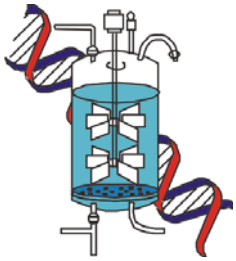
Universidad de León
Departamento de Biología molecular

INBIOTEC
Instituto de Biotecnología de León



Control por fosfato en la biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus en dos especies del género *Streptomyces*

MIRIAM MARTÍNEZ CASTRO

LEÓN 2011

Universidad de León

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

El Dr. D. **JUAN FRANCISCO MARTÍN MARTÍN** como Director[1], y el Dr. D. **CARLOS BARREIRO MÉNDEZ** como co-director de la Tesis Doctoral titulada **"Control por fosfato de la biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus en dos especies del género *Streptomyces*"** realizada por Dña. **MIRIAM MARTÍNEZ CASTRO** en el Departamento de **BIOLOGIA MOLECULAR**, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 9 de DICIEMBRE de 2010

Dr. Juan Francisco Martín

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR UNIVERSIDAD DE LEÓN

Dr. Carlos Barreiro Méndez

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

Universidad de León

ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)

El Departamento de **BIOLOGÍA MOLECULAR** en su reunión celebrada el día 14 de Diciembre de 2010 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada "**Control por fosfato de la biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus en dos especies del género *Streptomyces***", dirigida por el Dr. D. JUAN **FRANCISCO MARTÍN MARTÍN** y el Dr. D. **CARLOS BARREIRO MENDÉZ**, elaborada por Dña. MIRIAM MARTÍNEZ CASTRO.y cuyo título en inglés es el siguiente "**Phosphate control of the immunosuppressant tacrolimus biosynthesis in two species of *Streptomyces* genus**".

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 14 de Diciembre de 2010.

El Secretario,

Fdo.: Carlos Polanco de la Puente

Vº Bº
El Director del Departamento,

Fdo.: Arsenio Fernández López

A mis padres

Agradecimientos

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la ayuda, apoyo y ánimo que he recibido de muchas personas. El mundo de la ciencia es un mundo fascinante pero en ocasiones muy duro, momentos que se quedan en el olvido gracias al cariño que he sentido por muchos de los que me rodean.

A Juan Francisco Martín, Director de esta Tesis, por haber confiado en mí al darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección.

A Carlos Barreiro, Co-director de esta Tesis y compañero, por todas tus enseñanzas y consejos pero sobre todo por la paciencia en los momentos de incertidumbre y desanimo. Gracias por enseñarme a poner en todo lo que hago un cuidado exquisito.

Al Ministerio de Educación por haberme otorgado una beca predoctoral, así como la financiación para la realización de estancias en el extranjero y a la Universidad de León por ofrecerme el apoyo administrativo y de diversos recursos para la consecución de este trabajo.

A todos los compañeros de Inbiotec por crear un ambiente de trabajo cálido; en general, siempre he recibido buenas palabras y disposición cuando he requerido ayuda o colaboración. En especial quiero dar las gracias a todas las personas que han pasado por mi "cuarto" con las que he compartido el trabajo del día a día codo con codo.

A Antonio por la paciencia y amabilidad con las que me escuchas y aconsejas cada vez que tengo dudas sobre el complejo mundo de los Streptomicetos. A Ramiro y a José, por socorrerme en los momentos de colapso informático. A Elena, compañera de viaje en algún que otro congreso y a Javi, que me procuró medio de transporte y "culturizantes" conversaciones para la vuelta a casa durante muchos fines de semana. A los compañeros de descansos Silvia, Carlos P, Pedro y otros por ayudarme a desconectar; que bien vienen esos momentos para enfrentarse de nuevo al trabajo. A Rosma y a Patricia, por esa sonrisa cada vez que les llevaba unas muestras a secuenciar. A Claudia, Susi y Maite por sus consejos y conversaciones en las campanas o por los pasillos. A Alberto, Alma, Ana, Carlos G, Carmen, Irene, Fernando T, Katarina, Mafe, María, Marta, Nuria, Ricardo, Rosma, Rubén, Saeed, Tamara, Vane-Vane y Zahra por vuestro compañerismo. To my Ljubljana mates and Petko, which made me feel part of its group and showed me another way of working with *Streptomyces*.

A Josefina, Berna, Andrea, Bea y Alcira, gracias a su apoyo técnico y administrativo es más fácil sacar el trabajo adelante.

Existen ciertos compañeros más especiales que no sólo me han ayudado a crecer como científica sino también como persona y con los que he tenido el placer de compartir el tiempo tanto dentro como fuera del laboratorio. Además, me han ayudado a descubrir que la ciencia no sólo se hace en el laboratorio sino que, a veces, las ideas más importantes aparecen a lo largo de interesantes conversaciones en los viajes, cenas o a la luz de las farolas.

Thank you Sedef for your kind teachings and advise in my first steps in the *Streptomyces* world. A Mónica y a Carlos, por hacerme sentir como en casa desde el primer día, pero sobre todo por ese saber escuchar y la compañía en los malos momentos. Nunca se me olvidará ese viaje a Valencia. A Inma, Tania, Raúl y Kristian, por todos los momentos que hemos compartido. A pesar de que las circunstancias de la vida nos han deparado destinos diferentes espero que los lazos de amistad, que se forjaron aquí en León, duren para siempre.

A Lorena y Rebe, mis "pequeñas" compañeras del último año, gracias por vuestro cariño y por hacerme olvidar de vez en cuando "que tenía un tesis que escribir". A Fernando, por estar siempre dispuesto a que te bombardeara con miles de preguntas del regulón *pho*. A Alcira, por la simpatía y el humor desbordantes con los que has sabido ganarte a esta burgalesa.

A mi grupo de "cenitas" Abel, Chi, Pili, Rubén y Ruti, por aportarme los momentos de desconexión del mundo científico y otros puntos de vista de ver la vida. Gracias por aceptar que en algunas ocasiones no podía estar porque seguía "encerrada" en el laboratorio.

Y por supuesto, quiero agradecer el apoyo incondicional de mi familia que aunque no entendiesen muy bien que en qué consistía mi trabajo siempre me han proporcionado el aliento y cariño necesarios para seguir adelante. Gracias por estar siempre a mi lado.

A Javi, contar contigo me hace más fuerte para afrontar cualquier reto de la vida. Gracias por tu confianza y ayuda.

Abreviaturas

ADNt ADN total o genómico

ADNasa: desoxirribonucleasa

antibiótico^{R}: resistente a un determinado antibiótico

antibiotico^{S}: sensible a un determinado antibiótico

Apr: apramicina

ARNasa: ribonucleasa

ARNr: ARN riobosomal

ARNt: ARN de transferencia

ARS: Agricultural Research Service

ATCC: *American Type Culture Collection*

AU: unidades de absorbancia

BSA: seroalbúmina bovina

C: unidad de repetición que forma el núcleo de la unión

CIA: Cloroformo-isoamílico Mezclar 24 partes de cloroformo y 1 de alcohol isoamílico.

CoA: coenzima A.

Da: dalton.

ddNTP: didesoxinucleótido trifosfato.

DE: dominio efector de un regulador

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato.

DO_{600}: densidad óptica a 600 nm de longitud de onda

DR: dominio receptor de un regulador

DRu: unidad de repetición directa (direct repeat unit)

DSMZ: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*

DTT: ditiotreitol

E: unidad de repetición extensión de la unión

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

E_U: unidad de extensión inestable de los operadores de PhoP

E_S: unidad de extensión de soporte de los operadores de PhoP

GST: glutatión-S-transferasa

HPLC Cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*).

kb: kilobase

Kn: kanamicina

M: molar.

MOPS: ácido 3-(N-morfolino)propanesulfonico]

MTBE: metilterbutileter

nm: nanómetro

nt: nucleótido

pb: pares de bases

Pi: fosfato inorgánico

rpm: revoluciones por minuto

SDS: docedil sulfato sódico

TFA: ácido trifluoro acético

Tris: tris-hidroximetil-aminometano.

U: unidades

UFC: unidades formadoras de colonias

UV: luz ultravioleta

WT: fenotipo salvaje (wild type).

1. Introducción 1

1.1. Sistemática del género *Streptomyces* 3
1.1.1. Descubrimiento de los Actinomicetos....3
1.1.2. Taxonomía del género *Streptomyces*....4
1.1.3. Posición actual del género *Streptomyces* en el Orden de los Actinomycetales 7
1.2. Características del género *Streptomyces* 9
1.2.1. Ciclo de vida....9
1.2.2. Particularidades genéticas....12
1.2.3. Metabolismo secundario y su regulación....15
1.3. Control por fosfato en el género *Streptomyces*....24
1.3.1. El sistema de dos componentes PhoR-PhoP....25
1.3.2. PhoB/P el regulador de respuesta....30
1.3.3. El regulón *pho*....36
1.4. Tacrolimus....43
1.4.1. Inmunosupresores....43
1.4.2. Mecanismo de acción de los inmunosupresores....45
1.4.3. Biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus....46
1.4.4. Agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus....49
1.4.5. Especies del género *Streptomyces* productoras de inmunosupresores....51
1.5. Objetivos....53

2. Materiales y métodos 55

2.1. Microorganismos utilizados....57
2.1.1. Cepas de *Escherichia coli*....57
2.1.2. Especies pertenecientes al género *Streptomyces*....58
2.1.3. Otros microorganismos....58
2.1.4. Crecimiento y conservación de los microorganismos....59
2.2. Medios de cultivo....60
2.2.1. Medios de cultivo para *E. coli*....60
2.2.2. Medios de cultivo para *Streptomyces* spp.....61
2.2.3. Medios propios de los estudios de taxonomía de *Streptomyces*....62
2.2.4. Otros medios....65
2.2.5. Aditivos de los medios de cultivo....65
2.3. Equipamiento....66
2.3.1. Centrífugas....66
2.3.2. Arcones agitadores....66
2.3.3. Equipos HPLC....67

2.3.4. Espectrofotómetros....67
2.4. Vectores plasmídicos....67
2.5. Productos específicos para Biología Molecular....69
2.5.1. Enzimas....69
2.5.2. Marcadores de peso molecular....70
2.5.3. Oligonucleótidos....70
2.5.4. Conjunto de reactivos comerciales....74
2.6. Análisis informático....74
2.7. Extracción de ADN....75
2.7.1. Limpieza y precipitación del ADN....75
2.7.2. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*....76
2.7.3. Aislamiento de ADN total de *Streptomyces* spp. 79
2.8. Extracción de ADN de geles de agarosa....81
2.8.1. Método de congelación rápido (Freeze-squeeze)....81
2.8.2. Extracción mediante *QIAEX® II Gel Extraction Kit* 81
2.8.3. Extracción mediante *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* 83
2.9. Cuantificación y análisis de pureza de ácidos nucleicos....84
2.10. Tratamiento enzimático del ADN....84
2.10.1. Hidrólisis con endonucleasas de restricción....84
2.10.2. Desfosforilación de los extremos 5´ libres del ADN 85
2.10.3. Modificación enzimática de los extremos....85
2.10.4. Ligación de fragmentos de ADN 86
2.11. Electroforesis de ADN en geles de agarosa 87
2.12. Método de hibridación tipo Southern....88
2.12.1. Transferencia de ácidos nucleicos....88
2.12.2. Marcaje de sondas para Southern 90
2.12.3. Hibridación y detección de ADN....91
2.13. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 93
2.13.1. Típica reacción de PCR 94
2.14. Secuenciación de ADN....95
2.15. Transformación de microorganismos 96
2.15.1. Transformación de *E. coli*....96
2.15.2. Conjugación de *Streptomyces* spp. 99
2.16. Procedimientos propios de la caracterización taxonómica 100
2.16.1. Estudios de quimiotaxonomía....100
2.16.2. Determinación del contenido en G+C del genoma 103
2.17. Construcción y amplificación de una genoteca de *Streptomyces* spp. en el vector SuperCos 1 105

2.17.1. Preparación del vector SuperCos 1 106
2.17.2. Preparación del ADN genómico 106
2.17.3. Ligación y empaquetamiento 110
2.17.4. Titulación de la reacción de empaquetamiento 110
2.17.5. Amplificación de la genoteca 111

2.18. Obtención de mutantes mediante REDIRECT© 112
2.18.1. Purificación del molde para la obtención del producto de PCR 113
2.18.2. Diseño de los cebadores para la obtención del producto de PCR 113
2.18.3. Amplificación por PCR del casete de resistencia 114
2.18.4. Transformación de *E. coli* BW25113/pIJ790 con el cósmido de *Streptomyces* que contiene el gen a sustituir 115
2.18.5. Sustitución del gen de interés por el casete de resistencia 115
2.18.6. Transferencia del cósmido recombinante a *Streptomyces* 116

2.19. Análisis de interacciones proteína-ADN 117
2.19.1. Ensayos de retraso de la movilidad electroforética (EMSA) 117
2.19.2. Ensayos de protección de ADN frente a ADNasa I 123

2.20. Valoración del fosfato inorgánico presente en el medio 125

2.21. Análisis de la producción de tacrolimus 126
2.21.1. Tratamiento de las muestras de fermentación 126
2.21.2. Cuantificación de tacrolimus 127

3. Resultados y discusión 129

3.1. Determinación de la posición taxonómica de dos species de *Streptomyces* productoras de tacrolimus 131
3.1.1. Introducción 133
3.1.2. Situación taxonómica de *Streptomyces* sp. ATCC 55098 135
3.1.3. Situación taxonómica de `*S. tsukubaensis*´ NRRL 18488 141
3.1.4. Conclusiones 147

3.2. Construcción y organización de la librería génica de *S. tacrolimicus* y `*S. tsukubaensis*´ en SuperCos 1 149
3.2.1. Introducción 151
3.2.2. Construcción de la librería génica 151
3.2.3. Organización de la librería génica 155
3.2.4. Rastreo de la librería génica 157
3.2.5. Conclusión 160

3.3. Control por fosfato en la biosíntesis de tacrolimus por la especie *S. tacrolimicus* ATCC 55098 161
3.3.1. Introducción 163
3.3.2. El sistema de dos componentes PhoR-P de *S. tacrolimicus* 163
3.3.3. Estudio funcional del sistema PhoR-P de *S. tacrolimicus* 169

3.3.4. Análisis del efecto de la concentración de fosfato en la producción de tacrolimus por la especie *S. tacrolimicus* 178
3.3.5. Estudio de la regulación por PhoP: búsqueda de cajas PHO 184

3.4. Control por fosfato de la biosíntesis de tacrolimus por la especie *`S. tsukubaensis´* 191
3.4.1. Estabilización génica de *`S. tsukubaensis´* 193
3.4.2. Optimización de medios para la producción de tacrolimus por la especie *`S. tsukubaensis´* : influencia de la concentración de fosfato 194
3.4.3. El sistema de dos componentes PhoR-P en *`S. tsukubaensis´* 205
3.4.4. Inactivación del sistema de dos componentes PhoR-P 206
3.4.5. El regulón *pho* en *`S. tsukubaensis´* 215

4. Discusión general 231

4.1. Estudios preliminares de las especies *S. tacrolimicus* y *`S. tsukubaensis´* 233
4.1.1. Especies de *Streptomyces* productoras de tacrolimus 233
4.1.2. Características genéticas de *S. tacrolimicus* y *`S. tsukubaensis´* 234
4.1.3. Desarrollo de herramientas moleculares para el estudio de *S. tacrolimicus* y *`S. tsukubaensis´* 236

4.2. Relación entre la respuesta a la escasez de fosfato y la diferenciación morfológica en *S. tacrolimicus* 237

4.3. El regulón *pho* en el género *Streptomyces* 242

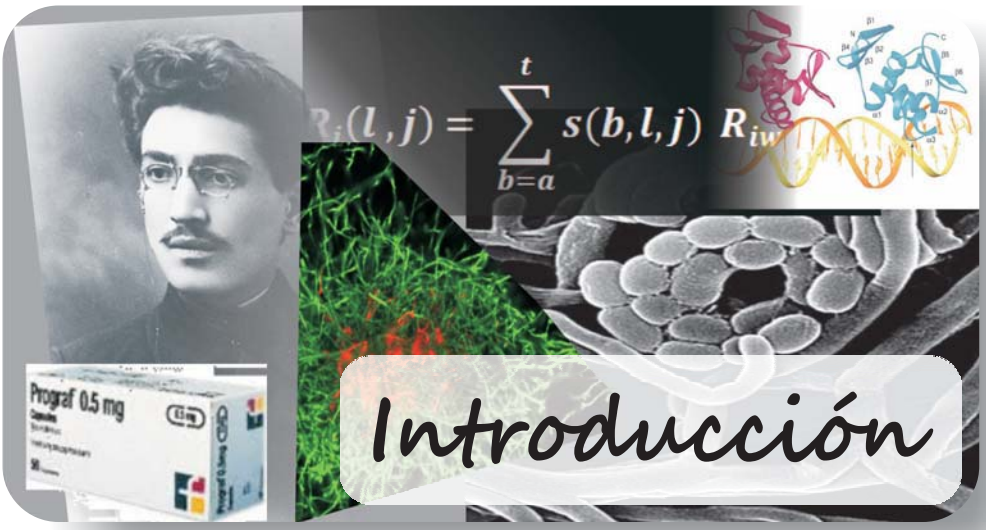
5. Conclusiones 251

6. Bibliografía 255

7. Anexo 281

7.1. Cajas PHO en *Streptomyces* 283

7.2. Publicaciones científicas 295


$R_i(l,j) = \sum_{b=a}^{t} s(b,l,j)\ R_{iw}$
Prograf 0.5 mg
Introducción

1.1. Sistemática del género *Streptomyces*

1.1.1. Descubrimiento de los Actinomicetos

El género *Streptomyces* pertenece al filo de las Actinobacterias, compuesto por bacterias Gram-positivas con alto contenido en G+C (desde valores del 50% de algunas Corinebacterias hasta contenidos mayores al 70% del género *Streptomyces*). Dentro de este filo se incluye el orden de los Actinomycetales, grupo que presenta una alta variabilidad tanto morfológica, como en tamaño del genoma, ecología y patogenicidad. Este grupo incluye microorganismos patógenos de humanos como *Mycobacterium tuberculosis* o *Corynebacterium diphteriae* e importantes productores de antibióticos como el género *Streptomyces*.

En 1943, Selman Waksman y Arthur Henrici desarrollaron un sistema de clasificación de los Actinomicetos con el objetivo de organizar el conocimiento que se tenía de este grupo bacteriano, que hasta el momento era muy confuso. La capacidad para formar **células ramificadas**, se propuso como la **característica principal** que definía al grupo y el **grado de ramificación** sirvió como base para la **división** de los Actinomycetales en tres grupos principales, dos de los cuales se dividían a su vez en otros dos, resultando finalmente cinco géneros (Figura 1.1). El primero denominado ***Mycobacterium*** contenía microorganismos con células de **forma bacilar**; algunas de las cuales presentaban los bordes cortados. En este grupo se incluían los microorganismos causantes de la lepra y la tuberculosis. El siguiente grupo estaba constituido por microorganismos capaces de desarrollar **filamentos ramificados** que con el tiempo se fragmentaban en **células individuales**. Dependiendo de la capacidad para crecer en condiciones anaerobias o aerobias el grupo se dividió en dos géneros, ***Actinomyces* y *Nocardia*** respectivamente. La formación de densas **marañas de hifas interconectadas** que finalmente daban lugar a esporas definía al tercer y último grupo, que a su vez se dividía en dos, ***Streptomyces* y *Micromonospora***. El primer género producía esporas agrupadas en cadenas mientras que las esporas de *Micromonospora* aparecían aisladas unas de otras, como así indica su nombre, "esporas pequeñas e individuales".

Algunos de los nombres que se asignaron a los géneros mencionados reflejan la confusión que existía en la época en cuanto a la naturaleza de los Actinomycetales: ¿Eran hongos o bacterias? La palabra *Mycobaterium* significa "hongo bacteriano" debido a que sus células presentan un diámetro celular típico de bacterias, pero a su vez presenta la capacidad de fragmentarse, característica de los hongos y el nombre de *Streptomyces* se refiere a "hongo enrollado" (Hopwood, 2007). Esta confusión ha llegado hasta nuestros días, ya que en algunos manuales, que no son específicos de microbiología, aún podemos encontrar especies del género *Streptomyces* definidas como hongos (Klintmalm, 1994).

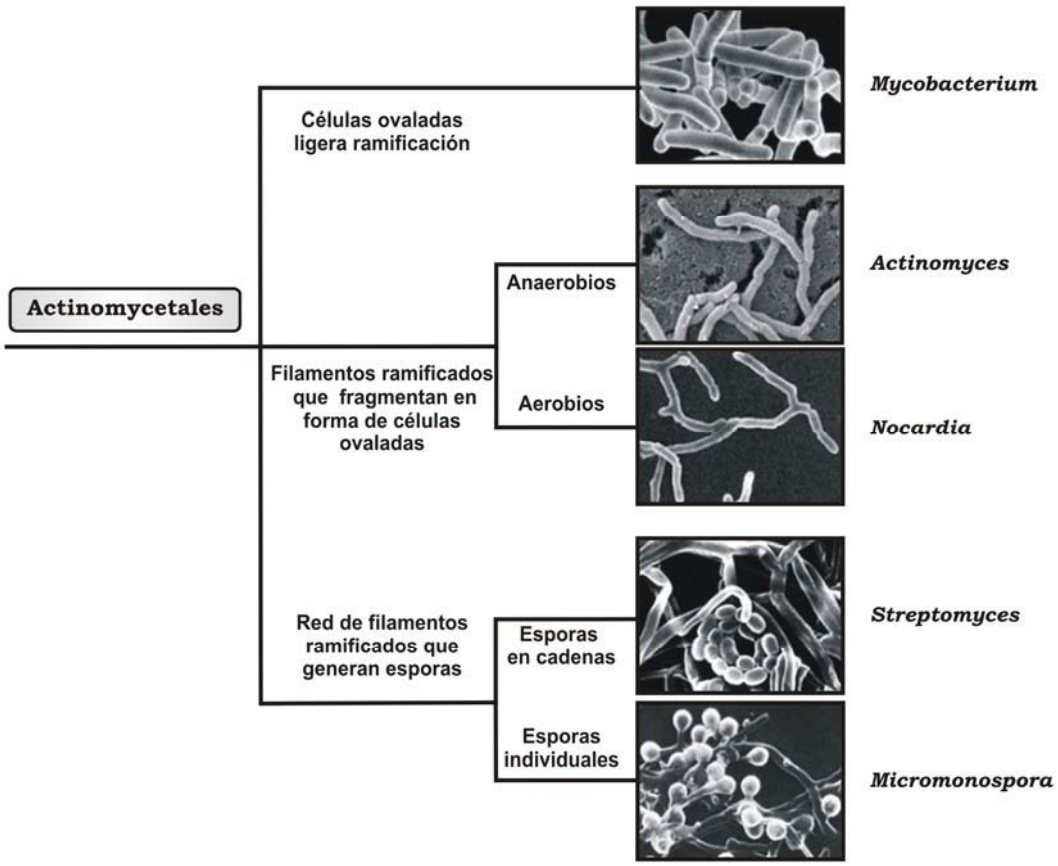


Figura 1.1: Esquema de los géneros que componen el orden de los Actinomycetales. Clasificación de los Actinomycetales según Waksman y Henrici basada en características morfológicas. (Modificado de Hopwood, 2007).

1.1.2. Taxonomía del género *Streptomyces*

El descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming fue el primer hito en la carrera por la búsqueda de sustancias con propiedades antibióticas producidas de manera natural por microorganismos. Debido a la gran efectividad que la penicilina presentaba frente a microorganismos Gram-positivos, Waksman decidió centrar sus esfuerzos en el descubrimiento de sustancias activas contra microorganismos Gram-negativos. En un principio, el grupo de Waksman estudió tres grupos de microorganismos como productores de sustancias con interés clínico: hongos, bacterias y Actinomycetales. Pronto descubrieron que el grupo de los Actinomycetales presentaba un mayor potencial productor y en 1943 llegó el gran hallazgo, la **estreptomicina**. Albert Schatz, integrante del grupo de Waksman, descubrió esta sustancia producida por *Streptomyces griseus*. La estreptomicina, además de ser activa frente a microorganismos Gram-negativos, también era efectiva frente al bacilo causante de la tuberculosis, por lo que seguidamente empezó a producirse de manera industrial (Hopwood, 2007).

La capacidad del género *Streptomyces* para producir antibióticos y metabolitos secundarios de interés clínico atrajo la atención de la comunidad científica sobre este grupo de microorganismos. La investigación llevada a cabo por grupos diferentes y aislados, junto con la necesidad de creación de patentes, desencadenó la aparición de un **gran número de especies** y de sistemas de clasificación (Anderson y Wellington, 2001). Algunas de las características utilizadas para la descripción de las nuevas especies aisladas eran de carácter muy subjetivo. Así, en 1957, Gause y colaboradores dividieron el género *Streptomyces* en 15 grupos basándose en el color del micelio sustrato y aéreo; mientras que en 1958 la clasificación llevada a cabo por Pridham y su grupo supuso la creación de 42 grupos definidos según la morfología de las esporas y el color del micelio aéreo. El propio Waksman, en 1961, clasificó 250 especies del género *Streptomyces* en 16 series usando como criterios el color del micelio sustrato y aéreo, la morfología de las cadenas de esporas, la producción de melanina, etc. En estudios posteriores se introdujeron otras características clasificatorias como propiedades bioquímicas, nutricionales y fisiológicas, pero sólo se aplicaban a determinadas especies.

En medio de este caos de clasificación y sobre-especiación, en 1964 se creó el ***International Streptomyces Project*** **(ISP)** con el objetivo de definir especies tipo del género *Streptomyces* (Shirling y Gottlieb, 1966; Shirling y Gottlieb, 1972). En este trabajo se establecieron métodos y criterios para la determinación de especies tipo y se redefinieron unas 450 especies con la colaboración de más de 40 laboratorios de 18 nacionalidades diferentes. Las nuevas especies se depositaron en cuatro colecciones de cultivo tipo: *American Type Culture Collection* (ATCC) en EEUU; *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS) en Holanda; *Institute for Fermentation, Culture Collection of Microorganism* (IFO) en Japón y *Research Institute for Antibiotics (*RIA) en Rusia. El ISP estableció como métodos de clasificación características morfológicas de las hifas y de las esporas, crecimiento en diferentes medios diseñados específicamente para este proyecto y características fisiológicas como la producción de melanina y asimilación de diferentes fuentes de carbono.

Taxonomía numérica

Los test propuestos por el ISP no fueron definitivos en la taxonomía de *Streptomyces* pero sentaron las bases de futuros sistemas de clasificación. El trabajo de Williams y colaboradores (1983) marcó el inicio en este género de la conocida como taxonomía numérica. Este sistema de clasificación se basaba en un mayor número de criterios fenotípicos los cuales se utilizaban para la construcción de **matrices numéricas** que permitían un análisis matemático y más objetivo de un gran número de cepas y especies. En este trabajo se analizaron 475 especies, las cuales se clasificaron en 19 grandes grupos, 40 grupos menores y 18 especies individuales.

Taxonomía polifásica

La aparición de nuevos métodos de Biología Molecular y el desarrollo de sistemas analíticos mucho más potentes provocó un profundo cambio en la taxonomía numérica. Entre los métodos de Biología Molecular cabe destacar la secuenciación y comparación de la secuencia del **ARNr 16S** que permite determinar relaciones a nivel de género, especie y cepa (Anderson y Wellington, 2001). La determinación de los niveles de hibridación ADN-ADN, el análisis de patrones de restricción (LFRFA, del inglés *Low-Frequency Restriction Fragment Analysis*) y la amplificación al azar de ADN polimórfico son algunas de las técnicas que han influido en la modernización de la taxonomía.

El desarrollo de instrumentación más sensible y rápida ha permitido un mayor conocimiento quimiotaxonómico de las especies del género *Streptomyces*. Así se están utilizando el análisis de la composición en ácidos grasos por cromatografía de gases, el análisis total de la célula por espectrometría de masas en combinación con la pirolisis de punto de Curie (PyMS, del inglés *Curie-point pyrolysis mass spectrometry*) o estudios de perfiles proteómicos obtenidos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. La integración de la **información genotípica, fenotípica y filogenética** constituye lo que hoy se conoce como Taxonomía Polifásica (Vandamme *et al.*, 1996).

La situación taxonómica actual del género *Streptomyces* ha quedado configurada de la siguiente forma (Garrity *et al.*, 2007):

Dominio: Bacteria
Filo: Actinobacteria
Clase: Actinobacteria
Subclase: Actinobacteridae
Orden: Actinomycetales
Suborden: Streptomycineae
Familia: Streptomycetaceae
Género: *Streptomyces*

El género *Streptomyces* es uno de los más numerosos y más estudiados. Hasta el momento se han descrito más de 500 especies y subespecies (Euzéby, 1997) las cuales aparecen reflejadas y se van actualizando en la página web: www.bacterio.cict.fr/s/*Streptomyces*b.html. Continuamente están apareciendo nuevas especies, en los seis primeros meses del año 2010 se han descrito 9 nuevos miembros pertenecientes al género *Streptomyces* como *specie novis*; lo que nos indica que todavía queda mucho por descubrir de este género tan importante.

1.1.3. Posición actual del género *Streptomyces* en el Orden de los Actinomycetales

La mayoría de los estudios taxonómicos realizados a gran escala del grupo de los Actinomycetales están basados en la secuencia del ARNr 16S o de otros genes individuales (Stackebrandt *et al.*, 1997; Chater y Chandra, 2006; Manteca *et al.*, 2006) que presentan ciertas características como: un alto grado de conservación, rara transferencia horizontal y una longitud suficiente para contener abundantes posiciones con información evolutiva.

La comparación de secuencias de macromoléculas conservadas es la base de la taxonomía tradicional de procariotas pero se ha demostrado que las filogenias basadas en la secuencia de una sola molécula no reflejan adecuadamente la relación filogenética debido a posibles eventos de transferencia horizontal de genes, tasas variables de mutación y de recombinación. La aparición de genomas completos ha permitido generar filogenias con mejor resolución y obtener una visión más amplia de la evolución de los distintos grupos bacterianos (Ventura *et al.*, 2007). La secuencia completa del genoma contiene una abundante cantidad de información filogenética por lo que se han desarrollado diferentes estrategias con el objetivo de manipular dicha información para la obtención de arboles filogenéticos. Los **árboles genómicos** se basan en diferentes aspectos del genoma: a) árboles genómicos basados en aspectos estadísticos del genoma; b) árboles de contenido génico basados en la ausencia o presencia de genes; c) árboles genómicos basados en el orden de los genes en el genoma; d) árboles basados en la similitud media de secuencia y e) arboles filogenómicos (Snel *et al.*, 2005).

La aparición de un gran número de genomas completos ha permitido realizar un nuevo estudio filogenético del orden de los Actinomycetales basado en la combinación de filogenias construidas con secuencias de genes individuales y en filogenias basadas en genomas completos (Alam *et al.*, 2010). En la realización de las filogenias basadas en el genomas completo se han utilizado todas las secuencias codificantes de las anotaciones de los genomas de 45 especies de Actinomycetales y 4 especies como grupos externos (*outgroup*). Mediante esta aproximación el árbol consenso obtenido presenta una mejor resolución y robustez que en las filogenias construidas con genes individuales. Las relaciones a nivel de familia son las mismas que las obtenidas en las filogenias construidas con un solo gen pero la metodología que combina secuencias individuales y genomas completos permite una mejor definición de las relaciones a nivel de especie (Figura 1.2).

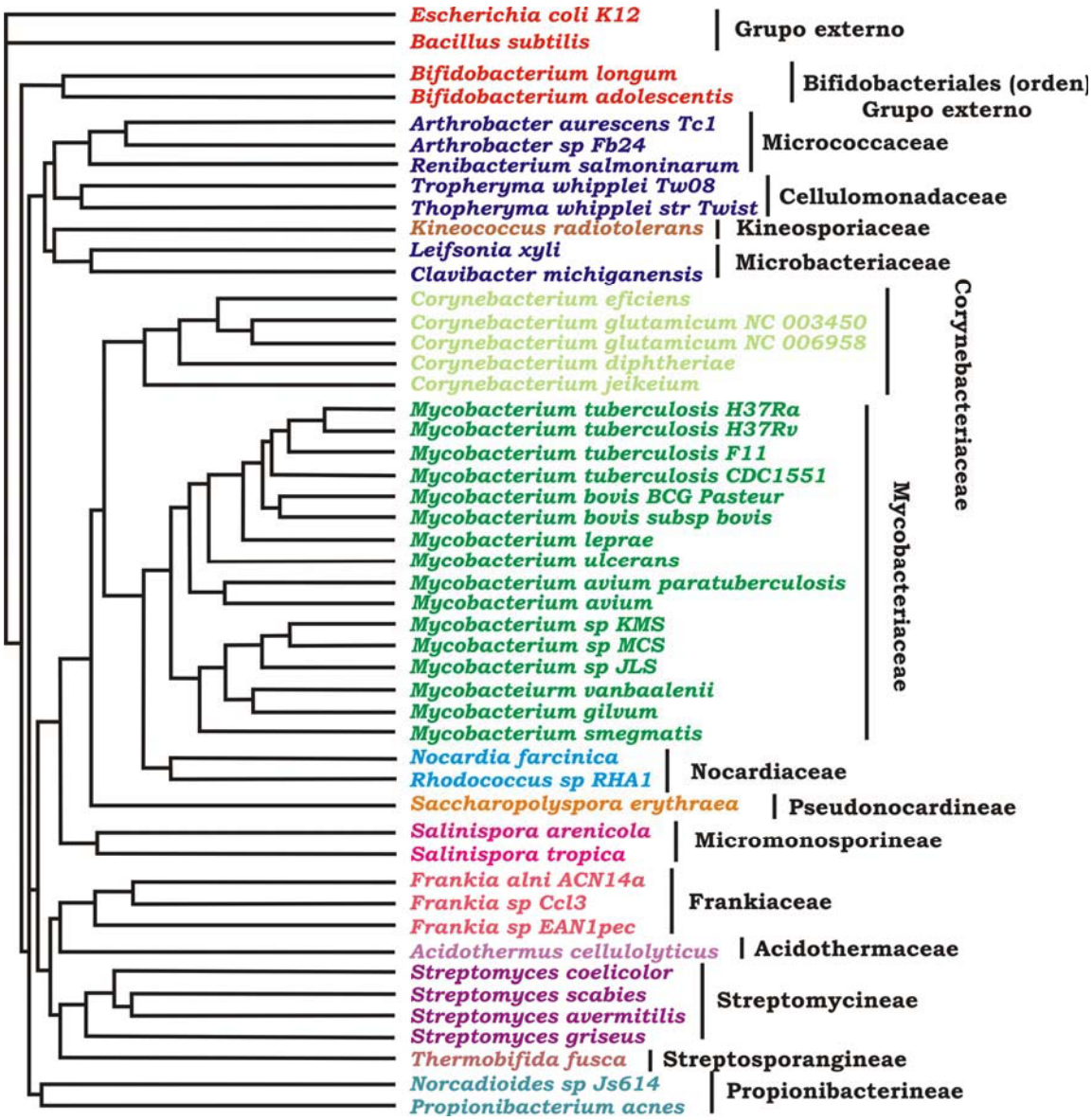


Figura 1.2: Árbol filogenético del orden de los Actinomycetales. Árbol consenso construido a partir de filogenias de genes individuales y de filogenias de genomas completos. A la derecha se marca la familia o el suborden que agrupa a las diferentes especies. (Modificado de Alam *et al.*, 2010).

1.2. Características del género *Streptomyces*

El antecesor de los actuales bacterias del género *Streptomyces* se originó hace 440 millones de años tras la colonización de la tierra por las plantas verdes y un rápido aumento del oxígeno en el atmósfera. Desde entonces, este género ha tenido un importante papel en la evolución del **hábitat del suelo** y sus características biológicas son un reflejo de la adaptación a este medio tan hostil y variable (Chater y Chandra, 2006).

El género *Streptomyces* se compone de bacterias aeróbicas **Gram-positivas** con un **alto contenido en G+C** en su genoma, 72-73 % (Ventura *et al.*, 2007). Una de las principales características de este género es la **complejidad del ciclo de vida** que comprende profundos cambios fisiológicos y morfológicos que culminan en la formación de esporas y biosíntesis de una extensa variedad de metabolitos secundarios. La pared celular de este género es de Tipo I (Lechevalier y Lechavelier, 1970), la cual se caracteriza por la presencia de ácido LL-diaminopimélico y glicina y la ausencia de azucares característicos (galactosa, arabinosa y xilosa).

Las bacterias del género *Streptomyces* son las más numerosas y ubicuas del suelo (Hodgson, 2000), aunque también aparecen, aunque en mucha menor proporción, en otros ambientes, como en el mar asociados a esponjas marinas (Pimentel-Elardo *et al.*, 2010) o en partículas en suspensión en el aire (LLoyd, 1969). Los productos resultantes de la degradación de las plantas son el principal nutriente de este género, por lo que es productor de un gran número de enzimas hidrolíticas extracelulares que le permiten degradar los polímeros insolubles presentes en el suelo. Además son microorganismos capaces de utilizar una gran variedad de componentes orgánicos como fuentes de carbono, incluyendo la quitina, el almidón o la pectina. La temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre los 25ºC y los 35ºC estando su pH óptimo entre 6,5 y 8,0 (Goodfellow, 1989).

1.2.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida que presenta el género *Streptomyces* es complejo (Figura 1.3) y se asemeja al de los hongos filamentosos, ya que ambos crecen formando hifas ramificadas. En una primera fase del crecimiento en medio sólido, la espora germina dando lugar a hifas ramificadas, filamentosas y multinucleadas, el conjunto de éstas constituye el **micelio sustrato**. En respuesta a la falta de nutrientes y otras señales, el micelio sustrato forma **hifas aéreas** rompiendo la tensión superficial y escapando del entorno acuoso. Las hifas aéreas se alargan y la región distal se divide en compartimentos unigenómicos mediante

septos de doble capa, que finalmente acaban constituyendo **esporas** individuales (Hopwood, 2006; Ohnishi *et al.*, 2002).

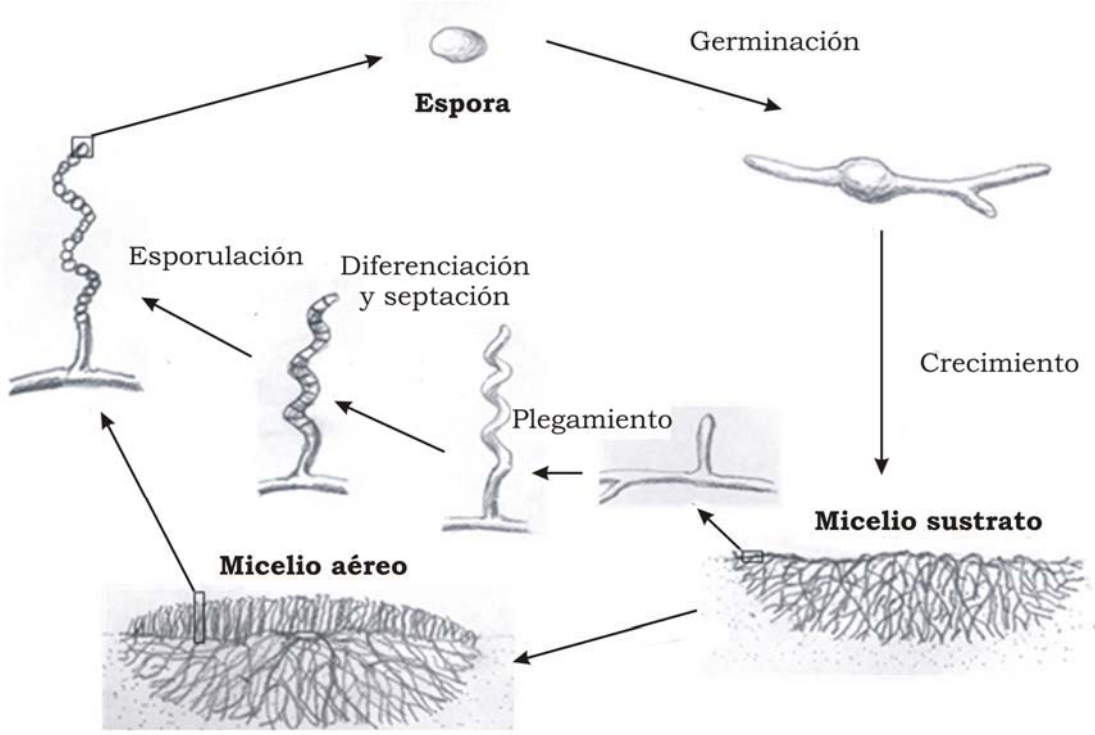


Figura 1.3: Ciclo de vida del género *Streptomyces*. En las fases tempranas de crecimiento se forma una espora que germina para dar lugar al micelio sustrato. En repuesta a limitación de nutrientes y otros factores se forma el micelio aéreo y las hifas que lo forman se segmentan en partes uninucleadas que dan origen a una nueva espora. [Modificado de la Tesis Doctoral de K. Apel, 2010].

La complejidad del ciclo de vida de *Streptomyces* ha colocado a este género como modelo para el estudio de la diferenciación celular en procariotas. Las fases por las que atraviesa el ciclo vital han sido estudiadas en profundidad, principalmente en *Streptomyces coelicolor,* microorganismo modelo del género.

Recientemente se han descrito nuevos aspectos del proceso de diferenciación del género *Streptomyces*. El ciclo de vida tradicional, mencionado en las anteriores líneas, se compone de dos estructuras miceliares diferenciadas: micelio sustrato (vegetativo) y micelio aéreo (reproductivo). Exceptuando casos aislados de este género que esporulan en líquido como *S. griseus*, *Streptomyces acrimycini* o *Streptomyces albus* (Daza *et al.*, 1989), se asume que en medio líquido la diferenciación morfológica no tiene lugar. El reciente modelo describe nuevas fases de diferenciación tanto para crecimiento en superficie como en cultivos sumergidos. En una primera fase se produce la germinación de las esporas como micelio joven compartimentalizado (**primer micelio**). Este tipo de micelio forma agregados desde tiempos tempranos en el crecimiento y comienza a morir desde el centro del agregado hacia afuera, se

intercalan segmentos de micelio viables y muertos (Figura 1.4), produciéndose finalmente una **muerte celular programada**. Este proceso de muerte supone una parada en el crecimiento que precede la formación de micelio multinucleado (**segundo micelio**) que crece a partir de los segmentos viables que quedan del primer micelio. Se han definido dos tipos de segundo micelio en base a la ausencia (temprano) o presencia (tardío) de las capas hidrofóbicas típicas de las hifas aéreas.

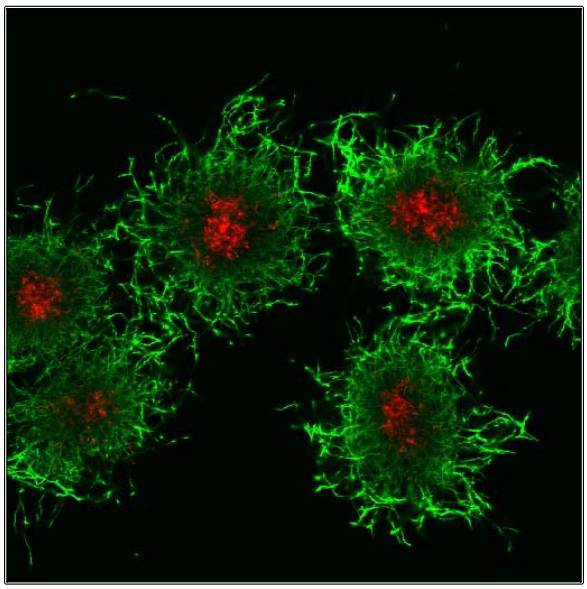


Figura 1.4: Micelio de *Streptomyces* vivo y muerto. Fotografía tomada con microscopio de fluorescencia confocal laser de micelio de *`S. tsukubaensis´*. Para analizar la viabilidad de la células se han usado dos tipos de colorantes, el ioduro de propidio que se une a los ácidos nucleicos de las células muertas y SYTO 9 que tiñe las células viables. El centro del agregado aparece de color rojo debido a que se produce una mayor acumulación de segmentos de micelio muerto, mientras que la zona externa es verde ya que el micelio de esta zona está vivo. (Fotografía cedida por P. Yagüe del Departamento de Biología Funcional y IUBA de la Universidad de Oviedo).

El micelio sustrato del modelo clásico se corresponde con un temprano segundo micelio multinucleado y el micelio aéreo con la fase tardía del segundo micelio, el cual ya se ha recubierto de la superficie hidrofóbica (Figura 1.5). El segundo micelio tardío sufre una segunda ronda de muerte dando lugar a formación de esporas.

En cultivos en líquido, el modelo clásico asume que los metabolitos secundarios son producidos por el micelio sustrato al alcanzar la fase estacionaria ya que en estas condiciones es infrecuente la diferenciación morfológica; en cambio, el nuevo modelo propone la muerte celular programada del primer micelio y la generación del segundo micelio que es el verdadero productor de metabolitos secundarios. En este nuevo modelo existe diferenciación morfológica tanto en líquido como en sólido, siendo la diferencia más importante la ausencia de una segunda ronda de muerte celular y esporulación en cultivos sumergidos (Manteca *et al.*, 2008; Manteca y Sánchez, 2009).

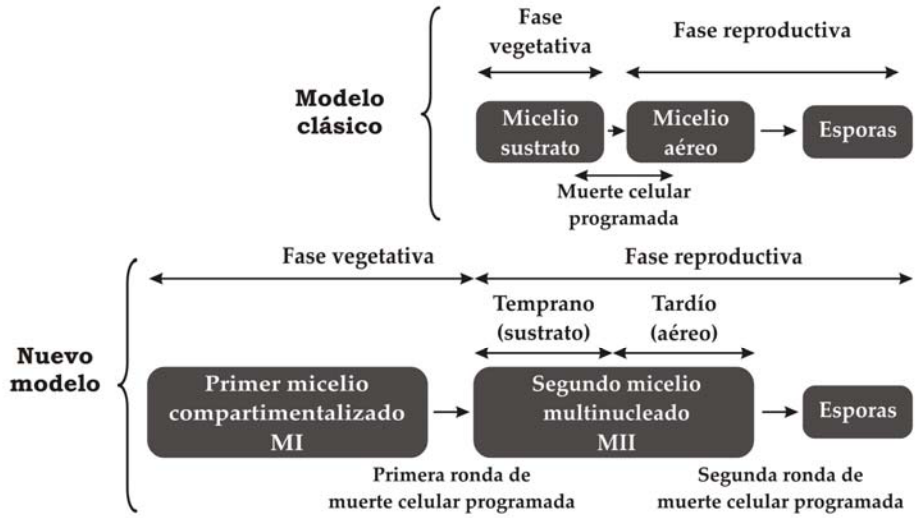


Figura 1.5: Fases de la diferenciación morfológica en *Streptomyces*. Esquema del nuevo modelo del ciclo celular propuesto para *Streptomyces* en comparación con el modelo clásico. Se indica las diferentes estructuras miceliares (Primer micelio MI y segundo micelio MII) y la muerte celular, así como la correspondencia con el tipo de fase vegetativa o reproductiva. En vertical se marca la correspondencia con la estructuras del modelo clásico, así el micelio sustrato corresponde al segundo micelio temprano y el micelio aéreo al segundo micelio tardío. (Modificado de Manteca y Sánchez, 2009).

