecular synthesis on the chromosome of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **177**: 473-476.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Britton, R., Geszvain, K., Lupski, J.R.** (1993). Conservation and evolution of the *rpsU-dnaG-rpoD* macromolecular synthesis operon in bacteria. *Mol. Microbiol.* **8**: 343-355.

- Vieira, J., Messing, J.** (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology* **153**: 3-11.
- Vigal, T., Gil, J.A., Daza, A., García-González, M.D., Villadas, P., Martín, J.F.** (1991). Effects of replacement of promoters and modification of the leader peptide region of the *amy* gene of *Streptomyces griseus* on synthesis and secretion of α -amylase by *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* **231**: 88-96.
- Virolle, M.J., Gagnat, J.** (1994). Sequences involved in growth-phase-dependent expression and glucose repression of a *Streptomyces* α -amylase gene. *Microbiol.* **140**: 1059-1067.
- Vögtli, M., Hütter, R.** (1987). Characterization of the hydroxystreptomycin phosphotransferase gene (*sph*) of *Streptomyces glaucescens*: nucleotide sequence and promoter analysis. *Mol. Gen. Genet.* **208**: 195-203.
- Vögtli, M., Chang, P.-C., Cohen, S.N.** (1994). *afsR2*: a previously undetected gene encoding a 63-amino-acid protein that stimulates antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol. Microbiol.* **14**: 643-653.
- von Heijne, G.** (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**: 99-105.
- von Hippel, P.H., Bear, D.G., Morgan, W.D., McSwinger, J.A.** (1984). Protein-nucleic acid interactions in transcription: a molecular analysis. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 389-446.
- Waldburger, C., Gardella, T., Wong, R., Susskind, M.M.** (1990). Changes in conserved region 2 of *Escherichia coli* ⁷⁰ affecting promoter recognition. *J. Mol. Biol.* **215**: 267-276.
- Wang, L.F., Doi, R.H.** (1986). Nucleotide sequence and organization of *Bacillus subtilis* RNA polymerase major sigma operon. *Nucl. Acids Res.* **14**: 4293-4307.
- Wang, J.C., Jacobsen, J.H., Saucier, J.-M.** (1977). Physicochemical studies on interactions between DNA and RNA polymerase. Unwinding of the DNA helix by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* **4**: 1225-1241.
- Wang, D., Meier, T.I., Chan, C.L., Feng, G., Lee, D.N., Landick, R.** (1995). Discontinuous movement of DNA and RNA in RNA polymerase accompany formation of a paused transcription complex. *Cell* **81**: 341-350.
- Weilbaecher, R., Hebron, C., Feng, G.H., Landick, R.** (1994). Termination-altering amino acid substitutions in the σ subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase identify regions involved in RNA chain elongation. *Genes & Dev.* **8**: 2913-2927.
- Westpheling, J., Ranes, M., Losick, R.** (1985). RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor*. *Nature* **313**: 22-27.
- Westpheling, J., Brawner, M.** (1989). Two transcribing activities are involved in expression of the *Streptomyces* galactose operon. *J. Bacteriol.* **171**: 1355-1361.
- Wiggs, J.L., Gilman, M.Z., Chamberlin, M.J.** (1981). Heterogeneity of RNA polymerase in *Bacillus subtilis*: Evidence for an additional factor in vegetative cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 2762-2766.
- Wiley, J., Santamaria, R., Guijarro, J., Geistlich, M., Losick, R.** (1991). Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Cell* **65**: 641-650.
- Wiley, J., Schwedock, J., Losick, R.** (1993). Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Genes & Dev.* **7**: 895-903.

- Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M.H., Sneath, P.H.A., Sackin, M.J.** (1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
- Wohllenben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E., Pühler, A.** (1988). Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* **70**: 25-37.
- Wong, H.C., Ting, Y., Lin, H.C., Reichert, F., Myambo, K., Watt, K., Toy, P.L., Drummond, R.J.** (1991). Genetic organization and regulation of the xylose degradation genes in *Streptomyces rubiginosus*. *J. Bacteriol.* **173**: 6849-6858.
- Wray, L.V., Fisher, S.H.** (1993). The *Streptomyces coelicolor glnR* gene encodes a protein similar to other bacterial response regulators. *Gene* **130**: 145-150.
- Wu, P.C., Srinivasan, K.V., Kendrick, K.E.** (1995). Regulated expression of the histidase structural gene in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **177**: 854-857.
- Wu, X., Roy, K.L.** (1993). Complete nucleotide sequence of a linear plasmid from *Streptomyces clavuligerus* and characterization of its RNA transcripts. *J. Bacteriol.* **175**: 32-52.
- Xie, W.Q., Jäger, K., Potts, M.** (1989). Cyanobacterial RNA polymerase genes *rpoC1* and *rpoC2* correspond to *rpoC* of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 1967-1973.
- Yu, T-W., Chen, C.W.** (1993). The unstable *melC* operon of *Streptomyces antibioticus* is codeleted with a Tn4811-homologous locus. *J. Bacteriol.* **175**: 1847-1852.
- Yura, T., Ishihama, A.** (1979). Genetics of bacterial RNA polymerase. *Ann. Rev. Genet.* **13**: 59-97.
- Zakrzewska-Czerwinska, J., Schrempf, H.** (1992). Characterization of an autonomously replicating region from the *Streptomyces lividans* chromosome. *J. Bacteriol.* **147**: 2688-2693.
- Zhang, Y., Hanna, M.M.** (1994). NusA Changes the conformation of *Escherichia coli* RNA polymerase at the binding site for the 3' end of the nascent RNA. *J. Bacteriol.* **176**: 1787-1789.
- Zhou, Y., Merkel, T.J., Ebright, R.H.** (1994). Characterization of the activation region of *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP) II. Role at class I and class II CAP-dependent promoters. *J. Mol. Biol.* **243**: 603-610.
- Zimmer, S.G., Millette, R.L.** (1975). DNA-dependent RNA polymerase from *Pseudomonas* BAL-31. I. Purification and properties of the enzyme. *Biochemistry* **14**: 290-299.
- Zou, C., Fujita, N., Igarashi, K., Ishihama, A.** (1992). Mapping the cAMP receptor protein contact site on the β subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Mol Microbiol.* **6**: 2599-2605.
- Zuber, P., Healy, J., Carter, H.L., Cutting, S., Moran, C.P.Jr., Losick, R.** (1989). Mutation changing the specificity of an RNA Polymerase sigma factor. *J. Mol. Biol.* **206**: 605-614.