1.2.2. Particularidades genéticas

Características del cromosoma de *Streptomyces*

El género *Streptomyces* es uno de los pocos ejemplos de bacterias con **cromosoma lineal** (Chen, 1996), el cual presenta un alto contenido en G+C y un tamaño dispar comprendido entre 6,7 y 11,9 Mb (correspondientes a los genoma de *Streptomyces clavuligerus* y *Streptomyces bingchenggensis,* respectivamente). El genoma de *S. coelicolor* (tamaño 8,6 Mb) fue el primero en ser secuenciado (Bentley *et al.*, 2002) y por primera vez los genes presentados por una bacteria (7825) superaban en número a los presentados por un microorganismo eucariota como *Saccharomyces cerevisiae* (su cromosoma contiene 6203 genes reconocidos).

Por el **alto contenido en G+C**, *Streptomyces* utiliza preferentemente codones que contienen estos nucleótidos en la tercera posición, lo que convierte en raros a los codones TTA (leucina), CTA (leucina) y TTT (fenilalanina) (Wright y Bibb, 1992). Respecto al inicio de traducción el codón utilizado mayoritariamente es AUG (metionina) pero también se puede encontrar GUG (valina) y CUG (Leucina).

El mecanismo de replicación de los **telómeros** de *Streptomyces* es único. El cromosoma lineal de este género presenta proteínas unidas covalentemente a los extremos 5´ (Lin *et al.*, 1993; Leblond *et al.*, 1996) las cuales intervienen en la replicación de los mismos. La

replicación del cromosoma tiene lugar de manera bidireccional desde un origen *oriC* localizado en el centro (Musialowski *et al.*, 1994) dejando los extremos 5´ sin completar al eliminar el último cebador de ARN, los cuales son extendidos mediante la intervención de un complejo proteico Tap/Tpg unido a los telómeros (Bao y Cohen, 2003).

¿Qué ventaja presenta un cromosoma lineal teniendo en cuenta las dificultades que conlleva su replicación? Las múltiples copias de un cromosoma circular, presentes en los compartimentos del micelio, pueden quedar unidas entre sí en los procesos de replicación y recombinación y podrían entorpecer la distribución del genoma en las ramificaciones de las hifas y durante la formación de las esporas (Volff y Altenbuchner, 1998; Hopwood, 2007). Además la estructura lineal también es favorable para la transferencia genética interespecífica, ya que la recombinación simple se da con facilidad entre el cromosoma lineal y plásmidos lineales conjugativos, los cuales son transferidos a otras bacterias como puede ser la transmisión de agrupaciones génicas de biosíntesis de antibióticos entre especies del género *Streptomyces*.

Hasta el momento, se ha completado la secuenciación de los genomas de *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002), *Streptomyces avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003), *S. griseus* (Ohnishi *et al.*, 2008), *Streptomyces scabies*, *S. clavuligerus* (Medema *et al.*, 2010) y *S. bingchenggensis* (Wang *et al.*, 2010); según aparece recogido en la base de datos del *European Biotechnolgy Institute* (www.ebi.ac.uk/genomes/bacteria.html). La aparición de nuevas y rápidas tecnologías de secuenciación como la pirosecuenciación (Metzker, 2005) ha supuesto una notable mejora, tanto económica como de tiempo, en el proceso de secuenciación por lo que es probable que en los próximo años el número de genomas secuenciados aumente de manera exponencial. Según la base de datos GOLD (del inglés, *Genomes Online Database*) en 2010 se encuentran en activo más de 30 proyectos de secuenciación de genomas de especies del género *Streptomyces*.

La comparación de los genomas revela una **región central conservada** de 5-6 Mb (Ohnishi *et al.*, 2008), en la que se localizan los **genes esenciales** implicados en la replicación, transcripción, traducción y el metabolismo central, y **dos regiones cercanas a los telómeros** de distinto tamaño (entre 1-2 Mb) y **secuencia variable** en las que se localizan genes que no tienen funciones esenciales, como los que intervienen en el metabolismo secundario o en la síntesis de enzimas hidrolíticas (Bentley *et al.*, 2002; Hopwood, 2006).

La alta sintenia encontrada entre la región central del genoma de *S. coelicolor* y los genomas circulares completos de *Mycobacterium tuberculosis* y *Corynebacterium diphtheriae* sugiere la existencia de un ancestro común para los Actinomycetales. Además, como ya se ha mencionado, el núcleo de los genomas de *Streptomyces* es más conservado que los brazos, lo que puede ser debido a la adquisición de grupos de genes mediante transferencia horizontal, lo cual también se explica por la abundancia de transposones en los extremos del cromosoma (Chen *et al.*, 2002).

Elementos extracromosomales

Plásmidos

La existencia de elementos extracromosomales en *Streptomyces* es bastante frecuente siendo los plásmidos los más usuales. Se han descrito numerosos plásmidos, entre los que se incluyen: plásmidos lineales, plásmidos integrativos, grandes plásmidos circulares de bajo número de copias y pequeños plásmidos circulares de alto número de copias.

Se han descrito plásmidos capaces de integrarse en sitios específicos del cromosoma del hospedador (*attB*) por recombinación con el sitio *attP* (sitio de integración del plásmido). Este tipo de plásmidos se encuentran integrados en el genoma del cromosoma del hospedador original, pero se comportan como elementos extracromosomales con replicación autónoma en otros hospedadores diferentes (Kieser *et al.*, 2000).

Los plásmidos lineales presentan estructuras muy similares a las descritas en el cromosoma lineal, se replican de manera independiente al cromosoma y contienen sus propias secuencias teloméricas.

Recientes descubrimientos, evidencian un importante papel de estos elementos extracromosomales en la evolución del género *Streptomyces* mediante la i**nteracción con el cromosoma** y su implicación en la **transferencia horizontal de genes**. Los plásmidos lineales acomodan, principalmente, genes del metabolismo secundario o genes no esenciales para el crecimiento (Mochizuki *et al.*, 2003; Bentley *et al.*, 2004) los cuales se suelen localizar en los brazos del cromosoma. La diversidad e inestabilidad observada en los extremos del cromosoma de especies de *Streptomyces* puede estar, en parte, mediada por la interacción con los plásmidos lineales. En *Streptomyces rimosus* se ha demostrado la existencia de interacciones entre el plásmido lineal pPZG101 y el cromosoma; así diferentes variantes morfológicos y mutantes auxótrofos presentan la pérdida del plásmido o la integración de partes del mismo en el cromosoma. Además, también se ha obtenido una cepa superproductora de oxitetraciclina por integración de parte de los genes de biosíntesis en el plásmido lineal (Gravius *et al.*, 1994). Otro ejemplo de interacción genoma-plásmido lo encontramos en *S. clavuligerus,* cuyo genoma presenta un tamaño menor (6,7 Mb) al descrito en otras especies de *Streptomyces* y las secuencias de los extremos no presentan las características típicas, que si aparecen en un megaplásmido de 1,8 Mb. Esto sugiere que dicho megaplásmido se ha originado por doble recombinación entre el cromosoma y un plásmido pequeño (Medema *et al.*, 2010).

Los plásmidos lineales pueden actuar como vectores mediando la transferencia horizontal de genes entre diferentes especies de *Streptomyces* (Ravel *et al.* 2000). La dinámica transferencia de información genética que existe entre el cromosoma de *Streptomyces* y los plásmidos lineales puede haber facilitado la rápida evolución en el metabolismo secundario que presenta el género *Streptomyces* (Medema *et al.*, 2010).

Fagos

Los miembros del género *Streptomyces* pueden ser hospedadores de fagos de doble cadena, los cuales pueden integrarse en el genoma o mantenerse libres (Lomovskaya *et al.*, 1980). Uno de los actinofagos más conocidos es el fago temperado ΦC31 de 41,4 Kb. Se trata de un fago de amplio rango de huéspedes, a partir del cual se han construido numerosos vectores de clonación para *Streptomyces* (Kieser *et al.*, 2000).

Inestabilidad genética

La inestabilidad genética es uno de los rasgos característicos del cromosoma de *Streptomyces* (Leblond y Decaris, 1994). Esta bacteria sufre espontáneamente grandes **deleciones y amplificaciones** debidas a procesos de recombinación en las regiones terminales poco conservadas (Volff y Altenbuchner, 2000). La inestabilidad afecta a diferentes características fenotípicas, con frecuencia de manera pleiotrópica, como la diferenciación molecular, la producción de metabolitos secundarios, la resistencia a antibióticos, la secreción de enzimas extracelulares y algunas veces al metabolismo primario, particularmente a uno o más pasos de la ruta de biosíntesis de la arginina (Volff y Altenbuchner, 1998).

En un principio se pensó que la inestabilidad genética podría estar relacionada con la linealidad del cromosoma, pero se ha comprobado que mutantes con cromosomas circulares construidos en el laboratorio (las regiones terminales del cromosoma son dispensables en condiciones de laboratorio) son más inestables (Fischer *et al.*, 1997a).

Aunque muchas de las reorganizaciones que se producen en genomas del género *Streptomyces* son neutras o desfavorables, la inestabilidad genética junto a la interacción cromosoma-plásmidos lineales puede ser la explicación a la gran variedad de polimorfismos que se encuentran en los extremos del cromosoma de diferentes especies que componen el género, lo que resulta en la existencia de numerosas y variadas agrupaciones de genes del metabolismo secundario (Fischer *et al.*, 1997b).

Al ser *Streptomyces* un género que principalmente se encuentra localizado en el suelo, la inestabilidad genética le confiere un enorme potencial en la adaptación a los numerosos y frecuentes cambios que se dan en la naturaleza (Volff y Altenbuchner, 1998).

1.2.3. Metabolismo secundario y su regulación

El género *Streptomyces* presenta una increíble capacidad para producir un amplio número de metabolitos secundarios. El 65 % de los antibióticos que se encuentran en el mercado son producidos por el grupo de los Actinomycetales en su mayor parte por *Streptomyces* (Hopwood, 2007). Además de antibióticos, este género produce inmunosupresores (tacrolimus, rapamicina y ascomicina), compuestos anticancerígenos

(bleomicina, dactinomicina, doxorubicina y estaurosporina), antifúngicos (anfotericina B, nistatina y pimaricina), herbicidas (fosfinotricina), compuestos para el tratamiento de la diabetes (acarbosa) y agentes antihelmínticos (avermectina y milbemicina) (Weber *et al.*, 2003). Hasta el momento sólo se ha descubierto un pequeña parte del potencial de estas bacterias; estimándose que el género *Streptomyces* es capaz de producir más de 100000 compuestos con actividad antimicrobiana de los cuales sólo se conoce un 3 % (Watve *et al.*, 2001).

Los genes implicados en la biosíntesis de un determinado metabolito secundario se encuentran agrupados en el genoma, formando **agrupaciones génicas**, cuyos tamaños varían desde unas pocas kb hasta 100 kb (Bentley *et al.*, 2002; Ohnishi *et al.*, 2008) y por lo general se localizan cerca de los extremos del cromosoma. Además, se conocen algunos plásmidos lineales que acomodan genes del metabolismo secundario, como SCP1 en *S. coelicolor* para la metilenomicina (Kirby y Hopwood, 1977), pPZG103 en *S. rimosus* para la oxitetraciclina (Gravius *et al.*, 1994), pSLA2-L en *Streptomyces rochei* para la lankacidina y la lankamicina (Kinashi *et al.*, 1994) y el megaplásmido pSCL4 de *S. clavuligerus* que acomoda unas 25 agrupaciones de metabolitos secundarios (Medema *et al.*, 2010).

La activación del **metabolismo secundario** y la **diferenciación morfológica** están relacionadas (Demain y Fang, 1995). El crecimiento de las bacterias del género *Streptomyces* se caracteriza por un paro temporal del mismo (Figura 1.6) (Granozzi *et al.*, 1990; Novotna *et al.*, 2003). el cual precede a la producción de antibióticos (Del Sol *et al.*, 2003) y puede activar los genes de biosíntesis y resistencia a antibióticos (Salah-Bey *et al.*, 1995), estimular una respuesta de estrés (Puglia *et al.*, 1995) así como el cese de la síntesis de algunas proteínas ribosomales (Blanco *et al.*, 1994). El modelo del ciclo de vida de *Streptomyces* propuesto recientemente por Manteca y colaboradores (2008), correlaciona la parada del crecimiento con la fase de transición entre el primer micelio compartimentalizado y el segundo micelio diferenciado multinucleado, el cual posee el potencial para la producción de metabolitos secundarios.

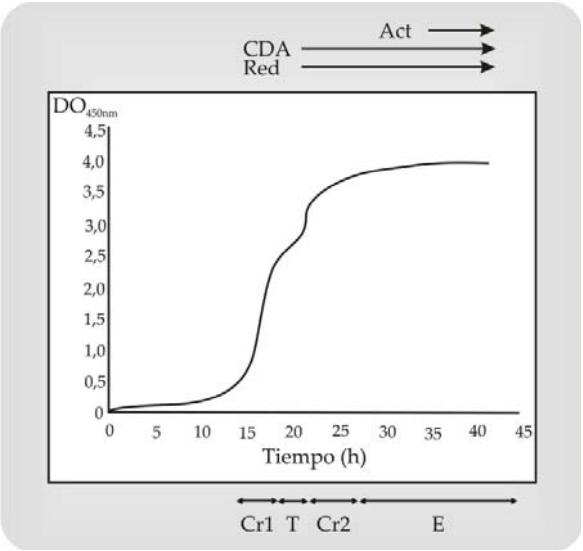


Figura 1.6: Relación temporal entre el crecimiento y la producción de antibióticos en *Streptomyces*. Crecimiento y producción de antibióticos de *S. coelicolor* en medio R5. El crecimiento se ha medido mediante densidad óptica a 450 nm. Cr1 es una primera fase de crecimiento rápido seguida de una fase de transición T, después de unas 2-3 horas entra en otra fase de crecimiento rápido Cr2 antes de entrar en la fase estacionaria. La producción undecilprodigiosina (Red), el antibiótico dependiente de calcio (CDA) y la actinorrodina (Act) se da al entrar en la fase estacionaria. (Modificado de Huang *et al.*, 2001).

La deficiencia en unos o varios factores nutricionales activa la biosíntesis de metabolitos secundarios como una posible respuesta de adaptación al medio. Tradicionalmente, se han descrito diferentes **niveles de regulación en la biosíntesis de metabolitos secundarios** en *Streptomyces* y ésta es la organización que se va a utilizar en el siguiente apartado para presentar de una manera más sencilla los diferentes mecanismos de regulación.

Un primer nivel corresponde a los genes que están implicados en la regulación de la **producción de metabolitos secundarios y en la diferenciación morfológica**, como los genes *bld* o los implicados en la respuesta estricta como *relA.* El segundo nivel está representado por genes con efecto **pleiotrópico** en una o varias rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios, como *afsR.* Y por último, el tercer nivel de esta cascada de regulación comprende a los reguladores **específicos de ruta** (Arias *et al.*, 1999).

Estudios recientes demuestran que los mecanismos de control en *Streptomyces* conforman una **red mucho más compleja**, en la cual existe una regulación cruzada entre los reguladores específicos de una ruta. Así, se encuentran reguladores asociados a un metabolito determinado implicados en la regulación de otras agrupaciones génicas de biosíntesis, y estos reguladores del tercer nivel también ejercen su control sobre los reguladores designados como de alto nivel pleiotrópicos (Huang *et al.*, 2005).

Regulación nutricional

Las fuentes fácilmente asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato estimulan el crecimiento, mientras que sus metabolitos inhiben la mayor parte de los procesos no esenciales en el organismo.

A. Regulación catabólica por carbono

A pesar de que la glucosa es una excelente fuente de carbono para estimular el crecimiento, interfiere en la síntesis de muchos antibióticos (Martin y Demain, 1980). Según lo observado en estudios de producción, los polisacáridos y oligosacáridos son mejores fuentes de carbono que la glucosa. Si en un medio de fermentación se combina la glucosa con otra fuente de carbono de asimilación más lenta, en primer lugar el microorganismo consumirá la glucosa sin que haya producción de antibiótico y una vez finalizada ésta, se utilizará la de asimilación más lenta para la biosíntesis de metabolitos secundarios (Demain y Fang, 1995).

B. Regulación por nitrógeno

La influencia de diferentes fuentes de nitrógeno, tanto orgánicas como inorgánicas, en la producción de metabolitos secundarios se ha estudiado en diversas especies del género *Streptomyces*, observándose una gran variedad en la preferencia de unas u otras fuentes. Así, se ha observado que la asparagina y glutamina favorecen la producción de cefalosporinas por *S. clavuligerus* (Aharonowitz y Demain, 1979), altos niveles de oleandomicina se consiguen en

medios con ácido aspártico para *Streptomyces antibioticus* y en el caso de *Streptomyces ambofaciens* se consigue una buena producción de espiramicina utilizando valina e isoleucina como fuentes de nitrógeno (Lebrihi *et al.*, 1992). Las fuentes de nitrógeno precursoras de los átomos de nitrógeno de las moléculas de metabolitos secundarios ejercen un esperado efecto positivo sobre la producción de los mismos, así la adición de L-lisina al medio de fermentación provoca un incremento del 150 % en la producción de rapamicina por *Streptomyces hygroscopicus,* lo que puede ser debido a su conversión en ácido pipecólico precursor de la rapamicina (Cheng *et al.*, 1995b).

Por otro lado, se ha observado en diferentes cultivos que un exceso de amonio provoca un descenso en la producción de metabolitos secundarios (Aharonowitz, 1980).

C. Regulación por fosfato

La producción de diversos tipos de metabolitos secundarios y antibióticos está regulada por el fosfato presente en el medio (ver apartado 1.3); es más, la biosíntesis de estos compuestos sólo se da en condiciones nutricionales limitantes de fosfato (Martin, 2004).

La biosíntesis de antibióticos formados directamente a partir de aminoácidos (homopéptidos como gramicidina S o heteropéptidos como las β-lactamas) es menos sensible a la regulación por fosfato que la síntesis de aquellos de tipo policétido (derivados del malonil-CoA) o aminoglicosídico (derivados de glucosa) (Martin, 1989).

D. Respuesta estricta y activación de la biosíntesis de metabolitos secundarios

Ante una situación de escasez de alguno de los nutrientes esenciales, las bacterias han desarrollado un sistema de regulación que se conoce como respuesta estricta. El efecto más importante de la respuesta estricta es la **inhibición de la síntesis de ARNr** aunque también conlleva la **activación o represión** de ciertos genes. La limitación de aminoácidos en el medio de cultivo conduce a que los ARNt descargados se unan al sitio A del ribosoma induciendo que la proteína asociada a los ribosomas RelA, catalice la síntesis de ppGpp (guanosina 5`-difosfato-3´-difosfato). Mediante la unión de estos nucleótidos a la ARN polimerasa se bloquea la transcripción de muchos genes necesarios para el crecimiento rápido (Ochi, 1990). La síntesis de ppGpp supone un cambio de la expresión de genes propios del crecimiento exponencial a la expresión de genes propios de la fase estacionaria (proteínas implicadas en morfogénesis o metabolismo secundario principalmente) (Hesketh *et al.*, 2007).

La molécula de ppGpp sintetizada en la respuesta estricta es una señal para el comienzo de la biosíntesis de antibióticos (Kelly *et al.*, 1991; Bibb, 1996; Xu *et al.*, 2002) excepto en el caso de *S. clavuligerus,* en el que se ha observado una superproducción de antibióticos en mutantes *relA,* los cuales no producen ppGpp (Gómez-Escribano *et al.*, 2008). El mecanismo exacto mediante el cual actúa la molécula de ppGpp aun no ha sido elucidado, se piensa que

dicha molécula puede estar directamente implicada en la selección de los promotores de los genes de biosíntesis por la ARN polimerasa (Bibb, 1996; Hesketh *et al.*, 2007).

La proteína RelA es un regulador que responde a ciertas condiciones nutricionales ya que parece que sólo se requiere en condiciones de escasez de nitrógeno y de carbono. En cuanto a lo que ocurre en condiciones de escasez de fosfato existen discrepancias, Sun y colaboradores (2001) proponen la activación de la síntesis de metabolitos secundarios por un metabolismo independiente a ppGpp mientras que Ryu y colaboradores (2007) describen la regulación de la síntesis de ppGpp por la proteína RshA. Así, ppGpp en *S. coelicolor* es selectivamente regulado por RelA o RshA en respuesta a una determinada limitación nutricional.

Regulación pleiotrópica

A. Moléculas señal tipo γ-butirolactonas

Los microorganismos del género *Streptomyces* emplean moléculas de tipo γ-butirolactona como **señales químicas u hormonas bacterianas** en el control de la **producción de antibióticos** y en algunos casos, como *S. griseus* o *S. rochei* (Horinouchi, 2007; Arakawa *et al.*, 2007), también en la **diferenciación morfológica**. Estas moléculas son efectivas a muy baja concentración (del orden nanomolar) y presentan diversas estructuras (Figura 1.7) que difieren en la longitud, ramificación y estereoquímica de la cadena lateral de tipo ácido graso (Takano, 2006).

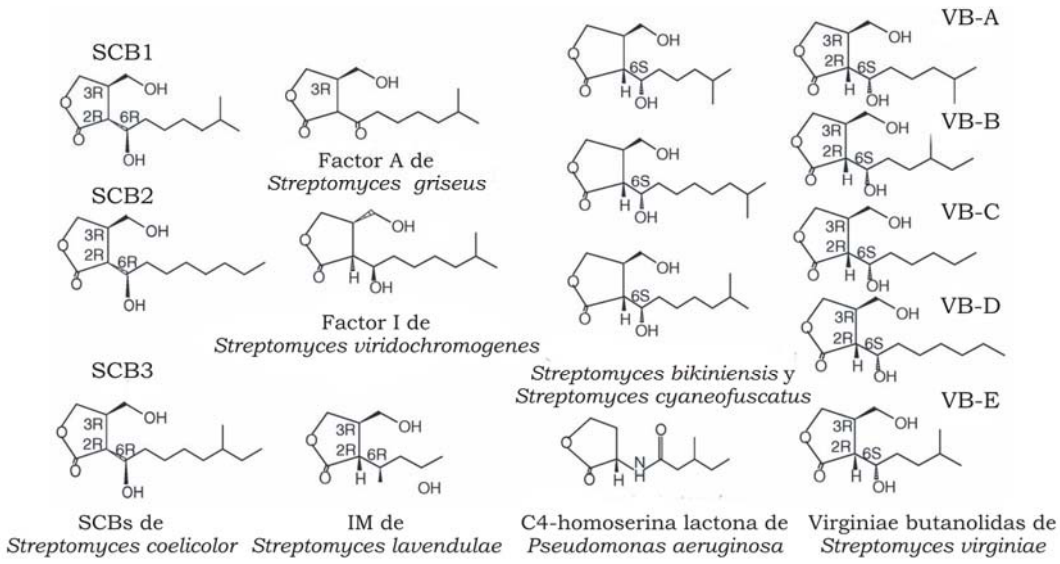


Figura 1.7: Estructura química de algunas butirolactonas de *Streptomyces* y C4-homoserina lactona de *Pseudomonas aeruginosa*. (Modificado de Takano, 2006).

Las γ-butirolactonas actúan uniéndose a un receptor citoplasmático inhibiendo la unión del mismo a su diana en el cromosoma. La mayoría de estos receptores son represores, por lo que la unión a las moléculas señal provoca la activación de determinados genes. Las proteínas receptoras presentan una alta especificidad por una γ-butirolactona determinada (Ohnishi *et al.*, 2005). Los procesos de biosíntesis de estas moléculas señal no han sido completamente descifrados, pero si se conocen algunas de las proteínas implicadas como AfsA en *S. griseus.* La más representativa de las γ-butirolactonas y la primera en describirse fue el factor A (Khokhlov *et al.*, 1967), que induce tanto la producción de estreptomicina como la esporulación en *S. griseus* (Horinouchi y Beppu, 1992).

La adición de γ-butirolactonas a un medio de fermentación de *Streptomyces* provoca un adelanto en el inicio de la producción de metabolitos secundarios (Takano *et al.*, 2001); lo que ha llevado a especular sobre la función de las γ-butirolactonas como moléculas de *quorum sensing* (Folcher *et al.*, 2001). Otros autores (Bibb, 2005) opinan que la síntesis de estas moléculas es debida a una desconocida señal fisiológica, como puede ser una limitación en los nutrientes, y no como indicadores de la densidad celular.

Además de las moléculas tipo γ-butirolactona se han descrito otros compuestos autoinductores en el género *Streptomyces*, como el factor Pi en *Streptomyces natalensis*, el cual presenta la siguiente estructura química 2,3-diamino-2,3-bis (hidroximetil)-1,4-butanodiol. Este factor suprime la producción de piramicina a concentraciones del orden nanomolar de manera similar a moléculas de *quorum-sensing* (Recio *et al.,* 2004)

B. Regulación mediante sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes son un mecanismo conservado, fundamentalmente en procariotas, para el control de la expresión de determinados genes en respuesta a factores del medio (Stock *et al.*, 1990). Estos sistemas transductores de señales se componen de una **quinasa sensora** y un **regulador de respuesta** (Figura 1.8); el dominio extracitoplasmático de cada proteína sensora responde ante determinados estímulos. La transducción de la señal requiere en primer lugar la autofosforilación en un residuo de histidina de la proteína sensora en su forma dimérica, la cual actúa como fosfodonante en la autofosforilación en un residuo de aspartato presente en el regulador de respuesta (Hakenbeck y Stock, 1996). La fosforilación del regulador de respuesta controla la actividad de éste que, por lo general, actúa como factor de transcripción.

Se han descrito numerosos sistemas de dos componentes implicados en la regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios en diversas especies del género *Streptomyces,* algunos ejemplos de los mismos se describen a continuación.

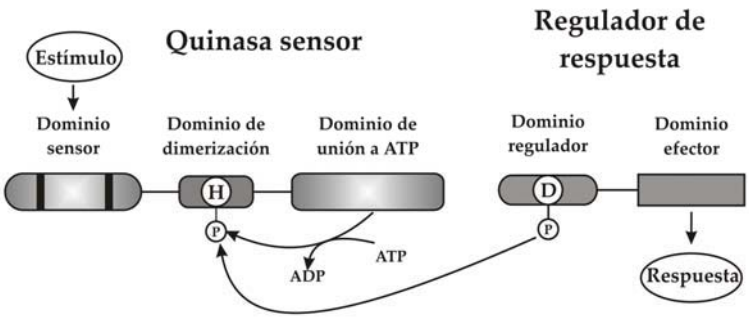


Figura 1.8: Modo de activación de un sistema de dos componentes. Un sistema de dos componentes está constituido por una quinasa sensora y un regulador de respuesta. Ante un determinado estímulo la quinasa sensora se autofosforila en un residuo de histidina y se transfiere un grupo fosfato a un residuo de aspartato del regulador de respuesta provocando su activación. (Modificado de Hutchings *et al.*, 2004).

El operón ***cutRS*** fue el primer sistema de dos componentes identificado en *Streptomyces*. Este operón reprime la producción de antibióticos ya que se ha comprobado que mutantes de *`Streptomyces lividans´* defectivos en *cutR* o *cutS* producen en mayor cantidad actinorrodina (Tseng y Chen, 1991) y la sobreexpresión de *cutRS* en *S. coelicolor* reprime la producción (Chang *et al.*, 1996). El sistema **AbsA1/AbsA2** también reprime la producción de antibióticos en *S. coelicolor* debido a la interferencia directa del regulador AbsA2 en la expresión de los reguladores específicos de los genes de biosíntesis (McKenzie y Nodwell, 2007).

El control por fosfato en la biosíntesis de metabolitos secundarios esta mediado por el sistema de dos componentes **PhoR/PhoP**, donde PhoR es una proteína quinasa sensora y PhoP es un regulador de respuesta de unión a ADN perteneciente a la familia OmpR/PhoB (Sola-Landa *et al.*, 2003). En respuesta a una deficiencia de fosfato en el medio, la proteína PhoP fosforilada regula la expresión de los genes del regulón *pho,* desencadenándose una serie de cambios en la célula para poder sobrevivir a la limitación de fosfato (Sola-Landa *et al.*, 2005).

Estos son sólo algunos ejemplos de los numerosos sistemas de dos componentes que se han descrito en el género *Streptomyces*. La secuenciación del genoma de *S. coelicolor* permitió identificar 84 genes que codifican quinasas sensoras, 67 de los cuales se localizaban próximos a genes que codificaban reguladores de respuesta; por lo que se podría suponer la existencia de **67 posibles sistemas de dos componentes** (Hutchings *et al.*, 2004).

C. Sistemas de serina-treonina quinasas

La transducción de señales en bacterias no sólo esta mediada por sistemas de dos componentes, sino también por proteínas típicas de eucariostas como las serina-treonina quinasas (Zhang, 1996). Una de estas proteínas es el factor de transcripción **AfsR** que participa en la regulación del metabolismo secundario en *S. coelicolor* y en *`S. lividans´*

(Matsumoto *et al.*, 1994) y en la diferenciación morfológica en *S. griseus* (Umeyama *et al.*, 1999).

El regulador AfsR es fosforilado en residuos de serina y treonina por diferentes quinasas cuya actividad quinasa es a su vez activada por fosforilación en residuos de serina y treonina conformando un sistema similar a los descritos en eucariotas (Matsumoto *et al.*, 1994; Horinouchi, 2003). AfsR es el punto de integración de múltiples señales detectadas por las diferentes quinasas provocando la activación de la expresión de *afsS*, el cual activa mediante un mecanismo desconocido, la transcripción de los reguladores específicos de los genes de biosíntesis de antibióticos en *S. coelicolor*.

D. Cascada reguladora de los genes *bld*

En el género *Streptomyces* existen mutantes incapaces de formar micelio aéreo conocidos como mutantes *bld* [del inglés *bald*, que significa calvo debido a que las colonias presentan una apariencia suave y brillante por la **ausencia de formación de micelio aéreo** (Merrick, 1976)]. Este tipo de mutantes **no producen la proteína SapB**, necesaria para romper la tensión superficial del medio mediante el recubrimiento de las hifas por una capa hidrofóbica y así poder emerger el micelio aéreo. Además, algunos de los mismos presentan un fuerte defecto en la producción de antibióticos, lo que sugiere que la formación de micelio aéreo y la síntesis de antibióticos comparten puntos de regulación (Nodwell *et al.*, 1999).

Los genes *bld* codifican muy diferentes tipos de moléculas, como ARNt [*bldA* (Lawlor *et al.*, 1987)], un transportador de membrana [*bldK* (Nodwell y Losick, 1998)], un factor sigma [*bldN* (Bibb *et al.*, 2000)], un factor anti-anti-sigma [*bldG* (Bignell *et al.*, 2000)], y varios factores de transcripción [*bldB* (Pope *et al.*, 1998), *bldD* (Elliot *et al.*, 1998) y *bldM* (Molle y Buttner, 2000)].

Estudios de complementación de mutantes, en los cuales el crecimiento próximo de dos determinados mutantes restablece la formación del micelio aéreo, han permitido determinar el orden de la cascada de los genes *bld;* para lo cual se han examinado todos los posibles pares de mutantes *bld* (Willey *et al.*, 1993; Nodwell *et al.*, 1999).

$$bldJ < bldk/bldL < bldA/bldH < bldG < bldC < bldD/bldM$$

Cada mutante es capaz de complementar todos aquellos que aparecen a su izquierda, posiblemente mediante la producción de alguna señal de la que los otros carecen o mediante la inactivación de un inhibidor extracelular. Además también existen genes que no son incluidos en ninguno de los grupos de complementación como son *bldB* y *bldN*.

Uno de los genes *bld* mejor caracterizados es *bldA* (Piret y Chater, 1985), el cual codifica el único ARNt específico para los codones UUA para leucina (Lawlor *et al.*, 1987). Los codones TTA no aparecen en los genes que se expresan durante el crecimiento vegetativo, ni en los genes estructurales de la producción de antibióticos o la diferenciación morfológica; pero en

cambio, si aparecen en genes que se expresan en la última fase del crecimiento como reguladores específicos de las rutas de biosíntesis de antibióticos, genes de esporulación o enzimas extracelulares (Leskiw *et al.*, 1991; Chater y Chandra, 2008). Los niveles del ARNt codificado por *bldA* permanecen bajos hasta el inicio del metabolismo secundario y la diferenciación morfológica, siendo máximos en la última fase del crecimiento (Leskiw *et al.*, 1993; Trepanier *et al.*, 1997).

Regulación específica de ruta

Los genes específicos de una ruta biosintética son aquellos cuya mutación afecta específicamente a la producción de un único antibiótico. A continuación se describen algunas de las familias de reguladores específicos más ampliamente distribuidas en el género *Streptomyces*.

A. Familia de reguladores SARP

Muchas de las proteínas reguladoras específicas del metabolismo secundario en el género *Streptomyces* pertenecen a la familia SARP (***Streptomyces antibiotic regulatory proteins***). Esta familia se ha identificado en diferentes agrupaciones génicas del metabolismo secundario, asociadas a genes de biosíntesis de policétidos aromáticos (Lombó *et al.*, 1999; Ichinose *et al.*, 2003), péptidos ribosomales y no ribosomales (Ryding *et al.*, 2002; Widdick *et al.*, 2003), undecilprodigiosinas (Cerdeño *et al.*, 2001), policétidos Tipo I (Sun *et al.*, 2003; Oliynyk *et al.*, 2003), β-lactamas (Núñez *et al.*, 2003) y compuestos azoxi (Garg *et al.*, 2002).

Las proteínas SARP contienen un dominio hélice-vuelta-hélice en el extremo amino terminal similar al que caracteriza a la familia de reguladores OmpR y actúan como factores transcripcionales (Lombó *et al.*, 1999; Sheldon *et al.*, 2002).

En general, los miembros de la familia SARP actúan como reguladores específicos excepto en el caso de AfsR, el cual tiene un efecto integrador de múltiples señales que se traducen como una cascada de fosforilación (Horinouchi, 2003).

B. Familia de reguladores LAL

Las proteínas de la familia de reguladores transcripcionales LAL (***large ATP-binding regulators of the LuxR family***) contienen un bucle P de unión a ATP en el extremo amino terminal y en el extremo carboxilo terminal un dominio de unión a ADN del tipo hélice-vuelta-hélice característico de la familia LuxR (De Schrijver y De Mot, 1999). Este tipo de reguladores aparecen especialmente asociados a genes de biosíntesis de policétidos como picromicina (Wilson *et al.*, 2001), anfotericina (Carmody *et al.*, 2004), geldanamicina (He *et al.*, 2008) o rapamicina (Kuscer *et al.*, 2007).

1.3. Control por fosfato en el género *Streptomyces*

El fósforo es un elemento esencial para los seres vivos, ya que forma parte de las moléculas portadoras de la información genética como el ADN y el ARN y de compuestos implicados en el metabolismo central energético, como es el ATP. Pero además, el fósforo también constituye parte de la estructura química de otras moléculas como los azúcares fosforilados, los fosfolípidos, coenzimas y otros fosfonucleótidos como el cAMP, GTP o el ppGpp. En la regulación post-traduccional de muchas proteínas también está implicado el fósforo (procesos de fosforilación y desfosforilación) (Wanner, 1996).

La limitación de alguno de los factores nutricionales, incluido el fósforo, supone un estrés para la célula bacteriana que provoca una disminución en su tasa de crecimiento. Los microorganismos han desarrollado una serie de sofisticadas estrategias para sobrevivir a la deficiencia de fósforo que les permiten mantener la viabilidad celular en periodos de escasez y recuperar su tasa de crecimiento rápido en el momento en el que dicho nutriente vuelve a estar disponible (Siegele y Kolter, 1992).

En el género *Streptomyces*, la limitación en fosfato no sólo afecta al crecimiento sino también a la diferenciación morfológica (Chater y Bibb, 1997) y a la biosíntesis de metabolitos secundarios (Martin y Demain, 1980; Martin, 2004). El fosfato ejerce un control negativo sobre el metabolismo secundario provocando que la producción de estos compuestos sólo tenga lugar cuando dicho elemento nutricional se encuentre en condiciones limitantes para el microorganismo. Así, se ha comprobado en la producción de diferentes ccompuestos, como por ejemplo en la biosíntesis de cefalosporinas por *S. clavuligerus* (Jhang *et al.*, 1989), de actinorrodina por *S. coelicolor* (Doull y Vining, 1990) o de rapamicina por *S. hygroscopicus* (Cheng *et al.*, 1995a).

El control negativo del fosfato sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios se ha observado en un gran número de microorganismos, como proteobacterias, bacterias Gram-positivas y hongos filamentosos. La producción de metabolitos secundarios confiere al microorganismo una ventaja ecológica; en un momento en el que el microorganismo se encuentra en condiciones limitantes para un crecimiento normal los metabolitos secundarios inhiben el crecimiento de sus competidores en el entorno (Martin y Demain, 1980; Chater y Bibb, 1997).

Hasta los años 90, los estudios realizados sobre el efecto del fosfato en la producción de metabolitos secundarios en el género *Streptomyces* eran fundamentalmente de carácter fisiológico; los mecanismos moleculares implicados en la respuesta de la célula a la situación de escasez de fosfato han sido elucidados recientemente.

1.3.1. El sistema de dos componentes PhoR-PhoP

La respuesta a la escasez de fosfato en bacterias está mediada por un sistema de dos componentes. Este tipo de sistemas constituyen un mecanismo conservado en los organismos procariotas para una expresión coordinada de diferentes genes en respuesta a diferentes factores medioambientales. Entre otros, los sistemas de dos componentes participan en quimiotaxis, captación de nutrientes, fijación del nitrógeno, esporulación, *quorum sensing* y virulencia (Hoch, 2000; Stock *et al.*, 2000).

Los sistemas de dos componentes se componen típicamente de una proteína **quinasa sensora** y un **regulador de respuesta**. Bajo una determinada señal, la proteína sensora en forma dimérica se autofosforila en un residuo de histidina (uno de los monómeros cataliza la fosforilación del otro monómero). A continuación, el regulador de respuesta cataliza la transferencia del grupo fosforilo desde la fosfohistidina a un residuo conservado de aspartato presente en el propio regulador provocando su activación. El regulador de respuesta en su forma fosforilada desencadena la respuesta mediante la activación o represión de diferentes genes (Stock *et al.*, 1995; West y Stock, 2001; Bourret, 2010). Aunque los reguladores de respuesta principalmente actúan como factores transcripcionales, en algún caso también pueden tener alguna actividad enzimática o regular la actividad de una proteína.

El sistema de dos componentes implicado en el control por fosfato ha sido analizado en diferentes microorganismos, como por ejemplo: PhoR-PhoB en *Escherichia coli* (Wanner y Chang, 1987), PhoR-PhoP en *Bacillus subtilis* (Hulett *et al.*, 1994), PhoR-PhoS en *Corynebacterium glutamicum* (Kocan *et al.*, 2006), PhosS-PhosR en *Campylobacter jejuni* (Wösten *et al.*, 2006) o PhoR-PhoP en *Clostridium acetobutylicum* (Fiedler *et al.*, 2008). Existen casos con sistemas más complejos como en *Myxococcus xanthus,* en el que la regulación está mediada por tres sistemas de dos componentes (PhoR1-PhoP1, PhoR2-PhoP2 y PhoR3-PhoP3) y un regulador de respuesta PhoP4 (Pham *et al.*, 2006).

En el género *Streptomyces* dicho sistema fue caracterizado por primera vez en la especie `*S. lividans*´ bajo el nombre de PhoR-PhoP (Sola-Landa *et al.*, 2003). La proteína sensora PhoR contiene un dominio transmembrana en el extremo amino terminal, el cual le puede servir de anclaje a la membrana citoplasmática. Esta proteína contiene todos los dominios típicos de las proteínas sensoras, como la caja H donde se localiza el residuo de histidina sobre el que se produce la autofosforilación. PhoP pertenece a la familia de reguladores transcripcionales OmpR/PhoB y contiene aminoácidos conservados en el extremo amino terminal donde se localiza el residuo de aspartato sobre el que se produce la fosforilación. El extremo carboxilo terminal incluye un motivo de unión a ADN del tipo hélice-vuelta-hélice alado (Sola-Landa *et al.*, 2003). El regulador de respuesta actúa como factor transcripcional activando o reprimiendo la expresión de una serie de genes, los cuales integran el denominado regulón *pho*.

En el genoma de *Streptomyces* spp. el sistema *phoR-P* se localiza adyacente en disposición cola-cabeza y en sentido divergente a *phoU* (posible modulador de la respuesta a la escasez de fosfato) (Figura 1.9). Estos tres genes se expresan a partir de un promotor bidireccional localizado en la región intergénica entre *phoU* y *phoRP* (Sola-Landa *et al.*, 2003).

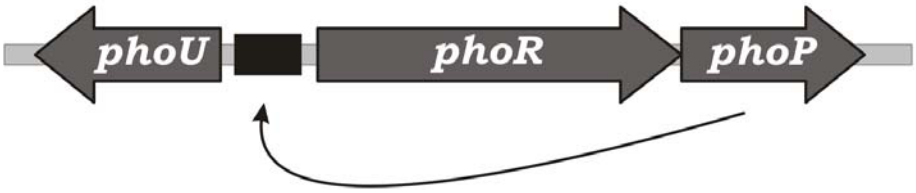


Figura 1.9: Disposición de los genes *phoRP* y *phoU* en el género *Streptomyces*. El regulador de respuesta PhoP controla la expresión del operón *phoR-P* y de *phoU* mediante la unión al promotor bidireccional situado en la zona intergénica *phoU-phoRP*.

Los genes *phoR* y *phoP* se cotranscriben como un **transcripto bicistrónico** sin secuencia líder, a partir del promotor intergénico bidireccional pero además *phoP* se puede transcribir de forma individual a partir de un promotor localizado en la región terminal 3´ de *phoR* (Ghorbel *et al.*, 2006a). En *S. coelicolor* y en *S. natalensis* se ha comprobado que PhoP se **autorregula** mediante la unión al promotor bidireccional (Sola-Landa *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2007), sin embargo no se ha detectado unión de PhoP al promotor específico para *phoP* (Sola-Landa *et al.*, 2005).

Transducción de señales implicadas en la respuesta a la escasez de fosfato en *E. coli* y en *B. subtilis*

La respuesta a la escasez de fosfato extracelular supone un cambio global en la célula lo que implica la actuación de una compleja red de rutas de transducción de señales que llevan a cabo una fina regulación del cambio. Los integrantes de los sistemas de dos componentes comparten estructuras lo que permite una reacción cruzada (*cross talk*) entre quinasas y reguladores de respuesta de diferentes sistemas. El sistema PhoR-P es el regulador principal en la respuesta a la limitación de fosfato, pero tanto en *E. coli* como en *B. subtilis* se han caracterizado otros sistemas de dos componentes que también intervienen en esta respuesta.

En *E. coli* la activación del regulador de respuesta PhoB esta mediada por **PhoR** (su correspondiente histidina quinasa) y por **CreC**, especialmente en ausencia de PhoR (Amemura *et al.*, 1990). La activación de PhoB también responde a la fosforilación por la molécula de **acetil-fosfato**, intermediario de la ruta Pta-AckA [fosfotransacetilasa (Pta) y acetato quinasa (AcKA)] la cual interviene en el metabolismo del carbono (McCleary y Stock, 1994). La regulación mediante CreC y acetil-fosfato es independiente de la concentración de fosfato extracelular. Tanto la proteína CreC, como el acetil-fosfato están implicados en el metabolismo del carbono y además la molécula de acetil-fosfato interviene en el metabolismo

central del fosfato. Esto sugiere una regulación más global, no sólo mediada por el fosfato extracelular, de los genes implicados en la respuesta a la limitación del fosfato (Wanner y Wilmes-Riesenberg, 1992). Además, la activación de PhoB esta mediada por al menos otras siete quinasas (Fisher *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2005) lo que permite a la célula integrar múltiples señales y adaptarse rápidamente a los cambios.

En la respuesta a la escasez de fosfato en *B. subtilis* están implicados tres sistemas reguladores (Figura 1.10). Uno es el sistema **PhoR-PhoP** (responsable de la inducción del regulón *pho* y homólogo al sistema PhoR-PhoB de *E. coli*) (Seki *et al.*, 1987; 1988); otro es **SigB** (un factor sigma responsable de la respuesta al estrés general de la célula) y otro un **mecanismo desconocido**, independiente a los dos anteriores (Antelmann *et al.*, 2000). Hasta el momento, no se ha establecido la función de las proteínas reguladas por el mecanismo desconocido pero constituyen una pequeña fracción del estimulón *pho*.

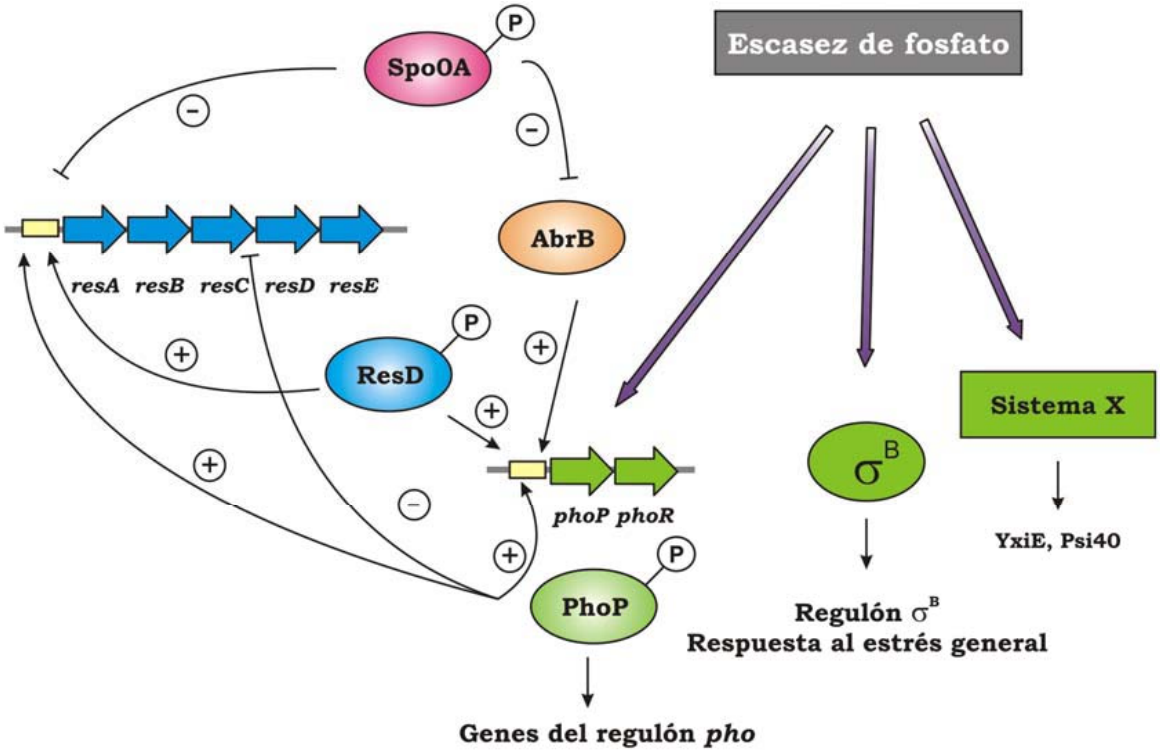


Figura 1.10: Respuesta a la escasez de fosfato en *B. subtilis*. La escasez de fosfato en *B. subtilis* activa el regulón *pho* mediante el sistema PhoR-P, una respuesta al estrés general mediada por el factor σ^B y la expresión de dos genes *yxiE* y *psi40* mediante un mecanismo desconocido. Además en la regulación del sistema *phoR-P* intervienen otros sistemas como ResD-E y AbrB que actúan como reguladores positivos y Spo0A que reprime la expresión de *phoRP*. Mediante el símbolo positivo se indica activación de la expresión y con negativo represión. (Basado en publicaciones de Hulett, 1996 y Antelmann *et al.*, 2000).

En esta bacteria, la maquinaria de respuesta a la escasez de fosfato mediada por **PhoR-P** también está bajo el control de varios sistemas de dos componentes. Estas interconectadas rutas incluyen una proteína implicada en la iniciación de la esporulación **Spo0A** y el sistema de dos componentes **ResD-ResE**, que tiene un papel importante en la

regulación de la respiración en la fase tardía del crecimiento (Nakano *et al.*, 1996). Rutas paralelas regulan positivamente el regulón *pho* vía PhoR-P, una de estas rutas incluye el sistema ResD-ResE y la otra, el regulador de transición de estado, AbrB (Hulett, 1996). Los sistemas Spo, Res y Pho actúan de manera secuencial en la regulación de la respuesta a la escasez de fosfato. En condiciones de exceso de fosfato el sistema PhoR-P se expresa de manera basal, así cuando la señal de escasez de fosfato se produce ésta es detectada rápidamente desencadenándose la inducción de la expresión de *phoR-P* (Paul *et al.*, 2004). Tanto AbrB como ResD son necesarios para una completa inducción de *phoR-P*. Si la limitación de fosfato continua en el tiempo, el sistema Spo0A provoca el inicio de la esporulación y reprime la respuesta a la escasez de fosfato regulando negativamente las dos rutas anteriores (Hulett, 1996).

Inhibición, activación y desactivación del sistema PhoR-B/PhoR-P

La escasez de fosfato extracelular parece ser la señal que provoca la activación del sistema PhoR-P aunque la transducción de señales que van desde la captación de la señal hasta el sistema de dos componentes es un proceso que aún no se conoce en profundidad. En *E. coli* se ha propuesto un modelo en el cual el **sistema de transporte Pst y la proteína PhoU** juegan un importante papel en la ruta de señalización de fosfato (Wanner, 1997). En esta bacteria los genes del sistema de transporte Pst, *pstSCAB(2)* forman un operón junto a *phoU*, mientras que en otros microorganismos como en el género *Streptomyces* dichos genes se encuentran en operones distintos (Sola-Landa *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2007).

Según el modelo de Wanner, el sistema PhoR-P pasa por tres estados distintos (Figura 1.11) en el proceso de la transferencia de la señal de fosfato (Hsieh y Wanner, 2010). En condiciones de exceso de fosfato, la proteína de unión a fosfato PstS se encuentra totalmente saturada y se forma un complejo entre el sistema Pst, la proteína PhoU y PhoR en el cual la proteína PhoR se encuentra inhibida. En estas condiciones PhoR muestra actividad fosfatasa evitando así la fosforilación de PhoB por otras quinasas o por la molécula de acetil-fosfato (Carmany *et al.*, 2003). Si el fosfato es limitante se suelta el complejo inhibidor por lo que PhoR se activa actuando como autoquinasa y fosfodonante en la autofosforilación de PhoB. El aumento de la concentración de fosfato en el medio provoca la formación del complejo represor y PhoR cataliza la desfosforilación de PhoB.

La proteína PhoU tiene una doble función en la respuesta al fosfato. Se ha demostrado que en ausencia de PhoU se produce un transporte incontrolado de Pi hacia el interior celular mediante el sistema Pst, incluso sobrepasándose niveles tóxicos para la célula. PhoU interviene en la regulación de la homeostasis del fosfato inhibiendo el sistema Pst cuando los valores de fosfato intracelular son elevados (Rice *et al.*, 2009). Además, como se ha descrito anteriormente PhoU actúa como regulador negativo del sistema PhoR-P promoviendo el cambio de actividad de PhoR de autoquinasa a fosfatasa (Surin *et al.*, 1986), por lo que de

esta manera también inhibe la expresión del sistema Pst ya que se encuentra positivamente regulado por el sistema PhoR-B. PhoU controla tanto la abundancia como la actividad del sistema de transporte Pst.

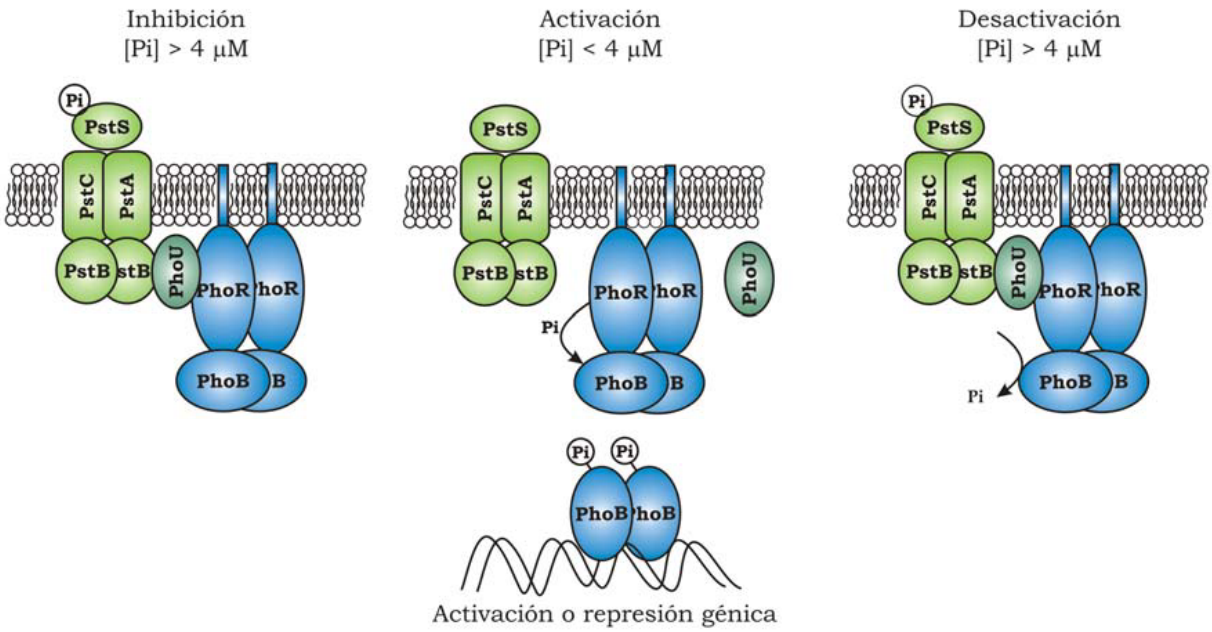


Figura 1.11: Modelo de la inhibición/activación del sistema PhoR-B en *E. coli*. En condiciones de exceso de fosfato [Pi] > 4 µM se forma un complejo entre el sistema de transporte Pst, la proteína PhoU y PhoR que provoca la inactivación de esta última. Si la concentración de fosfato en el medio es menor a 4 µM se suelta el complejo de represión por lo que PhoR pasa a un estado de activación y se provoca la fosforilación de PhoB, lo que desencadena la respuesta por activación o represión de ciertos genes. Si la concentración de fosfato se recupera a valores no limitantes PhoR pasa a un estado de desactivación y cataliza la desfosforilación de PhoB. (Modificado de Hsieh y Wanner, 2010).

En el genoma de *B. subtilis* se ha caracterizado el operón que codifica las proteínas del sistema de transporte Pst, pero mientras en *E. coli phoU* forma parte de este mismo operón en *B. subtilis* no se ha definido ningún ortólogo de PhoU (Qi *et al.*, 1997). El sistema Pst de *B. subtilis* está implicado en el transporte de fosfato pero no en la regulación del regulón *pho*. En este microorganismo el sistema PhoR-P está regulado por otros sistemas por lo que la regulación mediada por PhoU puede no ser necesaria.

A pesar de que *phoU* es uno de los primeros integrantes definidos del regulón *pho* en *Streptomyces*, su papel dentro de la respuesta a la escasez de fosfato en este género es desconocido. El gen *phoU* de *S. coelicolor* codifica una proteína con una identidad del 28,1 % con PhoU de *E. coli* y se localiza en el genoma adyacente a los genes *phoR-P*. Las proteínas tipo PhoU son metaloproteínas con dos lugares de unión de átomos de hierro (Liu *et al.*, 2005) y es probable que PhoU pueda estar implicada en la resistencia a un estrés oxidativo suave. La escasez de fosfato incrementa la sensibilidad de la célula al estrés oxidativo y parece que PhoU puede actuar como modulador de la respuesta al estrés oxidativo. Pero

hasta el momento el papel de PhoU, tanto en la respuesta a la escasez de fosfato como al estrés oxidativo, sigue siendo incierto (Ghorbel *et al.*, 2006a).

1.3.2. PhoB/P el regulador de respuesta

Características de PhoB/P

La proteína PhoP pertenece a la **sub-familia OmpR/PhoB** de reguladores de respuesta la cual se caracteriza por el dominio de unión a ADN en forma de **hélice-vuelta-hélice alado** (Brennan, 1993). Los reguladores de respuesta constan de dos dominios que se pliegan de manera independiente, un **dominio receptor** (DR) conservado en el que se produce la fosforilación y un **dominio efector** (DE) variable de unión a ADN (Mack *et al.*, 2009). Estos dominios se encuentran unidos por una cadena polipeptídica de longitud variable cuya flexibilidad dificulta la cristalización de la proteína completa (Martínez-Hackert y Stock, 1997). Tanto en PhoB de *E. coli* y en PhoP de *B. subtilis* la cristalización se ha logrado de cada dominio por separado (Blanco *et al.*, 2002; Birck *et al.*, 2003; Arribas-Bosacoma *et al.*, 2007).

Los reguladores de respuesta se suelen encontrar en forma de **dímero**, el cual se produce por la interacción entre superficies del dominio receptor. En PhoB la dimerización se produce de forma simétrica (Arribas-Bosacoma *et al.*, 2007) mientras que en PhoP de *B. subtilis* la dimerización es asimétrica (diferentes superficies entran en contacto por lo que cada monómero de un dímero presenta una segunda superficie para un posible oligomerización) (Birck *et al.*, 2003).

La estructura general de los DE se encuentra altamente conservada y se compone de tres elementos que son críticos para la regulación transcripcional (ver figura 1.12): una **hélice** de unión al surco mayor del ADN, un **ala** de unión al surco menor del ADN y un **bucle** implicado en la activación transcripcional (Blanco *et al.*, 2002; Hickey *et al.*, 2009). Dicho bucle se orienta lateralmente de tal manera que puede interaccionar con la ARN polimerasa provocando el inicio de la transcripción.

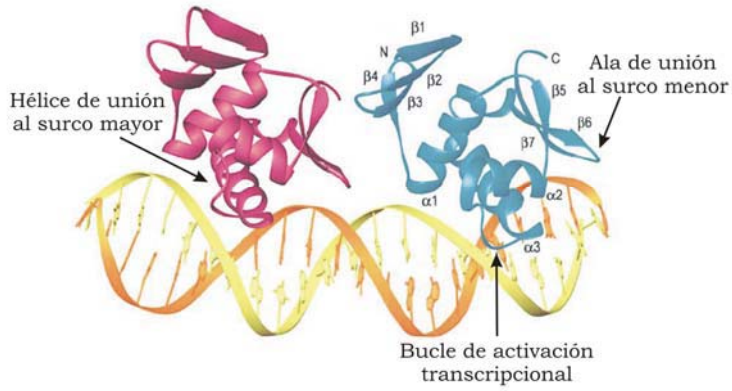


Figura 1.12: Representación de la estructura de unión del dominio efector de PhoB de *E. coli* con la molécula de ADN. Se muestran dos unidades del dominio efector de PhoB ya que la unión al ADN se produce en tándem. Los elementos críticos de la proteína para la unión con el ADN se muestran señalados con flechas. (Modificado de Blanco *et al.*, 2002).

Efecto de la fosforilación en la activación del regulador de respuesta

La fosforilación del regulador de respuesta **modula la transcripción** (Stock *et al.*, 1995) y aunque dicha fosforilación, en la mayoría de los casos, es esencial para el funcionamiento de la proteína tiene diferentes efectos en los diferentes reguladores de la familia OmpR/PhoB (Birck *et al.*, 2003).

En el caso de **PhoB de *E. coli*** se ha observado que la fosforilación influye en la **dimerización**. Este regulador presenta una estructura dimérica simétrica tanto en su estado activo como inactivo (Bachhawat *et al.*, 2005). En el estado inactivo desfosforilado el DR de PhoB está en equilibrio entre monómero y dímero; en este estado se produce una interacción entre el DR y el DE inhibiéndose la actuación de este último. Tras la fosforilación se forma un dímero con una orientación diferente (Mack *et al.*, 2009) liberando al DE de la inhibición lo que permite la unión entre este dominio y secuencias de repetición directa en el ADN. El DR desfosforilado de PhoB actúa como inhibir del DE (Solá *et al.*, 1999; Ellison y McCleary, 2000).

El regulador de respuesta **PhoP de *B. subtilis*** se encuentra en forma de dímero asimétrico tanto en su estado desfosforilado como fosforilado y puede unirse al ADN en estas dos formas, por lo tanto la fosforilación no es necesaria ni para la dimerización ni para la unión al ADN de este regulador. Sin embargo, son necesarias menores concentraciones de PhoP fosforilado que PhoP sin fosforilar para que sea efectiva la unión al ADN por lo que la fosforilación tiene efecto en la **afinidad al ADN** (Chen *et al.*, 2003). También se ha observado, que tras la unión del dímero de PhoP al sitio de unión central, la oligomerización de más unidades de PhoP se hace en su forma fosforilada, por lo que la fosforilación es necesaria para la unión cooperativa de las unidades de PhoP, es decir la fosforilación está implicada en la **interacción proteína-proteína** (Birck *et al.*, 2003).

El DE de PhoB aislado presenta una mayor afinidad por el ADN que la proteína completa en su estado no fosforilado, debido a que se ha eliminado el efecto inhibitorio ejercido por el DR (Ellison y McCleary, 2000). Lo mismo ocurre en el caso de PhoP de *S. coelicolor* en el que se ha demostrado que el DE [purificado como proteína de fusión junto a glutatión-S-transferasa (GST)] se une con mayor afinidad al ADN que la proteína completa (Sola-Landa *et al.*, 2005). Mientras que, el dominio de unión a ADN aislado de PhoP de *B. subtilis* se encuentra en forma monomérica en solución y su afinidad por el ADN es unas cinco veces menor que para la proteína completa no fosforilada (Chen *et al.*, 2004). Lo que sugiere que **PhoP de *S. coelicolor*** presenta una estructura con **mayor similitud a PhoB de *E. coli*** que a PhoP de *B. subtilis*.

Unión de PhoP al ADN: cajas PHO

La función llevada a cabo por el regulador de respuesta requiere la unión con la molécula de ADN. La secuencia de ADN reconocida por la proteína PhoB/P se conoce como

caja PHO (Makino *et al.*, 1986). En *S. coelicolor* se ha realizado un detallado estudio de las cajas PHO, las cuales se componen de **unidades de repetición directa** (DRus, del inglés *direct repeat units*) de **11 nucleótidos dispuestas en tándem**; cada repetición es reconocido por un monómero de PhoP. Una organización similar se ha observado en diferentes microorganismos como *E. coli* (Blanco *et al.,* 2002), *B. subtilis* (Liu *et al.,* 1998a), *C. jejuni* (Suzuki *et al.,* 2004) o *C. glutamicum* (Schaaf y Bott, 2007).

La secuencia consenso de las repeticiones directas es específica de cada microorganismo. En los primeros estudios de la unión de PhoP a la molécula de ADN (en la zona promotora intergénica entre *phoU-phoRP* y en el promotor de *pstS*) se definió la secuencia consenso en *S. coelicolor* como G(G/T)TCAYYYR(G/C)G (donde Y es una pirimidina y R una purina) (Sola-Landa *et al.*, 2005). Posteriormente, el análisis de más de 25 promotores de genes controlados por PhoP mediante ensayos de retraso de movilidad electroforética (EMSA, del inglés *electrophoretic mobility shift assay*) y protección frente a ADNasa I han permitido definir las características de las cajas PHO en *Streptomyces* y elucidar un modelo de unión de PhoP al ADN, denominado **modelo I** (Sola-Landa *et al.*, 2008). Las características que definen este modelo se pueden resumir en: i) al menos dos repeticiones directas son necesarias para que se produzca la unión PhoP-ADN; ii) la longitud de 11 nucleótidos es importante, ya que la afinidad de PhoP por una caja de 10 nucleótidos cae drásticamente; iii) la posición de cada nucleótido no tiene la misma relevancia dentro de cada repetición (Figura 1.13), que se divide en una parte conservada de 7 nucleótidos y otra parte más variable de 4. Dentro de la longitud total de 11 nucleótidos, que encaja con el número de nucleótidos por vuelta que presenta la doble hélice del B-ADN (10,6 nucleótidos por vuelta); la parte más conservada se sitúa en el surco mayor mientras que la parte variable se localiza en el surco menor; iv) la unión de un monómero a una determinada repetición es más fuerte cuanto más conservada sea la secuencia y v) la unión de monómeros de PhoP a repeticiones consecutivas es favorecida por las interacciones proteína-proteína.

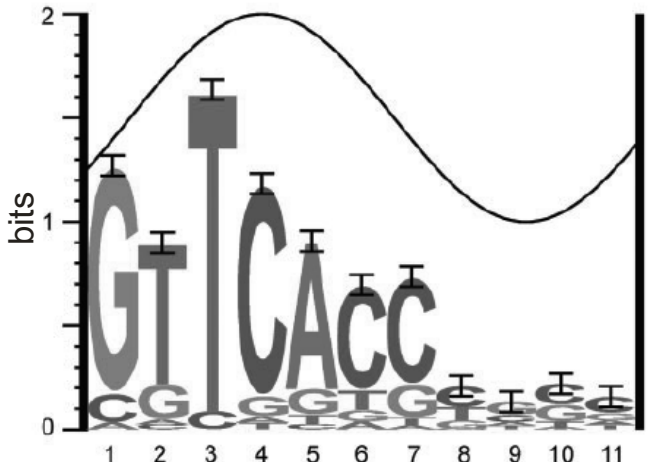


Figura 1.13: Logotipo de la secuencia de 11 nts de unión de PhoP al ADN correspondiente al modelo I que incluye 37 DRus de *S. coelicolor*. La altura de cada letra es proporcional a la frecuencia con la que aparece dicha base en las secuencias analizadas y se corresponde con un valor de contenido de información (bits). La onda superior marca la localización de una DRu respecto a una vuelta de hélice del B-ADN; así las siete primeras posiciones se localizan en el surco mayor quedando las otras cuatro en el surco menor. Las barras de error se muestran en la parte superior de cada letra. (Tomado de Sola-Landa *et al.*, 2008).

Los genes del regulón *pho* muestran una expresión diferenciada en la respuesta a la escasez de fosfato, lo que puede ser mediado por la afinidad del regulador de respuesta por las correspondientes cajas PHO. Las secuencias de las zonas promotoras reconocidas por PhoP presentan diferentes estructuras lo que probablemente origine la diferente afinidad que presenta PhoP por los diversos genes del regulón *pho*. Así, se distinguen dos tipos de repeticiones en los operadores reconocidos por PhoP: unas constituyen el **núcleo del operador** (simbolizadas por una C del inglés *core*) y otras constituyen la **extensión** (E, del inglés *extension*). El núcleo constituye la estructura mínima requerida para que se produzca la unión de PhoP y en las repeticiones de extensión se produce la unión de PhoP tras la ocupación previa del núcleo. Teniendo en cuenta el número y tipo de DRus, las zonas reconocidas por PhoP se pueden clasificar en tres clases de operadores (Figura 1.14):

- **Clase I**: incluye zonas con dos únicas DRus y se detecta un solo complejo de retraso en los ensayos de movilidad electroforética. Ésta es la estructura más simple y las repeticiones presentan un alto grado de conservación.

- **Clase II**: se compone de tres DRus, de las cuales al menos una DRu presenta un grado de conservación muy alto. En los análisis de EMSA se detecta un solo complejo de unión proteína-ADN.

Estas dos clases de operadores de PhoP se componen únicamente de repeticiones núcleo (dos o tres DRus) a las cuales se unen los monómeros de PhoP a un mismo tiempo.

- **Clase III**: comprende operadores más complejos, en este caso dos o tres DRus conservadas componen el núcleo en el cual se produce la unión de PhoP en primer lugar con una alta afinidad. Al aumentar la concentración de proteína la longitud del sitio de unión se extiende a DRus adyacentes menos conservadas. Dentro de este tipo de operadores se han definido diferentes estructuras que explican la unión secuencial de PhoP: a) junto al núcleo de la zona de unión se encuentran **repeticiones de extensión (E) poco conservadas**, monómeros de PhoP se unen a cada repetición E dando diferentes complejos de unión en los ensayos de EMSA; b) entre el núcleo y una repetición conservada denominada de **soporte** (E_S, del inglés *support*) existe una repetición muy poco conservada, denominada **inestable** por el efecto que causa (E_U, del inglés *unstable*). La unión a esta última repetición (E_U) se da gracias a la presencia de la repetición E_S, produciéndose la unión de los dos monómeros al mismo tiempo; c) se pueden dar separaciones de 1 ó 2 nucleótidos entre dos repeticiones, la separación provoca el mismo efecto que la repetición E_U, dificultando la interacción proteína-proteína y la repetición separada tiene una función de apoyo E_S.

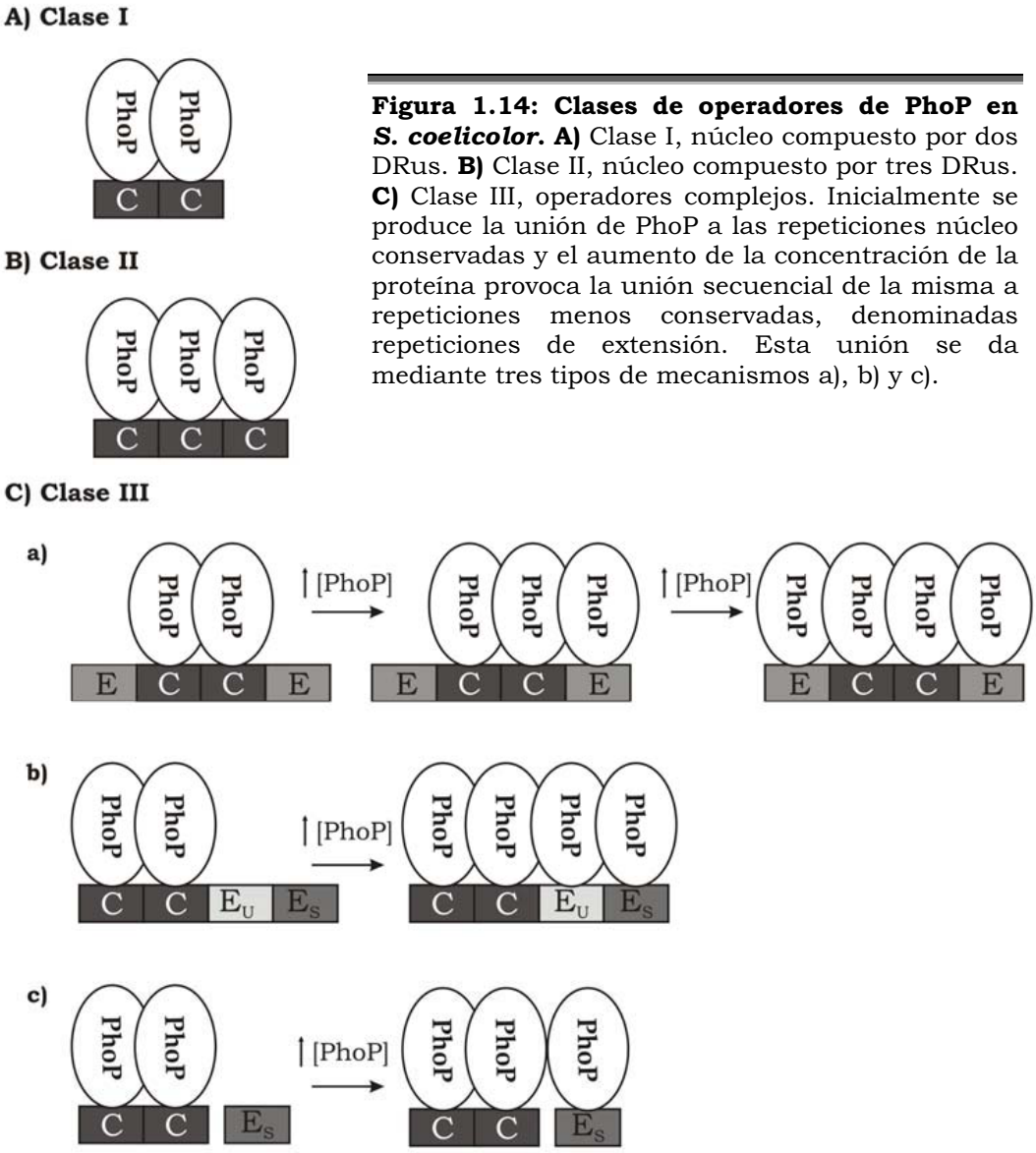


Figura 1.14: Clases de operadores de PhoP en *S. coelicolor*. A) Clase I, núcleo compuesto por dos DRus. **B)** Clase II, núcleo compuesto por tres DRus. **C)** Clase III, operadores complejos. Inicialmente se produce la unión de PhoP a las repeticiones núcleo conservadas y el aumento de la concentración de la proteína provoca la unión secuencial de la misma a repeticiones menos conservadas, denominadas repeticiones de extensión. Esta unión se da mediante tres tipos de mecanismos a), b) y c).

Inducción y represión génica por el regulador PhoB/PhoP

La respuesta a la escasez de fosfato requiere la expresión de ciertos genes y la represión de otros; así PhoP en algunos casos funciona como represor y en otros como activador.

En ***E. coli*** se ha descrito que **PhoB** ejerce su efecto activador uniéndose a la región -35 y **supliendo la carencia de la caja -35** que presenta los genes que regula (Makino *et al.*, 1986; Makino *et al.*, 1993). La unión de PhoB al ADN activa la transcripción contactando con la subunidad σ^{70} de la ARN polimerasa la cual es atraída hacia el promotor. Además se induce una curvatura en el ADN que facilita el reconocimiento por parte de ARN polimerasa de ciertas secuencias (Blanco *et al.*, 2002).

En el caso de ***B. subtilis*** son necesarias dos regiones para la completa transcripción de los genes del regulón *pho*, la primera se encuentra en la **zona promotora de los genes** y la segunda incluida en la **región codificante**. Es normal que ciertos reguladores presenten

zonas de unión dentro de la región codificante, pero por lo general esto se relaciona con la represión de la transcripción debido al bloqueo del progreso de la ARN polimerasa. En *B. subtilis* esta unión es necesaria para la completa activación de la transcripción y mientras que, tanto PhoP como PhoP fosforilada (PhoP-P) se unen a la zona promotora; sólo las moléculas de PhoP fosforiladas presentan unión dentro de la secuencia codificante de los genes. Estudios *in vitro* han demostrado que la activación de la transcripción se produce en presencia de PhoP-P y de la holoenzima σ^A ARN polimerasa (homólogo del factor σ^{70}), no siendo necesario ningún factor sigma adicional. El mecanismo por el cual es necesaria la unión de PhoP-P a las dos zonas para la completa transcripción no se conoce con exactitud (Liu *et al.*, 1998b; Qi y Hulett, 1998).

En el género ***Streptomyces*** es probable que la activación de la transcripción de los genes del regulón *pho* siga un **modelo similar al presentado en *E. coli***, ya que la zona de unión de PhoP al ADN se localiza, de manera general, en la zona promotora de dichos genes (Sola-Landa *et al.*,, 2005; Apel *et al.*, 2007; Santos-Beneit *et al.*, 2008; Rodríguez-García *et al.*, 2009; Santos-Beneit *et al.*, 2009b).

La **represión ejercida por PhoP** se puede llevar a cabo mediante diferentes mecanismos. Un mecanismo consiste en el **impedimento estérico** causado por la unión de la proteína en el promotor de un determinado gen lo que impide el reconocimiento de la secuencia por parte de la ARN polimerasa y por tanto su acción. La represión de PhoP sobre la expresión de *glnR,* regulador global del metabolismo del nitrógeno en *Streptomyces,* es un ejemplo de este mecanismo. La caja PHO solapa con el promotor por lo que la unión de PhoP a la zona promotora bloquea la unión de la ARN polimerasa y por lo tanto reprime la expresión de *glnR*. El segundo mecanismo se da por **competencia** entre PhoP y otra proteína por un mismo sitio de unión. Así, en el caso del gen *glnA*, glutamina sintetasa, se ha visto que PhoP compite con el regulador GlnR impidiendo la activación mediada por GlnR sobre la expresión de *glnA*. Por último, PhoP puede **interferir en la transcripción bloqueando la elongación** mediante la unión a una zona del ADN situada entre el promotor y la región codificante (mecanismo que se conoce como *road-block)*. En este caso la caja PHO no solapa con el promotor ni con los sitios de unión de otro regulador (en este caso GlnR) como ocurre en la zona promotora del gen *amtB* que codifica una proteína transportadora de nitrógeno (Rodríguez-García *et al.*, 2009).

La regulación transcripcional ejercida por PhoP es compleja ya que también puede actuar como **activador y represor para un mismo gen**. En los genes *phyC* (fitasa) de *Bacillus amyloliquefaciens* y *pitH2* (transportador de fosfato de baja afinidad) de *S. coelicolor,* la unión de PhoP al ADN se produce en la zona -35 del promotor, cuando la proteína se encuentra en baja concentración, lo que es esencial para la expresión del gen. Un aumento en la concentración de la proteína provoca la unión cooperativa de monómeros de PhoP a

cajas PHO adyacentes solapando con la caja -10 lo que impide la expresión del gen (Makarewicz *et al.*, 2006; Santos-Beneit *et al.*, 2008).

1.3.3. El regulón *pho*

El regulón *pho* fue definido, por primera vez, en *E. coli* como el conjunto de genes cuya expresión está bajo el control del sistema de dos componentes PhoR-PhoB (Torriani, 1990). En un principio los genes descritos del regulón *pho* estaban implicados principalmente en funciones de captación y degradación de fuentes extracelulares de fósforo; pero estudios posteriores han incrementado el número de genes y funciones pertenecientes a este grupo. El regulón *pho*, además de estar implicado en el control de la homeostasis del fosfato, es parte de una compleja red que interviene en la patogenicidad de esta bacteria y la respuesta al estrés (Lamarche *et al.*, 2008).

El desarrollo de técnicas ómicas ha permitido realizar un análisis global de los genes de *E. coli* afectados por la concentración de fosfato en el medio; así mediante estudios proteómicos se han detectado cerca de 400 genes implicados en esta respuesta (VanBogelen *et al.*, 1996). Sin embargo, hasta la fecha sólo 31 genes han sido confirmados como miembros del regulón *pho* (Hsieh y Wanner, 2010).

En *S. coelicolor,* mediante estudios transcriptómicos y proteómicos se han identificado 468 genes afectados por la deleción de *phoP* (Rodríguez-García *et al.*, 2007). La mayor parte de estos genes están implicados en la obtención de fosfato aunque también se han identificado otras funciones. La respuesta de la célula bacteriana ante una situación de deficiencia de fosfato supone la modificación de la expresión de un gran número de genes. Hasta el momento se han identificado fundamentalmente los genes implicados en la acción primaria que es la de captación de fosfato extracelular a partir de compuestos orgánicos como inorgánicos pero recientemente se han identificado nuevas dianas del regulador de respuesta, como genes relacionados con la regulación de otros factores nutricionales. En los siguientes apartados se describen los miembros del regulón *pho* que han sido definidos hasta el momento en el género *Streptomyces* (Figura 1.15) y también se mencionan ejemplos en otros microorganismos que se consideren de interés.

- **Respuesta primaria a la escasez de fosfato**

La respuesta a la escasez de fosfato comprende principalmente la inducción de proteínas relacionadas con la captación de fosfato inorgánico (Pi) a partir de compuestos orgánicos y el transporte de fosfato al interior celular.

Obtención de fosfato inorgánico de compuestos orgánicos

En la naturaleza se encuentran numerosas fuentes de fosfato procedentes de restos de animales y plantas, como son los fosfolípidos, azúcares fosforilados, nucleótidos y fitatos (inositol fosfatos) (Moura *et al.*, 2001). Sin embargo, en estos compuestos el fosfato se

encuentra en formas dificilmente asimilables para los microorganismos por lo que estos han desarrollado diferentes sistemas enzimáticos con los que poder hidrolizar los compuestos orgánicos de fósforo.

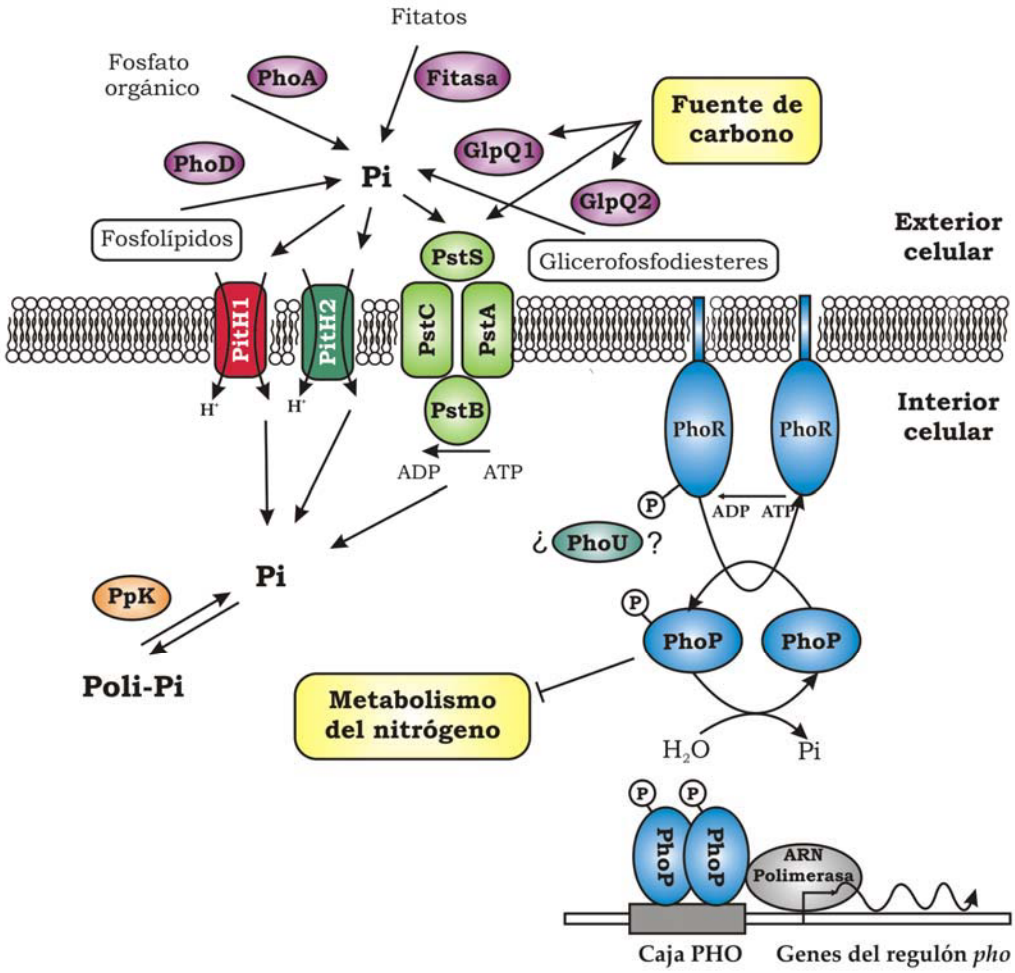


Figura 1.15: El regulón *pho* en *Streptomyces*. La escasez de fosfato en el medio provoca la fosforilación de la proteína sensora PhoR y la transferencia de un grupo fosforilo al regulador de respuesta PhoP. Esta proteína fosforilada se une a la zona promotora de los genes del regulón *pho* activando o reprimiendo su expresión. Existe una regulación cruzada entre el metabolismo del fosfato, del nitrógeno y del carbono. En rojo se muestra el transportador PitH1 que aunque no pertenezca al regulón *pho* parece estar implicado en el metabolismo del fosfato.

Ante una situación de limitación de fosfato, en el género *Streptomyces* se activan diferentes **fosfatasas** que son secretadas en grandes cantidades. La expresión de PhoA (fosfatasa alcalina) y PhoD (fosfolipasa D) está directamente activada por PhoP, mientras que PhoC (fosfatasa alcalina) se induce en condiciones de escasez de fosfato de manera independiente a PhoP (Apel *et al.*, 2007). El regulador PhoP también activa otros sistemas de obtención de fosfato como las **glicerofosfodiéster fosfodiesterasas** GlpQ1 y GlpQ2 (Santos-Beneit *et al.*, 2009b) y una **fitasa** (Rodríguez-García *et al.*, 2007; Sola-Landa *et al.*, 2008). La fosfatasa alcalina PhoA libera Pi de fosfatos orgánicos mientras que la fosfolipasa PhoD hace

uso de los fosfolípidos de la membrana como fuente de fosfato al igual que las glicerofosfodiéster fosfodiesterasas GlpQ1 y GlpQ2, las cuales son proteínas secretadas que hidrolizan los glicerofosfodiésteres (compuestos obtenidos por la deacilación de los fosfolípidos) para dar sn-glicerol-3-fosfato y el correspondiente alcohol (Larson *et al.*, 1983). Los fitatos son una abundante forma de almacenamiento de fosfato que se puede encontrar en granos y en residuos vegetales como cereales y legumbres (Kerovuo y Tynkkynen, 2000) por lo que es lógico que el género *Streptomyces*, y otros microorganismos habitantes del suelo como *B. subtilis* (Powar y Jagannathan, 1982), produzcan fitasas para acceder a esta fuente de fosfato.

Transporte de fosfato al interior celular

Una vez liberado el fosfato de los compuestos orgánicos es necesario el transporte al interior celular para que la célula pueda hacer uso de dicho elemento. El fosfato inorgánico puede atravesar la membrana bacteriana mediante dos sistema de transporte: el **sistema Pit** (*phosphate inorganic transport*) y el **sistema Pst** (*phosphate specific transport*). El sistema Pit, de baja afinidad por el fosfato, transporta el Pi quelado con un metal divalente (MeHPO4) mediante la energía aportada por el simporte de protones (van Veen *et al.*, 1994). Por otro lado, el sistema Pst presenta una alta afinidad por el fosfato y lleva a cabo el transporte gracias a la energía liberada por la hidrólisis de ATP. El sistema Pst es un transportador de tipo ABC, los cuales están formados por una proteína de unión al sustrato, una o dos proteínas de membrana y una proteína citoplasmática con función ATPasa que aporta la energía libre necesaria para el transporte (Higgins, 1992).

En el genoma de *S. coelicolor* se han identificado tres sistemas de transporte de fosfato: PitH1, PitH2 y PstSCAB. La expresión tanto de *pitH2* como de *pstSCAB* está regulada directamente por PhoP (Santos-Beneit *et al.*, 2008; Sola-Landa *et al.*, 2005). En condiciones de exceso de fosfato el transporte del mismo al interior celular se lleva a cabo mediante PitH1, en el momento en que se detecta una escasez de fosfato se expresa el transportador PitH2 y si la limitación continua se activa el sistema PstSCAB, transportador de alta afinidad que conlleva gasto de ATP. Es lógico que en primer lugar se active el sistema Pit ya que conlleva un menor gasto energético para la célula que el sistema Pst (Santos-Beneit *et al.*, 2008).

En el género *Streptomyces* no se ha definido ningún sistema capaz de transportar al interior celular fosfato orgánico pero este tipo de transportadores si se encuentran en otros microorganismos. Tanto *E. coli* como *C. glutamicum,* presentan un sistema Ugp capaz de transportar fosfato orgánico (glicerofosfodiésteres y glicerol-3-fosfato) para utilizarlo como fuente de fosfato cuando el Pi escasea (Schweizer y Boos, 1984; Ishige *et al.*, 2003). Aunque la mayor parte de las moléculas fosforiladas que se encuentran en la naturaleza son ésteres de fosfato, en los cuales el fósforo se encuentra unido al átomo de oxígeno, también se

encuentran otros compuestos fosforilados en los que el fósforo se enlaza directamente con un átomo de carbono, como son los fosfonatos. *E. coli* también tiene la capacidad de utilizar este tipo de compuestos fosforilados como fuente de fosfato y dicha función está codificada por el operón *phn* de 14 genes (*phnCDEFGHIJKLMNOP*) (Chen *et al.*, 1990). Los sistemas Ugp y el operón *phn* son miembros del regulón *pho* en estos microorganismos.

Consumo de material de almacenamiento

Otra de las estrategias de la célula para sobrevivir a la escasez de fosfato es el consumo de material de almacenamiento que contiene fósforo, como polifosfatos, nucleótidos o ácidos teicóicos.

Al igual que ocurre en *B. subtilis* (Liu *et al.*, 1998a) es posible que en condiciones de escasez de fosfato, el género *Streptomyces* responda sustituyendo **material de la pared celular** rico en fósforo como los ácidos teicóico por otros polímeros que no contienen dicho elemento. Aunque hasta el momento no se ha caracterizado la agrupación génica de biosíntesis de los ácidos teicóicos en *S. coelicolor*, si se han identificado cinco agrupaciones de genes implicados en la biosíntesis de la pared celular que se encuentran bajo el control de PhoP (Rodríguez-García *et al.*, 2007).

La escasez de fosfato en la célula también está relacionada con el balance energético ATP/ADP. En estas condiciones la relación ATP/ADP es baja (Martín *et al.*, 1978) y la enzima PpK actúa como nucleósido difosfato quinasa regenerando ATP a partir de ADP y polifosfatos. Los **polifosfatos** son polímeros de fosfato de reserva que se forman en condiciones de alto fosfato y son hidrolizados cuando hay necesidad de fosfato en la célula. La enzima PpK es capaz de sintetizar polifosfatos a partir de ATP así como de regenerar ATP a partir de polifosfatos en presencia de un exceso de ADP. La expresión del gen *ppK* está inducida en condiciones de escasez de fosfato y posiblemente se encuentre bajo el control de PhoP aunque no se ha confirmado la unión de PhoP a la zona promotora de dicho gen (Chouayekh y Virolle, 2002; Ghorbel *et al.*, 2006b).

Interacción entre el fosfato y el metabolismo del nitrógeno y del carbono

El crecimiento bacteriano requiere una concentración equilibrada de las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. La integración de las diferentes señales nutricionales permite a la célula bacteriana redirigir los recursos energéticos a la obtención de unos u otros nutrientes y de esta manera adaptarse a los adversos cambios que se producen en la naturaleza.

Control del fosfato sobre el metabolismo del nitrógeno

El metabolismo del nitrógeno en el género *Streptomyces* está bajo el control de dos reguladores globales de la familia OmpR: GlnR y GlnRII (Fink *et al.*, 2002). GlnR es un activador/represor que controla muchas de las rutas importantes relacionadas con la asimilación de nitrógeno (Tiffert *et al.*, 2008). Ante una situación de limitación de nitrógeno, GlnR activa la transcripción de *glnA* y *glnII,* genes que codifican glutamina sintetasas, las cuales son enzimas implicadas en la asimilación de amonio en forma de nitrógeno orgánico (Merrick y Edwards, 1995). El operón *amtB-glnK-glnD* implicado en el transporte de amonio también se encuentra bajo el control positivo de GlnR. Por otra parte GlnRII, el segundo regulador, presenta una secuencia aminoacídica similar a GlnR y también se une a la zona promotora de *glnA, glnII* y *amtB*. Sin embargo, no es estrictamente un homólogo a GlnR y su papel en el metabolismo del nitrógeno no ha sido todavía definido (Reuther y Wohlleben, 2007).

En condiciones de escasez de fosfato se produce una represión de los genes del metabolismo del nitrógeno. El control que ejerce PhoP sobre el metabolismo del nitrógeno tiene lugar a **dos niveles**: en *S. coelicolor* se ha comprobado que PhoP se une al promotor de ***glnR***, el regulador global, y además también se une a la zona promotora de ***glnA, glnII* y *amtB***. Este doble mecanismo de regulación asegura un fino control de PhoP sobre los genes *glnA, glnII* y *amtB-glnD-glnK.* (Rodríguez-García *et al.*, 2009). El control negativo que ejerce PhoP sobre los genes del metabolismo del nitrógeno, provoca un ahorro de los recursos de la célula empleados en la asimilación de nitrógeno y canaliza las funciones génicas hacia la obtención de fosfato.

Regulación cruzada entre el metabolismo del fósforo y del carbono

En el género *Streptomyces* no se ha definido una interacción global entre el metabolismo del fósforo y del carbono pero si se han descrito algunos **miembros del regulón *pho*** que a su vez están **regulados por diferentes fuentes de carbono** (Martín y Liras, 2010)**.**

En `*S. lividans´*, la proteína de unión a fosfato PstS, integrante del sistema de transporte de fosfato inorgánico de alta afinidad Pst, se acumula en el sobrenadante en cultivos suplementados con ciertas fuentes de carbono como fructosa, galactosa o manosa (Diaz *et al.*, 2005). La expresión de PstS está fuertemente inducida por PhoP (Sola-Landa *et al.*, 2005; Rodríguez-García *et al.*, 2007) pero éste no es el único regulador, ya que se ha observado una expresión basal de PstS independiente de PhoP. Aunque el fosfato es la principal señal para la activación de PstS, esta proteína también se encuentra bajo el control de otro regulador que puede actuar en función de la fuente de carbono presente en el medio (Esteban *et al.*, 1998).

Este doble control sobre PstS por dos reguladores del metabolismo del fosfato y del carbono también se ha detectado en *C. glutamicum*. En condiciones limitantes de fosfato, la

expresión del operón *pstSCAB* se encuentra bajo el control del sistema de dos componentes PhoS-R (ortólogo del sistema PhoR-P de *Streptomyces* spp.) y del regulador GlxR (Panhorst *et al.*, 2010). El regulador GlxR tiene un efecto represor sobre los genes de bypass del glioxilato y se ha demostrado *in vitro* su unión a diversos genes implicados en el metabolismo central del carbono (Park *et al.*, 2010).

Otro ejemplo de interacción fosfato-carbono lo encontramos en las glicerofosfodiéster fosfodiesteras GlpQ1 y GlpQ2 de *S. coelicolor*. Estas son enzimas extracelulares necesarias para la utilización de los glicerofosfodiésteres bien como fuente de carbono o de fosfato dependiendo de los requerimientos nutricionales de la bacteria. Tanto *glpQ1* como *glpQ2* están bajo el control de PhoP (Rodríguez-García *et al.*, 2007) pero su expresión también se encuentra afectada por la fuente de carbono presente en el medio (Santos-Beneit *et al.*, 2009b).

Por otro lado, si se ha descrito una interacción global entre el metabolismo del fósforo y del carbono en otros microorganismos, como por ejemplo en *B. subtilis*. En esta bacteria, se ha demostrado que el sistema de dos componentes PhoR-P se encuentra bajo el control de la proteína A de control catabólico CcpA (del inglés, *catabolite control protein A*).

Respuesta a la escasez de fosfato y producción de metabolitos secundarios

La biosíntesis de metabolitos secundarios es dependiente de la fase de crecimiento en la que se encuentre el microorganismo y se desencadena ante la falta de alguno de los elementos nutricionales principales, especialmente el fosfato (Martin y Demain, 1980; Doull y Vining, 1990; Martin, 2004). Una alta concentración de fosfato en el medio reduce significativamente la producción de metabolitos secundarios en el género *Streptomyces.* La sensibilidad ante la escasez de fosfato es diferente para las distintas clases de productos, así se ha comprado que la biosíntesis de macrólidos como la pimaricina o la candicidina es muy sensible a la concentración de fosfato en el medio (Asturias *et al.*, 1990; Mendes *et al.*, 2007), donde una concentración de 2 mM suprime la producción de pimaricina por *S. natalensis* casi en su totalidad. En cambio, la biosíntesis de otros antibióticos, como las cefamicinas, se inhibe a concentraciones en torno a 10-20 mM.

En los últimos años, se han comenzado a desentrañar los mecanismos implicados en la respuesta a la escasez de fosfato en el género *Streptomyces*. El sistema de dos componentes PhoR-P, actor principal de la cascada de respuesta, ha sido definido y caracterizado así como muchos de los genes del regulón *pho*. También se ha profundizado en los mecanismos de unión de PhoP al ADN y la regulación transcripcional mediada por dicha proteína. Sin embargo, aún no se ha llegado a definir la cascada completa que va desde la detección de la señal por el sistema PhoR-P hasta los genes de biosíntesis de metabolitos secundarios.

Dichos genes no están regulados de manera directa por el regulador de respuesta PhoP ya que se ha comprobado tanto en *S. natalensis* como en *S. coelicolor* que PhoP no se une a las zonas promotoras ni de los genes de biosíntesis ni de los reguladores específicos de los mismos (Mendes *et al.*, 2007; Santos-Beneit *et al.*, 2009a). Por lo tanto deben existir otros factores implicados en la producción de metabolitos secundarios relacionados con la respuesta a la escasez de fosfato.

En *S. coelicolor*, la producción de antibióticos además de estar bajo el control de reguladores específicos de ruta, se encuentra regulada por diversos reguladores pleiotrópicos. Entre estos se encuentra AfsR, regulador positivo de la biosíntesis de antibióticos bajo ciertas condiciones nutricionales (Floriano y Bibb, 1996). El control de AfsR sobre el metabolismo secundario implica diferentes genes entre los que se encuentra el factor semejante a sigma *afsS* (Lee *et al.*, 2002), el cual activa los reguladores específicos de ruta *actII*-ORF4 y *redD* disparando la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina (Horinouchi, 2003). Recientemente, se ha demostrado la existencia de una regulación cruzada entre PhoP y AfsR (Santos-Beneit *et al.*, 2009a), PhoP se une a la zona promotora de *afsS* compitiendo con AfsR y ésta se une a la zona promotora de *phoR-P* y *pstS* genes del regulón *pho*. En este trabajo se demuestra por primera vez el control de PhoP sobre un gen regulador del metabolismo secundario.

La proteína PhoP es un regulador global que afecta, de manera directa o indirecta, a un gran número de genes pero aún no está claro su papel en la biosíntesis de metabolitos secundarios. En `*S. lividans*´ y en *S. natalensis* la deleción de PhoP aumente la producción de antibióticos en medio complejo rico en fosfato (Sola-Landa *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2007) lo que sugiere la acción de PhoP como represor del metabolismo secundario, mientras que en *S. coelicolor* PhoP actúa como activador de la biosíntesis de undecilprodigiosina y actinorrodina en medio definido (Santos-Beneit *et al.*, 2009a). La regulación mediada por PhoP puede ser diferente dependiendo de la especie o dependiendo del medio de cultivo utilizado para la producción.

1.4. Tacrolimus

1.4.1. Inmunosupresores

A principios de los años 60 se realizaron los primeros trasplantes de órganos, en 1963 se consiguió el primer trasplante de hígado y casi cinco años después el primero de corazón. Durante los años 60 y 70 se realizaron numerosos trasplantes de órganos en todo el mundo pero con resultados poco satisfactorios, ya que muy pocos pacientes superaron el año tras la intervención. Hay que esperar a los ochenta para que las mejoras de todo tipo: quirúrgicas, de anestesia, de manejo de la coagulación, pero sobre todo de inmunosupresión lleven a una verdadera explosión de la técnica (www.ont.es). Las terapias de inmunosupresión actúan inhibiendo el sistema inmune de manera que se **evita el rechazo al nuevo órgano**.

El uso tradicional de corticoides como tratamiento anti-rechazo tras el trasplante ha sido reemplazado por fármacos inhibidores de la calcineurina, como la ciclosporina A y el **tacrolimus**. Los corticoides afectan a varias líneas de leucocitos mientras que los inhibidores de la calcineurina, debido a **su efectividad específica sobre las células T**, han reducido los casos de rechazo y las infecciones secundarias provocadas por el tratamiento con corticoides (Duncan y Wilkes, 2005). En los últimos años, el uso de la ciclosporina A ha disminuido en favor del tacrolimus debido a la menor toxicidad y especialmente a la **mayor efectividad** de este último (Gummert *et al.*, 1999; Meier-Kriesche *et al.*, 2006).

El inmunosupresor tacrolimus (*Tsukuba macrolide immunosuppressant*), o también conocido como FK506 o Fujimycin, fue aislado por primera vez en 1984 en caldos de fermentación de *`Streptomyces tsukubaensis´* por la empresa farmacéutica japonesa Fujisawa Pharmaceutical Co. (Kino *et al.*, 1987a; Kino y Goto, 1993). Este compuesto, producido por especies filogenéticamente diferentes del género *Streptomyces* (Garrity *et al.*, 1993), fue el primer inmunosupresor macrólido descubierto. Posteriormente, se han descubierto varias moléculas muy similares en estructura y función como la rapamicina (sirolimus) y la ascomicina (FK520 o FR-900520), entre otros (Figura 1.16).

Estructuralmente, el tacrolimus es un anillo lactona macrólido de 23 miembros. Por su parte, la ascomicina es un compuesto prácticamente idéntico con una única diferencia en el carbono 21, donde el tacrolimus presenta una cadena lateral alilo ($-CH_2=CH_2$) y la ascomicina una cadena etilo ($-CH_2-CH_3$). Mientras que la rapamicina, de estructura no tan similar, está compuesta por un anillo de 31 átomos con tres enlaces dobles conjugados (Reynolds y Demain, 1997).

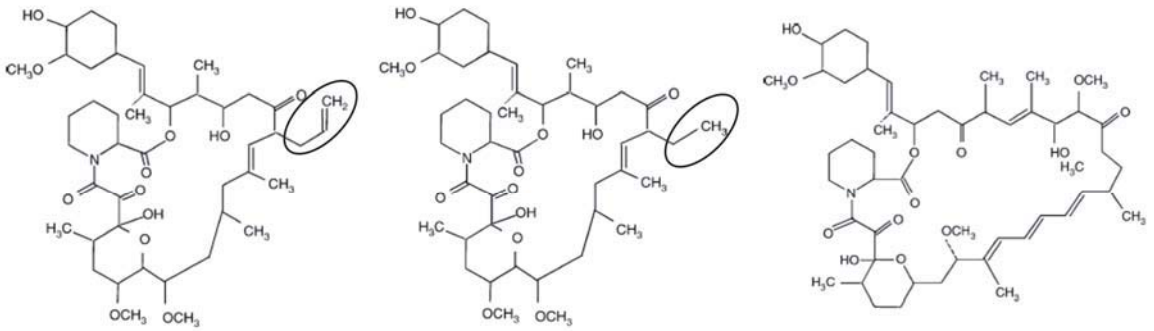


Figura 1.16: Estructura química de tacrolimus y otros macrólidos inmunosupresores. La ascomicina sólo difiere del tacrolimus en la cadena lateral del carbono 21 (indicado con un óvalo) mientras que la rapamicina presenta una estructura más diferente.

El tacrolimus, tras aprobarse su uso desde mediados de los años noventa, se utiliza fundamentalmente para prevenir el rechazo en pacientes trasplantados de hígado, de riñón o de corazón. También puede utilizarse para el tratamiento del rechazo a aloinjertos cuando otros medicamentos inmunosupresores no son eficaces. Durante más de una década, el tacrolimus se ha comercializado por la compañía Astellas Pharma (surgida de la fusión de las compañías Fujisawa y Yamanouchi) bajo la marca comercial Prograf (adultos) Advagraf (adultos, de liberación más lenta que Prograf) y Modigraf (niños) (www.emea.europa.eu). La patente para la comercialización del tacrolimus ostentada por Astellas Pharma expiró en EEUU en abril del 2008 y en Europa durante el 2009; por lo que recientemente otras compañías se han introducido en este mercado, consiguiendo la aprobación en EEUU para la comercialización de dicho inmunosupresor como fármaco genérico, en 2009 Sandoz y en 2010 Watson Laboratories, Inc., Mylan Pharma y Dr Reddys Labs LTD (www.fda.gov).

Los inhibidores de la calcineurina también son efectivos en el tratamiento de la dermatitis atópica (Koo *et al.*, 2005; Ingram *et al.*, 2009), comercializándose el tacrolimus bajo el nombre de Protopic y la ascomicina como Pimecrolimus en forma de pomada. Además estos compuestos presentan una potente actividad antifúngica, lo que sugiere un papel en la naturaleza como inhibidores de microorganismos competidores de la especie de *Streptomyces* que los produce (Arndt *et al.*, 1999).

El tacrolimus presenta un amplio rango de aplicaciones, especialmente en enfermedades autoinmunes. Aunque estos usos aún se encuentran en fase experimental; actualmente se ha probado la eficacia y seguridad en el tratamiento de la artritis reumatoide (Akimoto *et al.*, 2008); y también se han obtenido buenos resultados en el tratamiento de la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn y otras enfermedades autoinmunes. Estos resultados aún deben ser confirmados con estudios clínicos más amplios (Benson *et al.*, 2008).

Los agentes inmunosupresores como el tacrolimus y la rapamicina también presentan propiedades antimitóticas, anticoagulantes y anti-inflamatorias por lo que también se utilizan en stents, dispositivos metálicos colocados en arterias coronarias para evitar su obstrucción (Romano *et al.*, 2010). La neurorregeneración y la neuroprotección son otras de las propiedades que presenta el tacrolimus por lo que podría ser efectivo en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson (Guo *et al.*, 2001). Todas estas posibles nuevas aplicaciones son cuidadosamente analizadas para valorar los riesgos y ventajas de las terapias con tacrolimus, ya que el tratamiento con este compuestos presenta efectos secundarios como nefrotoxicidad o hipertensión que hay que valorar (Bai *et al.*, 2010).

Actualmente, la investigación biotecnológica en torno al tacrolimus, se centra en el desarrollo de análogos con la misma actividad inmunosupresora pero menor toxicidad y que presenten una mayor facilidad en la administración al paciente (Borris *et al.*, 1990; Moss *et al.*, 2010).

1.4.2. Mecanismo de acción de los inmunosupresores

El mecanismo de acción de estos compuestos inmunosupresores se basa en el bloqueo de la actividad de los **linfocitos T**. Aunque químicamente no están relacionados, el tacrolimus y la ciclosporina A ejercen su efecto de manera muy similar mediante la inactivación de la **calcineurina** (Wiederrecht *et al.*, 1993), mientras que la rapamicina, compuesto macrólido al igual que tacrolimus, bloquea una ruta diferente de activación de los linfocitos T (Neuhaus *et al.*, 2001).

El tacrolimus o FK506 difunde a través de la membrana plasmática de las células T (Figura 1.17) uniéndose en el interior citoplasmático a una proteína denominada inmunofilina **FKBP12** (del inglés *FK506-binding protein-12KDa*) (Siekierka *et al.*, 1989). La ciclosporina A actúa de manera similar uniéndose a una inmunofilina denominada **ciclofilina** (CpN, del inglés *cyclophilin*). Los complejos formados por los fármacos inmunosupresores y las inmunofilinas bloquean la función de la calcineurina, una serina/treonina fosfatasa dependiente de calcio, impidiendo su acceso y desfosforilación a determinados sustratos (Clipstone y Crabtree, 1992) como el NFAT (del inglés *nuclear factors of activated T cells*). Si la fracción citosplasmática del NFAT no es desfosforilada no puede acceder al núcleo donde se une a la fracción nuclear formando el complejo activo de este factor transcripcional. Entre los genes regulados por los factores NFAT, se encuentran genes que se requieren para la ayuda de las células B, como la interleucina 4 (IL-4) y el ligando CD40 y genes implicados en la proliferación de las células T, como la interleucina 2 (IL-2). Por la tanto la presencia de los fármacos inmunosupresores en las células T origina una depresión en el sistema inmune, evitando así el rechazo al órgano trasplantado (Ho *et al.*, 1996; Dumont, 2000).

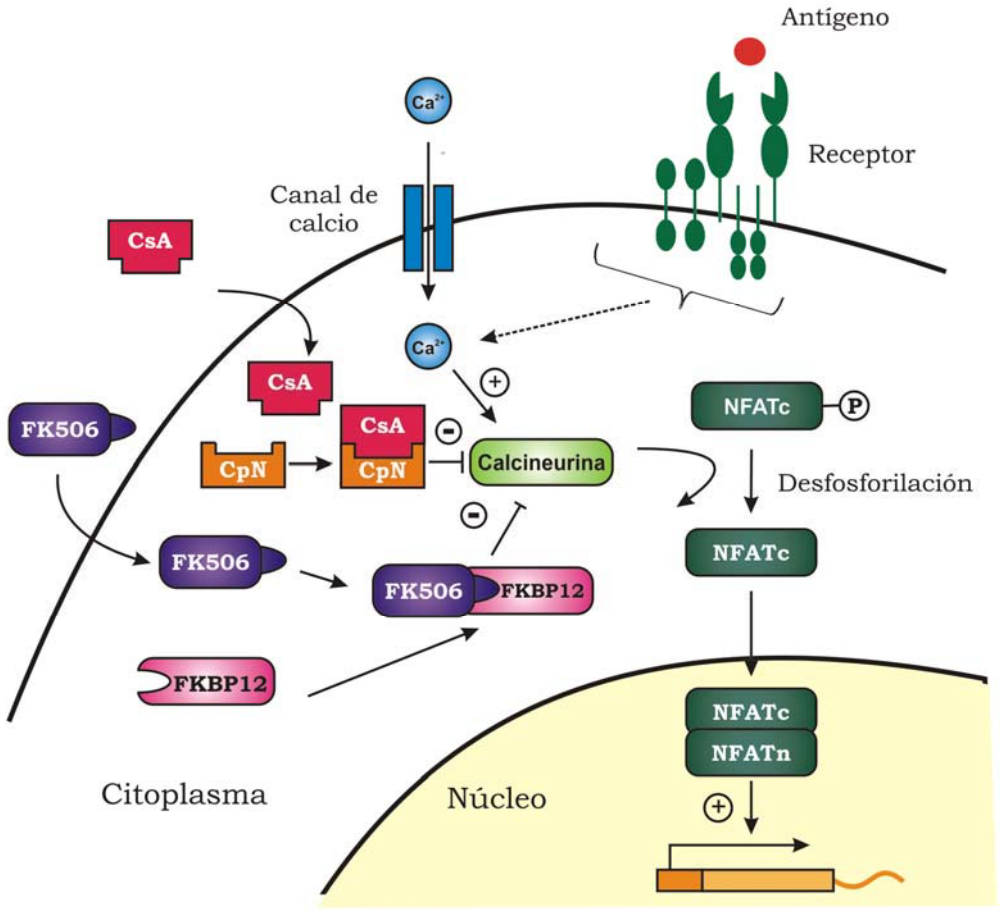


Figura 1.17: Mecanismo de acción del tacrolimus (FK506) y de la ciclosporina A (CsA). En el interior celular el tacrolimus se une a FKBP12 y la ciclosporina A a CpN, ambos complejos bloquean la fosfatasa calcineurina. El reconocimiento de un antígeno por parte de los receptores de membrana de las células T provoca un aumento de calcio en el citoplasma y la consiguiente activación de la calcineurina. Esta proteína actúa desfosforilando la subunidad citoplasmática del factor transcripcional NFAT (NFATc) permitiendo su acceso al núcleo. En el núcleo se produce la unión con la subunidad nuclear (NFATn) formado el complejo activo. El NFAT activo regula la transcripción de ciertos genes implicados en la activación de la respuesta inmune (Modificado de Expert reviews in Molecular Medicine © Cambridge University Press ISSN 1462-3994).

1.4.3. Biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus

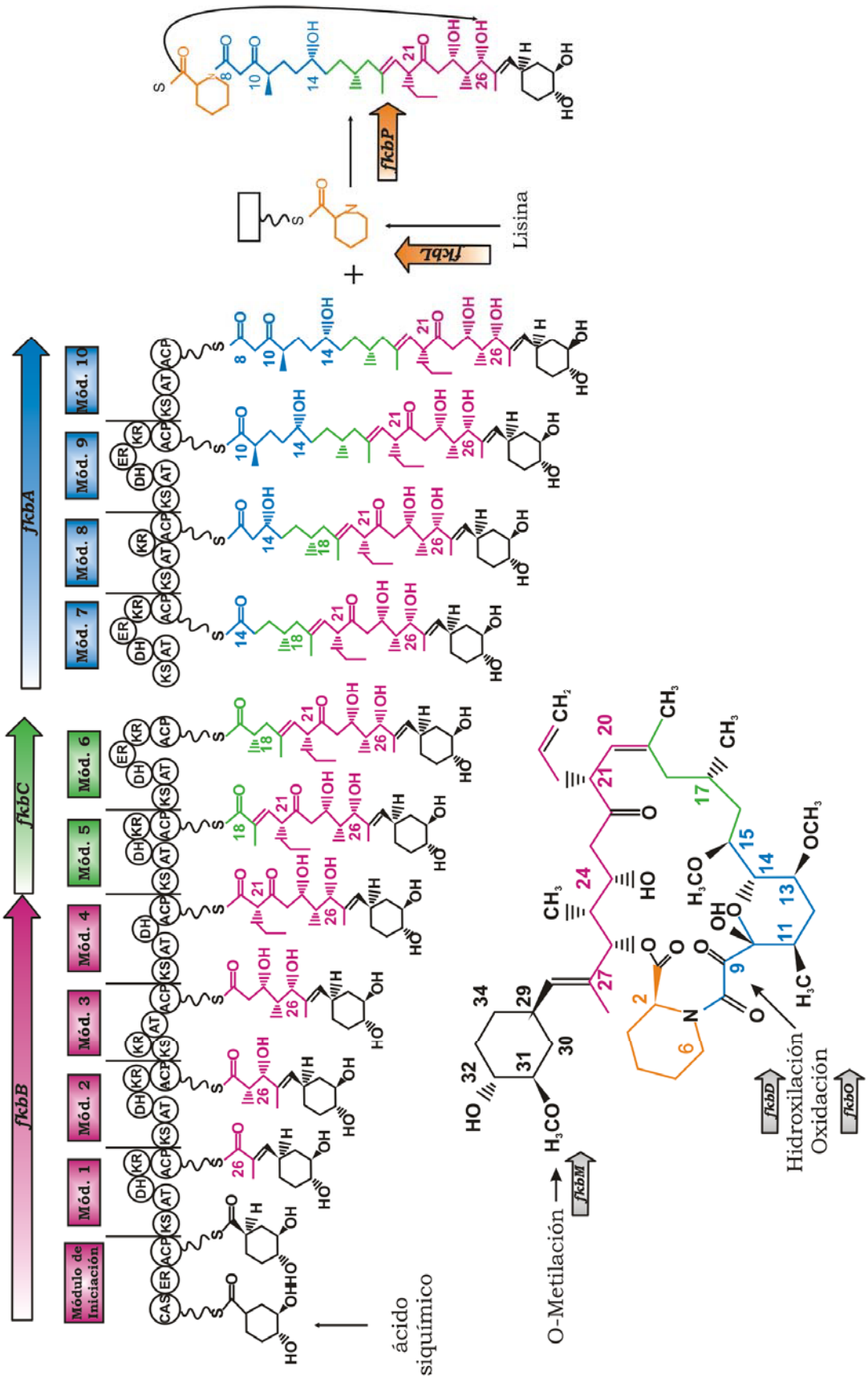
La ruta de biosíntesis de tacrolimus es similar a la de otros policétidos macrólidos descritos hasta el momento, como la eritromicina (Cortes *et al.*, 1990) o la rapamicina (Schwecke *et al.*, 1995) y sigue un mecanismo similar a la biosíntesis de ácidos grasos. Dicha ruta consiste en una **condensación secuencial de ácidos carboxílicos** de cadena corta (normalmente 2-4 átomos de carbono), activados en forma de ésteres de coenzima A (CoA), en la cual están implicados complejos sistemas enzimáticos conocidos como policétido sintasas.

En la síntesis de los inmunosupresores tacrolimus, rapamicina y ascomicina están implicados sistemas híbridos de **policétidos sintasas** (PKS, del inglés *polyketide*

synthases)/**sintasas de péptidos no ribosomales** (NRPS, del inglés *nonribosomal peptide synthases*). Existen dos tipos de policétidos sintasas; en la formación del anillo de tacrolimus intervienen las de tipo I, las cuales se componen de combinaciones de dominios agregados en módulos formando proteínas de gran tamaño, cada módulo individual está implicado en un ciclo de extensión de la cadena. Mientras que las policétido sintasas de tipo II se componen de grupos de proteínas con una única función que intervienen de manera repetida hasta que la cadena es completada (Hopwood y Sherman, 1990).

La unidad iniciadora en la biosíntesis de tacrolimus es **dihidrociclohexil-carbonil-CoA**, un derivado del ácido siquímico (precursor de los aminoácidos aromáticos). Las unidades que van a constituir el esqueleto carbonado comprenden 2 moléculas de **malonil-CoA** (pasos 3 y 10), 5 moléculas de **metilmalonil-CoA** (pasos 1, 2, 5, 6 y 9), 2 moléculas de **metoximalonil-CoA** (pasos 7 y 8) y una molécula de 5 átomos de carbono (**propilmalonil-CoA** o **alilmalonil-CoA**) (paso 4). En la biosíntesis de la ascomicina se ha descrito que la unidad que se incorpora en el paso 4 es etilmalonil-CoA; dicha unidad supondrá la diferencia con la molécula de tacrolimus. Cada módulo de extensión de las policétido sintasas incorpora de manera específica una unidad extendedora, cataliza pasos específicos de procesamiento de los grupos β-ceto y pasa la cadena al siguiente módulo (Figura 1.18). Tras 10 rondas de condensación, una molécula de **pipecolato** (derivado del metabolismo de la lisina) se une a la cadena mediante la formación de un enlace amida con un grupo acilo seguido de la ciclación de la cadena formando el anillo macrólido. Dicho anillo sufre diferentes modificaciones post-policétido sintasa: el carbono 9 es hidroxilado y oxidado dando lugar a la configuración α–cetoamida y el grupo hidroxilo presente en el carbono 31 es metilado (Motamedi *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2000; Goranovic *et al.*, 2010).

Figura 1.18: Ruta de biosíntesis de tacrolimus. Las flechas que aparecen en la parte superior representan las policétido sintasas y los rectángulos marcan los módulos (Mod.) de los que se componen cada policétido sintasa. Los diferentes dominios catalíticos se representan con círculos: ACP, proteína transportadora de grupos acilo; AT, acil transferasa; CAS, CoA-sintasa; DH, deshidratasa; ER, enoil-reductasa; KR, oxoacil-reductasa; KS, oxoacil-sintasa. La cadena policetídica aparece en diferentes colores dependiendo de la policétido sintasa que está implicada (rosa FkbB, verde FkbC y azul FkbA), la unidad iniciadora se representa en negro y en naranja el ácido pipecólico. En la parte inferior izquierda se recoge la estructura completa del tacrolimus con las diferentes modificaciones post-policétido sintasa. Algunos de los genes implicados en la biosíntesis de tacrolimus se representan con flechas anchas marcando la función que desempeñan. (Modificado de Motamedi y Shafiee, 1998).


fkbB
fkbC
fkbA
Módulo de Iniciación
Mód. 1
Mód. 2
Mód. 3
Mód. 4
Mód. 5
Mód. 6
Mód. 7
Mód. 8
Mód. 9
Mód. 10
ácido siquímico
fkbL
Lisina
fkbP
O-Metilación
fkbM
Hidroxilación
Oxidación
fkbD
fkbO

1.4.4. Agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus

La secuenciación y análisis de la región central, que incluye las policétido sintasas, de la agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus se ha llevado a cabo principalmente en la cepa *Streptomyces* sp. ATCC 53770 (MA 6548) (Motamedi *et al.*, 1997; Motamedi y Shafiee, 1998) y en menor medida en *Streptomyces* sp. ATCC 55098 (MA 6858) (Shafiee *et al.*, 1994). Dichas cepas fueron aisladas y patentadas por la compañía Merck durante los años 90. Recientemente, se ha completado la secuenciación de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus en otra especie productora `*S. tsukubaensis*´ NRRL 18488 (Goranovic *et al.*, 2010). Por otro lado, la agrupación génica de biosíntesis de la ascomicina (compuesto muy similar al tacrolimus) ha sido secuenciada por completo en la cepa *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* ATCC 14891 (Wu *et al.*, 2000). La región central donde se localizan las policétido sintasas así como otros genes flanqueantes (*fkbL*, *fkbD* y *fkbM*) presentan una misma sintenia y similar secuencia en ambas agrupaciones de biosíntesis (Figura 1.19).

A la izquierda de *fkbL,* ambas agrupaciones comparten un grupo de genes (*fkbG, H, I, J, K*) implicados en la incorporación de los grupos metoxilo en los carbonos 13 y 15 mediante la inusual unidad extendedora metoximalonil-CoA utilizada en los pasos 7 y 8 de la formación de la cadena. Los genes que se localizan a la izquierda de la sub-agrupación de biosíntesis de metoximalonil-CoA son diferentes. Así, en la agrupación génica para la ascomicina se encuentra un grupo de genes (*fkbU, W, E, F*) implicado en la provisión de la unidad extendedora de etilmanolil-CoA que dará lugar al grupo etilo del carbono 21. Mientras que en la agrupación génica de tacrolimus se localiza un grupo de genes (*allA, K, R, D, M, P, O, S*) implicado en la formación de la unidad extendedora de cinco carbonos (propilmalonil-CoA o alilmalonil-CoA) que va a dar lugar al grupo alilo del carbono 21.

En las regiones flanqueantes también se han localizado algunos genes reguladores. En la agrupación génica de la ascomicina a la derecha de *fkbM* se localiza *fkbN*, homólogo a un posible regulador de la colesterol oxidasa. En la parte izquierda de la agrupación aparecen *fkbR1* y *fkbR2* posibles reguladores, el primero relacionado con la familia de reguladores LysR transcripcionales y el segundo con la familia de proteínas reguladoras del tipo monoamino oxidasa. Por último, en la región 3´ de *fkbN* se encuentra *fkbQ*, con homología a una tioesterasa de tipo II; se propone que está proteína está implicada en la corrección de errores que se hayan llevado a cabo durante la actuación de las policétido sintasas (Wu *et al.*, 2000). En la agrupación correspondiente a tacrolimus sólo se ha localizado el factor de transcripción *allN* perteneciente a la familia de reguladores AsnC (Goranovic *et al.*, 2010).

Ninguno de los genes secuenciados hasta el momento está implicado en la biosíntesis de la unidad iniciadora derivada del ácido siquímico; al igual que tampoco se han localizado en la agrupación génica de biosíntesis de la rapamicina (Schwecke *et al.*, 1995). Es probable que enzimas de metabolismo primario desempeñen esta función.

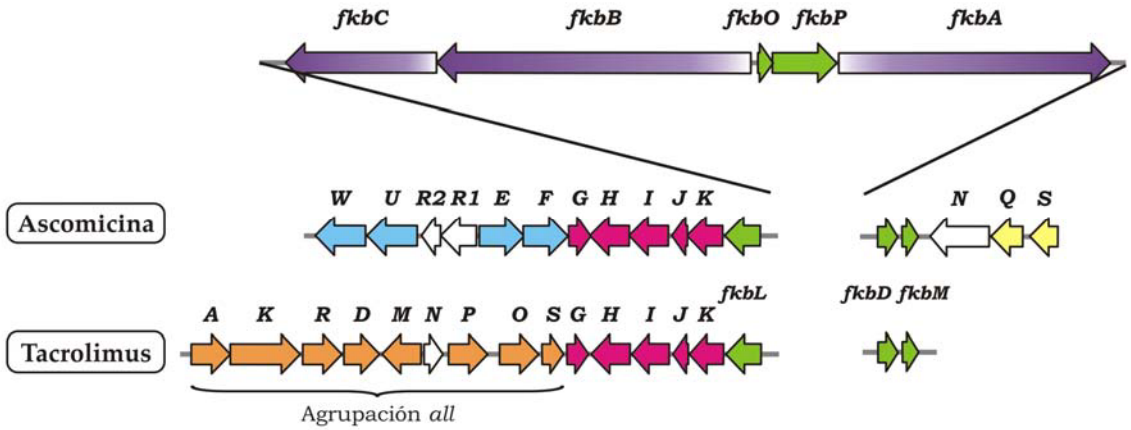


Figura 1.19: Agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus y de ascomicina. Los genes que constituyen las policétido sintasas (morado) y otros genes flanqueantes que están implicados en funciones de comienzo, finalización del anillo y modificaciones post-policétido sintasa (verde) presentan una sintenia y secuencia similar en ambas agrupaciones génicas. En amarillo aparecen los genes flanqueantes localizados a la derecha que sólo han sido secuenciados en la agrupación génica de biosíntesis de ascomicina. El grupo de genes implicados en la formación de unidad extendedora inusual metoximalonil-CoA (rosa) es localizado en ambas agrupaciones mientras que a la izquierda se encuentran diferentes grupos de genes (azul en la ascomicina y naranja en tacrolimus) los cuales están implicados en la formación de la unidad extendedora que se va a localizar en el carbono 21 y marca la única diferencia entre ambos inmunosupresores. En blanco se representan posibles genes reguladores.

En la siguiente tabla (Tabla 1.1) se recogen los genes que conforman la agrupación génica de biosíntesis del tacrolimus y sus respectivas funciones.

Tabla 1.1: Agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus. Tabla resumen con los nombres y funciones de los genes que se localizan en la agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus.

Gen	Función
fkbA, fkbB y fkbC	Policétido sintasas tipo I
fkbL	α-deaminación y ciclación de la lisina en pipecolato
fkbP	activación e incorporación del pipecolato en la cadena policetídica
fkbO	oxidación en el anillo macrocíclico
fkbM	Metiltransferasa
fkbD	C9-hidrolasa
fkbG, H, I, J, K	Formación metoximalonil-CoA que va a incorporar los grupos metoxilo en los carbono 13 y 15
allA, K, R, D, M, P, O, S	Formación de propilmalonil-CoA o alilmalonil-CoA que va a incorporar el grupo alilo del carbono 21
allN	Factor de transcripción perteneciente a la familia AsnC

1.4.5. Especies del género *Streptomyces* productoras de inmunosupresores

Tras el descubrimiento de `*S. tsukubaensis*´ como productor de tacrolimus, numerosos esfuerzos se han centrado en la búsqueda de nuevas cepas de *Streptomyces* productoras de inmunosupresores (Tabla 1.2). Con el objetivo de profundizar en la relación entre estas cepas se han realizado diferentes estudios taxonómicos que han puesto de manifiesto una gran lejanía filogenética de las cepas productoras de inmunosupresores dentro del género *Streptomyces*. Esto sugiere la transferencia horizontal de genes como explicación a que estas cepas compartan rutas de biosíntesis similares (Garrity *et al.*, 1993; Muramatsu *et al.*, 2005).

Tabla 1.2: Especies del género *Streptomyces* productoras de compuestos inmunosupresores utilizados en trasplantes de órganos.

Inmunosupresor	Sinónimo	Productor	Referencias
Tacrolimus	FK506 Fujimycin	`*Streptomyces tsukubaensis*´	Kino *et al.*, 1987a
		Streptomyces sp. ATCC 55098 (MA 6858)	Dumont *et al.*, 1992
		Streptomyces sp. ATCC 53770 (MA 6548)	Garrity *et al.*, 1993
		Streptomyces sp. MA 6949	Sigmund *et al.*, 2003
		Streptomyces kanamiceticus KCC-S0436	Muramatsu *et al.*, 2005
		Streptomyces glaucescens	Kumar *et al.*, 2005
		`*Streptomyces clavuligerus* CKD 1119´	Kim y Park, 2008
Ascomicina	FK520 FR9520 Inmunomicina	*Streptomyces hygroscopicus* subsp. *yakushimaensis*	Hatanaka *et al.*, 1988
		`*Streptomyces tsukubaensis*´	Hatanaka *et al.*, 1989
		Streptomyces hygroscopicus var. *ascomyceticus*	Nielsen *et al.*, 1991
		Streptomyces tubercidicus	Kónya *et al.*, 2008
Rapamicina	Sirolimus	*Streptomyces hygroscopicus*	Vézina *et al.*, 1975
Everolimus	Derivado de la rapamicina	*Streptomyces hygroscopicus*	Formica *et al.*, 2004

***Streptomyces sp.* ATCC 55098**

La cepa de *Streptomyces* sp. ATCC 55098 (MA 6858) fue aislada por primera vez de los excrementos del ciervo de cola blanca en Virginia (EEUU) en 1992, por la compañía Merck & Co., Inc. (Dumont *et al.*, 1992). Los primeros documentos que encontramos sobre esta cepa son patentes de la compañía Merck sobre diferentes procesos para la producción de

tacrolimus (Dumont *et al.*, 1992; Salituro *et al.*, 1993). A mediados de los años 90 se publican algunos trabajos, también firmados por científicos de Merck, más centrados en el estudio de la producción de tacrolimus a nivel molecular y se secuencian algunos de los genes implicados en la biosíntesis como *fkbM* y *fkbD* (Shafiee *et al.*, 1994; Motamedi *et al.*, 1996).

Los estudios más recientes se centran en la optimización de las condiciones de fermentación con el objeto de aumentar la producción de tacrolimus, así encontramos un trabajo de Yoon y Choi (1997) en el que se describe un medio definido para la fermentación de *Streptomyces* sp. ATCC 55098. En los últimos trabajos publicados no se especifica con detalle la cepa productora de tacrolimus, siendo en algunos casos un mutante de *Streptomyces* sp. ATCC 55098 y en otros casos sólo se especifica que es un mutante de *Streptomyces* spp. (Vaid y Narula, 2006; Singh y Behera, 2009; Jung *et al.*, 2009).

`S. tsukubaensis´

El nombre de tacrolimus va asociado a *`S. tsukubaensis´* ya que éste fue el primer microorganismo productor que se describió (Kino *et al.*, 1987a) por la compañía Fujisawa Pharmaceutical Co., LTD., (Japón). Dicha cepa fue aislada en la zona de Tsukuba (Japón) y de ahí el nombre de la misma. Esta cepa de *Streptomyces* fue patentada bajo el nombre de *`Streptomyces tsukubaensis´* Nº 9993 (Fujisawa, EP 184162) y depositada en el *Fermentation Research Institute* (Japón) con el número de depósito FERM BP-927. Posteriormente, se redepositó en 1989 en el *Agricultural Research Culture Collection International Depository* (Estados Unidos) con el número de depósito NRRL 18488 (Baumann y Emmer, 1999).

La especie *`S. tsukubaensis´*, además de tacrolimus, produce otros dos macrólidos policétidos análogos que también inhiben la respuesta inmune *in vitro*: la ascomicina (FK-520 o FR-900520) y FR-900525. La ascomicina sólo se diferencia del tacrolimus en la cadena lateral del carbono 21 mientras que el compuesto FR-900525 lo hace en una prolina en lugar del grupo piperidina-2-dicarboxílico (Hatanaka *et al.*, 1989). Hasta el momento no se ha descrito ninguna aplicación comercial del macrólido FR-900525.

Todos los trabajos que se han publicado sobre *`S. tsukubaensis´* son, en su mayor parte, de carácter industrial encaminados a optimizar la producción de tacrolimus (Kino *et al.*, 1987a; Turło *et al.*, 2006). En la actualidad esta especie está despertando un mayor interés a nivel de Biología Molecular; así, en el último año se ha completado en esta especie la agrupación de biosíntesis de tacrolimus y se han depositado nuevas secuencias en las bases de datos. Hasta el 2010, las únicas secuencias depositadas se correspondían con el ARNr 16S y actualmente se encuentra parte de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus (Goranovic *et al.*, 2010) así como secuencias de patentes relacionadas con la generación de análogos de tacrolimus (Moss *et al.*, 2010).

1.5. Objetivos

Al comienzo de este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Determinación de la posición taxonómica de los productores de tacrolimus *Streptomyces* sp. ATCC 55098 y *`S. tsukubaensis´*.

2. Desarrollo de herramientas básicas para la realización de estudios de Biología Molecular en las cepas *Streptomyces* sp. ATCC 55098 y *`S. tsukubaensis´*.

3. Caracterización del sistema de dos componentes PhoR-P en *Streptomyces* sp. ATCC 55098 y análisis del efecto del fosfato sobre la producción de tacrolimus y la diferenciación morfológica.

4. Estudio del efecto de la concentración de fosfato sobre la producción de tacrolimus en *`S. tsukubaensis´* y caracterización del sistema de dos componentes PhoR-P. Análisis del regulón *pho* en esta especie.

Materiales y métodos

2.1. Microorganismos utilizados

2.1.1. Cepas de *Escherichia coli*

*** *E. coli* DH5α** (Hanahan, 1983)**:** Cepa con la que se puede obtener una alta eficiencia de transformación. Posee una deleción en el gen *lacZ* del operón *lac*, lo que permite seleccionar aquellos transformantes portadores de cualquier plásmido capaz de realizar la α-complementación de dicha mutación. Estas bacterias se utilizan para la clonación rutinaria de construcciones génicas.

Genotipo: F^- *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *hsd*R17, (rk–mk+), *sup*E44, *rel*A1, λ-, (φ80d *lacZ*ΔM15), Δ(*lacZ*YA-*argF*), U169.

*** *E. coli* BW25113/pIJ790** (Datsenko y Wanner, 2000)**:** Cepa utilizada en la tecnología REDIRECT©. El plásmido PIJ790 contiene la función λ RED (*gam, bet, exo*) la cual incrementa la tasa de recombinación utilizando ADN lineal, el gen de resistencia a cloranfenicol que permite la selección de cepas transformadas con derivados del SuperCos 1 (contiene los genes de resistencia a apramicina y a kanamicina) y un origen de replicación sensible a la temperatura (requiere 30ºC para la replicación).

Genotipo: *lac*I^q *rrn*B_{T14} Δ*lac*Z_{WJ16} *hsd*R514 Δ*ara*BAD_{AH33} Δ*rha*BAD_{LD78}

*** *E. coli* ET12567/pUZ8002** (MacNeil *et al.*, 1992): Cepa donadora en el proceso de conjugación con especies del género *Streptomyces*. Carece de un sistema de metilación funcional (*dam*-, *dcm*-, *hsd*) por lo que el material genético que se transfiere no es metilado y por lo tanto no es degradado por el potente sistema de restricción sensible a la metilación de algunas especies de *Streptomyces*. El plásmido no movilizable pUZ8002 (Sia *et al.*, 1996; Paget *et al.,* 1999) contiene las funciones necesarias para que se produzca la transferencia de vectores que contengan el origen de transferencia *oriT*. Se cultiva en presencia de cloranfenicol para mantener la mutación *dam*- y kanamicina para mantener el plásmido pUZ8002.

Genotipo: *dam*-13::Tn9, *dcm*-6, *hsd*M, *hsd*R, *rec*F143, *zjj*201::Tn10, *gal*K2, *gal*T22, *ara*14, *lac*Y1, *xy*l5, *leu*B6, *thi*1, *ton*A31, *rps*L136, *his*G4, *tsx*78, *mtli gln*V44, F^-**.**

*** *E. coli* XL1-Blue** (Bullock *et al.,* 1987): Cepa deficiente para la recombinación, necesaria para mantener la estabilidad de las construcciones que porta. La mutación *hsd*R evita la digestión del ADN clonado por el sistema de endonucleasas *Eco*K de *E. coli*. Esta es la cepa hospedadora de las genotecas construidas en SuperCos 1.

Genotipo: *rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *hsd*R17 *sup*E44 *rel*A1 *lac* [F´ *pro*AB *lac*I^q*ZΔM*15 Tn10 (Tet^r)].

2.1.2. Especies pertenecientes al género *Streptomyces*

*** *Streptomyces tacrolimicus* [antiguamente *Streptomyces* sp. ATCC 55098^T (MA 6858)]** (Martínez-Castro *et al.*, 2010; Dumont *et al.*, 1992)**:** Cepa tipo de la especie *S. tacrolimicus* aislada por la compañía farmacéutica Merck & Co., Inc. (EEUU) descrita como productora del inmunosupresor tacrolimus. Procedente de la colección americana de cultivos tipo ATCC.

*** *Streptomyces flavofungini* DSM 40366^T** (Uri y Bekesi, 1958)**:** Especie filogenéticamente cercana a *S. tacrolimicus*, obtenida de la colección alemana de cultivos tipo DSMZ.

*** *Streptomyces fulvissimus* DSM 40593^T** (Jensen, 1930) Especie filogenéticamente cercana a *S. tacrolimicus* obtenida de la colección de cultivos tipo DSMZ.

*** `*Streptomyces tsukubaensis´* NRRL 18488** (Kino *et al.*, 1987a)**:** Cepa silvestre aislada por la compañía Fujisawa Pharmaceutical Co., LTD., (Japón). Fue la primera especie de *Streptomyces* definida como productora de tacrolimus, además también produce un compuesto de estructura y función similar conocido como ascomicina. Dicha especie ha sido obtenida de la colección americana de cultivos tipo ARS también conocida como NRRL.

*** *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064^T** (Higgens y Kastner, 1971)**:** Especie filogenéticamente cercana a *`S. tsukubaensis´* obtenida de la colección de cultivos tipo ATCC.

*** *Streptomyces amakusaensis* DSM 40219^T** (Nagatsu *et al.,* 1963)**.** Especie filogenéticamente cercana a *`S. tsukubaensis´* obtenida de la colección de cultivos tipo DSMZ.

*** *Streptomyces inusitatus* DSM 41441^T** (Hasegawa *et al.*, 1978)**:** Especie filogenéticamente cercana a *`S. tsukubaensis´* obtenida de la colección de cultivos tipo DSMZ.

* ***Streptomyces durmitorensis* DSM 41863^T** (Savic *et al.*, 2007) Especie del género *Streptomyces* descrito como productor de un análogo a tacrolimus. Esta especie ha sido obtenida de la colección de cultivos tipo DSMZ.

2.1.3. Otros microorganismos

*** *Saccharomyces cerevisiae* TB23** (Breuder *et al.*, 1994; Arndt *et al.*, 1999): Cepa de *S. cerevisiae* sensible a tacrolimus (FK 506) y ciclosporina (CsA) utilizada en la detección de tacrolimus mediante el método de bioensayo. Dicha cepa ha sido cedida por el Dr. J. Heitman del Departamento de Genética, Farmacología y Biología del Cáncer del Centro Médico Universitario Duke de Durham (EEUU).

Genotipo: *MATα pº ilv*5 *ura*3 *feu*2 :: *his*G (CsA^S FK506^S).

2.1.4. Crecimiento y conservación de los microorganismos

Crecimiento

Crecimiento de *E. coli:* El crecimiento en medio sólido se llevó a cabo en medio LA a 37°C. Los cultivos en medio líquido se realizaron en medio LB a 37ºC, en matraces lisos y con agitación orbital a 250 rpm.

Crecimiento de *Streptomyces* spp.: El crecimiento rápido en medio sólido se realizó en TSA mientras que los cultivos para la recolección de esporas se han realizado en TBO o en ISP4 a 28ºC. Los medios TSB o BASAm fueron los utilizados para los cultivos en medio líquido en matraces lisos o indentados a 28ºC y con agitación orbital a 220 rpm.

Crecimiento de *S. cerevisiae*: El crecimiento tanto el líquido como el sólido se realiza en medio YPD a 30ºC.

Conservación

Conservación de *E. coli*: Las diferentes cepas utilizadas durante este trabajo se conservaron en placas con medio sólido, protegidas con Parafilm®. De esta forma se mantuvieron entre 2 y 4 meses. La conservación a largo plazo se realizó en una suspensión de glicerol a concentración final del 20 % (v/v), manteniéndolos a -80°C.

Conservación de *Streptomyces* spp.: La conservación a medio plazo se realizó en placas de medio sólido como en el caso de *E. coli*. La producción de esporas por *Streptomyces* permitió la conservación de las diferentes especies y cepas de este género en estas formas de resistencia durante largos periodos de tiempo. Las esporas de *Streptomyces* se obtuvieron siguiendo el siguiente protocolo:

- Sembrar esporas o micelio en placas de medio de esporulación e incubar a 28ºC durante 10-15 días.
- Verter sobre el cultivo 1 ml de glicerol 20 % y raspar la superficie con un bastoncillo de algodón estéril, de manera que las esporas se desprendan de la placa.
- Recoger la solución de esporas y repetir el proceso hasta que se hayan recolectado la mayor parte de las esporas.
- Agitar la solución de esporas vigorosamente (*vortex*) y filtrar a través de una punta de micropipeta de 5 ml obturada con un poco de algodón hidrófilo estéril.
- Centrifugar la solución a 4ºC, durante 10 minutos a 6000 rpm y retirar el sobrenadante. Resuspender el precipitado de esporas en glicerol 20 %. Conservar a -80ºC

Conservación de *S. cerevisiae*: La conservación de esta cepa se realiza mediante siembra periódica en placas, las cuales se mantienen selladas con Parafilm® a 4ºC.

2.2. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo que se utilizaron en este trabajo se esterilizaron en autoclave a 120ºC, durante 20 minutos. La esterilización de diferentes soluciones por filtración se llevó a cabo mediante filtros estériles de 0,22 μm de diámetro de poro (Millipore). A continuación se detallan las cantidades necesarias para la preparación de un litro de medio. Todos los medios se prepararon en agua destilada.

2.2.1. Medios de cultivo para *E. coli*

LB (Luria-Bernati) (Miller, 1972): Medio utilizado tanto en sólido como en líquido para el cultivo de *E. coli.*

Triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g

Ajustar el pH a 7,5 con NaOH 1 N. Para su utilización como medio sólido (**LA**) añadir 20 g de agar por litro.

TB (Terrific Broth) (Tartof y Hobbs, 1987): Medio líquido para el crecimiento de *E. coli* y la obtención de ADN plasmídico.

Extracto de levadura	24 g
Triptona	12 g
Glicerol	4 ml

Añadir agua destilada hasta 900 ml. Después de esterilizar añadir 100 ml de una solución esterilizada por filtración de: K_2HPO_4 720 mM (12,54 g/100 ml y KH_2PO_4 170 mM (2,31 g/100 ml).

SOB (Hanahan, 1983): Medio líquido utilizado para la obtención de células competentes de *E. coli*.

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,5 g

Tras disolver estos componentes, añadir 10 ml de KCl 250 mM. Ajustar el pH a 7,0 con KOH 5 M y añadir agua destilada hasta 1 litro. Después de esterilizar, añadir 5 ml de $MgCl_2$ 2 M esterilizado por filtración. Los iones Mg^{2+} también pueden proceder de $MgSO_4$, siempre que la concentración final sea de 10 mM. Al añadir a dicho medio glucosa al 50 % (88 ml) se denomina medio **SOC**.

2.2.2. Medios de cultivo para *Streptomyces* spp.

TSB (Sambrook y Russell, 2001): Medio utilizado tanto en sólido como en líquido para el crecimiento rápido de cepas de *Streptomyces*.

Peptona de caseína	17 g
NaCl	5 g
Peptona de soja	3 g
K_2HPO_4	2,5 g
Glucosa	2,5 g

Ajustar el pH a 7,3. Para su utilización como medio sólido (**TSA**) añadir 20 g/l de agar.

BASAm: Medio líquido utilizado para un crecimiento rápido de *Streptomyces,* también se utiliza para el preinóculo de alguno de los medios de producción de tacrolimus. La composición de este medio está basada en el medio BASA descrito por Dumont y colaboradores (1992).

Glucosa	20 g
Extracto de levadura	20 g
Mezcla de peptonas	20 g
$KN0_3$	2 g
NaCl	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g

Elementos traza: $FeS0_4 \cdot 7H_2O$, 25 mg; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 5 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg; $CaC1_2 \cdot 2H_20$, 20 mg. Ajustar el pH a 7,0 con NaOH 1 N. Las soluciones de glucosa y de $FeS0_4 \cdot 7H_2O$, esterilizadas por filtración, se añaden al medio tras el autoclavado.

TBO (Higgens *et al.*, 1974): Medio sólido utilizado para la esporulación.

Pasta de tomate	20 g
Copos de avena	20 g
Agar	2,5 g

Ajustar el pH a 6,5 con NaOH 1N.

ISP4 (Difco™) (Shirling y Gottlieb, 1966): Medio sólido comercial utilizado para la esporulación de *`S. tsukubaensis´* y en los estudios de taxonomía del género *Streptomyces*.

Almidón soluble	10 g
Na_2HPO_4	1 g
$MgSO_4$	1 g
NaCl	1 g
$(NH_4)_2SO_4$	2 g
$CaCO_3$	2 g
Agar	20 g

Elementos traza: $FeS0_4 \cdot 7H_2O$, 1 mg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 1 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 mg.

El medio viene preparado de manera que solo es necesaria la disolución de 37 g de mezcla sólida en 1 litro de agua destilada. El pH queda comprendido en un intervalo de 7,2 ±0,2.

2xTY (Sambrook y Russell, 2001): Medio utilizado para la germinación de las esporas de *Streptomyces* mediante choque térmico.

Triptona	1,6 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	85 mM

Ajustar el pH a 7,2 con NaOH 1 N.

MS (Hobbs *et al.*, 1989): Medio sólido utilizado para la conjugación intergenérica de *Streptomyces* con células de *E. coli.*

Manitol	20 g
Harina de soja	20 g
Agar	20 g

2.2.3. Medios propios de los estudios de taxonomía de *Streptomyces*

- **Medios descritos por el *International Streptomyces Project* (ISP) (Shirling y Gottlieb, 1966).**

Algunos de estos medios se encontraban disponibles de manera comercial a través de la casa comercial Difco™; el resto se han preparado siguiendo las especificaciones del ISP.

Solución de elementos traza (1 litro):

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,1 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g

ISP1-*Tryptone-Yeast Extract Br*oth (Difco™):

Digerido pancreático de caseína	5 g
Extracto de levadura	3 g

Disolver 8,0 g de la mezcla sólida en 1 litro de agua destilada. El pH queda comprendido en un intervalo de 7,2 ±0,2.

ISP2-*Yeast Extract- Malt Extract Agar* (Difco™):

Extracto de levadura	4 g
Extracto de malta	10 g
Dextrosa	4 g
Agar	20 g

Disolver 38 g de la mezcla sólida en 1 litro de agua destilada. El pH queda comprendido en un intervalo de 7,2 ±0,2.

ISP3-*Oatmeal Agar*:

Harina de avena	20 g
Agar	18 g

Para la preparación de este medio, hervir 20 g de harina de avena en 1 litro de agua destilada durante 20 minutos. Filtrar mediante un filtro de tela de algodón. Añadir 1 ml de la solución de elementos traza y completar con agua destilada hasta un litro. Ajustar el pH a 7,2 con una solución de NaOH 1 N. Por último añadir 18 g de agar.

ISP4-*Inorganic Salts-Starch Agar* (Difco™): Ha sido descrito en el anterior apartado.

ISP5-*Glycerol-Asparagine Agar*:

L-asparagina (anhidro)	1 g
Glicerol	10 g
K_2HPO_4 (anhidro)	1 g
Solución de elementos traza	1 ml
Agar	20 g

El pH de este medio se queda comprendido entre 7,0-7,4, no ajustar si está en este rango.

ISP6-*Peptone-Iron Agar* (Difco™):

Peptona	15 g
Peptona de proteosa	5 g
Citrato de amonio férrico	0,5 g
Glicerofosfato de sodio	1 g
Tiosulfato de sodio	0,08 g
Agar	15 g

Disolver 36 g de la mezcla sólida en 1 litro de agua destilada. El pH queda comprendido en un intervalo de 6,7 ±0,2.

ISP7-*Tyrosine Agar*

Glicerol	15 g
L-tirosina	0,5 g
L-asparagina	1 g
K_2HPO_4 (anhidro)	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
NaCl	0,5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g
Solución de elementos traza	1 ml
Agar	20 g

Ajustar el pH en el rango 7,2-7,4.

ISP9-*Carbon utilization médium*

Medio basal:

$(NH_4)_2SO_4$	2,64 g
KH_2PO_4 (anhidro)	2,38 g
$K_2HPO_4 \cdot 3H2O$	5,65 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
Solución Pridham y Gottlieb	1 ml
Agar	15 g

Disolver los componentes en agua destilada y medir el pH. Si es necesario ajustar a pH 6,8-7,0 con una solución 1 N de NaOH ó 1 N de HCl.

Solución Pridham y Gottlieb (1 litro):

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,64 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,11 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,79 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,15 g

Las soluciones de las diferentes fuentes de carbono se esterilizan por filtración. Se añaden al medio basal esterilizado por autoclave a una concentración final de 1 %.

Medios descritos en el estudio de taxonomía numérica de *Streptomyces* de Williams y colaboradores (1983).

Medio para el estudio de la asimilación de fuentes de nitrógeno:

D-glucosa	10 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
NaCl	0,5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01g
K_2HPO_4	1,0 g
Bacto-agar (Difco)	12 g

Ajustar el pH a 7,4. Las soluciones de las diferentes fuentes de nitrógeno se esterilizan por filtración. Se añaden al medio basal a una concentración final de 0,1 % una vez que ha sido esterilizado por autoclave.

MBA (*Modified Bennett´s Agar*): Modificación del medio Bennett´s para esporulación de *Streptomyces* descrito por Jones (1949).

Extracto de levadura	1 g
Extracto de carne	1 g
N-Z-amina-A	2 g
Glicerol	10 g

Ajustar el pH a 7,3 con NaOH.

- **Otros medios**

Medio 172:

Glucosa	10 g
Glucidex-20	20 g
Extracto de levadura	5 g
Peptona de caseína	5 g
Agar	1,8 g

Ajustar el pH a 6,8 y después añadir 8 g de $CaCO_3$.

Medio 172A:

Se compone de la misma base que el medio 172 pero sustituyendo el $CaCO_3$ por 2,5 g/l de MOPS [ácido 3-(N-morfolino)propanesulfonico] como corrector del pH. Ajustar el pH a 7,2.

2.2.4. Otros medios

YPD (Lodder, 1970) Medio utilizado para el crecimiento de *S. cerevisiae* TB23 tanto en líquido como en sólido.

Glucosa	20 g
Extracto de levadura	10 g
Peptona bacteriana	20 g

Para obtener medio sólido se añaden 20 g/l de agar.

2.2.5. Aditivos de los medios de cultivo

Los aditivos fueron utilizados siguiendo las instrucciones de Sambrock y Russell (2001). Los más frecuentes fueron antibióticos e indicadores de complementación del gen *lacZ* (Tabla 2.1).

Las soluciones concentradas de antibióticos (*stocks*) disueltas en agua se esterilizaron por filtración a través de filtros estériles de 0,22 μm de diámetro de poro (Millipore). Los antibióticos disueltos en compuestos orgánicos no necesitan ser esterilizados. Todas estas disoluciones se conservan a -20ºC.

Tabla 2.1: Concentración de las soluciones de aditivos utilizados para la selección de transformantes y concentración final de uso tanto en medio sólido como en líquido.

Concentración de la solución	Concentración final	
	***Streptomyces* spp.**	***E. coli***
Ácido nalidíxico (Nal) 25mg/ml en NaOH 1N		25 µg/ml
Ampicilina (Amp) 200 mg/ml en agua destilada		100 µg/ml
Apramicina (Apr) 100 mg/ml en agua destilada	50 µg/ml	
Cloranfenicol (Cm) 50 mg/ml en etanol absoluto		25 µg/ml
Kanamicina (Kn) 100 mg/ml en agua destilada	50 µg/ml	50 µg/ml
Tioestreptona (Tio) 50 mg/ml en DMSO (dimetilsulfóxido)	25 µg/ml	
IPTG (1-isopropil-β-D-galactopiranósido) 100 mM en agua destilada		0,05 mM
X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido) 20 mg/ml en dimetilformamida		40 µg/ml

2.3. Equipamiento

2.3.1. Centrífugas

Centrífuga de mesa utilizada para microtubos de 1,5 ó 2 ml: 5415D Eppendorf.

Centrífuga para tubos GSA y SS34: RC 5B Plus Sorvall.

Centrífugas para tubos de 50 ml: Allegra X-22R y Allegra 21R (Beckman Coulter).

Centrífuga para tubos de 10 ml: GS-15 R Beckman.

Ultracentrífuga: Optima™ MAX (130000 rpm) Beckman Coulter.

2.3.2. Arcones agitadores

Cultivos de *E. coli*: Model G25, New Brunswick Scientific Co. Inc.

Fermentaciones de *Streptomyces*: C25KC, New Brunswick Scientific Co. Inc.

2.3.3. Equipos HPLC

Sistema de HPLC Agilent series 1100.

Sistema de Waters Alliance HPLC.

2.3.4. Espectrofotómetros

Equipo NanoDrop (Thermo Scientific) para la cuantificación de soluciones de ADN y ARN.

2.4. Vectores plasmídicos

A continuación se muestran los vectores plasmídicos utilizados en este trabajo (Figura 2.1), describiéndose nombre, origen o referencia y uso de los mismos.

pBluescript® (KS/SK) (Agilent Technologies Genomics): Plásmidos (2,9 kb) multicopia de *E. coli* derivados del pUC19. Contienen un fragmento del gen *lacZ* (subunidad α) capaz de complementar la deleción presente en el gen de la α-galactosidasa de algunas cepas de *E. coli* (denominada complementación α), como es el caso de la cepa *E. coli* DH5α. Ello permite la selección de transformantes portadores del plásmido por la presencia en el medio de cultivo de IPTG, que es un fuerte inductor del gen *lacZ* y de X-gal, el cual es utilizado como substrato por la α-galactosidasa codificada por el gen *lacZ*. Generalmente, cuando no hay ningún inserto en el policonector del vector aparecen colonias de color azul, mientras que cuando un fragmento está presente, éste impide la aparición de la coloración azul observándose las colonias blancas. **KS** indica un policonector orientado 5' *Kpn*I→*Sac*I 3' con respecto al extremo 5' del gen *lacZ* y **SK** la orientación contraria 5' *Sac*I→*Kpn*I 3'. En este trabajo se ha utilizado la orientación SK.

El pBluescript tiene una amplia región de clonación múltiple donde se localizan 21 sitios únicos reconocidos por enzimas de restricción. Flanqueando el policonector se encuentran la secuencias promotoras de las ARN polimerasas T7 y SP6. Además, este vector contiene el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación *ColE1* para *E. coli* del plásmido pBR322.

pGEM-T Easy (Promega): Vector (3,0 kb) comercial para la clonación de productos de PCR. Este vector se suministra digerido con *Eco*RV y con una timidina en cada extremo 3', de tal forma que los productos de PCR generados con determinadas ADN polimerasas, que añaden una desoxiadenosina en los extremos 3' de los fragmentos amplificados, tienen una elevada compatibilidad para ligar con el vector.

Contiene promotores de las ARN polimerasas T7 y SP6 flanqueando un policonector con sitios de restricción específicamente dispuestos para el uso del kit *Promega´s Erase-a-Base System* para la generación de deleciones. Presenta también un origen de replicación de *E. coli*

(*ColE1*) y un origen de replicación monocatenario del fago f1, además de contener un gen de resistencia a ampicilina.

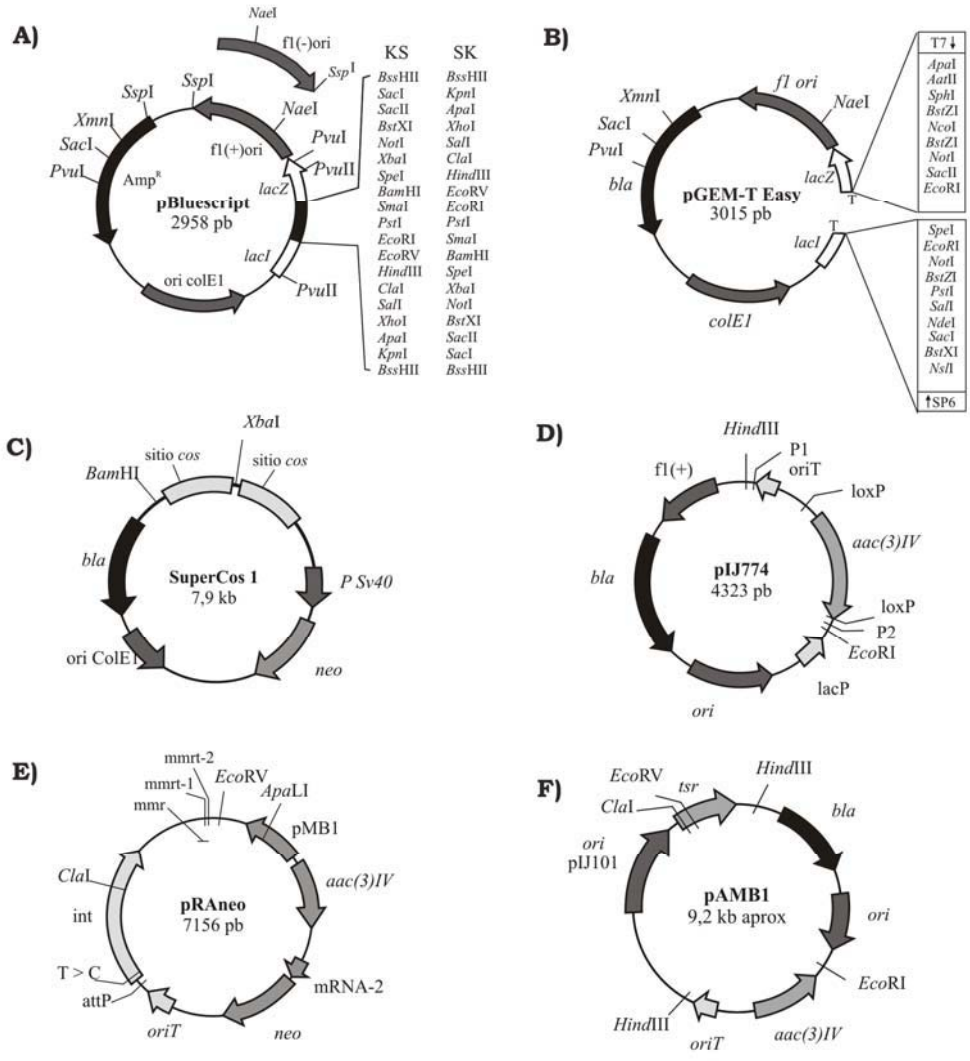


Figura 2.1: Principales vectores utilizados en este trabajo. Se indican tamaños, marcadores de resistencia, orígenes de replicación, terminadores y cortes de enzimas de restricción. **A)** Vector comercial pBluescript®. **B)** Vector comercial pGEM®-T Easy. **C)** Cósmido comercial para la construcción de genotecas SuperCos 1. **D)** Vector que contiene el casete utilizado en la deleción mediante REDIRECT© pIJ774. **E)** Vector conjugativo integrativo pRAneo. **F)** Vector multicopia conjugativo para la expresión de genes en *Streptomyces*.

SuperCos 1 (Agilent Technologies Genomics): Cósmido (7,9 kb) (Evans *et al.,* 1989) que se caracteriza por contener: a) secuencias promotoras de bacteriofagos T3 y T7 flanqueando un sitio único de clonación (*Bam*HI); b) sitios *cos* que permiten la inserción de fragmentos de ADN de un tamaño determinado (30-42 kb); c) secuencias de reconocimiento para llevar a cabo con rapidez mapas de restricción; d) sitios únicos de restricción *Not*I, *Sac*II y *Sfi*I flanqueando el sitio de clonación que permiten extraer el ADN inserto del vector y e) genes

que permiten la amplificación y expresión de los cósmidos recombinantes en células eucariotas. Presenta el origen de replicación en *E. coli ColE1* y además contiene los genes de resistencia a ampicilina y a kanamicina.

pIJ774 (Khodakaramian *et al.,* 2006)**:** Vector (4,3 kb) derivado del pBluescript que contiene el casete (gen de resistencia a apramicina y el origen de transferencia *oriT*) que sustituye al gen de interés cuando se lleva a cabo la deleción mediante REDIRECT©. Dicho casete se encuentra flanqueado por sitios *loxP* los cuales permiten la eliminación del casete en *Streptomyces* usando un derivado del fago atemperado ΦC31, el cual expresa la recombinasa Cre durante la fase de infección. Presenta un origen de replicación *ColE1* para *E. coli* y además contiene el gen de resistencia a ampicilina.

pRAneo (R. Pérez-Redondo, A. Rodríguez-García y A. Ramos, no publicado): Vector (7,1 kb) integrativo conjugativo derivado del p-LUXAR[+] (Rodríguez-García *et al.*, 2007). Este vector incorpora el origen de transferencia *oriT* lo que permite su introducción en una célula de *Streptomyces* por conjugación y se integra en el cromosoma hospedador en el sitio de integración del fago ΦC31. Contiene los genes de resistencia a apramicina y kanamicina.

pAMB1 (AM. Botas, no publicado): Vector (7,8 kb aproximadamente) replicativo conjugativo derivado del pIJ699 (Kieser y Melton, 1988) y el pIJ773 (Gust *et al.*, 2003). Este vector está constituido por un fragmento de 3,5 kb procedente del pIJ699 que contiene un terminador, genes de replicación (*rep*) y un origen de replicación en *Streptomyces* pIJ101. La parte correspondiente al plásmido completo pIJ773 incorpora el origen de transferencia *oriT* para su transferencia por conjugación, además de los genes de resistencia a apramicina y a ampicilina, así como el origen de replicación *ColE1* para *E. coli*.

2.5. Productos específicos para Biología Molecular

2.5.1. Enzimas

Las enzimas de restricción mencionadas en esta memoria fueron suministradas por las casas comerciales: New England BioLabs, MBI Fermentas y Takara.

Otro tipo de enzimas utilizadas fueron: Fragmento **Klenow** de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Roche); **T4 ADN polimerasa** (Fermentas); **ligasa** del fago T4 (Roche), **fosfatasa** (*Antarctic Phosphatase*-BioLabs); **lisozima** (Fluka Chemical & Biochemical Co); **ribonucleasa A** (Sigma), **proteinasa K** (Merck), ***Taq*** ADN polimerasa (Promega) **Go Taq™** ADN polimerasa (Promega); **Platinum® Pfx** ADN polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen), **Phusion®** ADN polimerasa de alta fidelidad (New England Biolabs), **ADNasa I** (*Lyophilized bovine pancreas DNase*-Roche grade I).

2.5.2. Marcadores de peso molecular

Los marcadores de peso molecular para ADN utilizados (Figura 2.2) así como las casas comerciales en las que se adquirieron han sido:

1kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen), marcador comercial que presenta bandas desde 12 kb a 100 pb. Este marcador se diluye en TE a una concentración final de 50 ng/µl. Se utilizan 5 µl por gel.

- **TE**: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético), pH 8,0; agua destilada.

DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled (Roche), marcador comercial marcado con digoxigenina que presenta bandas desde 23 kb a 125 pb (ADN del fago λ digerido con *Hind*III). Se utilizan 10 µl por gel.

ADN del fago λ digerido con *Kpn*I, presenta bandas de gran tamaño entre 47 y 1,5 kb.

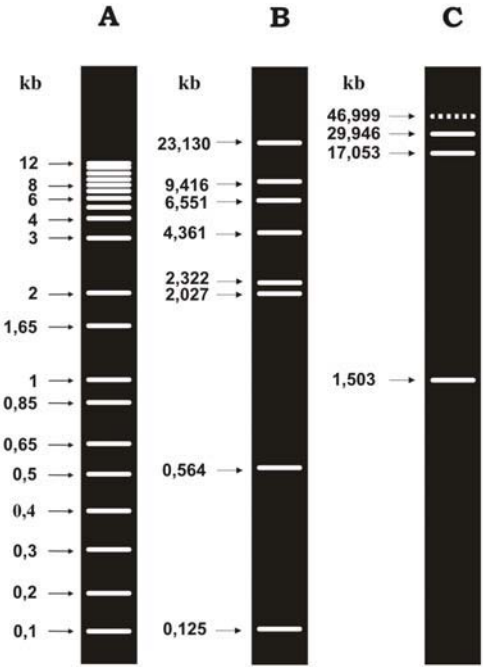


Figura 2.2: **Esquema de los patrones de peso molecular de ADN en geles de agarosa** (al 1 % en los esquemas A y B y al 0,4 % en el esquema C). Mediante flechas se indica el tamaño de los fragmentos en kilobases. **A)** *1kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); **B**) *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled* (Roche); **C)** ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción *Kpn*I.

2.5.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados fueron adquiridos a Sigma-Aldrich® o a Bonsai Technologies en el caso de cebadores necesarios para la tecnología REDIRECT© y cebadores marcados con fluoróforos.

Cuando se necesitó añadir secuencias de corte para enzimas de restricción, se siguieron las recomendaciones presentes en el catálogo comercial de New England Biolabs Inc. En las tablas siguientes se detalla la secuencia de los mismos y las diferentes modificaciones.

Tablas 2.2: Cebadores utilizados en este trabajo. Los cebadores se detallan en tres tablas dependiendo si se han diseñado específicamente para *S. tacrolimicus*, para *`S. tsukubaensis´* o cebadores universales o específicos para otras especies de *Streptomyces*. Se señala el nombre, secuencia (5' a 3') y modificación que presenta con respecto a la secuencia original (subrayado).

Cebadores específicos para *S. tacrolimicus*		
Nombre	Secuencia 5´→3´	Modificación/Marcaje
16S-sense	TCACGGAGAGTTTGATCCTG	No
16S-ant	GCGGCTGCTGGCACGTAGTT	No
16S-seq	AGTAACACGTGGGCAATCTG	No
16S-*Cla*I	ACATCGATGACGCTGTGAAC	Corte *Cla*I
16S-*Xba*I	GTGATCTAGACGCACCTTCC	Corte *Xba*I
16SII-1	GCTCGTAGGCGGCTTGTCA	No
16SII-2	ACGTCGTCCCCACCTTCC	No
16SII-3	ACCCTTGTCCCGTGTTGC	No
PhoR-M1	CAGATCGAACTGGACCTGCCC	No
PhoR-M2	GGTGACGGCCAGCTCGAT	No
phoRP-D	CGGCAGTCCCGGCAGCATCA	No
PHO1	CCGCCTCGTCGAGGACCA	No
PHO2	CGGCGTGCGTGCTCGTGCT	No
R-Prom	CCGCAGCGAGGTGACGACTA	No
phoP-M4	ACGGACAACCGGCACGGG	No
PHOPRev1	GCCCCCTGACACACCCTTAG	No
PHOPRev2	CGGCGGAGCACTACTTCA	No
PHOEco1	GGGCGGCAGGTCGGTGTG	No
PHORU2	GCCTCCAGGTTATGCGGGT	No
PHOBSF	CGGGACGGTGGCGCTGAA	No
PHOBSR	GGGCAGAACCTTACATGAA	No
PHOPD3	CCCCGCCGATCACCACAC	No
PHOBst1	GCCGAGCCTGACCGATTC	No
PHOPD4	GCCGACCGTTCCCGTAAG	No
PHORU3	GCGGCCGATCAGAAGGTG	No
PHORU4	GCAGGTCGAGGGAGCGTAG	No
PHORU5	CGCGTGGTGTACCTGGTGAC	No
PHOEco2	GCCGTCCTTCAGCGCCTTG	No
PHOEco3	GGGCTACGACCAGGACGAG	No
PHOEco4	CGTTTCTGCGGTCTGCGGTT	No
PHOEco5	CGACCGGGTGAGACTGAAAC	No
PHOBst2	CACGATATCGAGCCGCCG	No
PHOBSF2	GCGGCGAGGCAGAGAAGG	No

PHOBSR2	GGACCTGAGATCGCCGTAG	No
PHOBSF3	GCGGCGGGCATCGGTGAC	No
RDRF	TGGGAGCGCCGTGCGCCACCCGCATAACCTG GAGGCATGATTCCGGGATCCGTCGACC	P1 REDIRECT
RDPF	CATTCTTCCTGCCCCGGAGGTCCTTCCGTGAC CCGAGTGATTCCGGGATCCGTCGACC	P1 REDIRECT
RDPR	CCGCAGCCTGATCGGACTCCCATATTATAAGG ACCCCTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	P2 REDIRECT
phoRM3	ATCGAGCTGGCCGTCACC	No
CPHOU2-PvuI	GGTCGTCCCCGATCGAGTC	Corte *Pvu*I
CPHOD-BglII	GCAGATCTCCCTCCGCAC	Corte *Bgl*II
pURP-U	TCCCTCTCTTGGATGGCGC	No
pcarD-U	CCTCTTGGTCCGTCCTTCG	No
pcarD-D	CCCCTTCCGTGGCTATCA	No

Cebadores específicos para `*S. tsukubaensis*´		
Nombre	Secuencia 5´→3´	Modificación/Marcaje
phoRt-F	GCCGCCCGGCGTCGACAC	No
phoRt-R	ACCCAGTGCGGCGGCCAG	No
RDRF_ts	CGAGACCAATGCGATGACCATGCCTAACCTTG AGGCATGATTCCGGGATCCGTCGACC	P1 REDIRECT
RDPF_ts	TCCGCATTTCGAGATCCCTGCCCCGGAGGTCC TTCCGTGATTCCGGGATCCGTCGACC	P1 REDIRECT
RDPR_ts	GACGTTCGTCGTACGTCCGGCGGCGGGCGGG GCCGTCTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	P2 REDIRECT
CPHOtF-EcoRI	GCATGGAATTCCCTCTCTC	Corte *Eco*RI
CPHOtR-EcoRI	CGTCGAATTCCCCGGAGAC	Corte *Eco*RI
phoRP-1	GGCGTCGACCGTCAGTTT	No
phoRP-2	CGGGTCCAGAACGACGAT	No
phoRP-3	CGGGTGAACTCTGGGCGAC	No
phoRP-4	TACGAACGCAGAGCGAAGG	No
phoRP-6	CGACCTGCTGGAGATGCTG	No
URPts-U	CCCTCTCTCGGTGACCGTG	Marcaje Cy3 en 5´
URPts-D	CGCCGCGTTCACGTCCAT	No
phoAp-U	CCGCCACAACTCGATCAAA	Marcaje 6FAM en 5´
phoAp-D	GGTGAACGGATCGGTTTTGA	No
phoDp-U	AGGGCACTCCTTCGCTGA	Marcaje 6FAM en 5´
phoDp-D	CAGATTACCGGGAGGTAGGG	No
TS3214p-U	GCATCAGTCAAGTGCGGTG	Marcaje 6FAM en 5´
TS3214p-D	ACAGCGGTAGCGGCAGGT	No
pstSp-U	TGAACCCGTGCGTCTCCC	Marcaje 6FAM en 5´

pstSp-D	TCCTTCCAGAAGCCGCCG	No
pitH2p-U	CAAGATCGGATGAACGGC	Marcaje 6FAM en 5´
pitH2p-D	TGTGTTCCATTTACCCAGGC	No
ppKp-U	ACAACACGGCGGCGGTAC	Marcaje 6FAM en 5´
ppKp-D	GGGGGTGTGATGATCCGTA	No
glnRp-U	CTCAATACGGACACCATCGG	Marcaje 6FAM en 5´
glnRp-D	AAGCAGCAGGGAGCTCATC	No
glnAp-U	GACGAAGATGGCACCGAG	Marcaje 6FAM en 5´
glnAp-D	CCAACTCCTCCTACTCCCG	No
amtBp-U	CCTGACGGACAAGCTGACC	Marcaje 6FAM en 5´
amtBp-D	CGTCTCCTCGTCGTCGGT	No
glnIIp-U	CCACAAGGGACGGACTGC	Marcaje 6FAM en 5´
glnIIp-D	GGTGCCGTCGATCCAGAT	No
Gaap-U	AGGCGTGGAGGGCGGGGTAT	Marcaje 6FAM en 5´
Gaap-D	GCCGCAGGCTCCGTACCGAA	No
TS338p-U	CCTCGTCCCAGGTGGCGG	Marcaje 6FAM en 5´
TS338p-D	AGCCGCATTCCGTAGCCGC	No

Cebadores universales o específicos para otras especies de *Streptomyces*		
Nombre	Secuencia 5´→3´	Modificación/Marcaje
16S-sense	TCACGGAGAGTTTGATCCTG	No
16S-ant	GCGGCTGCTGGCACGTAGTT	No
16S-seq	AGTAACACGTGGGCAATCTG	No
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA	No
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	No
Directo (F)	GTAAAACGACGGCCAGT	No
Reverso (R)	GGAAACAGCTATGACCATG	No
6FAM-SP6	TAGGTGACACTATAGAATAC	Marcaje 6-FAM en 5´
6FAM-Directo	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	Marcaje 6-FAM en 5´
AprA2	GGATCCGGCCTTTGAATGGGTT	Corte *Bam*HI
AprSaI	CAACGTCGACTCGTTCTCCGCTCA	Corte *Sal*I
T3-cos	CCCGCAATTAACCCTCACTAAAG	No
T7-cos	CATAATACGACTCACTATAGGGA	No
PhoR-1	GCTGCATATGGCCAGGGACAC	*S. coelicolor*
PhoR-2	GAGCAACTAGTTCACGGAAGGAC	*S. coelicolor*
PhoP-3	GACCCATATGCTCGTCGTCGAG	*S. coelicolor*
PhoP-2	GGACTAGTCTACGGCTCGAAC	*S. coelicolor*

2.5.4. Conjunto de reactivos comerciales

Varios experimentos se realizaron con la ayuda de sistemas comerciales o *Kits*:

GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare): Recuperación de bandas de ADN a partir de geles de agarosa.

QIAEX® II Gel Extraction Kit (Qiagen): Recuperación de bandas de gran tamaño (a partir de 5 kb) de ADN a partir de geles de agarosa.

illustra™ plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare): Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*.

ATP™ Plasmid Mini Kit (ATP Biotech Inc.): Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*.

QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen): Obtención de ADN plasmídico de gran tamaño de *E. coli*.

Gigapack® III XL packaging extract. (Agilent Technologies Genomics): Empaquetamiento de cósmidos recombinantes en partículas de fagos.

Big Dye®Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems): Sistema de secuenciación mediante PCR.

Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare): Sistema para la secuenciación de fragmentos con cebadores marcados con fluorescencia. Se obtiene la secuencia de cada base por separado.

DIG Oligonucleotide 3´-End Labeling Kit, 2nd Generation (Roche Applied Science): Sistema para el marcaje con digoxigenina en los extremos 3´ de fragmentos de ADN.

2.6. Análisis informático

El análisis y tratamiento rutinario de las secuencias de ADN y proteínas ha sido realizado mediante el paquete informático **Vector NTI Advance™** (Invitrogene™). El estudio de relaciones filogenéticas se ha llevado a cabo mediante el uso de los siguientes programas:

- **PHYLIP 3.65** (*PHYLogeny Inference Package*) (Felsenstein, 2005.).
- **MEGA 4** (Tamura *et al.*, 2007).

El estudio de las zonas de unión del regulador de respuesta PhoP al ADN mediante ensayos de protección con ADNasa I se ha realizado con el programa:

- **Peak Scanner™** (Applied Biosystems™).

Diversos recursos de internet han sido de gran utilidad, especialmente las bases de datos:

- **EMBL-EBI** (www.ebi.ac.uk).
- **GenBank** (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/).
- **PubMed** (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/).

Además se han utilizado diferentes motores de búsqueda y comparación disponibles *online:*

- **BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool disponible *online* por *European Bioinformatic Institute,* EBI (www.ebi.ac.uk/Tools/blast2/nucleotide.html) o por *National Center of Biotechnology Information,* NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Motor de búsqueda de las secuencias que presentan una mayor identidad a una secuencia problema.
- **ClustalW2:** herramienta para la realización de alineamientos múltiples (www.ebi.ac.uk/clustalw/).
- **RSA Tools:** *Regulatory Sequence Analysis Tools*, herramienta que facilita la búsqueda de secuencias reguladoras en zonas no codificantes (http://rsat.ulb.ac.be/rsat/).
- **EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms**: el algoritmo Needleman-Wunsch ha sido utilizado para el cálculo de similitud entre dos secuencias. (www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/).
- **Smart**: predicción de dominios proteicos (http://smart.embl-heidelberg.de/).

2.7. Extracción de ADN

2.7.1. Limpieza y precipitación del ADN

La eliminación de proteínas de las soluciones de ADN se realizó mediante un proceso de limpieza con fenol o **fenolización**. Este proceso consiste en la adición sobre la solución de ADN de un volumen de fenol-CIA, mezclar (1 a 5 minutos) y la posterior centrifugación de la mezcla durante 5 minutos a 13000 rpm. Se recupera la fase acuosa y se repite de nuevo el paso anterior hasta que la solución de ADN se vea libre de impurezas. Este proceso se finaliza utilizando 1 volumen de CIA**,** con el fin de eliminar los restos de fenol que pueden quedar, recuperando de nuevo la fase acuosa tras agitar y centrifugar.

En la **precipitación** de ADN lo que se pretende es que éste pierda su solubilidad en agua por la adición de sales y de un alcohol. Para ello a la suspensión acuosa de ADN se le añaden 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato sódico 3M, pH 7,0. La mezcla se mantiene mínimo 2 horas a -20°C ó 30 minutos a -80°C. Se centrifuga a 13000 rpm durante

30 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante. Opcionalmente, se puede lavar el precipitado con 0,5 volúmenes de etanol al 70 %, volviendo a centrifugar y retirar el sobrenadante. Una vez seco el precipitado se resuspende en agua o en TE, pudiéndose conservar a 4°C o preferentemente congelado (-20°C) durante largos períodos de tiempo.

* Soluciones:

- **Fenol-CIA**: 1/2 volumen de fenol neutro pH 7,4 : 1/2 volumen de CIA.
- **Fenol neutro**: Neutralizar el fenol ácido comercial AquaPhenol™. Diluir 5 ml pH Marker™ 7,5 en 50 ml de agua destilada y añadir la disolución a los 250 ml de AquaPhenol™. Mezclar y dejar que se separen las dos fases. El pH de la fase superior acuosa se puede determinar con un pHmetro (no utilizar tiras de medida de pH porque el fenol puede interferir en la medida). El valor de pH debe ser 7,5 ± 0,05.
- **Cloroformo-isoamílico (CIA)**: Mezclar 24 partes de cloroformo y 1 de alcohol isoamílico.
- **Etanol al 70 %:** Diluir etanol absoluto en agua al 70 % (v/v).

2.7.2. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*

Lisis alcalina

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

* Protocolo:

- Inocular 100 ml de medio TB con células de *E. coli* portadoras del plásmido que se pretende aislar. Incubar durante 12-16 horas. El medio debe estar suplementado con el/los antibióticos necesario/s para el mantenimiento del plásmido.
- Recoger las células por centrifugación en tubos de centrífuga tipo GSA a 4500 rpm durante 5 minutos y retirar el sobrenadante.
- Añadir 5 ml de Solución I de lisis (TEG) y resuspender con ayuda de un *vortex*. Transferir a un tubo de centrífuga tipo SS34 o Falcon y añadir lisozima en una concentración final de 10 mg/ml. Mezclar bien y poner en hielo 10 minutos.
- Añadir 10 ml de Solución II de lisis y mantener en hielo 10 minutos, agitando cada 2 minutos. La mezcla debe ir adquiriendo un aspecto cada vez más mucoso.
- Añadir 7,5 ml de Solución III de lisis y mantener en hielo 10 minutos, agitando suavemente cada 2 minutos.
- Centrifugar a 4°C durante 30 minutos y 6000 rpm, filtrar el sobrenadante a través de una gasa estéril a otro tubo de centrífuga idéntico. Añadir 12 ml de isopropanol, mezclar y centrifugar a temperatura ambiente durante 10 minutos a 5000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado hasta que se evapore el isopropanol.

- Resuspender el precipitado en 2 ml de agua destilada, pasarlo a un tubo de 10 ml y añadir 2 ml de LiCl 5 M frío. Dejar la mezcla 15 minutos en hielo y después centrifugar a 4°C durante 15 minutos a 4500 rpm.
- Recoger el sobrenadante en un tubo Corex® y añadir 10 ml de etanol al 100 %. Dejar precipitar al menos 2 horas a -20°C.
- Centrifugar a 4°C durante 10 minutos a 7000 rpm y eliminar el sobrenadante. Secar el precipitado hasta que se evapore el etanol y resuspender en 400 µl de agua destilada. Transferir a microtubos de 1,5 ml.
- Añadir 4 µl de ARNasa (10 mg/ml) e incubar 30 minutos a 37°C.
- Fenolizar, repitiendo al menos dos veces el paso de fenol-CIA y una vez el paso de CIA. Precipitar el ADN durante un mínimo de 2 horas a -20 °C.
- Centrifugar a 13200 rpm y 4°C durante 30 minutos, opcionalmente lavar con etanol al 70 %. Eliminar el etanol y dejar secar el precipitado. Resuspender en 100 µl de agua destilada (Puede utilizarse TE, pero a veces ocasiona problemas de digestión del ADN).

* Soluciones:

- **Solución I de lisis (TEG**): 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 50 mM glucosa. La glucosa puede ser sustituida por sacarosa, denominándose a la solución **TES**. Esterilizar en autoclave a 120°C 20 minutos. La glucosa (esterilizada por filtración) se añade después de autoclavar la solución para evitar su caramelización. Conservar a 4°C.
- **Lisozima:** preparar en solución acuosa a una concentración final de 50 mg/ml.
- **Solución II de lisis**: 0,2 N NaOH; 1 % SDS (docedil sulfato sódico) en agua. Esta solución se prepara justo antes de usar.
- **Solución III de lisis**: 60 % acetato potásico 5 M (autoclavado); 11,5 % ácido acético glacial y 28,5 % de agua. Conservar a 4°C.
- **ARNasa:** diluir en agua a una concentración final de 10 mg/ml. Hervir 10 minutos para eliminar ADNasas.

Minilisis

Este es un protocolo abreviado de la lisis alcalina, en el cual se obtiene menor cantidad de ADN, aunque suficiente para realizar varias reacciones de secuencia o el marcaje de una sonda. Presenta como ventajas sobre la lisis alcalina que la extracción se realiza con menores volúmenes y de manera más rápida.

* Protocolo:

- Inocular 5 ml de medio TB con células de *E. coli* portadoras del plásmido que se pretende aislar. Cultivar durante 12-16 horas. El medio debe ser suplementado con el/los antibióticos necesario/s para el mantenimiento del plásmido.
- Recoger las células por centrifugación a 4500 rpm durante 5 minutos y retirar el sobrenadante.

- Resuspender el precipitado en 200 µl de Solución I de lisis (TEG). Pasar a un microtubo de 1,5 ml e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 400 µl de Solución II de lisis y mantener en hielo 5 minutos agitando cada 2 minutos.
- Añadir 300 µl de Solución III de lisis y mantener en hielo 10 minutos agitando cada 2 minutos. Al finalizar este paso la mezcla ha de tener un aspecto mucoso.
- Centrifugar 20 minutos a 13200 rpm y recoger con cuidado el sobrenadante para evitar retirar los restos celulares del fondo del microtubo. Pasar el sobrenadante a un nuevo microtubo.
- Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol, mezclar y centrifugar a temperatura ambiente durante 30 minutos a 13200 rpm.
- Eliminar el sobrenadante, dejar secar el precipitado y resuspender en 100 µl de agua destilada. Añadir 7 µl de ARNasa (10 mg/ml) e incubar 30 minutos a 37°C.
- Fenolizar, repitiendo dos veces el paso de fenol-CIA y una vez el paso de CIA. Añadir 2,5 volúmenes de etanol a la solución acuosa de ADN y dejar precipitar durante al menos 2 horas a -20°C o media hora a -80°C.
- Centrifugar a 13200 rpm y 4°C durante 30 minutos. Eliminar el etanol y dejar secar el precipitado. Resuspender en 30 µl de agua destilada.

Minipreparación (Miniprep)

Este método, utilizado para obtener ADN plasmídico de *E. coli* a pequeña escala y de forma rápida, fue básicamente el descrito por Holmes y Quigley (1981). Con este método se obtiene cantidades de ADN suficientes para el análisis de plásmidos recombinantes aislados de transformantes de *E. coli.*

* Protocolo:

- Tomar una colonia con un palillo estéril e inocular un microtubo de 1,5 ml con 1 ml de medio TB suplementado con el/los antibióticos necesario/s para el mantenimiento del plásmido. Incubar durante 12-16 horas.
- Precipitar las células mediante centrifugación a 10000 rpm durante 1-2 minutos.
- Mientras tanto, mezclar 200 µl de STET y 3 µl de lisozima (50 mg/ml) por cada minipreparación y añadir 200 µl de la mezcla a cada microtubo.
- Resuspender el precipitado agitando vigorosamente durante 40 segundos y hervir durante otros 40 segundos.
- Centrifugar 15 minutos a 13200 rpm y eliminar con un palillo estéril el precipitado de restos celulares.
- Añadir 200 µl de isopropanol. Mezclar unos segundos. Dejar reposar entre 30 segundos y 5 minutos. Centrifugar a temperatura ambiente 15 minutos a 13200 rpm.

- Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado. Resuspender en 50 µl de agua destilada.

* Soluciones:

- **STET:** 8 % sacarosa; 0,5 % Tritón X-100; 50 mM EDTA, pH 8,0; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; en solución acuosa.

2.7.3. Aislamiento de ADN total de *Streptomyces* spp.

Existen diferentes métodos de extracción de ADN desarrollados para el género *Streptomyces*. El método de **Kirby** permite obtener ADN de gran pureza pero es un proceso laborioso y requiere el uso de una gran cantidad de fenol. Por el contrario, el método de ***Salting-out*** es un método sencillo y no precisa de etapas de fenolización.

Método de Kirby

El protocolo para este método de extracción de ADN está basado en el descrito en el manual *Practical Streptomyces Genetics* (Kieser *et al.,* 2000).

* Protocolo:

- Inocular 50 ml de medio TSB o BASAm con esporas o con micelio de *Streptomyces*. Opcionalmente, se puede añadir glicina a una concentración final de 0,5 % ya que facilita la rotura de la pared celular, mejorando la extracción de ADN. Incubar con agitación orbital durante 36-48 horas a 28ºC.
- Recoger el micelio por centrifugación a 6000 rpm durante 20 minutos y retirar el sobrenadante. Si el micelio es difícil de precipitar se le puede añadir un volumen de agua destilada antes de centrifugar.
- Resuspender el micelio en 6 ml de tampón TES suplementado con 200 µl de lisozima (50 mg/ml). Incubar a 37ºC durante 30 minutos.
- Añadir 8 ml de solución Kirby (2X) y agitar vigorosamente durante 1 minuto.
- Añadir 16 ml de Fenol-CIA y agitar vigorosamente durante 15 segundos.
- Centrifugar durante 10 minutos a 4000 rpm y transferir la fase acuosa a un nuevo tubo. Repetir el mismo tratamiento. Este proceso de fenolización se puede realizar con tubos de 15 ml Phase Lock Gel Heavy (5 PRIME) de manera más rápida y fácil. Previamente a la utilización de los tubos es necesaria su centrifugación a máxima velocidad durante 1 minuto con el objeto de compactar la matriz interior.
- Volver a centrifugar como en el paso anterior y recoger de nuevo la fase acuosa. Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol. Agitar suavemente hasta que precipite el ADN.
- Recoger el "ovillo" de ADN con la punta de una pipeta Pasteur y resuspender en 1 ml de agua destilada.

- Opcionalmente, añadir 4 µl ARNasa (10 mg/ml) e incubar a 37ºC durante 30 minutos.
- Fenolizar, repitiendo dos veces el paso de fenol-CIA y una vez el paso de CIA. Precipitar el ADN durante al menos 2 horas a -20°C o media hora a -80°C.
- Centrifugar a 13200 rpm durante 30 minutos. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado. Resuspender en 200-500 µl de agua destilada dependiendo de la cantidad de ADN que se haya extraído. Si no se consigue una suspensión homogénea del ADN, calentar la solución a 50ºC hasta la completa disolución del ADN.

* Soluciones:

- **Tampón TES**: 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,3 M sacarosa.
- **Solución Kirby (2X)**: 2 g SDS; 12 g sodio 4-amino-salicílico; 5 ml Tris-HCl 2 M pH 8,0; 6 ml Fenol neutro, añadir agua destilada hasta 100 ml.

Método de *Salting-out*

El método descrito es una variación del publicado por Pospiech y Neumann (1995) y se encuentra recogido en el manual *Practical Streptomyces Genetics* (Kieser *et al.,* 2000).

* Protocolo:

- Inocular 30 ml de medio TSB o BASAm con esporas o con micelio de *Streptomyces*. Opcionalmente, se puede añadir glicina a una concentración final de 0,5 %. Incubar con agitación orbital durante 36-48 horas a 28ºC.
- Recoger el micelio por centrifugación en tubo Falcon a 6000 rpm durante 20 minutos y retirar el sobrenadante. Si el micelio es difícil de precipitar se le puede añadir un volumen de agua destilada antes de centrifugar.
- Resuspender el precipitado de micelio en 5 ml de tampón SET y añadir 100 µl de lisozima (50 mg/ml). Incubar 30 minutos a 37ºC.
- Añadir 50 µl de ARNasa (10 mg/ml) y 140 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Agitar y añadir 300 µl SDS 20 %. Mezclar por inversión e incubar la mezcla 2 horas a 55ºC. Agitar la solución regularmente.
- Añadir 2 ml de NaCl 5 M. Agitar por inversión y dejar enfriar.
- Añadir 5 ml de cloroformo y agitar suavemente en agitador de mesa durante 30 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar 15 minutos a 6000 rpm. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo Falcon y añadir 0,6 volúmenes de isopropanol. Agitar suavemente hasta que precipite el ADN.
- Recoger el "ovillo" de ADN con la punta de una pipeta Pasteur y dejar secar al aire para eliminar los restos de isopropanol. Resuspender en 200-500 µl de agua destilada dependiendo de la cantidad de ADN que se haya extraído. Si el ADN es difícil de resuspender calentar la solución a 50ºC hasta la completa disolución del ADN.

* Soluciones:

- **Tampón SET**: 75 mM NaCl; 75 mM EDTA pH 8,0 ml; 20 mM Tris-HCl pH 7,5.
- **Proteinasa K:** preparar en solución acuosa a una concentración final de 20 mg/ml.
- **ARNasa:** preparar en solución acuosa a una concentración final de 10 mg/ml. Hervir durante 10 minutos para eliminar las ADNasas.
- **SDS 20 %:** preparar en agua destilada.

2.8. Extracción de ADN de geles de agarosa

Determinados fragmentos de ADN separados mediante electroforesis en geles de agarosa fueron extraídos de la matriz con el fin de ser empleados en manipulaciones posteriores. Para ellos se emplearon tres métodos distintos dependiendo principalmente del **tamaño del fragmento de ADN** a extraer. El primero de ellos es una técnica tradicional basada en la congelación rápida de la banda de agarosa con el ADN en su interior y la centrifugación a través de algodón hidrófilo; este método se utilizó especialmente para fragmentos de gran tamaño, por encima de las 5 kb. También para fragmentos de gran tamaño, se usó el sistema comercial *QIAEX® II Gel Extraction Kit*. El tercer procedimiento es el sistema comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* y se utilizó para la extracción de fragmentos de un tamaño menor de 5 kb.

2.8.1. Método de congelación rápido (*Freeze-squeeze*)

Esta técnica conocida como ***freeze-squeeze*** (Tautz y Renz, 1983) es un método rápido y sencillo, con un porcentaje de recuperación de ADN del 70 %.

* Protocolo:

- Cortar la banda de del gel procurando escindir la menor cantidad de agarosa posible. Introducir el fragmento de agarosa en un microtubo de 1,5 ml y congelar la banda a -20ºC durante 30 minutos o a -80ºC durante 15 minutos.
- Colocar un microtubo, al que se ha practicado un orificio en el fondo y se ha obturado con una pequeña cantidad de algodón hidrófilo, sobre un microtubo intacto. Situar la banda en el microtubo agujereado y centrifugar a 13200 rpm durante 10 minutos.
- Fenolizar la fase acuosa recogida en el tubo inferior, una vez con fenol/CIA y seguidamente con CIA. Precipitar el ADN con etanol.
- Resuspender el precipitado en un volumen de agua destilada de 10 µl.

2.8.2. Extracción mediante *QIAEX® II Gel Extraction Kit*

La extracción mediante kits se basa en la solubilización de la agarosa y una adsorción selectiva del ADN en presencia de un agente caotrópico, que permite la unión de ADN de doble cadena a la matriz. De esta manera los contaminantes son eliminados mediante lavados y el ADN se eluye en un tampón de baja fuerza iónica, TE o agua destilada.

Este kit está especificado para la extracción de ADN de tamaños comprendidos entre **40 bp a 50 kb** desde geles de agarosa o soluciones. Utiliza partículas de silica gel como matriz para la adsorción del ADN.

El porcentaje de recuperación depende del tamaño del ADN a extraer y está comprendido entre 60 % y 95 %, consiguiéndose la mayor tasa de recuperación para ADN cuyo tamaño es próximo a 500 pb. El protocolo seguido es básicamente el indicado por el fabricante:

- Pesar un microtubo de 1,5 ml. Colocar la banda de agarosa que contiene el ADN a purificar en dicho tubo y volver a pesar. Calcular el peso de la banda de agarosa.

- Añadir 3 volúmenes de Buffer QX1 a 1 volumen de gel para fragmentos de ADN entre 100 pb y 4 kb (por ejemplo añadir 300 µl de Buffer QX1 para 100 mg de gel). Si el fragmento de ADN no está comprendido entre los tamaños anteriormente especificados seguir la siguiente tabla:

Fragmentos de ADN < 100 pb	Añadir 6 volúmenes de Buffer QX1.
Fragmentos de ADN > 4 kb	Añadir 3 volúmenes de Buffer QX1 más 2 volúmenes de agua destilada.

- Resuspender las partículas QIAEX II mediante agitación mecánica (*vortex*) durante 30 segundos. Añadir QIAEX II a la mezcla de ADN según la siguiente tabla:

≤ 2 µg de ADN	Añadir 10 µl de QIAEX II.
2-10 µg de ADN	Añadir 30 µl de QIAEX II.
Para cada 10 µg de ADN adicionales	Añadir 30 µl de QIAEX II adicionales.

- Incubar a 50°C durante 10 minutos para solubilizar la agarosa y unir el ADN a las partículas de silica gel. Mezclar con *vortex* durante 2 minutos para mantener el QIAEX II en suspensión. El color de la mezcla debe ser amarillo (si el color es naranja o morado añadir 30 µl de acetato de sodio 3M, pH 5,0 y mezclar. El color se debe volver amarillo. Incubar durante 5 minutos adicionales).

- Centrifugar las muestras 30 segundos y retirar el sobrenadante con cuidado.

- Lavar el precipitado con 500 µl de Buffer QX1. Resuspender el precipitado con agitación mecánica, centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos y eliminar el sobrenadante. Este paso de lavado permite eliminar los restos de agarosa.

- Lavar dos veces el precipitado con 500 µl de Buffer PE. Resuspender el precipitado, centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos y eliminar el sobrenadante. Este paso de lavado permite eliminar los restos de sales.

- Dejar secar el precipitado al aire durante 10-15 minutos.
- Añadir 20 µl de agua destilada para eluir el ADN y resuspender el precipitado con agitación mecánica. Incubar según la siguiente tabla:

Fragmentos de ADN ≤ 4 kb	Incubar a temperatura ambiente 5 minutos.
Fragmentos de ADN 4-10 kb	Incubar a 50ºC durante 5 minutos.
Fragmentos de ADN > 10 kb	Incubar a 50ºC durante 10 minutos.

- Centrifugar durante 30 segundos. Recoger el sobrenadante en otro tubo.

Nota: La adsorción del ADN por las partículas QIAEX II solo es eficiente a pH ≤ 7,5. El buffer QX1 contiene un indicador de pH que es amarillo cuando el pH ≤ 7,5 y naranja o violeta cuando el pH es superior.

Para fragmentos mayores de 10 kb resuspender el precipitado mediante agitación suave. La agitación mecánica puede fragmentar el ADN.

2.8.3. Extracción mediante *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*

Este kit usa una matriz (*glass fiber matrix*) colocada sobre una mini-columna para la extracción de fragmentos de ADN comprendidos entre **50 bp** y **10 kb**. El proceso de extracción es rápido y permite un porcentaje de recuperación del ADN en torno al 60 %-80 %, en el caso de fragmentos cargados en geles de agarosa, y del 95 % de productos de PCR de solución. El protocolo seguido es el indicado por el fabricante.

- Pesar un microtubo de 1,5 ml. Colocar la banda de agarosa que contiene el ADN a purificar en dicho tubo y volver a pesar. Calcular el peso de la banda de agarosa.
- Añadir 10 µl del Tampón de captura tipo 3 por cada 10 mg de peso de la banda (no añadir menos de 300 µl de Tampón de captura por muestra).
- Mezclar y calentar a 60ºC durante 15-30 minutos hasta que la agarosa esté completamente disuelta.
- Colocar una GFX microcolumna en su microtubo correspondiente (incluidos en el kit) y transferir hasta 800 µl de la mezcla de Tampón de captura más la muestra (si quedase más volumen transferirlo en una segunda ronda). Dejar a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugar a 13200 rpm durante 30 segundos.
- Descartar el eluido y volver a colocar la columna en el mismo microtubo.
- Añadir 500 µl del Tampón de lavado tipo 1 sobre la microcolumna. Centrifugar a 13200 rpm durante 2 minutos.
- Colocar la microcolumna en un nuevo microtubo de 1,5 ml y añadir 10-50 µl de agua caliente (50ºC) sobre la membrana de la columna. Dejar a temperatura ambiente 5 minutos y centrifugar a 13200 rpm durante 1 minuto.

2.9. Cuantificación y análisis de pureza de ácidos nucleicos

La cuantificación de la cantidad de ácidos nucleicos presentes en una solución se realiza con el equipo Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) mediante medidas espectrofotométricas (A_{260}). La relación absorbancia/cantidad de ácidos nucleicos viene establecida por las siguientes concentraciones equivalentes a una unidad de absorbancia medida a 260 nm:

50 µg/ml ADN bicatenario
40 µg/ml ARN total
33 µg/ml ADN monocatenario

Además la relación A_{260}/A_{280} indica la pureza de la muestra. Una muestra **pura de ADN** presenta una relación **A_{260}/A_{280} ≈ 1,8**; mientras que un **valor ≈ 2** se acepta como una muestra **pura de ARN**. Si se obtiene un valor algo menor en ambos casos es debido a la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que tienen un máximo de absorbancia cercano a 280 nm. La relación A_{260}/A_{230} ofrece otra medida de la pureza de la solución de ácidos nucleicos. Por lo general, el valor 260/230 para una muestra pura de ADN es más alto que la relación 260/280. Dicho valor se encuentra comprendido entre 1,8 y 2,2; si la relación A_{260}/A_{230} es apreciablemente menor indica la presencia de sustancias contaminantes (ND-1000 Spectrophotometer. V3.2 *User's Manual*).

2.10. Tratamiento enzimático del ADN

2.10.1. Hidrólisis con endonucleasas de restricción

Las enzimas de restricción necesarias para este trabajo se utilizaron siguiendo las recomendaciones de los proveedores (New England BioLabs, MBI Fermentas y Takara). Toda enzima posee unas condiciones óptimas de reacción que varían según el tipo de enzima, estas condiciones son: la temperatura de reacción, las condiciones salinas y los aditivos que son suministrados por los tampones de digestión.

El esquema para preparar una reacción de digestión es el siguiente:

Tampón de digestión 10X	1/10 del volumen final
BSA 0,01 %(si lo requiere la enzima)	1/10 del volumen final
Tritón 0,01 % (si lo requiere la enzima)	1/10 del volumen final
ADN	X µg
Enzima de restricción	2X unidades
Agua destilada	el resto

Incubar 2 ó 3 horas a la temperatura adecuada. En el caso de ADN total el tiempo de digestión es mayor, al menos unas 5 horas.

2.10.2. Desfosforilación de los extremos 5´ libres del ADN

Este tipo de tratamiento se aplica a los vectores de clonación, que han sido linealizados, para prevenir su religación. Ponderando el tiempo empleado en este procedimiento y los resultados obtenidos, sólo es recomendable recurrir a la desfosforilación bien cuando se pretendan conseguir ligaciones que por algún motivo resulten problemáticas, o bien en el caso de vectores con alto riesgo de religación como los digeridos con una única enzima.

La fosfatasa **hidroliza los extremos 5' fosfato** del ADN, lo cual impide la formación de enlaces fosfodiéster entre los dos extremos de la misma molécula. Las pautas para una reacción de desfosforilación son las siguientes:

Tampón 10X	1/10 del volumen final
ADN	1-5 µg de ADN digerido
Fosfatasa antártica	1 µl (5 U)
Agua destilada	el resto

- **Tampón 10X**: 500 mM Bis-Tris-Propano-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM $ZnCl_2$ (pH 6,0).

Condiciones de la reacción: Incubar 15 minutos a 37ºC en el caso de extremos 5´ protuberantes o extremos cohesivos o 60 minutos a 37°C para la desfosforilación de extremos 3´ protuberantes. Es conveniente realizar dos rondas de desfosforilación entre las cuales la mezcla se incuba a 65ºC 10 minutos para inactivar la enzima. Para finalizar, la enzima se elimina por fenolización o bien mediante el uso de los kit de extracción de ADN.

2.10.3. Modificación enzimática de los extremos

Los extremos protuberantes generados por las enzimas de restricción fueron, en ocasiones, modificados para obtener extremos romos o semirrellenados y poder ligar así fragmentos de ADN, en principio, no compatibles. En el caso de extremos **5´ protuberantes** el rellenado de los extremos lo lleva a cabo la actividad polimerasa 5´→3´ del fragmento **Klenow** de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Si los extremos fuesen **3´ protuberantes** se consiguen extremos romos mediante la actividad exonucleasa 3´→5´ de la **T4 DNA polimerasa**.

Las pautas para preparar una reacción con **Klenow** son las siguientes:

Nucleótidos (dNTPs)	1mM de cada dNTP necesario
Tampón 10X	1/10 del volumen final
ADN	1 µg
Klenow	1 U
Agua destilada	volumen variable entre 20-50 µl

- **Tampón 10X:** 500 mM Tris (pH 7,5), 100 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT (ditiotreitol), 500 µg/ml BSA.

Condiciones de la reacción: 15 minutos a 37ºC. La enzima se inactiva mediante la adición de 2 µl de 0,2 M EDTA (pH 8,0) o mediante el calentamiento a 65ºC durante 10 minutos.

El esquema de una reacción con **T4 DNA polimerasa** es el siguiente:

Tampón 5X	1/5 del volumen final
ADN digerido o producto de PCR	1 µg
dNTPs (2 mM)	1 µl
T4 ADN polimerasa	1 U
Agua destilada	hasta 20 µl

- **Tampón 5X:** 335 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C), 33 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 84 mM $(NH_4)_2SO_4$.

Mezclar y centrifugar brevemente. Incubar a 11ºC durante 20 minutos o a temperatura ambiente durante 5 minutos. Parar la reacción calentado a 75ºC durante 10 minutos.

Nota: La actividad exonucleasa 3´→5´ de la T4 DNA polimerasa es más efectiva sobre ADN de cadena sencilla que en ADN de doble cadena.

2.10.4. Ligación de fragmentos de ADN

La ADN ligasa del fago T4 cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato del ADN de doble cadena, requiriendo iones Mg^{2+} y ATP como cofactores. La reacción se efectúa en el mínimo volumen posible, preferiblemente 10 µl.

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

ADN del vector	50-100 ng
ADN del inserto	Calcular con la siguiente ecuación
Tampón de ligación (10x)	1 µl
Ligasa del fago T4	1 µl (5 U)
Agua destilada	hasta 10 µl

Para el cálculo de la concentración de inserto se utiliza la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{ng de vector x tamaño del inserto (kb)}}{\text{tamaño del vector (kb)}} \text{ x } 5 = \text{ng de inserto}$$

Si en la reacción se ligan extremos cohesivos entre sí, se efectúa a 14-16ºC durante un mínimo de 6 horas. En el caso de extremos romos la reacción se mantiene a temperatura ambiente pudiendo reducirse el tiempo de incubación.

2.11. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa se realizó según la descripción de Sambrook y Russell (2001). Se utilizó agarosa (Pronadisa) disuelta por calentamiento en tampón Tris-acetato (TAE) con concentraciones entre 0,6 y 2 % dependiendo del rango de tamaños de los fragmentos de ADN a separar (ver tabla 2.3).

Tabla 2.3: Concentración de agarosa utilizada en los geles para resolver fragmentos de ADN de diferentes tamaños.

Concentración de agarosa (%)	Tamaños de los fragmentos de ADN separados
0,6	1-30 kb
0,8	0,8-12 kb
1,0	0,5-10 kb
1,0	0,5-10 kb
1,5	0,2-3 kb
2,0	0,05-2 kb

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

* Protocolo:

- Disolver la cantidad necesaria de agarosa en tampón TAE por calentamiento en microondas. Compensar la pérdida por evaporación con agua destilada.
- Dejar enfriar la solución de agarosa sin que llegue a solidificarse y verter sobre la bandeja colocada en el soporte apropiado para la realización de geles. Dejar enfriar hasta la total solidificación del gel, al menos 20 minutos. Colocar el gel en la cubeta de electroforesis y llenar la misma con tampón TAE hasta cubrir el gel.
- Mezclar las muestras de ADN con 1/10 del volumen final de tampón de carga concentrado y dispensar en el gel. Desarrollar la electroforesis mediante la aplicación de una diferencia de potencial de entre 1 y 5 voltios/cm de gel.
- Teñir el ADN por inmersión del gel durante 20-30 minutos en una solución de Bromuro de etidio (EtBr), éste se intercala en la doble cadena y en las estructuras secundarias de los ácidos nucleicos de cadena sencilla permitiendo su visualización al iluminar el gel con luz ultravioleta. Los geles se visualizan y fotografían sobre un transiluminador Spectroline TR-302 o SYNGENE (emite luz con longitud de onda de 302 nm) con el sistema Video Graphic Printer UP-860CE (Sony).

* Soluciones:

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

- **Tampón de carga concentrado (10X):** 0,25 % azul de bromofenol, 40 % sacarosa; 0,25 % xilén-cianol; en solución acuosa. Se esteriliza en la olla a presión a 120°C durante 20 minutos. Se conserva a 4°C o a temperatura ambiente. En un gel de agarosa al 1 % el azul de bromofenol migra a una velocidad similar a un fragmento de 500 pb y el xilén-cianol a una velocidad similar a un fragmento de 4000 pb.
- **Bromuro de etidio (EtBr):** Se prepara una solución concentrada a 10 mg/ml en agua y se conserva a 4°C protegido de la luz. Para un litro de agua destilada se añaden 200 µl de la solución concentrada. Conservar a temperatura ambiente.

2.12. Método de hibridación tipo Southern

2.12.1. Transferencia de ácidos nucleicos

Transferencia de ADN a filtros de nailon (Southern)

La transferencia a un soporte sólido de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción y sometidos a migración electroforética en geles de agarosa se denomina ***Southern blotting*** o **transferencia tipo Southern** (Southern, 1975). Esta técnica se basa en la fragmentación *in situ* del ADN, separación de las cadenas del mismo y transferencia de estas en forma monocatenaria a la membrana, para su posterior fijación a la misma mediante luz UV. La transferencia se realiza mediante un **sistema de vacío** (*VacuGene XL*, GE Healthcare).

* Protocolo:

- Separar el ADN mediante electroforesis, teñirlo y fotografiarlo con una regla como referencia, a no ser que se use posteriormente un marcador de peso molecular marcado con digoxigenina.
- Cortar una membrana de nailon 1 cm por cada lado mayor que el tamaño del gel. Depositarla en la unidad de transferencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Humedecer la membrana con SSC 2X y conectar el vacío.
- Para colocar el gel sobre la membrana, comenzar por el extremo con pocillos e ir dejándolo caer suavemente. Es importante que no queden burbujas, las cuales interferirían en la transferencia de ADN.
- Cubrir toda la superficie del gel con Solución despurinizante y dejar 20-30 minutos (en este tiempo la banda de menor tamaño del tampón de carga, azul de bromofenol, debe cambiar su color de azul a amarillo). Transcurrido este tiempo se retira la solución.
- Cubrir la superficie del gel con Solución desnaturalizante durante 20-30 minutos (la banda perteneciente al tampón de carga recupera su color azul original).

- Retirar la solución y cubrir la superficie del gel con la Solución neutralizante durante 30 minutos.
- Por último, retirar la solución neutralizante y cubrir la superficie del gel con SSC 20X durante 90 minutos.
- Retirar todo el líquido y marcar con un bolígrafo la posición de los pocillos del gel sobre la membrana antes de retirarlo.
- Colocar la membrana sobre papel de filtro y fijar el ADN a la misma mediante luz ultravioleta (UV-Stratalinker 2400, Stratagene). Dejar secar la membrana.
- Estas membranas se pueden conservar a 4°C protegidos con papel Whatman 3MM y papel de aluminio durante varios meses.

* Soluciones:

- **Solución despurinizante:** 0,25 M HCl.
- **Solución desnaturalizante:** 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH.
- **Solución neutralizante:** 1,5 M NaCl; 0,05 M Tris-HCl, pH 7,2; 1 mM EDTA.
- **SSC 20X:** 3 M NaCl; 0,3 M citrato sódico, pH 7,0.

Transferencia *in situ* de ADN de colonias

Esta técnica se emplea cuando el ADN que se pretende hibridar procede de una colonia, generalmente con el fin de rastrear un genoteca. Este proceso se realizó según el método descrito en el **Manual específico de hibridaciones con digoxigenina:** *DIG Application Manual for Filter Hybridization* 2000 (Roche Diagnostics GmbH).

* Protocolo:

- Crecer colonias aisladas en placas con medio LA suplementado con el antibiótico adecuado sobre una membrana de nailon durante 16-20 horas.
- Para realizar la lisis celular, saturar 2 hojas de papel Whatman 3MM (de tamaño ligeramente superior al de la membrana) en bandejas diferentes con: solución desnaturalizante, solución neutralizante y SSC 2X (2 hojas para cada solución).
- Colocar la membrana (con las colonias hacia arriba) sobre el papel embebido en la Solución desnaturalizante durante 15 minutos.
- Secar brevemente la membrana dejándola sobre papel de filtro.
- Colocar la membrana sobre el papel embebido en Solución neutralizante durante 15 minutos.Volver a secar dejando la membrana sobre papel de filtro.
- Colocar la membrana sobre el papel humedecido con SSC 2X durante 10 minutos.
- Colocar la membrana sobre papel de filtro y fijar el ADN a la membrana mediante luz ultravioleta (UV-Stratalinker 2400, Stratagene).

- Formar una bandeja del tamaño de la membrana con papel de aluminio. Colocar la membrana en dicha bandeja y humedecerla con una solución de proteinasa K (2 mg/ml). Incubar una hora a 37ºC.
- Colocar la membrana entre pliegos de papel de filtro humedecidos con agua destilada y aplicar presión con un rodillo. Al retirar el papel parte de los restos celulares se quedan adheridos al mismo y son a su vez eliminados. Limpiar con cuidado la membrana frotando la superficie suavemente con pañuelos de papel humedecidos en agua destilada.

* Soluciones: Ver anterior apartado.

2.12.2. Marcaje de sondas para Southern

El sistema de marcaje no radiactivo comercializado por la compañía Roche emplea un hapteno esteroide (digoxigenina) para marcar fragmentos de ADN. La digoxigenina está unida al nucleótido trifosfato dUTP por un enlace éster. Las sondas marcadas con digoxigenina son generadas enzimáticamente por el **método de cebado al azar** (*random primed*) descrito por Feinberg y Vogelstein (1983).

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

* Protocolo:

- Obtener 1-3 μg de ADN en forma lineal del fragmento a marcar en un volumen máximo de 15 μl.
- Desnaturalizar el ADN hirviéndolo durante 10 minutos y transferirlo rápidamente a hielo. Añadir 2 μl *DIG DNA labeling mix* 10X, 2 μl de *hexanuleotides mix* 10X y 1 μl de Klenow. Centrifugar para recoger la muestra en el fondo del microtubo.
- Incubar la mezcla a 37°C al menos durante 60 minutos. Preferiblemente incubar entre 16 y 24 horas.
- Parar la reacción congelando directamente o añadiendo 2 μl de EDTA 0,25 mM, pH 8,0 y mantener a -20ºC hasta su utilización.

Cuantificación del marcaje

Un paso importante antes de utilizar las sondas marcadas es comprobar su marcaje. La cantidad de ADN marcado depende de la cantidad inicial y la pureza del ADN molde y el tiempo de incubación a 37ºC.

Para cuantificar el marcaje se realizan diluciones seriadas (1**:**5) de la solución de ADN marcado asumiendo que a partir de 1 µg de ADN se obtienen 780 ng de sonda marcada tras 20 horas de incubación (según el proveedor) y que se tiene un volumen final de 20 µl de producto.

Dilución	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
Cantidad de ADN (pg/µl)	78	15,6	3,12	0,624	0,1248

- Aplicar 1 µl de cada dilución sobre una membrana *Hybond-N™* (GE Healthcare).
- Fijar la sonda mediante luz ultravioleta (UV-Stratalinker 2400, Stratagene).
- Seguir los mismos pasos de los que consta la detección de ADN del protocolo del Southern (2.12.3) a partir del equilibrado de membrana con Tampón I durante 1 minuto en agitación.

Nota: Para poder utilizar una sonda marcada con digoxigenina, es suficiente que se aprecie marcaje con claridad entre los puntos de 312 pg a 62,4 pg. Cuanto mayor sea la dilución en la que se detecte marcaje, más veces se podrá reutilizar la sonda.

2.12.3. Hibridación y detección de ADN

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

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

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

Los **lavados** permiten la eliminación selectiva de las uniones inespecíficas que hayan podido producirse entre la sonda y el ADN. La disminución de la unión inespecífica durante los lavados se consigue: a) disminuyendo la **concentración de sales** del tampón de lavado, b) aumentando la **concentración de detergentes** en el tampón de lavado y c) aumentando la **temperatura y la duración** del lavado

La **detección** permite visualizar la unión de la sonda con los fragmentos de ácidos nucleicos mediante **reacción colorimétrica** en las hibridaciones resueltas con NBT y BCIP, o bien mediante **quimioluminiscencia** en caso de hibridaciones realizadas utilizando CDP-Star.

Las hibridaciones tipo Southern siempre se realizaron con sondas de ADN bicatenario marcadas con digoxigenina. La temperatura óptima de hibridación para cada sonda se dedujo de forma experimental; en el caso de las sondas 100 % homólogas, la temperatura utilizada fue de 65-70°C, siendo reducida sólo en casos de sondas con baja homología.

* Protocolo:

- Colocar la membrana en una bolsa de hibridación y añadir 20 ml de Solución de prehibridación por cada 100 cm^2 de membrana. Sellar la bolsa herméticamente e incubar a la temperatura a la que se va a realizar la hibridación durante 1-2 horas.
- Hervir la sonda previamente marcada 10 minutos para desnaturalizar el ADN. Enfriar rápidamente en hielo. Añadir la sonda así desnaturalizada a una nueva Solución de prehibridación. Esta solución de hibridación puede ser reutilizada varias veces, en caso de ser así, desnaturalizar de igual manera.
- Eliminar la solución de prehibridación y añadir la Solución de hibridación, dejando el conjunto a la temperatura de hibridación un mínimo de 8-10 horas. Tras el tiempo de hibridación, recuperar la solución de hibridación en un tubo para su reutilización y conservarla a -20°C.
- Lavar dos veces la membrana con Solución de lavado I durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación.
- Lavar dos veces la membrana con Solución de lavado II durante 25 minutos a 65°C en agitación.
- Equilibrar la membrana con Tampón I durante 1 minuto en agitación.
- Bloquear la membrana con Tampón II durante 30 minutos, en agitación.
- Sustituir el tampón II por la Solución de anticuerpos y dejar al menos 30 minutos en agitación. Realizar este paso en bolsa de hibridación.
- Eliminar la Solución de anticuerpos, lavar la membrana 2 veces con Tampón I durante 15 minutos en agitación.
- Eliminar el Tampón I y sustituirlo por Tampón III durante 2 minutos, en agitación.
- Mezclar 45 µl de Solución NBT y 35 µl de Solución X-fosfato por cada 10 ml de Tampón III y añadir esta solución de color a una bolsa de hibridación con la membrana en su interior. Sellar la bolsa y mantenerla en oscuridad hasta que aparezcan señales de hibridación (precipitado marrón en el filtro).
- Retirar la solución de color y detener la reacción añadiendo agua destilada.

* Soluciones:

- **Solución de prehibridación:** 5X SSC; 1 % agente bloqueante (*Blocking Reagent* de Roche); 0,1 % N-lauril sarcosina; 0,02 % SDS.
- **Solución de hibridación:** Solución de prehibridación más la sonda marcada.
- **Solución de lavado I:** 2X SSC y 0,1 % SDS.
- **Solución de lavado II:** 0,1X SSC y 0,1 % SDS.
- **Tampón I:** 100 mM ácido maléico; 150 mM NaCl, pH 7,5.
- **Tampón II:** Tampón I más 0,5-1 % de agente bloqueante (*Blocking Reagent* de Roche).
- **Tampón III:** Se prepara por una parte 1 M Tris-HCl, pH 9,5; y por otro lado 1 M NaCl; 500 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. De esta forma las soluciones están a 10X, mezclándose antes de usar como 1X.
- **Solución de anticuerpos:** diluir en una proporción 1:10.000 anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) en Tampón II.
- **Solución NBT (Azul de nitrotetrazolio):** NBT 75 mg/ml en dimetilformamida 70 % en agua destilada.
- **Solución X-fosfato (BCIP):** (X-fosfato = 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) 50 mg/ml en dimetilformamida.

2.13. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica descrita inicialmente por Mullis y Faloona (1987) permite la amplificación de ácidos nucleicos. Así, partiendo de una molécula de ADN diana se pueden obtener entre 10^5 y 10^9 veces una secuencia específica contenida en ella mediante la utilización de oligonucleótidos (o cebadores) diseñados al efecto y una ADN polimerasa termoestable.

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

1. Desnaturalización: Consiste en la separación de las dos cadenas del ADN molde mediante la incubación a elevada temperatura (94-98ºC). Las hebras disociadas permanecerán de esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente como para permitir la unión de los cebadores.

2. Anillamiento de los cebadores: Básicamente consiste en la unión de dos oligonucleótidos al ADN diana. Cada uno de los cuales es complementario a una de las dos cadenas del ADN y su diseño es tal, que quedan enfrentados por sus extremos 3' tras el anillamiento flanqueando la región a amplificar. La distancia entre ellos determinará la longitud de la secuencia de ADN que se pretende obtener.

3. Extensión: Consiste en la elongación de los cebadores del conjunto ADN-cebador por la acción de una ADN polimerasa termoestable, a una temperatura próxima a los 72ºC, durante un tiempo que depende de la longitud del fragmento a amplificar. El resultado del proceso es la formación de las dos nuevas cadenas de ADN, copias de la molécula molde y

que han incorporado en el extremo 5' de su secuencia al cebador respectivo. Este paso depende de la velocidad de proceso de la enzima (p.ej.: GoTaq polimerasa 1 kb/minuto).

En el mercado existen diversas ADN polimerasas que se pueden usar para PCR y cada una de ellas con unas características y condiciones específicas para llevar a cabo la reacción. En este caso, dos han sido las enzimas utilizadas aunque de diferentes casas comerciales: a) *Taq DNA polymerase* (Promega) o *GoTaq* (Promega), cuando la introducción de un pequeño número de errores no resultaba crucial para el experimento (p. ej.: sondas). Esta enzima deja una desoxiadenosina en cada extremo 3', lo que permite clonar directamente los fragmentos amplificados por PCR en vectores del tipo pGEM-T Easy (Promega); b) *Platinum® Pfx DNA polymerase* (Invitrogen) o *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs), se utilizó cuando la fidelidad en la copia es imprescindible (p. ej.: secuenciación del ARNr 16S).

2.13.1. Típica reacción de PCR

En la tabla 2.4 se especifican, de acuerdo al catálogo ***PCR applications manual*** (Roche), los valores normales de los distintos componentes para la realización de un típica reacción de amplificación por PCR. Estos valores son orientativos y han de ser ajustados en función de la ADN polimerasa, el tipo de región a amplificar, etc. De igual forma, en algunas reacciones se hace necesario el uso de aditivos que potencian la eficiencia o especificidad de la reacción (betaina, seroalbúmina bovina, detergentes, etc).

Tabla 2.4: Componentes necesarios para realizar una reacción de PCR y concentraciones finales para 50 µl de reacción.

ADN molde	10-50 ng ADN total/0,1-1 ng ADN plasmídico
Cebadores (18-20 pb)	0,1-1,0 µM
ADN polimerasa	0,5-2,5 unidades
$MgCl_2$	1-5 mM (normalmente 1,5 mM)
dNTP	50-500 µM (normalmente 200 µM)
Tampón 10X	1X
DMSO (ver nota)	5 %
Agua destilada	Hasta 50 µl

Nota: En la amplificación de fragmentos de ADN pertenecientes a *Streptomyces* (genoma con alto contenido en G+C) es necesario añadir DMSO en la mezcla de PCR. El DMSO facilita la separación de la doble cadena de ADN por lo que incrementa la eficiencia de la reacción de PCR.

Los tiempos y temperaturas para una reacción de PCR son básicamente empíricos y dependen de diversos factores como: contenido en **G+C del ADN**, contenido en **G+C de los oligonucleótidos**, **longitud del fragmento** a amplificar, **velocidad de procesamiento** de la ADN polimerasa, **abundancia de ADN molde**, etc. De modo genérico estos tiempos y temperaturas aparecen reflejados en la tabla 2.5.

Tabla 2.5: Tiempos y temperaturas de reacción típicos para una reacción de PCR.

Desnaturalización inicial		5 min. a 94-98ºC	1 ciclo
Amplificación	**Desnaturalización**	30 s. a 94-98ºC	30-40 ciclos
	Anillamiento	30-45 s Tª según cebadores	
	Extensión	X s a 72ºC (depende de la polimerasa)	
Extensión final		10 min. a 72ºC	1 ciclo

Al finalizar cualquier reacción de PCR, es recomendable analizar el resultado de la misma en un gel de agarosa, comprobando la cantidad de amplificación, no existencia de bandas inespecíficas, etc.

2.14. Secuenciación de ADN

La secuenciación por el método de Sanger (1977) requiere como molde ADN de cadena sencilla para que la ADN polimerasa actúe. Este molde puede conseguirse a partir de vectores del tipo fagémido o por desnaturalización de ADN bicatenario en una reacción de PCR.

El proceso de secuenciación se realizó por el método de los didesoxinucleótidos descrito por Sanger (1977). Para ello se ha empleado el sistema de secuenciación automática no radiactiva *ABI Prism* 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) y el *ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems).

La síntesis de ADN complementario a un ADN de cadena sencilla a partir de un cebador la realiza la ADN polimerasa del fago T7. La síntesis se puede detener de forma aleatoria por la introducción de pequeñas cantidades de didesoxinucleótidos (ddNTP), análogos a los desoxinucleótidos (dNTP) que carecen del grupo 3' hidroxilo necesario para la formación del siguiente enlace fosfodiéster. Estos didesoxinucleótidos están conjugados con un fluoróforo específico para cada uno de los mismos.

En la fase de elongación, la ADN polimerasa incorpora los ddNTPs al azar en distintos tiempos, dando lugar a una población de moléculas fluorescentes de distintos tamaños. Las reacciones son sometidas a electroforesis en capilar y los fragmentos de ADN en su migración a lo largo del mismo atraviesan un haz fijo de luz láser, lo que genera señales fluorescentes que son detectadas y almacenadas por el sistema.

Cada reacción de secuencia se realiza en un volumen de 20 µl, manteniendo las proporciones que a continuación se reflejan:

Premix sequencing buffer (P)	2 µl
5X *Sequencing buffer* (B)	2 µl
Cebador (20 µM)	1 µl
ADN molde	200-500 ng
DMSO	0,7-1,4 µl
Agua destilada	Hasta 20 µl

El *Premix sequencing buffer* (P) contiene los ddNTPs, dNTPs y la ADN polimerasa. El 5X *Sequencing buffer* (B) es el tampón de la reacción. En ninguno de los dos casos se conoce la composición exacta. La cantidad de ADN molde indicada es para el caso de ADN plasmídico, siendo entre 5 y 80 ng para productos de PCR, entre 25-50 ng para ADN de cadena sencilla y de 0,5 a 1 µg para cósmidos.

La preparación de una muestra de ADN para la secuenciación del mismo conlleva los siguientes pasos:

* Protocolo:

- Realizar una reacción de PCR para cada muestra con los siguientes valores: 1 ciclo de 94ºC, 3 minutos; 25 ciclos de 96ºC 10 segundos, 50ºC 5 segundos, 60ºC 4 minutos.
- Pasar la reacción a un microtubo de 1,5 ml. Añadir 5 µl de EDTA (125 mM) y 60 µl de etanol absoluto. Mezclar e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 4°C durante 20 minutos a 13200 rpm. Retirar el sobrenadante.
- Lavar el precipitado (casi invisible) con 60-70 µl de etanol al 70 %.
- Centrifugar 15 minutos a 13200 rpm y temperatura ambiente. Retirar el etanol y dejar evaporar los posibles restos.
- Conservar a -20°C hasta el momento de su análisis.
- Descongelar la muestra a temperatura ambiente durante unos minutos.
- Añadir 30 µl de Hi-Di Formamida (Applied Biosystems) y mezclar con *vortex* durante 1 minuto.
- Desnaturalizar la reacción calentando a 95°C durante 3-5 minutos.
- Mezclar nuevamente con *vortex* y centrifugar para recoger la reacción en el fondo del tubo.

2.15. Transformación de microorganismos

2.15.1. Transformación de *E. coli*

Obtención de células competentes

Para introducir ADN en *E. coli* por medio del método de transformación, se requiere una disponibilidad de las bacterias que facilite el paso de las moléculas de ADN a través de las

barreras externas de la célula. A este estado se le denomina **competencia** y las células que lo presentan se denominan **células competentes**. Se siguieron dos métodos de inducción del estado de competencia dependiendo de la eficiencia deseada en cada caso: un método basado en el uso de cationes divalentes que utiliza **cloruro de rubidio** (Hanahan, 1985) y el método **SEM** (*simple and efficient method*) descrito por Inoue y colaboradores (1990). Este segundo método está basado en el procedimiento del cloruro de rubidio y aunque no se consigue la alta eficiencia que presenta el primero, requiere de soluciones más baratas (el cloruro de rubidio es un compuesto caro) y es más reproducible en cuanto a la eficiencia conseguida. El método SEM se utilizó de manera rutinaria para inducir el estado de competencia de diferentes cepas de *E. coli*, especialmente de las DH5α que se utilizaron como células hospedadoras de mezclas de ligación (nuevas construcciones de plásmidos). Mientras que, el método de cloruro de rubidio fue el procedimiento seguido para obtener la competencia de las cepas de *E. coli* ET12567/pUZ8002, ya que para ciertos experimentos era necesaria su transformación con cósmidos por lo que se requería una alta eficiencia.

A) Método del Cloruro de Rubidio

La utilización de este método permite la obtención de células competentes de *E. coli* con una eficiencia de transformación de hasta 10^8 transformantes por µg de ADN.

* Protocolo:

- Crecer *E. coli* en medio LB sólido para obtener un cultivo fresco.
- Inocular 5 ml de medio SOB suplementado con la solución de magnesio (2ml por cada 100 ml de SOB) con una colonia de *E. coli*. Incubar toda la noche (12-14 horas) a 37ºC y 250 rpm.
- Inocular 100 ml de SOB suplementado con magnesio con 200-400 µl del preinóculo. Incubar a 37ºC y 250 rpm hasta alcanzar la DO_{600} de 0,48.
- Enfriar el matraz en hielo, a partir de este paso trabajar en frío. Recoger las células por centrifugación en tubos de centrífuga tipo GSA a 5000 rpm y 4ºC durante 5 minutos y retirar el sobrenadante.
- Resuspender suavemente el precipitado celular en 30 ml de solución fría (4ºC) RF1. Mantener en hielo durante 30 minutos.
- Centrifugar 5 minutos a 5000 rpm y 4ºC y retirar el sobrenadante.
- Resuspender el precipitado en 8 ml de la solución fría (4ºC) RF2.
- Repartir en alícuotas de 120 µl en microtubos de 1,5 ml y congelar en nitrógeno líquido. Conservar a -80ºC.
- Con 10-20 pg de un plásmido previamente cuantificado, comprobar la eficiencia de transformación expresándola en transformantes/µg de ADN.

* Soluciones:

- **RF1:** 100 mM RbCl; 50 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 30 mM acetato potásico; 10 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 15 % glicerol. Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M.
- **RF2:** 10 mM MOPS; 10 mM RbCl, 75 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 15 % glicerol. Ajustar el pH a 6,8 con NaOH 1N.
- **Solución madre de magnesio**: 1M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 1M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Esterilizar las anteriores soluciones por filtración.

B) Método SEM

En este protocolo son importantes: la **temperatura** de crecimiento del cultivo (18ºC), trabajar durante todo el proceso de lavados e inducción de la competencia a **4ºC**, mantener la **relación de 1/10** entre el medio y la capacidad del matraz para que exista una buena aireación y agitar las células de **forma suave**, no utilizando el vortex.

* Protocolo:

- Crecer *E. coli* en medio LB sólido (LA) para obtener un cultivo fresco.
- Crecer durante la noche a 37°C un preinóculo en medio SOC (5 ml) con 20-30 colonias de *E. coli*.
- Inocular 50 ml de medio SOC con un 1 % de preinóculo. Crecer en agitación (250 rpm) a 18°C.
- Cuando el cultivo alcance una DO_{600} de 0,6, colocar el matraz en hielo 10 minutos. A partir de este paso trabajar en frío.
- Centrifugar a 3000 rpm en tubos tipo GSA durante 10 minutos.
- Retirar los restos de medio y resuspender en 80 ml de tampón TB frío (4ºC). No usar agitador. Dejar en hielo 10 minutos.
- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- Retirar los restos de medio y resuspender en 20 ml de tampón TB frío agitando manualmente. Añadir 1,4 ml de DMSO (concentración final 7 %). Agitar suavemente y dejar en hielo 10 minutos.
- Repartir en alícuotas de 100 µl de células en microtubos de 1,5 ml. Inmediatamente congelar en nitrógeno líquido. Conservar a -80°C.
- Con 10-20 pg de un plásmido previamente cuantificado, se comprueba la eficiencia de transformación expresándola en transformantes/µg de ADN.

* Soluciones:

- **Tampón TB** (Para 1 litro): 10 mM PIPES (3,025 g), 15 mM $CaCl_2$ (1,65 g), 250 mM KCl (18,65 g). Ir añadiendo KOH 1 M para que se disuelvan los componentes y a la par ajustar el pH a 6,7. Después añadir 10,9 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$. Esterilizar por filtración y conservar a 4°C.

Procedimiento de transformación

El método de transformación empleado fue descrito por Hanahan (1983) y es prácticamente universal para las diversas cepas de *E. coli,* pudiendo ser usado para transformar células competentes preparadas por cualquier método.

* Protocolo:

- Descongelar las células competentes manteniendo el tubo en hielo.
- A una solución de células descongeladas se les añade el ADN hasta un volumen máximo de 10-15 µl y se mantiene la mezcla en hielo durante 30 minutos.
- Choque térmico a 42°C durante 90 segundos. Enfriar en hielo 1-2 minutos.
- Añadir 400 µl de LB e incubar las células durante 1 hora en agitación (250 rpm) a 37°C. Este tiempo de incubación permite que la célula exprese los genes de resistencia a antibióticos incluidos en el plásmido con el que se acaba de transformar.
- Finalmente, sembrar las células en placas con medio suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de transformantes.

Nota: Si la resistencia del plásmido es ampicilina no hace falta incubar las células a 37ºC durante 1 hora. Tras el choque térmico directamente en medio sólido con antibióticos.

2.15.2. Conjugación de *Streptomyces* spp.

La conjugación se define como la transferencia de información genética desde una célula donadora a otra receptora, por un mecanismo que incluye un **contacto directo célula a célula**, un plásmido conjugativo en la célula donadora y la intervención de estructuras superficiales especializadas y de funciones específicas. Este proceso se puede dar entre células de un mismo género, o entre células de géneros diferentes (conjugación intergenérica).

El protocolo descrito para la transferencia genética es una modificación (Flett *et al.*, 1997) del método descrito por Mazodier y colaboradores (1989). Muchas cepas de *Streptomyces* contienen un sistema de restricción sensible a la metilación del ADN por lo que previamente el plásmido a conjugar se introduce en un **hospedador carente de sistemas de metilación**. En este caso se utiliza la cepa de *E. coli* ET12567 (MacNeil *et al.*, 1992), que contiene el plásmido no movilizable pUZ8002 (Sia *et al.*, 1996; Paget *et al.*, 1999), el cual contiene las funciones de transferencia necesarias (genes *tra*) para que se produzca el paso de material genético de una célula a otra.

* Protocolo:

- Preparar células competentes de *E. coli* ET12567/pUZ8002 en presencia de kanamicina (25 µg/ml) y cloranfenicol (25 µg/ml) para mantener el plásmido pUZ8002 y la mutación *dam,* respectivamente. Utilizar el método del Cloruro de Rubidio si van a ser transformadas con cósmidos.

- Transformar el plásmido o cósmido a conjugar en las células competentes de *E. coli* ET12567/pUZ8002. Distribuir en placas de LB suplementado con el antibiótico adecuado e incubar a 37ºC.
- Inocular una colonia en 5 ml de LB con cloranfenicol (25 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y el antibiótico correspondiente a la construcción a conjugar. Incubar durante toda la noche, con agitación orbital a 250 rpm y a una temperatura de 37ºC.
- Diluir 0,5 ml del cultivo en 25 ml de LB con antibióticos. Incubar en agitación orbital (250 rpm), a 37ºC, durante 3-5 h hasta alcanzar una DO_{600} entre 0,4-0,6.
- Lavar dos veces las células con 25 ml de LB para eliminar los antibióticos que pueden inhibir el crecimiento de *Streptomyces*.
- Mientras se lavan las células, resuspender una concentración de esporas determinada (depende de la especie de *Streptomyces*) en 500 µl de medio 2xTY. Aplicar un choque térmico de 50ºC, durante 10 min. Alternativamente, se puede usar micelio; para lo cual se recoge con un bastoncillo el micelio (1/8 de la superficie de una placa de 9 cm de diámetro) crecido en TSA durante 24 horas a 28ºC. El micelio se resuspende en 500 µl de glicerol 20 %. En este caso no es necesario aplicar choque térmico.
- Mezclar 0,5 ml de células de *E. coli* con 0,5 ml de suspensión de esporas o de micelio de *Streptomyces* y agitar vigorosamente. Centrifugar y resuspender el precipitado en unos 50 µl del sobrenadante.
- Plaquear en medio MS al que se ha añadido 10-20 mM de $MgCl_2$ (sin antibióticos) e incubar a 28ºC, durante 18-24h.
- Añadir una cobertera de 1,5 ml de agua con 0,5 mg de ácido nalidíxico (impide el crecimiento de microorganismos Gram-negativos como *E. coli*) y el antibiótico de selección adecuado, en la mayoría de los casos 1,25 mg de apramicina. Extender la cobertera por toda la superficie de la placa. Incubar a 28ºC, durante 5-6 días hasta que aparezcan las colonias.

2.16. Procedimientos propios de la caracterización taxonómica

2.16.1. Estudios de quimiotaxonomía

Análisis de la pared celular

La detección e identificación del tipo de isómero del ácido diaminopimélico (DAP) presente en la pared celular se realiza mediante una modificación del procedimiento descrito por Hasegawa y colaboradores (1983). El ácido diaminopimélico al reaccionar con la ninhidrina da un color verde oliva característico lo que permite su detección en cromatografía en capa fina.

* Protocolo:

- Incubar la cepa objeto de estudio en medio líquido. Recoger 2 ml y centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender el precipitado en 2 ml de SDS al 8 % y sonicar en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. Volver a centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos y eliminar el sobrenadante. Repetir este paso una segunda vez.
- Lavar el precipitado con 8 ml de agua destilada y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
- Hidrolizar la muestra con H_2SO_4 y neutralizar con una solución saturada de $Ba(OH)_2$.
- Evaporar el sobrenadante y disolver el residuo en 0,3 ml de agua destilada.
- Tomar 2 µl del hidrolizado y colocarlo en una placa de celulosa para la cromatografía.
- Las condiciones de desarrollo cromatográficas son las siguientes: la fase móvil se compone de metanol:agua destilada:HCl 6N:piridina (80:26:4:10, v:v).
- Una vez finalizada la cromatografía, se seca la placa y se aplica la Solución de ninhidrina mediante un pulverizador. Calentar la placa a 100ºC durante 3 minutos para que tenga lugar la reacción colorimétrica.

* Soluciones:

- **Solución de ninhidrina:** 200 mg en 100 ml de etanol.

Nota: En el procedimiento de Hasegawa y colaboradores (1983) la hidrólisis de las células se realiza con HCl, pero con este ácido los resultados no son siempre claros mientras que el ácido sulfúrico ofrece mejores resultados.

Determinación de azúcares

Método basado fundamentalmente en el protocolo de Hasegawa y colaboradores (1983).

* Protocolo:

- Colocar en un tubo de vidrio (que tenga tapón de rosca con teflón) 1 ó 2 colonias de la cepa crecida en medio sólido.
- Añadir al tubo 0,1 ml de HCl 0,25 N y autoclavar a 121ºC durante 15 minutos.
- Una vez frío, 2 µl del hidrolizado se pican directamente en una placa de celulosa.
- En esta placa también se coloca, 1 µl de una solución estándar de azúcares formada por galactosa, glucosa, manosa, arabinosa, xilosa y ribosa; cada uno de los cuales se encuentra a una concentración final del 1 %.
- La placa de celulosa se introduce en la cámara cromatográfica donde se encuentra el solvente: n-butanol:agua destilada:piridina:tolueno (10:6:6:1, v/v), dejando que la cromatografía transcurra durante unas 3 horas.
- Secar la placa de celulosa y a continuación rociarla con anilina-ácido ftálico.

- Calentar dicha placa a 100ºC durante 4 minutos para poder visualizar las manchas correspondientes a los azúcares.

* Soluciones:

- **Anilina-ácido ftálico**: 1,625 g de ácido ftálico disuelto en 50 ml de n-butanol saturado en agua y 1 ml de anilina.

Determinación de la composición en ácidos grasos

El análisis de la composición de ácidos grasos se realizó con micelio crecido en cultivos sólidos. En este caso se utilizó un medio específico para el crecimiento de Actinobaterias en el cual no se produce la esporulación. Esto se debe a que la composición en ácidos grasos de las esporas es diferente a la de las células vegetativas. El procedimiento seguido se puede dividir en tres partes:

1. Obtención de la biomasa

* Protocolo:

- Inocular la superficie de una placa de medio 172 con un cultivo puro de la cepa de *Streptomyces* analizada e incubar durante siete días a 28ºC.
- El micelio crecido en esa placa se usa como inóculo de una nueva placa de medio 172A que se incuba durante otros siete días a la misma temperatura.
- El micelio de esta segunda placa es el utilizado para la extracción de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

2. Extracción de los ésteres metílicos

* Protocolo:

- Raspar el micelio cuya área de crecimiento corresponde a la mitad de la superficie de una placa de 9 cm de diámetro de medio 172A. Depositar el micelio en un tubo Pyrex® de 100x15 mm, dotado con tapón de rosca y cierre de teflón.
- Añadir 1,5 ml de Reactivo 1 e incubar a 100ºC durante 10 minutos.
- Agitar la muestra durante 15 segundos e incubar a 100ºC durante 45 minutos.
- Enfriar la mezcla en un baño de agua y añadir 3 ml de Reactivo 2. Agitar la suspensión durante 15 segundos e incubar en esta ocasión a 80ºC durante 15 minutos.
- Enfriar de nuevo la muestra en un baño de agua y añadir 1,5 ml de Reactivo 3.
- Agitar la bifase formada por rotación a 65 rpm durante 10 minutos y posteriormente, separar las dos fases por centrifugación a 3000 rpm durante 3 minutos.
- Transferir la fase superior a un nuevo tubo Pyrex® y añadir 3 ml de Reactivo 4.
- Agitar la muestra por rotación a 65 rpm durante 10 minutos y separar las fases por centrifugación a 5000 rpm durante 6 minutos.

Recoger la fase superior que contiene los ésteres metílicos en un vial de cromatografía. Se puede almacenar a -80ºC hasta su posterior análisis por cromatografía de gases.

* Soluciones:

- **Reactivo 1:** 45 g de NaOH en 300 ml de metanol: agua (1:1 v:v).
- **Reactivo 2:** 295 ml de HCl 32% + 205 ml de agua destilada + 425 ml de metanol.
- **Reactivo 3:** hexano-éter etílico 1:1.
- **Reactivo 4:** 10,8 g de NaOH en 900 ml de agua destilada.

3. Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico de las muestras se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 serie II dotado con una columna Hewlett Packard's Ultra 2 (5% fenil-metil silicona) de 25 m x 0,2 mm x 0,33 μm.

Condiciones del proceso cromatográfico:

Gas portador	Nitrógeno
Presión en cabeza de columna	15 psi
Flujo columna	0,41 ml/minuto
Flujo split	23 ml/minuto
Flujo purga del septo	1,96 ml/minuto
FID flujo de hidrógeno	24 ml/minuto
FID flujo de aire	260 ml/minuto
FID flujo de nitrógeno	29,5 ml/minuto
Temperatura inicial	170ºC
Temperatura final	270ºC
Gradiente de temperatura	5ºC/minuto
Temperatura del inyector	300ºC
Temperatura del detector	320ºC
Volumen de inyección	5 μl

2.16.2. Determinación del contenido en G+C del genoma

La determinación del contenido en G+C se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) siguiendo el procedimiento descrito por Tamaoka y Komagata (1984).

1. Hidrólisis enzimática del ADN

* Protocolo:

- Incubar en medio líquido TSB o BASAm durante unas 48 horas la especie de *Streptomyces* determinada. Extraer el ADN genómico por el método de Kirby utilizando los tubos de 15 ml *Phase Lock Gel Heavy* para la fenolización (ver apartado 2.7.3).
- Limpiar el precipitado de ADN con etanol al 70 %, para lo cual mezclar la solución de ADN con etanol al 70 %, centrifugar 15 minutos a 13200 rpm y eliminar el sobrenadante. Repetir este paso de limpieza otras dos veces con el fin de eliminar todas las sales ya que pueden interferir en posteriores tratamientos. Finalmente, disolver la muestra de ADN en agua destilada a una concentración final de 1 mg/ml.
- Calentar la solución de ADN a 100ºC durante 5 minutos y enfriar rápidamente en un baño de hielo.
- Mezclar 10 µl de la solución de ADN desnaturalizado con 10 µl de una solución de nucleasa P1. Incubar a 50ºC durante 1 hora.
- Añadir 10 µl de una solución de fosfatasa alcalina bacteriana e incubar a 37ºC durante 1 hora.
- La muestra hidrolizada se puede conservar a -20ºC. Utilizar entre 10 y 15 µl para el análisis por HPLC.

* Soluciones:

- **Solución de nucleasa P1:** 0,1 mg disueltos en 1 ml de tampón acetato de sodio 40 mM con $ZnSO_4$ 2 mM; pH 5,3.
- **Solución de fosfatasa alcalina bacteriana**: 2,4 U/ml disueltas en un tampón de Tris-HCl 0,1 M; pH 8,3.

2. Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico se realizó en un equipo de HPLC Agilent Series 1100 dotado con una columna Zorbax SB-C18, 4,6 mm ID x 150 mm (tamaño de partícula 3,5 µm).

Como controles se han utilizado los cuatro desoxirribonucleósidos comercializados por Sigma. Previamente, se calculó el agua que habían absorbido los cristales mediante análisis elemental de carbono y nitrógeno (Sidi; Servicio Interdepartamental de Investigación, Universidad Autónoma de Madrid) de esta manera se determinó la pureza exacta de los controles.

Condiciones del proceso cromatográfico:

Fase móvil	0,6M $NH_4H_2PO_4$ (pH 4,0) + acetonitrilo (20:1,v/v)
Flujo columna	1 ml/min
Temperatura columna	25ºC
Longitud de onda de detección	270 nm

Hibridación ADN-ADN

La técnica de hibridación ADN-ADN mide el grado de similitud genética entre fragmentos de secuencias de ADN. El valor de hibridación ADN-ADN permite determinar la distancia filogenética entre dos especies.

La realización de este experimento conlleva un primer paso de desnaturalización de tres soluciones de ADN: ADN A, ADN B y mezcla de ADN A-B. La relación ADN-ADN se determina de manera espectrofotométrica comparando las curvas de renaturalización de los ADN individuales y de la mezcla de ADN.

Este experimento fue contratado como servicio externo a *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ). A continuación se describe de forma resumida el procedimiento seguido.

* Protocolo:

- La extracción del ADN genómico se realiza mediante una prensa French (Thermo Spectronic).
- El ADN se purifica mediante cromatografía con columnas de hidroxiapatito siguiendo las indicaciones de Cashion y colaboradores (1977).
- La hibridación ADN-ADN se realiza siguiendo el protocolo definido por De Ley y colaboradores (1970) con las modificaciones descritas por Huss y colaboradores (1983).
- La medida de las curvas de renaturalización se realiza con un espectrofotómetro Cary 100 Bio UV/VIS equipado con un compartimento de muestras termostatizado y con control de temperatura con una sonda *in situ* (Varian).

2.17. Construcción y amplificación de una genoteca de *Streptomyces* spp. en el vector SuperCos 1

Una genoteca o librería genómica es una **colección de clones**, cada uno de los cuales contiene un vector al que se le ha insertado un fragmento del ADN total de un microorganismo. El total de la genoteca debe contener, teóricamente, todas las secuencias existentes en el ADN total de partida. Los fragmentos de ADN se generan por digestiones parciales con una enzima de restricción que presenta una alta frecuencia de corte en el genoma, generándose así una colección de fragmentos de una longitud idónea para la clonación en un vector determinado, en este caso un **cósmido**. Los cósmidos son plásmidos con los extremos cohesivos *cos* del bacteriófago λ. Estos plásmidos incorporan fragmentos de ADN comprendidos entre 30-42 kb, tamaño adecuado para el empaquetamiento en partículas fágicas y su posterior transferencia a las células hospedadoras mediante infección.

El procedimiento de construcción de la librería se puede dividir en los siguientes pasos:

2.17.1. Preparación del vector SuperCos 1

* Protocolo:

- Digerir 200 μg del vector de clonación SuperCos 1 con 2 U/μg de *Xba*I en un volumen total de 400 μl a 37ºC durante 3 horas.
- Comprobar la digestión en un gel de agarosa al 0,8 %. Se debe obtener una única banda de 7,9 kb.
- Limpiar el ADN con un paso de fenol-CIA y CIA. Precipitar el ADN durante un mínimo de 2 horas a -20°C o media hora a -80ºC. Centrifugar a 13200 rpm y 4°C durante 30 minutos. Retirar el etanol y dejar secar el precipitado. Resuspender en 150 μl de agua destilada y cuantificar la concentración de ADN.
- Desfosforilar con 0,5 μl de fosfatasa antártica (5 U/ml) por cada μg de ADN del vector. Incubar durante 30 minutos a 37ºC y posteriormente inactivar la enzima incubando la mezcla durante 10 minutos a 65ºC. Repetir la reacción de desfosforilación.
- Extraer el ADN por fenolización con un paso de fenol-CIA y CIA. Precipitar el ADN durante un mínimo de 2 horas a -20°C o media hora a -80ºC. Centrifugar a 13200 rpm y 4°C durante 30 minutos. Retirar el etanol y dejar secar el precipitado. Resuspender en 70 μl agua destilada.
- Digerir el vector tratado con 2 U de *Bam*HI por μg de ADN (*Bam*HI genera extremos cohesivos con *Sau3A*I) en un volumen final de 100 μl a 37ºC durante 3 horas. Extraer el ADN por fenolización como en los pasos anteriores. Resuspender en un volumen final de 20 μl y cuantificar la concentración de dicha solución. Finalmente, dejar la solución a una concentración de 1 μg/μl.
- Comprobar la digestión en un gel de agarosa al 0,8 %. Se deben obtener dos bandas de 1,1 y 6,5 kb, respectivamente.

2.17.2. Preparación del ADN genómico

Las digestiones parciales del ADN genómico se llevan a cabo con una enzima de restricción de **corte frecuente**, evitando así la exclusión sistemática de algunas de las secuencias del genoma. En este trabajo se utilizó ***Sau*3AI** que reconoce la secuencia GATC y genera extremos 5´ protuberantes. En primer lugar se realizó una digestión a pequeña escala para determinar la concentración de enzima adecuada para obtener los fragmentos de ADN de tamaño comprendido entre 30-42 kb. Una vez determinada la concentración de enzima óptima se llevó a cabo una digestión a gran escala con el objetivo de obtener suficiente ADN digerido para la construcción de la genoteca.

Digestión a pequeña escala

* Protocolo:

Extraer ADN genómico de *Streptomyces* spp. con cualquiera de los métodos especificados en el apartado 2.7.3, con las precauciones requeridas para obtener fragmentos de alto peso molecular (realizar todos los pasos de mezcla de manera suave, evitar los pipeteos agresivos y agitación).

Digerir con la enzima *Sau*3AI pequeñas cantidades de ADN, aproximadamente 10 µg, con diferentes concentraciones de enzima a 37ºC durante 30 minutos. Para ello mezclar 5 µl de cada dilución de enzima (D1-D8, especificadas en la tabla 2.6) con 45 µl de la mezcla de ADN (MA) y dejar 5 minutos en hielo para permitir la difusión de la enzima. Incubar durante 10 minutos a 37ºC en baño de agua y parar cada reacción de digestión añadiendo 2 µl de EDTA.

Comprobar la digestión parcial en un gel de agarosa al 0,4 %, dejar migrar durante 16-18 horas. Seleccionar las concentraciones de enzima con las que se obtengan fragmentos de ADN de un tamaño comprendido entre 30-42 kb.

* Soluciones:

- **Mezcla de ADN (MA):** 10 µg aproximadamente de ADNt, 45 µl tampón de digestión 10X, 5 µl BSA (10 mg/ml), agua destilada hasta 450 µl.
- **Tampón de dilución (TD)**: 150 µl tampón de dilución, 15 µl BSA (10 mg/ml), agua destilada hasta 1,5 ml.

Tabla 2.6: Mezclas de dilución de la enzima *Sau*3AI para la digestión parcial

Dilución	Solución de enzima	Tampón de dilución (TD)	$[Sau3AI]_F$ (U/µg de ADN)
D1	2 µl Sau3AI (4 U/µl)	38 µl	1,00
D2	10 µl D1	10 µl	0,50
D3	10 µl D2	90 µl	0,05
D4	20 µl D3	20 µl	$2{,}50 \cdot 10^{-2}$
D5	20 µl D4	20 µl	$1{,}25 \cdot 10^{-2}$
D6	20 µl D5	20 µl	$6{,}25 \cdot 10^{-3}$
D7	20 µl D6	20 µl	$3{,}12 \cdot 10^{-3}$
D8	20 µl D7	20 µl	$1{,}56 \cdot 10^{-3}$

Digestión a gran escala

* Protocolo:

Digerir una mayor cantidad de ADN (100 µg aproximadamente) con la concentración de enzima óptima, la mitad y una concentración intermedia, ya que al cambiar de escala las condiciones de digestión pueden cambiar. Si se tiene suficiente cantidad de ADN realizar varias digestiones por cada concentración, ya que en el próximo paso de ultracentrifugación se reduce la cantidad de ADN. Comprobar la digestión.

- Extraer el ADN por fenolización con fenol-CIA y CIA. Precipitar el ADN con etanol (-20ºC) durante 2 horas, centrifugar a 4ºC 45 minutos y eliminar el sobrenadante. Dejar secar unos minutos y resuspender en agua destilada durante toda la noche para asegurar una solución homogénea (no agitar con agitación mecánica ni con pipeta). Mezclar todas las digestiones de la misma concentración en un volumen final de 150 µl.
- Analizar mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,4 % una pequeña alícuota de cada digestión con el objetivo de seleccionar las dos digestiones que presenten una mayor cantidad de fragmentos comprendidos entre 30-42 kb.

Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa

Una vez digerido el ADN, se enriquece la solución en fragmentos de tamaño adecuado mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

*Protocolo:

- Colocar en dos tubos de 5 ml Beckman de ultracentrífuga 2,4 ml de la solución de sacarosa al 40 % y sobre ésta añadir lentamente, con la punta de la pipeta apoyada en la pared del tubo, 2,4 ml de la solución de sacarosa al 10 %.
- Tapar los tubos con parafilm y colocar en posición horizontal con un movimiento rápido y seco para evitar la mezcla de las soluciones. Dejar 8 horas en oscuridad para que se cree el gradiente por difusión.
- Volver a colocar los tubos en posición horizontal muy lentamente para no alterar el gradiente de sacarosa.
- Verter, apoyando la punta de la pipeta en la pared del tubo, 150 µl de ADNt digerido con *Sau*3AI. Pesar los tubos en balanza de precisión. Igualar el peso de los dos tubos añadiendo solución de sacarosa al 10%.
- Colocar cada tubo en un soporte de la ultracentrífuga y colgarlos enfrentados en el rotor basculante.Uultracentrifugación a 4ºC durante 18 horas a 30000 rpm.
- Separar el gradiente de fragmentos de ADN en fracciones mediante una bomba peristáltica (Miniplus 2, Gilson). Previamente a su uso estimar la velocidad de la bomba y el número de gotas necesarias para recoger fracciones de 250 µl. Introducir lentamente un extremo del capilar conectado a la bomba hasta el fondo de cada tubo y por el otro extremo recoger fracciones de 250 µl en microtubos de 1,5 ml.
- Analizar mediante electroforesis (30 voltios durante 12-16 horas) en agarosa al 0,4 % 10 µl de cada fracción con el objetivo de seleccionar las fracciones que presenten fragmentos de ADN entre 30-42 kb.
- Precipitar el ADN de las fracciones seleccionadas teniendo en cuenta las mezclas especificadas en la tabla 2.7. Dejar durante 16-18 horas a -20ºC y centrifugar a 4ºC a 13200 rpm durante 45 minutos.

- Eliminar el sobrenadante, añadir 500 µl de etanol 70 %, mezclar y volver a centrifugar a 4ºC a 13200 rpm durante 30 minutos. Eliminar el sobrenadante y dejar secar unos minutos.
- Resuspender lentamente todas las fracciones seleccionadas en un volumen final de 15 µl de agua destilada. Conservar la solución de ADN a 4ºC para evitar la rotura por ciclos de congelación/descongelación.
- Medir la concentración de la solución de ADNt/*Sau*3A. Se necesitan al menos 2,5 µg para el siguiente paso de ligación.

Nota: Durante todo el procedimiento usar puntas de pipeta cortadas para evitar el cizallamiento del ADN.

* Soluciones:

- **Solución de sacarosa 10 %:** 500 µl Tris HCl 1M, pH 8,0; 100 µl EDTA 0,5 M; 10 ml NaCl 5 M; 10 ml sacarosa 50 %; agua destilada hasta 50 ml.
- **Solución de sacarosa 40 %:** 500 µl Tris HCl 1M, pH 8,0; 100 µl EDTA 0,5 M; 10 ml NaCl 5 M; 40 ml sacarosa 50 %.

Tabla 2.7. Precipitación del ADN de las fracciones obtenidas por ultracentrifugación. Volúmenes de TE, AcNa (3M) y EtOH necesarios para precipitar el ADN correspondiente a cada fracción obtenida por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

Fracción	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
% Sacarosa	40	38,4	36,8	35,2	33,6	32,1	30,5	28,9	27,3	25,7
Fracción µl	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
TE µl	750	710,5	671	631,5	592	552,5	513	473,5	434	394,5
Total µl	1000	960,5	921	881,5	842	802,5	763	723,5	684	644,5
AcNa 3M µl	100	96,05	92,1	88,15	84,2	80,25	76,3	72,35	68,4	64,45
EtOH µl	2200	2113,1	2026,2	1939,3	1852,4	1765,5	1678,6	1591,7	1504,8	1417,9

Fracción	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**
% Sacarosa	24,2	22,6	21	19,4	17,8	16,3	14,7	13,1	11,57	10
Fracción µl	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
TE µl	355	315,5	276	236,5	197	157,5	118	78,5	39	0
Total µl	605	565,5	526	486,5	447	407,5	368	328,5	289	250
AcNa 3M µl	60,5	56,55	52,6	48,65	44,7	40,75	36,8	32,85	28,9	25
EtOH µl	1331	1244,1	1157,2	1070,3	983,4	896,5	809,6	722,7	635,8	550

2.17.3. Ligación y empaquetamiento

* Protocolo:

- Ligar los fragmentos de ADN/*Sau*3AI de *Streptomyces* spp. con el cósmido tratado a 4°C durante toda la noche.

  Mezcla de ligación:

  ADN (*Sau*3AI): 2,5 µg
  SuperCos 1 (*Bam*HI/*Xba*I): 1µl
  Tampón de ligación: 2 µl
  Agua destilada: hasta 20 µl
  Ligasa: 1 µl

  Antes de añadir la ligasa guardar 1 µl de la mezcla como control de ligación

- Analizar en un gel al 0,8 % 1 µl de la mezcla de ligación antes de añadir la ligasa y 1 µl después de la ligación para comprobar que la ligación se ha producido eficientemente.

Empaquetar el cósmido recombinante utilizando el extracto de empaquetamiento comercial Gigapack® III XL.

*Protocolo:

- Colocar un tubo con los extracto de empaquetamiento (-80°C) en hielo.
- Descongelar rápidamente los extractos de empaquetamiento calentando el tubo con las manos, justo hasta que empiece a descongelarse.
- Mezclar 4 µl del producto de ligación con los extractos de empaquetamiento. Agitar la mezcla suavemente con la punta de una pipeta evitando la formación de burbujas. Centrifugar brevemente.
- Incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas.
- Añadir 500 µl del tampón SM.
- Añadir 20 µl de cloroformo y mezclar suavemente. Centrifugar brevemente para sedimentar los restos.
- Recoger el sobrenadante que contiene los fagos a otro tubo. Guardar el producto de empaquetamiento a 4°C (puede ser almacenado hasta un mes).

*Soluciones:

- **Tampón SM:** 0,58 g de NaCl; 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 5 ml Tris HCl 1M, pH 7,5; 0,5 ml gelatina 2 %; disolver en un volumen de 100 ml con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

2.17.4. Titulación de la reacción de empaquetamiento

* Protocolo:

- Sembrar *E. coli* XL1-Blue en medio LA. Incubar toda la noche a 37°C.

- Inocular con una colonia 50 ml de LB suplementado con 10 mM $MgSO_4$ y 0,2 % de maltosa. Incubar a 37ºC con agitación orbital 250 rpm durante 4-6 horas, sin dejar que el cultivo sobrepase la DO_{600} 1.
- Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos a 4ºC y eliminar el sobrenadante.
- Resuspender el precipitado de células en la mitad del volumen inicial con 10 mM de $MgSO_4$ estéril.
- Diluir la solución en 10 mM de $MgSO_4$ estéril hasta una DO_{600} 0,5.
- Preparar diluciones 1:10 y 1:50 de la reacción de empaquetamiento en tampón SM.
- Mezclar 25 µl de cada dilución con 25 µl de la solución de células de *E. coli* en un tubo de 1,5 ml e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Añadir 200 µl de medio LB a cada muestra e incubar 1 hora a 37ºC en agitación. Este tiempo de incubación permite la expresión de los genes de resistencia a antibióticos.
- Centrifugar a 132000 rpm durante 1 minuto y eliminar el sobrenadante. Resuspender el precipitado de células en 250 µl de medio LB. Sembrar 50 y 100 µl en placas de LA con ampicilina (100 µg/ml). Incubar a 37ºC hasta que crezcan las colonias.
- Contar el número de colonias y expresar el título del empaquetamiento en unidades formadoras de colonias (UFC)/µl de producto de empaquetamiento. De esta manera se puede calcular el número de colonias que se esperan obtener del total (500 µl) de la reacción de empaquetamiento.

La formula diseñada por Clarke y Carbon (1976) permite el cálculo del número de colonias necesarias para que la genoteca sea representativa (ver resultados 3.2.2). Dicha fórmula relaciona la **probabilidad (P)** de incluir cualquier secuencia de ADN en una genoteca al azar de **N recombinantes** independientes:

$$N = \frac{\ln (1 - P)}{\ln (1 - f)}$$

Una vez que se comprueba que la reacción de empaquetamiento permite obtener una colección de clones representativa de todo el genoma con una **probabilidad del 99,99 %** se lleva a cabo la amplificación de la genoteca.

2.17.5. Amplificación de la genoteca

* Protocolo:

- En microtubos de 1,5 ml mezclar 75 µl de la reacción de empaquetamiento con el mismo volumen de solución de *E. coli* XL1-Blue (DO_{600} 0,5). Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Añadir 4 volúmenes de medio LB en cada tubo e incubar a 37ºC a 250 rpm de agitación orbital durante 1 hora.

- Sembrar alícuotas de 100 µl en placas de LB con ampicilina (100 µg/ml) e incubar a 37ºC durante toda la noche.
- Añadir 2 ml de LB sobre cada placa y raspar la superficie con un bastoncillo para desprender las colonias. Recoger la solución de colonias y añadir el mismo volumen de glicerol al 40 %. Conservar a -80ºC.
- Hacer diluciones entre $1x10^{-5}$ y $1x10^{-9}$ y sembrar en placas de LB con ampicilina (100 µg/ml). Contar las colonias y expresar el título de la genoteca UFC/ml.

2.18.Obtención de mutantes mediante REDIRECT©

La tecnología REDIRECT© permite la obtención de mutantes mediante el reemplazamiento del gen de interés por un casete de resistencia obtenido por PCR. Esta técnica consta de tres partes además de una cuarta opcional (Gust *et al.*, 2004).

En un primer paso, el gen de interés se ha de encontrar clonado en un vector replicativo de *E. coli*, generalmente en un cósmido. Dicha construcción es transformada en la cepa de *E. coli* BW25113 que contiene el plásmido pIJ790 con genes del **sistema de recombinación del bacteriófago λ** (los genes *red*). Estas proteínas aumentan considerablemente la eficiencia de recombinación homóloga en *E. coli* y permiten que se produzca el **reemplazamiento** del gen de interés contenido en el cósmido por un producto de PCR. Dicho producto de PCR contiene secuencias homólogas (36-50 pb) a las secuencias que flanquean el gen que se va a reemplazar, así como un gen de resistencia a antibióticos y el origen de transferencia *oriT*.

Una vez obtenido el cósmido recombinante, dicha construcción se transforma en una cepa de *E. coli* ET12567 **deficiente en metilación** de manera que posteriormente la construcción no se vea afectada por el potente sistema de restricción específico de metilación que tienen muchas de las especies del género *Streptomyces.* Además, esta cepa de *E. coli* posee el plásmido pUZ8002 capaz de **movilizar** en trans otros vectores que contengan el origen de transferencia *oriT*.

Por último, se lleva a cabo la transferencia del cósmido recombinante desde *E. coli* hasta *Streptomyces* mediante el proceso de **conjugación**. Una vez que la célula de *Streptomyces* ha incorporado el cósmido se debe producir una **doble recombinación** para conseguir la sustitución del gen de interés en el genoma de *Streptomyces* por el casete de resistencia.

Además, está técnica permite **eliminar el casete de resistencia** del mutante delecionado mediante el uso de **recombinasas**. La secuencia del casete de resistencia se encuentra flanqueada por sitios de reconocimiento de diferentes recombinasas, las cuales actúan catalizando la recombinación entre dichos puntos y por tanto eliminado el casete de resistencia. Existen dos tipos de sistemas de recombinasas: la **recombinasa FLP** la cual

reconoce los **sitios *frt*** presentes en el plásmido **pIJ773** y la **recombinasa Cre** que reconoce los **sitios *loxP*** presentes en el plásmido **pIJ774**.

El protocolo seguido es prácticamente el descrito en el manual del REDIRECT© (Gust *et al.*, 2002). Esta técnica ha sido desarrollada en el centro John Innes (Reino Unido) para *S. coelicolor* por lo que precisa de las pertinentes modificaciones y optimizaciones para su aplicación con éxito a otras especies de *Streptomyces.*

2.18.1. Purificación del molde para la obtención del producto de PCR

El centro John Innes ha desarrollado diferentes plásmidos (http://*Streptomyces*.org.uk/redirect/index.html) que contienen el casete de resistencia. En este trabajo se ha utilizado el plásmido **pIJ774** (ver apartado 2.4).

Se ha observado que el uso de los plásmidos completos como molde para la obtención del producto de PCR (casete de resistencia) resulta en un gran número de falsos positivos por lo que es importante extraer del plásmido la secuencia molde por digestión con enzimas de restricción.

* Protocolo:

- Digerir aproximadamente 10 µg del plásmido molde con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Hind*III en 1X del tampón adecuado (tampón M para enzimas de Takara) en un volumen final de 100 µl e incubar a 37ºC durante al menos 1 hora.
- Analizar la mezcla de digestión en un gel de agarosa al 0,8 % y cortar el fragmento de gel que contiene la banda correspondiente al casete de resistencia (1380 pb). Purificar mediante el uso del kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, resuspender en agua destilada y determinar su concentración.
- La ausencia de contaminación con plásmidos completos se comprueba utilizando 1 µl de la suspensión purificada para la transformación de células de *E. coli* competentes. Si no se obtiene ningún transformante se puede proseguir con el protocolo.

2.18.2. Diseño de los cebadores para la obtención del producto de PCR

La deleción de un determinado gen requiere del diseño de cebadores específicos. Cada cebador contiene los 39 nucleótidos (nt) en 5´ similares a la secuencia que flanquea el gen de interés en *Streptomyces* y el resto de nucleótidos en su extremo 3´ anillan con las secuencias flanqueantes del casete de resistencia (Figura 2.3) [todos los casetes de resistencia tienen las mismas secuencias flanqueantes P1 y P2, excepto el pIJ774 que contiene un nucleótido menos en P1 (Khodakaramian *et al.*, 2006)].

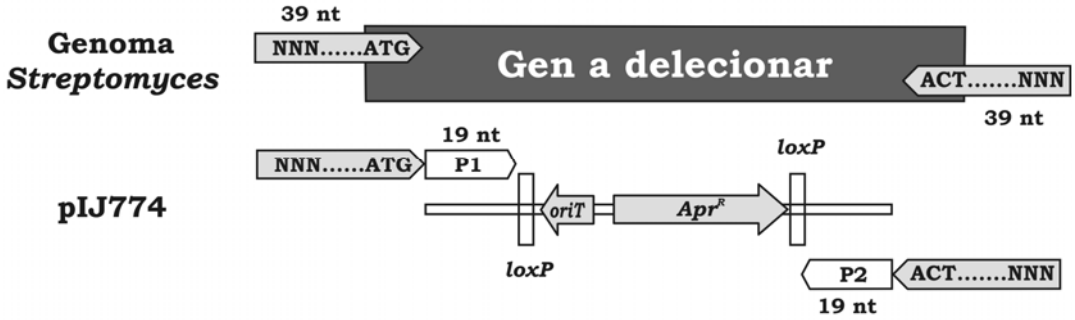


Figura 2.3: Diseño de los cebadores para la obtención del casete de resistencia. El extremo 5` de los cebadores contiene una secuencia homóloga a la secuencia flanqueante del gen a delecionar, incluido el codón de inicio y de fin. Mientras que el extremo 3´ está constituido por las secuencias P1 y P2, flanqueantes del casete de resistencia.

2.18.3. Amplificación por PCR del casete de resistencia

Es recomendable realizar la PCR con una ADN polimerasa de alta fidelidad para evitar la generación de errores en la amplificación del casete de resistencia, los cuales pueden interferir en posteriores pasos del protocolo. En este trabajo se ha usado la polimerasa Phusion®, para la cual se detalla la mezcla de PCR y el programa seguido:

Mezcla de PCR

DMSO	2,5 µl
Buffer HF 5X	10 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
Cebadores (10 µM)	2,5 µl/cebador
ADN molde	50 ng
Phusion	0,5 µl
Agua destilada	Hasta 50 µl

Programa de PCR

Desnaturalización inicial	98ºC	30 s	
Desnaturalización	98ºC	8 s	10 ciclos
Anillamiento	50ºC	20 s	
Extensión	72ºC	45 s	
Desnaturalización	98ºC	8 s	15 ciclos
Anillamiento	55ºC	20 s	
Extensión	72ºC	45 s	
Extensión final	72ºC	10 min	

Analizar 5 µl de la mezcla de PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %. Si la amplificación ha sido correcta limpiar los 45 µl restantes con el kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* y determinar su concentración.

2.18.4. Transformación de *E. coli* BW25113/pIJ790 con el cósmido de *Streptomyces* que contiene el gen a sustituir

El plásmido pIJ790 contiene un gen de resistencia a cloranfenicol y un origen de replicación sensible a la temperatura que precisa de **30ºC** para su **replicación** pero se pierde a 37ºC.

* Protocolo:

- Preparar células competentes BW25113/pIJ790 mediante el método SEM (ver 2.15.1).
- Transformar las células competentes con el cósmido que contiene los genes de interés de *Streptomyces*. **Importante:** Realizar los pasos de crecimiento a 30ºC.
- Comprobar mediante digestiones la introducción del cósmido en *E. coli* sin reorganizaciones y la presencia del plásmido pIJ790.

2.18.5. Sustitución del gen de interés por el casete de resistencia

Las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790 portadoras del cósmido de interés son electrotransformadas con el casete de resistencia obtenido mediante PCR.

* Protocolo:

- Inocular las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790/cósmido en 5 ml de LB suplementado con cloranfenicol (25 µg/ml) para mantener el plásmido pIJ790 y con los antibióticos de selección del cósmido. Incubar a **30ºC** (para no perder el plásmido pIJ790) durante 14-16 horas.
- Inocular 100 ml de SOB suplementado con 2 ml de MgSO4 1 M + MgCl2 1 M (concentración final 40 mM), cloranfenicol (25 µg/ml), los antibióticos de selección del cósmido y 1 ml de L-arabinosa 1 M (concentración final 10 mM, necesaria para inducir los genes *red*) con 1 % del preinóculo. Incubar a 30ºC y 200 rpm hasta alcanzar una DO_{600} próxima a 0,4 (3-4 horas).
- Centrifugar en tubos de GSA a 4ºC durante 5 minutos a 4000 rpm. Resuspender el precipitado en 20 ml de glicerol 10 % frío (4ºC).
- Centrifugar como en el paso anterior y resuspender el precipitado en 10 ml de glicerol 10 % frío. Volver a centrifugar y finalmente resuspender en 400 µl de glicerol 10 % frío.

- Mezclar 50 µl de la suspensión de células con 100-200 ng del producto de PCR. Poner la mezcla en una cubeta de electroporación de 0,2 cm fría (4ºC).
- Aplicar un pulso eléctrico con el electroporador (BioRad GenePulser II) en las siguientes condiciones: 2,5 kV, 500 Ω y 10 µF, debiendo transcurrir un tiempo de paso de corriente de entre 4,5 y 4,9 milisegundos.
- Añadir 1 ml de medio LB frío (4ºC) a la cubeta y transferir todo el contenido a un microtubo de 1,5 ml. Incubar durante al menos 3 horas a 30ºC.
- Sembrar en placas de medio LB suplementado con los antibióticos de selección del cósmido y apramicina (50 µg/ml). Incubar durante toda la noche a 37ºC por lo que se perderá el plásmido pIJ790. Si se van a realizar otras deleciones en el mismo cósmido, con diferentes resistencias a antibióticos, incubar a 30ºC y añadir cloranfenicol (25 µg/ml) a las placas para evitar la pérdida del plásmido pIJ790.
- Analizar las construcciones obtenidas mediante PCR o patrón de digestión.
- Una vez comprobado que la recombinación se ha producido eficientemente, extraer los cósmidos recombinantes mediante minilisis (ver 2.7.2). Realizar la extracción tan pronto como sea posible porque se pueden producir reorganizaciones debido a que las células BW25113 son altamente recombinogénicas.

Nota: En la misma colonia pueden co-existir cósmidos recombinantes y cósmidos silvestres. Estos últimos se perderán durante la transformación a la siguiente cepa de *E. coli* y además no contienen *oriT* por lo que no podrán ser transferidos a *Streptomyces*.

2.18.6. Transferencia del cósmido recombinante a *Streptomyces*

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

* Protocolo:

- Preparar células competentes ET12567/pUZ8002 mediante el método del RbCl (ver 2.15.1). Crecer en medio suplementado con kanamicina (25 µg/ml) y con cloranfenicol (25 µg/ml), para mantener el plásmido pUZ8002 y la mutación *dam* (metilación deficiente), respectivamente.
- Transformar las células competentes ET12567/pUZ8002 con el cósmido recombinante.
- Incubar durante la noche a 37°C un preinóculo en 5 ml de medio LB suplementado con cloranfenicol (25 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y apramicina (50 µg/ml).
- Llevar a cabo el proceso de conjugación para transferir el cósmido recombinante a *Streptomyces* (ver 2.15.2).
- Una vez añadida la cobertera con los antibióticos adecuados incubar a 28°C durante 5-6 días.

- Comprobar si se ha producido la doble recombinación mediante la siembra en placas de TSA suplementado con ácido nalidíxico (25 µg/ml) y los antibióticos de selección, donde el fenotipo debe ser apramicina resistente y kanamicina sensible.
- Realizar dos rondas de esporulación con los antibióticos pertinentes. En la primera ronda sembrar en estría para obtener colonias aisladas y en la segunda amplificar a partir de una sola colonia.
- Una vez obtenidas las esporas del mutante delecionado, volver a comprobar el fenotipo mediante siembra en TSA suplementado con los antibióticos necesarios.

2.19. Análisis de interacciones proteína-ADN

2.19.1. Ensayos de retraso de la movilidad electroforética (EMSA)

Este tipo de ensayos permite determinar si una proteína o una mezcla de proteínas es capaz de unirse a un fragmento determinado de ADN, así como el número de unidades de proteína que participan en la unión.

Esta técnica se basa en la **disminución de movilidad electroforética** que presentan los complejos proteína-ADN respecto a los fragmentos de ADN (sondas) a las que no se les ha unido proteína. Un primer paso consiste en la reacción de unión de la proteína al ADN, para la cual hay que determinar las condiciones óptimas (tampón de reacción, cantidades de reacción, temperatura y tiempo) dependientes de cada proteína. Tras la reacción de unión se analiza la mezcla en un gel de electroforesis.

La electroforesis se puede realizar tanto en geles no desnaturalizantes de poliacrilamida como en agarosa; en los primeros se consigue una mayor resolución mientras que en los segundos el análisis es mucho más rápido.

Marcaje de la sonda

A) Marcaje con digoxigenina

Este sistema de marcaje (*DIG Oligonucleotide 3´-End Labeling Kit, 2nd Generation*) no radioactivo, comercializado por la compañía Roche, está basado en el marcaje enzimático del extremo 3´ de la sonda de ADN. Dicho marcaje se lleva a cabo a través de una transferasa terminal que incorpora una molécula de digoxigenina-11-ddUTP al extremo 3´del ADN.

* Protocolo:

- Obtener 100 ng de ADN del promotor a estudio en un volumen máximo de 10 µl.
- Trabajar en hielo. Añadir los siguientes componentes: 4 µl de tampón de marcaje 5X, 4 µl de la solución de $CoCl_2$, 1 µl de solución de DIG-ddUTP y 1 µl de transferasa terminal.

- Mezclar y centrifugar brevemente.
- Incubar a 37ºC durante 15 min. Después enfriar en hielo.
- Parar la reacción con 2 µl de EDTA 0,2 M (pH 8,0).
- Añadir 3 µl de agua destilada para llegar a un volumen final de 25 µl y así obtener una concentración final de 4 ng/µl de ADN marcado.

* Cuantificación del marcaje:

La eficiencia de la reacción de marcaje se comprueba de igual manera que la detección que se va a realizar del EMSA, con una batería de diluciones seriadas (1/10):

Dilución	1:10	1:10	1:10
Cantidad de ADN (ng/µl)	0,4	0,04	0,004

* Protocolo:

- Aplicar 1 µl de cada dilución sobre una membrana *Hybond-N™* (GE Healthcare).
- Fijar la sonda mediante luz ultravioleta (UV-Stratalinker 2400, Stratagene).
- Seguir los mismos pasos de los que consta la detección de ADN mediante el uso de CDP-Star a partir del equilibrado de membrana con Tampón de lavado durante 1-5 minutos, en agitación.

B) Marcaje mediante fluoróforos

El marcaje de la sonda se consigue marcando los cebadores usados en la amplificación por PCR del promotor a estudio. Dicho marcaje es realizado por la casa suministradora de los cebadores (Bonsai Technologies parte de Thermo Scientific) en el extremo 5´ de uno de ellos. Se han utilizado diferentes fluoróforos, Cy3 y 6FAM; este último nos permite utilizar la misma sonda para el ensayo de protección. La detección de este tipo de marcaje se realiza mediante un escáner de fluorescencia [*Ettan™ DIGE Imager* (EDI) de GE Healthcare]. Los componentes de la reacción de PCR son los siguientes:

ADN molde	50 ng ADN total
Cebadores (18-20 pb)	0,4 µM
ADN polimerasa	0,5-2,5 unidades
$MgCl_2$	1-5 mM (normalmente 1,5 mM)
dNTP	50-500 µM (normalmente 200 µM)
Tampón 10X	1X
Agua destilada	Hasta 50 µl

Nota: Se usa la mínima cantidad posible de cebadores ya que al ir marcados con fluoróforos su precio es más elevado. También es importante usar un tampón de reacción que no lleve colorante debido a que puede interferir en la posterior detección de la fluorescencia.

En el programa de PCR el número de ciclos de amplificación es bajo, alrededor de 30, para evitar que la ADN polimerasa introduzca errores en el producto amplificado (ver apartado 2.13).

Reacción de unión proteína-ADN

En este trabajo todos los ensayos de movilidad electroforética se han realizado con el dominio de unión a ADN (DBD, del inglés *DNA binding domain*) de la proteína PhoP de *S. coelicolor* unida a la proteína GST ($PhoP^{DBD}$-GST; Sola-Landa *et al.*, 2005).

Diluciones de la proteína: se realizan diluciones seriadas de $PhoP^{DBD}$ en glicerol al 40 % o en tampón SPD (tampón de dilución de $PhoP^{DBD}$ de *S. coelicolor*) en un volumen final de 6 µl para cada reacción de unión.

- **Tampón SPD:** 40% glicerol; 5 mM glutatión reducido; 25 mM Tris-HCl pH 8,0.

Mezcla de la sonda:

	Marcaje con digoxigenina	Marcaje con fluoróforo
Tampón de unión 5X	2 µl	2 µl
Poli dI-dC (5 µg/µl)	1-5 µg	1-5 µg
Sonda marcada	1,2 ng	10 ng
Agua destilada	hasta 4 µl	hasta 4 µl

Nota: La mezcla detallada anteriormente es la necesaria para una reacción de unión. Generalmente, en un mismo experimento se ensayan diferentes concentraciones de proteína, así como un control sin proteína y otro control con exceso de sonda sin marcar (sonda fría).

* Soluciones:

- **Tampón de unión 5X**: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2 mM $MgCl_2$; 50 mM KCl; 1 mM DTT; 0,05 % Nonidet.
- **Poli dI-dC**: se prepara disuelto en agua. Competidor sintético de los ácidos nucleicos que evita o reduce las reacciones de unión inespecíficas de la proteína.

Reacción de unión: Mezclar la correspondiente dilución de proteína (6 µl) con la mezcla de la sonda (4 µl). Incubar a 30°C durante 30 minutos. Colocar las mezclas en hielo.

Electroforesis

A) Geles de poliacrilamida

Los geles no desnaturalizantes de poliacrilamida utilizados en los ensayos de movilidad electroforética constan de una única fase de separación cuya composición se detalla en la tabla 2.8.

Tabla 2.8: Composición de los geles no desnaturalizantes para EMSA. Se indican las cantidades para 1 y 2 geles de un grosor de 0,75 mm y una concentración de acrilamida del 5 % (volumen final: 6,25 ml y 12,5 ml respectivamente) del sistema Mini-PROTEAN® 3 (Bio-Rad).

Componente	1 gel	2 geles
Acrilamida/Bis-acrilamida 29:1	1,05 ml	2,10 ml
TBE 10%	312,5 µl	625 µl
Glicerol 40 %	312,5 µl	625 µl
Persulfato amónico 10 %	43,75 µl	87,5 µl
TEMED	4,4 µl	8,8 µl
Agua destilada	4,5 ml	9,0 ml

* Soluciones:

- **Acrilamida:** se adquiere de forma comercial ULTRA PURE ProtoGel® 30 % Acrilamida : 0,8 % Bis-acrilamida (National Diagnosis).
- **TBE 10X**: 108 g de Tris base; 55 g de ácido bórico; 40 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0 y agua destilada hasta completar un litro.
- **Persulfato de amonio 10 %:** persulfato de amonio 10 % en agua destilada.
- **TEMED**: N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina.

La electroforesis se realiza en el sistema de Bio-Rad Mini-PROTEAN® 3.

* Protocolo:

- Montar el soporte para la polimerización de los geles (8 x 7,3 cm) según las indicaciones del fabricante. Es importante que los cristales entre los que se va a formar el gel estén limpios, lavar previamente con agua destilada y etanol.
- Preparar la mezcla para los geles (Tabla 2.8), añadiendo al final el persulfato de amónio y el TEMED (catalizadores de la reacción de polimerización).
- Mezclar suavemente y distribuir entre los cristales hasta el borde superior. Colocar el peine entre los cristales evitando que se creen burbujas entre los pocillos.
- Dejar polimerizar durante al menos una hora. Se pueden usar directamente o guardar a 4°C durante toda la noche.
- Colocar los geles en la cámara de electroforesis y llenarla con Tampón de electroforesis TBE 0,5 %. Aplicar un voltaje de 80 V durante media hora para lavar el gel (precarrera).
- Si el marcaje de la sonda es con digoxigenina, añadir a las muestras Tampón de carga de ADN para depositarlas en los pocillos del gel, pero si la sonda está marcada con fluoróforos añadir solamente glicerol al 40 % (1 µl).
- Realizar la electroforesis a una tensión continua de 80-90 V hasta que la banda correspondiente al colorante del Tampón de carga de ADN esté a punto de salirse. En el caso de las sondas marcadas con fluoróforos colocar en un pocillo Tampón de carga el cual permite visualizar la evolución de la electroforesis y controlar el tiempo de carrera.

- Desmontar el sistema de electroforesis y retirar de la cubeta los cristales con el gel. Separar los cristales y retirar el gel colocando sobre el mismo, papel Whatman 3MM previamente humedecido con TBE 0,5 %. Si el marcaje se ha realizado con fluoróforos retirar el gel sin papel y colocarlo sobre el cristal del escáner.

B) Geles de agarosa

* Protocolo:

- Preparar un gel de agarosa al 2 % en la mitad de volumen que se suele utilizar en una electroforesis rutinaria (aproximadamente 3 mm de grosor).
- Cargar las mezclas sin añadirles Tampón de carga de ADN. Si es necesario, añadir glicerol a una concentración final del 20 % para facilitar que la muestra se deposite en el fondo del pocillo. Cargar en un pocillo aparte una alícuota del Tampón de carga de ADN para poder controlar el tiempo de carrera.

Detección del ensayo de retraso

A) Detección por quimioluminiscencia

Si el promotor objeto de estudio ha sido marcado con **digoxigenina** es preciso realizar una transferencia del resultado de la electroforesis a una membrana de nailon (Hybond-N™ de GE Healthcare) para una posterior detección por quimioluminiscencia. La transferencia se realizó mediante el sistema **electrotransferencia en semiseco** con el sistema *Trans-blot SD Semi-dry Transfer Cell* (Bio-Rad).

* Protocolo:

- Humedecer la membrana y 4 láminas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño que el gel en TBE 0,5 %.
- Situados desde el ánodo al cátodo (desde abajo a arriba) colocar: 2 láminas de papel Whatman 3MM, la membrana de nailon, el gel de poliacrilamida y por último otras 2 láminas de papel Whatman 3MM. Colocar las diferentes capas evitando la formación de burbujas.
- Ensamblar la unidad de transferencia en el equipo Mini Trans Blot y realizar la electrotransferencia durante 1 hora a 200 mA.
- Retirar la membrana de la unidad de transferencia y fijar el ADN mediante luz ultravioleta (UV-Stratalinker 2400, Stratagene).

Posteriormente, revelar la membrana mediante el uso de **CDP-Star**. Dicho compuesto es un sustrato quimiluminiscente de la fosfatasa alcalina, lo que permite la detección por la producción de luz visible.

* Protocolo:

- Equilibrar la membrana con Tampón de lavado durante 1-5 minutos, en agitación.
- Bloquear la membrana con Solución de bloqueo durante 30 minutos, en agitación.
- Sustituir la Solución de bloqueo por la Solución de anticuerpos y dejar al menos 30 minutos en agitación. Realizar este paso en bolsa de hibridación.
- Eliminar la Solución de anticuerpos y lavar 2 veces la membrana con Tampón de lavado durante 15 minutos en agitación.
- Equilibrar la membrana con Tampón de detección durante 2-5 minutos en agitación.
- Sustituir el Tampón de detección por la Solución de CDP-Star y mantener durante 5 minutos en oscuridad.
- Guardar la Solución de CDP-Star (varios usos almacenada a 4ºC) y envolver la membrana en plástico de hibridación.
- Exponer bajo una película de radiografía (Hyper film, GE Healthcare) en un estuche con pantallas intensificadoras de calcio-tungsteno-fósforo, durante un tiempo que varía entre 30 segundos y 5 minutos.
- Revelar la película sometiéndola al siguiente tratamiento: 1-5 minutos en Líquido revelador de rayos X Kodak (dilución 1:31), 1 minuto en Solución de parada, y 5 minutos en Líquido fijador Kodak (dilución 1:9). Lavar con agua y dejar secar la película.

* Soluciones:

- **Tampón de lavado:** 100 mM ácido maléico; 150 mM NaCl; 0,3 % Tween 20; pH 7,5. Tras preparar la solución, se esteriliza en autoclave. Antes de utilizar añadir Tween 20 al 0,3 %.
- **Solución de bloqueo:** Tampón de lavado sin Tween 20 más 1 % de agente bloqueante (*Blocking Reagent* de Roche).
- **Solución de anticuerpos:** diluir en una proporción 1**:**10.000 anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) en solución de bloqueo.
- **Tampón de detección:** 100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl.
- **Solución de CDP-Star:** 100 µl de CDP-Star (Roche) en 10 ml de tampón de detección.
- **Líquido revelador de rayos X:** diluir el preparado comercial de Kodak en proporción 1**:**31 en agua destilada.
- **Solución de parada:** 2,5 % ácido acético.
- **Líquido fijador:** diluir el preparado comercial de Kodak en proporción 1**:**9 en agua destilada.

B) Detección por fluorescencia

En este caso, la detección se realiza directamente sobre el gel en el que se ha realizado la electroforesis. Se desmonta el gel de la cubeta de electroforesis y se coloca en el escáner de fluorescencia. Dependiendo del fluoróforo con el que ha sido marcada la sonda se deberá seleccionar un canal de detección específico en el escáner. En el caso del marcaje con el

fluoróforo 6-FAM el canal es el correspondiente a Cy2. Por lo general, se utiliza un tiempo de exposición de 0,4 segundos.

2.19.2. Ensayos de protección de ADN frente a ADNasa I

Este tipo de experimento permite determinar con exactitud la secuencia de ADN que es reconocida por una determinada proteína, basándose en que la unión de la proteína al ADN impide que éste sea digerido por la enzima ADNasa I. Este ensayo consta de un primer paso de digestión de un promotor marcado con fluorescencia (control) y del mismo promotor al que se le ha unido una proteína. Tras la digestión se lleva a cabo la secuenciación del producto de ambas digestiones. La comparación de las secuencias permite detectar el sitio de unión, ya que en este punto no se ha producido la digestión del ADN y por lo tanto el electroforegrama aparece plano. Además se lleva a cabo la secuenciación de la zona promotora con los mismos cebadores marcados que se han utilizado en la amplificación del promotor usando el kit *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit* (GE Healthcare), que permite la secuenciación a partir de un cebador marcado con un fluoróforo. Medinate esta secuenciación se obtienen los electroforegramas para cada nucleótido por separado de la misma longitud que lo obtenidos para la protección, por lo que comparando estos electroforegramas con los de la protección se identifica la secuencia protegida, es decir la zona de unión de la proteína.

El protocolo seguido para la realización de los ensayos de protección se basa en el método descrito por Sola-Landa y colaboradores (2005).

Marcaje de la sonda

* Protocolo:

- Amplificar mediante PCR el promotor objeto de estudio. Realizar dos reacciones de PCR utilizando, cada vez, uno de los cebadores marcado con el fluoróforo 6-FAM.
- Purificar el fragmento de ADN mediante el kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* y determinar su concentración.

Reacción de unión proteína-ADN y digestión con ADNasa I

En este trabajo todos los ensayos de protección de ADN frente a ADNasa I se han realizado con PhoP^{DBD}-GST *S. coelicolor* (Sola-Landa *et al.*, 2005).

Diluciones de la proteína: Se realizan diluciones seriadas de la proteína en un tampón adecuado (SPD, para PhoP^{DBD} de *S. coelicolor*). Se usan 15 µl para cada reacción de unión.

Mezcla de la sonda:

A continuación se detallan las cantidades necesarias para una reacción de unión proteína-ADN. El volumen final de la reacción (sonda + proteína + ADNasa I) es de 45 µl.

Componente	Cantidad	Concentración final
Tampón de unión 5X	9 µl	1X
Poli dI-dC (5 µg/µl)	0,45 µl	0,05 µg/µl
Sonda marcada	0,42 pmoles	9,3 nM
Agua destilada	Hasta 27 µl	

Reacción de unión:

- Mezclar las diferentes diluciones de la proteína (15 µl) con el volumen correspondiente (27 µl) de mezcla de sonda.
- Incubar a 30ºC durante 30 minutos.
- Inmediatamente añadir 3 µl de una dilución 1:8000 de ADNasa I (2,5 10^{-3} U/µl) en Tampón de dilución, evitando la formación de burbujas. Incubar a 30ºC durante 1 minuto.
- Parar la reacción con 270 µl de Solución de paro.
- Finalizadas todas las reacciones (control sin proteína y reacciones con diferentes concentraciones de proteína) se fenolizan las muestras. Añadir 160 µl de CIA y 160 µl de fenol neutro. Centrifugar 7 minutos a 13200 rpm.
- Separar la fase acuosa superior a la que se le añade 40 µl de acetato de sodio 3M no tamponado y 0,84 ml de etanol. Dejar precipitar a -20ºC durante toda la noche.
- Centrifugar a 4ºC durante 45 minutos a 13000 rpm. Retirar el sobrenadante con pipeta y dejar secar al aire para eliminar los restos de etanol. Seguir el protocolo de tratamiento de muestras para la secuenciación (ver apartado 2.14) a partir de la adición de 30 µl de Hi-Di Formamida.
- Los mismos cebadores con los que se ha llevado a cabo el marcaje de la sonda son utilizados para la secuenciación de la zona promotora con *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit* (GE Healthcare). Si el ADN molde es un plásmido en el que se ha clonado la zona promotora es necesario, al menos, 1 µg para poder llevar a cabo la secuenciación.

Nota: Se utilizan los mismos cebadores en el marcaje del fragmento promotor y en la secuenciación de la región promotora con *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit*. Así, los electroforegramas obtenidos en la secuenciación son de la misma longitud que los fragmentos utilizados en la protección; lo que permite comparar ambos electroforegramas (mediante el programa Peak Scanner™) para identificar la secuencia de unión.

* Soluciones:

- **Tampón de reconstitución y dilución de la ADNasa I**: La ADNasa I se conserva a -20 ºC resuspendida a 2 U/µl en una solución compuesta de 20 mM Tris-HCl, pH 7,0; 50 mM NaCl; 100 µg/ml BSA; 1 mM DTT; 50 % glicerol. La composición del tampón de dilución es igual a la del tampón de reconstitución excepto por el glicerol que va a una concentración final de 10 %.
- **Solución de paro**: 9,2 ml de TE; 0,8 ml EDTA (0,5 M).

2.20. Valoración del fosfato inorgánico presente en el medio

El protocolo seguido es un método modificado del descrito por Lanzetta y colaboradores (1979). El método se basa en la producción de color debido a la reacción del fosfato presente en la muestra con los reactivos verde malaquita y molibdato de amonio produciéndose un complejo de fosfomolibdato. La posterior adición de citrato contribuye a estabilizar el color aumentando la reproducibilidad de la medida. La concentración de la muestra problema se determina frente a una recta patrón realizada con KH_2PO_4 (Scharlau). Para ello se preparó una solución maestra de KH_2PO_4 a una concentración de 1 mM, a partir de la cual se obtuvieron las concentraciones de referencia para la recta patrón que a continuación se especifican:

Concentración de fosfato (µM)	**KH_2PO_4 (1mM)**	**Agua destilada**
0,0	0,0 µl	100 µl
2,5	2,5 µl	97,5 µl
5,0	5,0 µl	95,0 µl
7,5	7,5 µl	92,5 µl
10,0	10,0 µl	90,0 µl
12,5	12,5 µl	87,5 µl
15,0	15 µl	85,5 µl

Nota: La concentración de fosfato de la recta patrón (µM) se refiere al volumen final de 1 ml que se obtiene tras la adición de los diferentes reactivos.

* Protocolo:

- Mezclar las soluciones Verde Malaquita y Molibdato de Amonio en proporción 3:1 y dejar en agitación 30 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 10 minutos a 6000 rpm y filtrar con filtros de 0,2 µm.
- Añadir 1 µl de la solución al 10 % de Tween 20 por cada ml de mezcla justo antes de usarla.

Para valorar el contenido en fosfato:

1. Añadir 800 µl de la solución anterior a 100 µl de muestra. Mezclar y dejar 1 minuto.
2. Añadir 100 µl de la solución de citrato. Mezclar y dejar 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Medir la absorbancia a 660 nm.

*Soluciones

- **Verde Malaquita:** 0,045 % de verde malaquita en agua destilada.
- **Molibdato de Amonio:** 4,2 % de molibdato de amonio en HCl 4N.
- **HCl 4N:** 33,12 ml de HCl 37 % en 66,88 ml de agua destilada.
- **Citrato de sodio:** 38,74 g de citrato de tri-sodio·$2H_2O$.
- **Tween 20:** 10 % de Tween 20 en agua destilada.

2.21. Análisis de la producción de tacrolimus

2.21.1. Tratamiento de las muestras de fermentación

Determinación del peso seco

* Protocolo:

- Recoger 2 ml de caldo de fermentación en un microtubo de 2 ml (previamente pesado vacío) y centrifugar a máxima velocidad 13200 rpm durante 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante, con cuidado de no retirar parte del micelio. Lavar dos veces el precipitado de micelio con agua destilada.
- Los tubos con el precipitado se secan a 80ºC hasta que el peso es constante, unas 48 horas.
- Pesar los tubos con el micelio seco y restar el peso del microtubo.

Extracción de tacrolimus

A. Extracción con metanol

- Recoger 2 ml de caldo en un tubo de 10 ml y añadir el mismo volumen de metanol grado HPLC.
- Agitar durante 1 hora y recoger 1 ml de la mezcla en un tubo de 1,5 ml. Las muestras se pueden almacenar a -20ºC o analizar inmediatamente
- Centrifugar las muestras 10 minutos a máxima velocidad 13200 rpm. Recoger 100 µl del sobrenadante, evitando arrastrar parte del precipitado, para cargarlo en los viales del HPLC.

B. Extracción con acetato de etilo

- Recoger 1 ml de caldo en un microtubo de 2 ml y añadir el mismo volumen de acetato de etilo grado HPLC.
- Agitar vigorosamente durante 5 minutos y centrifugar a máxima velocidad durante 10 minutos.

- En campana de extracción, recoger la fase superior en otro microtubo. Volver a extraer añadiendo de nuevo 1 ml de acetato de etilo sobre la fase inferior acuosa. Centrifugar y recoger la fase superior que se mezcla con la anterior.
- Eliminar el solvente hasta sequedad en centrífuga de vacio (*Speed-vac*) sin calentar.Resuspender los restos sólidos en metanol-agua (50:50).

2.21.2. Cuantificación de tacrolimus

Bioensayo

El bioensayo permite detectar la presencia de un determinado compuesto gracias a su **actividad bactericida**, por lo que al crecer en medio sólido el microorganismo sensible en presencia de dicho compuesto se observarán halos de inhibición.

El tacrolimus además de ser un inmunosupresor tiene actividad antifúngica lo que permite medir su actividad mediante bioensayo con levaduras. Las cepas de *S. cerevisiae* que normalmente se utilizan en los laboratorios no suelen ser sensibles al tacrolimus, ya que no precisan de la calcineurina (la enzima inhibida por el tacrolimus) para el crecimiento vegetativo. Estas cepas se pueden convertir en sensibles mediante un tratamiento con sal de litio 0,5 M. Los bioensayos se han realizado con una cepa mutante de *S. cerevisiae* TB23 sensible a tacrolimus (Arndt *et al.*, 1999; Breuder *et al.*, 1994).

El bioensayo es un **método semicuantitativo**, colocando muestras de concentración conocida se puede realizar una recta patrón que relacione el diámetro del halo con la concentración de tacrolimus. Esta recta permite estimar la concentración de las muestras problema ya que la medida del diámetro del halo es muy subjetiva.

* Protocolo:

- Inocular medio YPD líquido con *S. cerevisiae* TB23 crecida en placas de medio YPD sólido. Incubar a 30ºC en agitación hasta que alcance una DO_{600} 1,8-2,2.
- Añadir 3 ml del cultivo a 60 ml de YPD (1,5% de agar) que previamente se ha fundido y se mantiene en baño de agua a una temperatura de 42ºC. Agitar la mezcla suavemente evitando la formación de burbujas.
- Colocar la placa en una superficie plana y verter la mezcla YPD más el microorganismo sobre la misma, procurando que el medio quede homogéneamente distribuido por toda la placa. Dejar solidificar durante unos 20 minutos.
- Realizar los pocillos con un sacabocados de 5 mm de diámetro. En cada pocillo se colocan 50 µl de muestra y se dejan las placas durante 2 horas a 4ºC para permitir la difusión de la muestra.
- Incubar las placas a 30ºC, temperatura adecuada para el crecimiento del microorganismo sensible. A las 24 horas ya se pueden observar los halos de inhibición.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La determinación cuantitativa de la producción de tacrolimus se ha realizado en dos equipos de HPLC (del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) diferentes utilizando un método similar:

1. Sistema de HPLC Agilent series 1100 equipado con una columna Zorbax SB-C18, 4,6 mm ID x 150 mm (tamaño de partícula 3,5 µm) a una temperatura de 60ºC. La fase móvil utilizada es una mezcla de dos soluciones, A: solución acuosa de ácido trifluoro acético (TFA) al 0,01% y B: acetonitrilo más metilterbutileter (MTBE) al 20%. La detección se realiza a una longitud de onda 210 nm. La separación cromatográfica se realiza a un flujo de 1,7 ml/min con un método isocrático, 57% de A y 43% de B durante 8 minutos y medio. Tras la elución de las muestras se realiza un paso de lavado con acetonitrilo al 100% durante 3 minutos y se recuperan las condiciones de carrera durante otros 3 minutos. A continuación se muestra el programa de carrera:

Tiempo (min)	B (%)
0:00	43
8:50	43
8:60	100
12:60	100
13:00	43
17:00	43

2. Sistema de Waters Alliance HPLC equipado con una columna XBridge™ C18, 2,1 mm ID x 150 mm (tamaño de partícula 3,5 µm) a una temperatura de 50ºC. La fase móvil está constituida por tres soluciones A: solución acuosa de TFA al 0,01 %, B: acetonitrilo y C: MTBE. La detección se realiza a una longitud de onda 210 nm. La separación cromatográfica se realiza a un flujo de 0,5 ml/min siguiendo el siguiente método:

Tiempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0:00	65	28	7
8:50	65	28	7
8:60	0	80	20
12:60	0	80	20
13:00	65	28	7
17:00	65	28	7

S. albidoflavus NBRC 13010T (AB184255)
S. canescens NBRC 12751T (AB184117)
S. sampsonii ATCC 25495T (D63871)
S. champavatii NRRL B-5682T (DQ026642)
S. felleus NBRC 12766T (AB184129)
S. koyangensis
S. pupurascens JCM 4509T
S. violaceus NBRC 13105T
S. massasporeus
S. hawaiiensis NBRC
S. caelestis
99*
99*
57
82
76*
98*
89*
Resultados y discusión

Capítulo I

3.1. Determinación de la posición taxonómica de dos species de *Streptomyces* productoras de tacrolimus

3.1.1. Introducción

La importancia clínica, y por tanto comercial, del inmunosupresor tacrolimus ha provocado que diferentes compañías farmacéuticas y laboratorios hayan desarrollado programas de rastreo para encontrar sus propias cepas productoras de dicho compuesto. Así, se han descrito diferentes especies del género *Streptomyces* productoras de tacrolimus, pero en muchos casos no se ha establecido de manera rigurosa su posición taxonómica. Además, muchas de estas especies han sido definidas en forma de patente por lo que no se ha establecido una especie tipo. En la descripción de algunas de estas patentes se mezclan tanto la cepa silvestre como mutantes de la misma, por lo que no quedan definidas, de manera clara, las características y el potencial productor de la cepa silvestre.

En cambio, si se ha realizado un estudio más completo y riguroso de las relaciones filogenéticas que unen a algunas de las especies productoras de inmunosupresores. Así, dos estudios independientes (Garrity *et al.*, 1993; Muramatsu *et al.*, 2005) han concluido la falta de una relación filogenética cercana entre estas especies por lo que la adquisición de los genes de biosíntesis de tacrolimus se habrá producido, probablemente, mediante transferencia horizontal.

Por ello, se planteó la determinación de la situación taxonómica de las dos especies productoras de tacrolimus utilizadas en este trabajo, *Streptomyces* sp. ATCC 55098 y *`S. tsukubaensis´*. La realización de este estudio se abordó siguiendo los planteamientos de la taxonomía polifásica, que tiene en cuenta aspectos genotípicos, fenotípicos y filogenéticos.

Entre las características analizadas en la determinación de la posición taxonómica de las dos especies del género *Streptomyces,* se encuentran las siguientes:

A. Características quimiotaxonómicas

Composición de la pared celular

La determinación de la composición de la pared celular es un carácter importante en la taxonomía de bacterias Gram-positivas. El tipo de peptidoglicano de la pared de bacterias Gram-negativas es uniforme y aporta poca información. Por el contrario, las bacterias Gram-positivas poseen peptidoglicanos de diferente composición química, que pueden ser específicos del género o la especie (Vandamme *et al.*, 1996).

El género *Streptomyces* es único dentro de las bacterias Gram-positivas, por el desarrollo de un micelio muy ramificado debido al contenido en ácido LL-diaminopimélico (DAP). Otro de los parámetros de análisis de la pared celular es la composición en ciertos azúcares: galactosa, arabinosa, xilosa y madurosa. Los Actinomicetos que contienen el isómero meso-DAP presentan cuatro patrones diferentes en la composición de estos azúcares

lo que permite identificar unos de otros. El género *Streptomyces* no presenta un patrón de azucares característico.

Dependiendo de los tipos de aminoácidos y azúcares, así como del isómero de DAP presente en la pared celular, Lechavalier y Lechevalier establecieron en 1970, nueve tipos de pared celular dentro de los Actinomycetales y especies cercanas. El genero *Streptomyces* presenta pared celular de tipo I que se caracteriza por la ausencia de un patrón de azucares característico junto a la presencia del isómero LL-DAP.

Ácidos grasos

Los ácidos grasos son los mayores componentes de los lípidos y los lipopolisacáridos. La variabilidad que presentan en la longitud de la cadena, la posición de los dobles enlaces y los tipos de radicales químicos sustituyentes son parámetros utilizados en taxonomía bacteriana.

Los ácidos grasos se determinan como sus metil-ésteres por cromatografía gaseosa. La nomenclatura adoptada para los ácidos grasos es: i) el número anterior a los dos puntos indica el número total de carbonos de la molécula; ii) el número posterior a los dos puntos indica el número de dobles enlaces; el número que sigue (en caso de existir dobles enlaces) indica el carbono inicial del doble enlace contando a partir del extremo carboxílico precedido de la palabra cis o trans para especificar la correspondiente configuración y iii) la indicación iso o anteiso indica la posición del metilo terminal o subterminal, respectivamente. Así, el ácido graso 16:1 cis 9 se compone de una cadena de 16 átomos de carbono con un doble enlace (con configuración cis) entre los carbonos 9 y 10 contando a partir del extremo carboxilo terminal.

B. Contenido en G+C

La determinación del porcentaje en moles de guanosina mas citosina es uno de los clásicos métodos genotípicos y se considera imprescindible en la descripción taxonómica de una especie. En el mundo bacteriano este valor está comprendido entre 24 y 76 % (Vandamme *et al.*, 1996).

C. Árbol filogenético

La secuencia del ARNr 16S es una de las mejores herramientas para el estudio de las relaciones filogenéticas; ya que está presente en todas las bacterias, es funcionalmente constante y se compone de regiones muy conservadas así como dominios más variables.

En la taxonomía de *Streptomyces* está secuencia se ha utilizado para analizar relaciones filogenéticas a nivel de familia, género y especie (Anderson y Wellington, 2001).

D. Características fenotípicas y fisiológicas

Este tipo de parámetros son irrelevantes por si solos en la determinación de relaciones filogenéticas pero aportan información descriptiva que permiten reconocer un determinado microorganismo.

El análisis de estas características requiere de procedimientos estandarizados para conseguir resultados reproducibles en diferentes laboratorios. En el caso del género *Streptomyces* se siguen los procedimientos establecidos por el *International Streptomyces Project* (ISP) (Shirling y Gottlieb, 1966) y por el estudio de taxonomía numérica realizado por Williams y colaboradores (1983), los cuales establecen la composición de los medios y las condiciones en las que se debe desarrollar el análisis.

E. Hibridación ADN-ADN

La hibridación de ADN cromosomal de dos especies es uno de los parámetros utilizados en la taxonomía de *Streptomyces* para determinar la identidad entre especies. Este análisis se lleva a cabo monitorizando la re-asociación de ADN de cadena simple de diferentes organismos. El nivel de relación se expresa como porcentaje de homología y el umbral de especie viene dado por un valor mayor o igual al 70 % (Wayne *et al.*, 1987); es decir dos cepas de *Streptomyces* se consideran la misma especie si el nivel de relación de ADN-ADN es mayor o igual al 70%.

3.1.2. Situación taxonómica de *Streptomyces* sp. ATCC 55098

Inicialmente, se presentan las características de esta especie que la sitúan dentro de un determinado género. En una segunda parte del estudio se realiza una comparativa con las especies más cercanas, determinadas mediante un estudio filogenético basado en la secuencia del ARNr 16S.

Características morfológicas

La especie *Streptomyces* sp. ATCC 55098 se diferencia formando un micelio sustrato con un alto grado de ramificación sin verticilos. Las hifas aéreas se diferencian en cadenas flexibles de esporas con forma cilíndrica cuya superficie presenta un aspecto verrugoso (Figura 3.1). A nivel macroscópico las esporas presentan color blanco con tintes marrones. No se ha observado la producción de pigmentos en ninguno de los medios analizados.

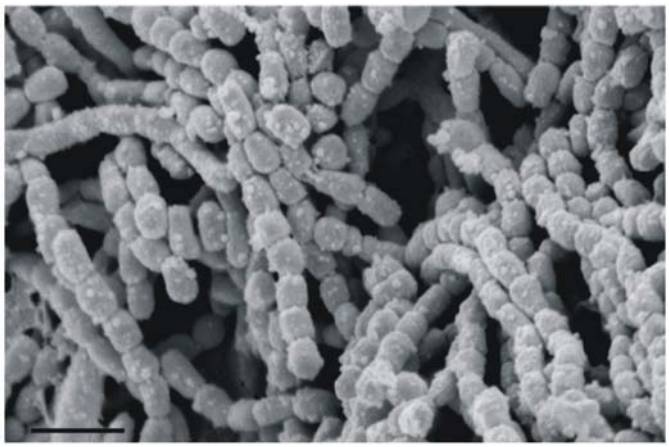


Figura 3.1: Micrografía de las esporas de *Streptomyces* sp. ATCC 55098 realizada con microscopio electrónico. El cultivo de *Streptomyces* sp. ATCC 55098 se realizó en medio ISP2 durante 14 días a 28ºC. Esta especie presenta esporas en forma de cillindro con superficie verrugosa. La barra negra que se encuentra en la parte inferior a la izquierda corresponde a 2 µm.

Características quimiotaxonómicas

A. Pared celular

El análisis de la composición de la pared celular ha mostrado la presencia de trazas de LL-DAP y la ausencia del isómero meso-DAP. Este resultado junto a la ausencia de azúcares de diagnóstico (galactosa, arabinosa, xilosa y madurosa) nos permite describir una **pared de tipo I** para la especie objeto de estudio, típica del género *Streptomyces*.

B. Ácidos grasos

Los ácidos grasos con una longitud de cadena comprendida entre C-12 y C-18 que aparecen en mayor proporción son:

Ácido graso	Proporción (%)
iso-14:0	16,75
iso-16:0	12,50
iso-15:0	12,25
anteiso-15:0	11,40
16:0	3,40
12:0	2,11
16:1 cis 9	1,30
iso-17:0	1,30
anteiso-17:0	1,20
iso-16:1	1,00
17:0 cyclo	1,00

Esta composición es característica del género *Streptomyces*, el cual presenta de manera mayoritaria ácidos grasos del tipo iso- y anteiso-, así como ácidos grasos de cadena saturada (Locci, 1989).

Contenido en G+C

Streptomyces sp. ATCC 55098 presenta un contenido en G+C de **71,0 mol %**, valor característico del género *Streptomyces.*

Análisis filogenético basado en la secuencia del ARNr 16S

El árbol filogenético está basado en la secuencia casi completa del ARNr 16S. La extracción del ADN total de *Streptomyces* sp. ATCC 55098 se realizó siguiendo el método *Salting-out* (ver 2.7.3). La región correspondiente al ARNr 16S se amplificó con los cebadores 16S-*Cla*I/16S-*Xba*I utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad de copia (*Platinum® Pfx,* Invitrogen). El producto de amplificación fue purificado desde gel mediante el kit comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* y clonado en el vector pBluescript SK^+ usando los cortes presentes en los cebadores *Cla*I y *Xba*I. La secuencia del ARNr 16S fue obtenida utilizando cebadores internos: 16S sense, 16S ant, 16SII-1, 16SII-2, 16SII-3.

Una vez obtenida la secuencia del ARNr 16S (1629 pb) se realizó una búsqueda de las secuencias con mayor identidad utilizando la aplicación informática Blast (EBI); dando como resultado secuencias pertenecientes al género *Streptomyces.*

El género *Streptomyces* está compuesto de más de 500 especies y subespecies [www.bacterio.cict.fr (Euzéby, 1997)] por lo que la realización de un árbol filogenético con todas las especies existentes sería muy complicado. Así, se seleccionaron las especies tipo cuya secuencia del ARNr 16S presentaba una identidad mayor o igual al 98% con la secuencia de *Streptomyces* sp. ATCC 55098 para la construcción del árbol filogenético.

Las secuencias seleccionadas se recortaron de manera que todas presentaran aproximadamente la misma longitud; por lo que finalmente el árbol se realizó con 18 secuencias de una longitud aproximada de 1469 pb.

En primer lugar, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias seleccionadas usando la herramienta bioinformática ClustalW. Utilizando dicho archivo de alineamiento se construyó el árbol mediante dos métodos diferentes: *neighbour-joining* y máxima verosimilitud ofrecidos por los paquetes informáticos MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) y PHYLIP (Felsenstein, 2005), respectivamente. La matriz de distancias utilizada por el algoritmo *neighbour-joining* fue calculada con el método "Kimura dos parámetros" (Kimura, 1980).

Ambos árboles se realizaron con un número de réplicas de 1000 mediante la herramienta *Bootstrap* (Felsenstein, 1985). Esta herramienta estadística nos permite evaluar la fiabilidad del árbol obtenido y se basa en la realización de pseudomuestreos de la alineación múltiple. Estos se basan en alineamientos de la misma longitud de secuencia que el original, en los que cada posición del alineamiento es elegida al azar por lo que se puede analizar una misma posición varias veces y otras posiciones no aparecerán en la pseudo-réplica. Cada pseudo-réplica permite realizar un árbol filogenético y el número de veces que

aparece una determinada rama en el conjunto final de árboles nos da la proporción de *Bootstrap* que nos indican la robustez de la misma. Además, la construcción del árbol filogenético mediante dos algoritmos diferentes también nos aporta información extra sobre la fiabilidad de cada rama.

En el árbol obtenido mediante el método de *neighbour-joining, Streptomyces* sp. ATCC 55098 aparece localizado en una rama individual cercana al grupo formado por ***Streptomyces flavofungini*** y ***Streptomyces fulvissimus*** (Figura 3.2)*;* mientras que en el árbol obtenido por máxima verosimilitud la cepa objeto de estudio no se incluye en ningún grupo. Estos resultados ya nos indican que *Streptomyces* sp. ATCC 55098 puede ser una especie nueva dentro del género *Streptomyces* ya que no existe una relación muy cercana con las especies que han presentado una mayor identidad en la secuencia del ARNr 16S.

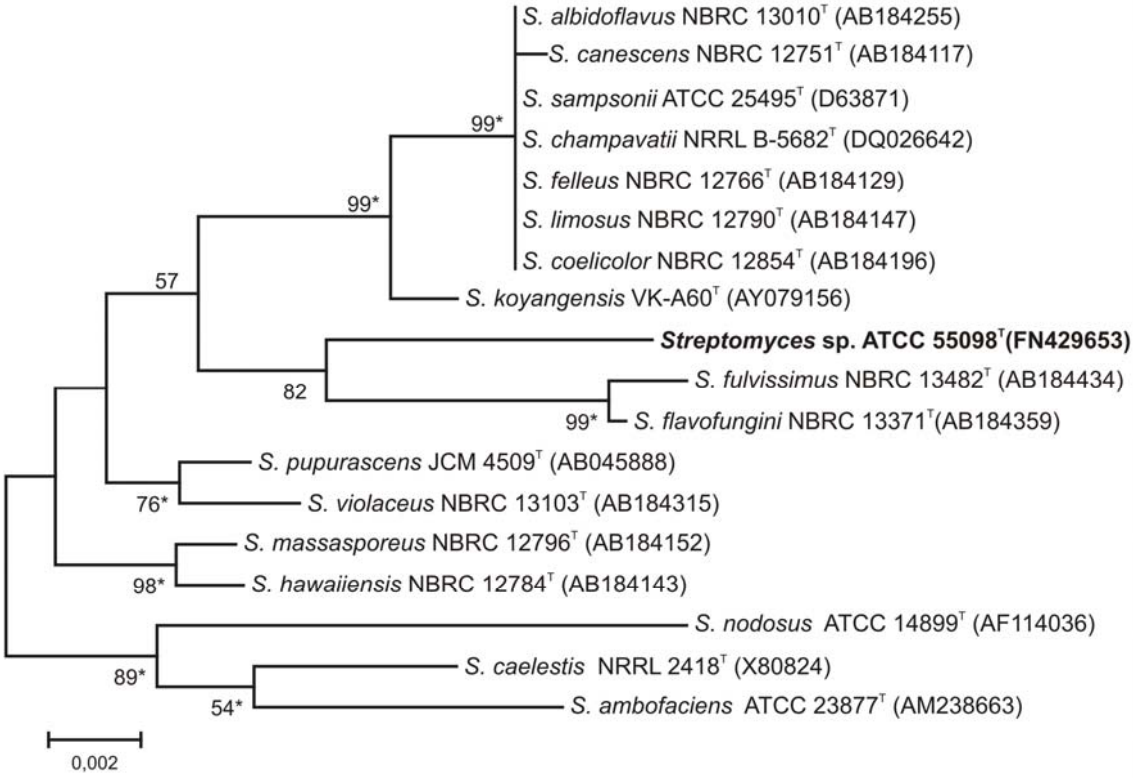


Figura 3.2: Árbol filogenético basado en la secuencia del ARNr 16S. Árbol filogenético construido mediante el método de *neighbour-joining*. Entre paréntesis aparece el número de acceso al GenBank de las respectivas secuencias de ARNr 16S. Los números que aparecen en los nodos de las ramas representan el valor de *Bootstrap* en porcentaje, basado en un análisis de 1000 réplicas (sólo se muestran los valores superiores al 50 %). Con un asterisco se marcan las ramas que se han obtenido también en el árbol construido mediante máxima verosimilitud. La barra en la parte inferior izquierda marca la longitud correspondiente a 0,002 sustituciones por nucleótido.

Este estudio filogenético nos permite determinar las especies filogenéticamente más cercanas a *Streptomyces* sp. ATCC 55098, las cuales son *S. fulvissimus* y *S. flavofungini.* La secuencia del ARNr 16S de *Streptomyces* sp. ATCC 55098 presenta el mayor grado de

identidad con el ARNr 16S de *S. fulvissimus* (98,6 %) y una identidad algo menor con *S. flavofungini* (98,4 %).

Los siguientes análisis están dirigidos a demostrar la diferencia entre *Streptomyces* sp. ATCC 55098 y las especies tipo más cercanas filogenéticamente.

Características fenotípicas y fisiológicas en diferentes medios de cultivo sólidos

La capacidad de esporulación, el color del micelio sustrato y aéreo y la producción de pigmentos difusibles fueron las características fenotípicas analizadas. En este estudio se utilizaron los medios ISP2, ISP3, ISP4 e ISP5; como ejemplo se muestra una foto del aspecto de las diferentes especies analizadas en medio ISP2 tras 14 días de incubación a 28°C (Figura 3.3). El análisis de la capacidad de producción de melanina se llevó a cabo en los medios ISP6 e ISP7, mientras que el estudio de la asimilación de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno se realizó en los medios ISP9 y en el medio para asimilación de fuentes de nitrógeno descrito por Williams y colaboradores (1983), respectivamente. Estos medios se suplementaron con las diferentes fuentes de carbono a una concentración de 1 % y de nitrógeno al 0,1 % y como control positivo de crecimiento se utilizó D-glucosa en el caso de las fuentes de carbono y L-asparagina [recomendado por (Langham *et al.*, 1989)] para la asimilación de fuentes de nitrógeno.

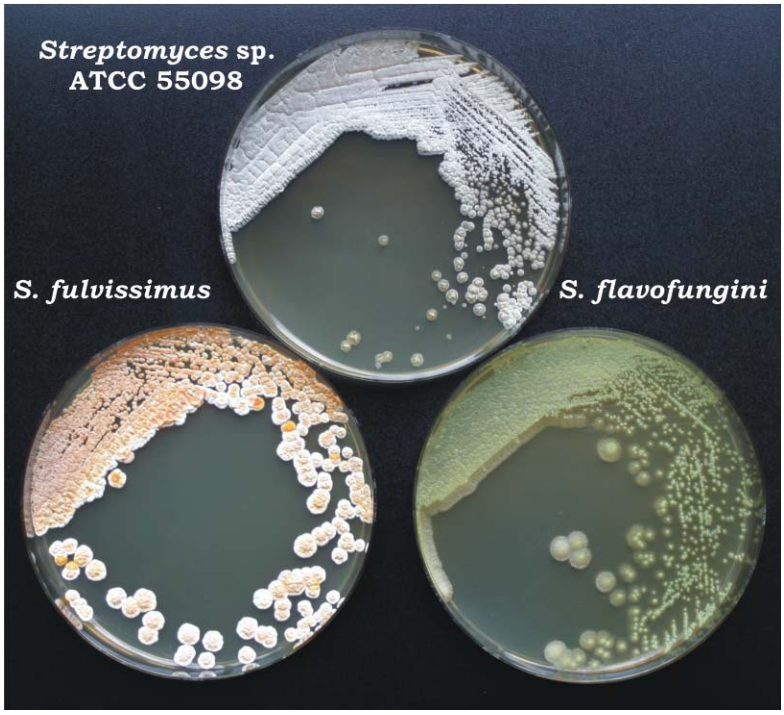
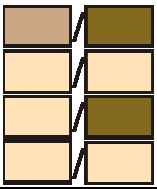
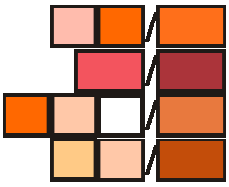
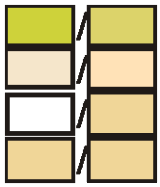


Figura 3.3: Características fenotípicas en ISP2. A modo de ejemplo de las pruebas fenotípicas, se muestra una fotografía de cultivos de *Streptomyces* sp. ATCC 55098 y las cepas filogenéticamente más cercanas *S. fulvissimus* y *S. flavofungini* en medio ISP2 tras 14 días de incubación a 28°C.

La tolerancia a diferentes temperaturas y pH se analizó en medio MBA, mientras que la tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl se ensayó en el medio 172. También se

utilizó el medio MBA para el análisis de la resistencia a diferentes concentraciones de antibióticos. Todos estos estudios se realizaron tras 14 días de incubación a 28ºC (excepto cuando se especifique otra temperatura). En la tabla 3.1 se recogen los rasgos que diferencian a *Streptomyces* sp. ATCC 55098 de las especies *S. fulvissimus* y *S. flavofungini*.

Tabla 3.1: Características fenotípicas y fisiológicas diferentes entre especies. Rasgos que diferencian a *Streptomyces* sp. ATCC 55098 de las especies filogenéticamente más cercanas.

Característica	ATCC 55098	*S. fulvissimus*	*S. flavofungini*
Esporulación			
ISP2	moderada	abundante	moderada
ISP3	moderada	pobre	pobre
ISP4	moderada	abundante	moderada
ISP5	moderada	abundante	ausente
Color micelio aéreo/sustrato*			
ISP2			
ISP3			
ISP4			
ISP5			
Producción de melanina			
ISP6	no	si	no
Fuentes de carbono 1 %**			
L-arabinosa	-	+	±
D-fructosa	±	+	±
Lactosa	±	-	±
D-maltosa	-	±	±
D-ramnosa	+	-	-
Sacarosa	-	±	-
Fuentes de nitrógeno 0,1 %			
L-hidroxiprolina	-	+	+
Tolerancia a NaCl	10 %	7 %	7 %
Crecimiento a 37ºC	no	si	si
Resistencia a antibióticos			
Novobiocina (100 µg/ml)	si	no	no
Tioestreptona (20 µg/ml)	no	si	si
Rifampicina (20 µg/ml)	no	si	no
Estreptomicina (20 µg/ml)	no	si	no
Cloranfenicol (20 µg/ml)	no	si	si
Clortetraciclina (20 µg/ml)	no	si	si
Tetraciclina (20 µg/ml)	no	si	si

* La gama de colores está tomada de *NBS-ISCC Colour System* (www.anthus.com).

** Asimilación positiva (+), significa que hay crecimiento en la fuente de carbono ensayada. Asimilación dudosa (±), significa que el crecimiento no es muy abundante. Asimilación negativa (-), cuando no se observa crecimiento en la fuente de carbono ensayada.

La producción de **melanina** es negativa para todas las cepas en ISP7. En todos los casos se ha observado crecimiento utilizando como única **fuente de carbono (1 %)**: D-glucosa, D-manitol, D-manosa y como única **fuente de nitrógeno (0,1 %)**: L-valina, L-cisteína, L-histidina, L-fenilalanina y L-treonina. No se ha observado crecimiento en ninguna de las especies cuando se utilizó como única fuente de nitrógeno: DL-2-ácido aminobutírico. Todas las cepas tienen la capacidad de crecer a un **pH** comprendido entre **5 y 9** y a una **temperatura** entre **16ºC y 30ºC**, mientras que a 4ºC no se observó crecimiento en ninguno de los casos.

Todas las especies de *Streptomyces* analizadas presentan **sensibilidad** a sulfato de kanamicina (10 µg/ml), apramicina (10 µg/ml), sulfato de gentamicina (10 µg/ml) y **resistencia** a penicilina G (100 µg/ml), ampicilina (100 µg/ml) y tacrolimus (100 µg/ml).

Hibridación ADN-ADN

Los niveles de relación ADN-ADN de las especies en estudio se muestran como media de los análisis realizados por duplicado:

	S. fulvissimus	*S. flavofungini*
Streptomyces sp. ATCC 55098	31,5 %	14,5 %

3.1.3. Situación taxonómica de `*S. tsukubaensis*´ NRRL 18488

La cepa `*S. tsukubaensis*´ fue descrita por primera vez en 1987 por científicos de Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd. Ese primer trabajo estaba dividido en tres partes; la primera contenía las condiciones de fermentación y de extracción para la obtención de tacrolimus, así como las características físico-químicas y biológicas de dicho compuesto (Kino *et al.*, 1987a), la segunda recogía el efecto inmunosupresor *in vitro* del compuesto tacrolimus (Kino *et al.*, 1987b) y la última estaba planteada como la descripción taxonómica de la especie productora de tacrolimus `*S. tsukubaensis*´. En las referencias del primer trabajo (Kino *et al.*, 1987a) se cita un estudio de taxonomía en preparación pero dicho análisis nunca llegó a publicarse. Las patentes referidas a la producción de tacrolimus con esta especie incluyen un estudio taxonómico (Okuhara *et al.*, 1990) pero no se ha realizado de manera rigurosa con el objetivo de caracterizar `*S. tsukubaensis*´ como una nueva especie y por lo tanto validar dicho nombre.

Se considera que el nombre de una especie es válidamente publicado si se incluye en:

***** *Approved Lists of Bacterial Names* (editado por VBD Skerman, V McGowan y PHA Sneath).

***** *Index of the Bacterial and Yeast Nomenclatural Changes Published in the International Journal of Systematic Bacteriology since the 1980 Approved Lists of Bacterial*

Names (desde el 1 de enero de 1980 hasta el 1 de enero de 1989) (editado por WEC Moore y LVH Moore).

***** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) desde el 1 de enero 1989.

El estado actual de la población microbiana se puede consultar en una base de datos *online* que recoge los nombres de los microorganismos que han sido válidamente publicados (www.bacterio.cict.fr).

Hasta el momento, el nombre de *`S. tsukubaensis´* no ha sido válidamente publicado y por ello aparece entrecomillado. *`S. tsukubaensis´* es unos de los productores de tacrolimus objeto de estudio en esta tesis, así que como parte del trabajo se determinó la situación taxonómica de dicha especie.

Características morfológicas

El micelio generado por *`S. tsukubaensis´* presenta una ramificación simple, es decir sin verticilos. Las esporas en forma cilíndrica y superficie lisa (Figura 3.4) aparecen unidas formando cadenas flexibles. A nivel macroscópico las esporas presentan color gris intenso. Se ha observado la producción de un pigmento de tonalidad comprendida entre rosa-rojo en diferentes medios de cultivo, especialmente en ISP2, donde se observa la coloración total de la placa de rojo intenso.

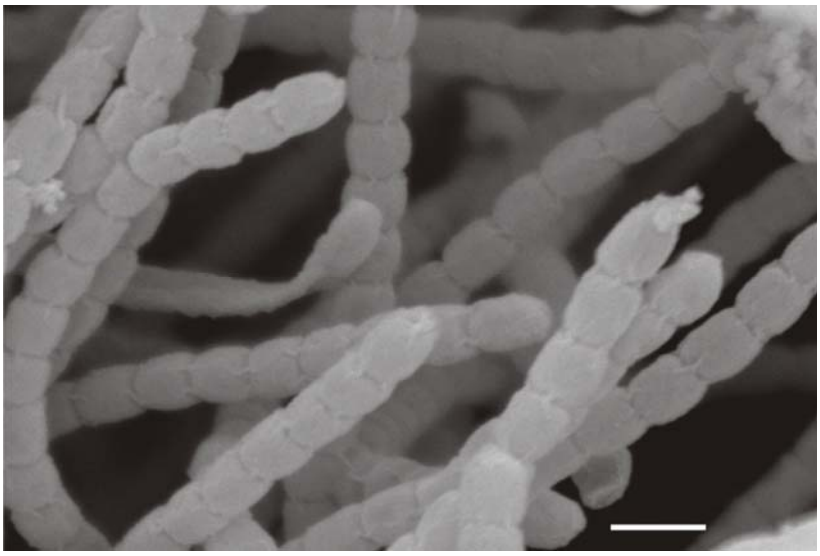


Figura 3.4: **Micrografía de las esporas de *`S. tsukubaensis´* realizada mediante microscopio electrónico.** El cultivo de la especie *`S. tsukubaensis´* se realizó en medio ISP2 durante 14 días a 28ºC. Esta especie presenta esporas en forma de cilindro con superficie lisa. La barra blanca que se encuentra en la parte inferior derecha corresponde a 1 µm.

Características quimiotaxonómicas

A. Pared celular

En la pared celular de `*S. tsukubaensis*´ se ha detectado la presencia del isómero LL-DAP y entre los azúcares sólo se encuentra presente la glucosa. Este resultado junto a la ausencia de azúcares de diagnóstico (galactosa, arabinosa, xilosa y madurosa) permite describir una **pared de tipo I** para la especie objeto de estudio, típica del género *Streptomyces*.

B. Ácidos grasos

Los ácidos grasos con una longitud de cadena comprendida entre C-12 y C-18 que aparecen en mayor proporción son:

Ácido graso	Proporción (%)
iso-14:0	18,81
anteiso-15:0	17,05
iso-16:0	15,16
iso-15:0	15,11
16:0	8,05
16:1	5,97
iso-13:0	3,81
iso-17:0	3,25
12:0	3,03
anteiso-17:0	2,91
iso-17:1	2,10
15:0	1,80
iso-16:1	1,46
14:0	1,43

Contenido en G+C

`*S. tsukubaensis*´ presenta un contenido en G+C de **70,2 mol %,** valor característico del género *Streptomyces*.

Análisis filogenético basado en la secuencia del ARNr 16S

En este caso no fue necesaria la secuenciación del ARNr 16S, gracias a la disposición de la secuencia completa del genoma de `*S. tsukubaensis*´.

La selección de las especies que iban a conformar el árbol filogenético (Figura 3.5) y la construcción del mismo se realizó siguiendo los mismos pasos que en el estudio filogenético realizado con *Streptomyces* sp. ATCC 55098.

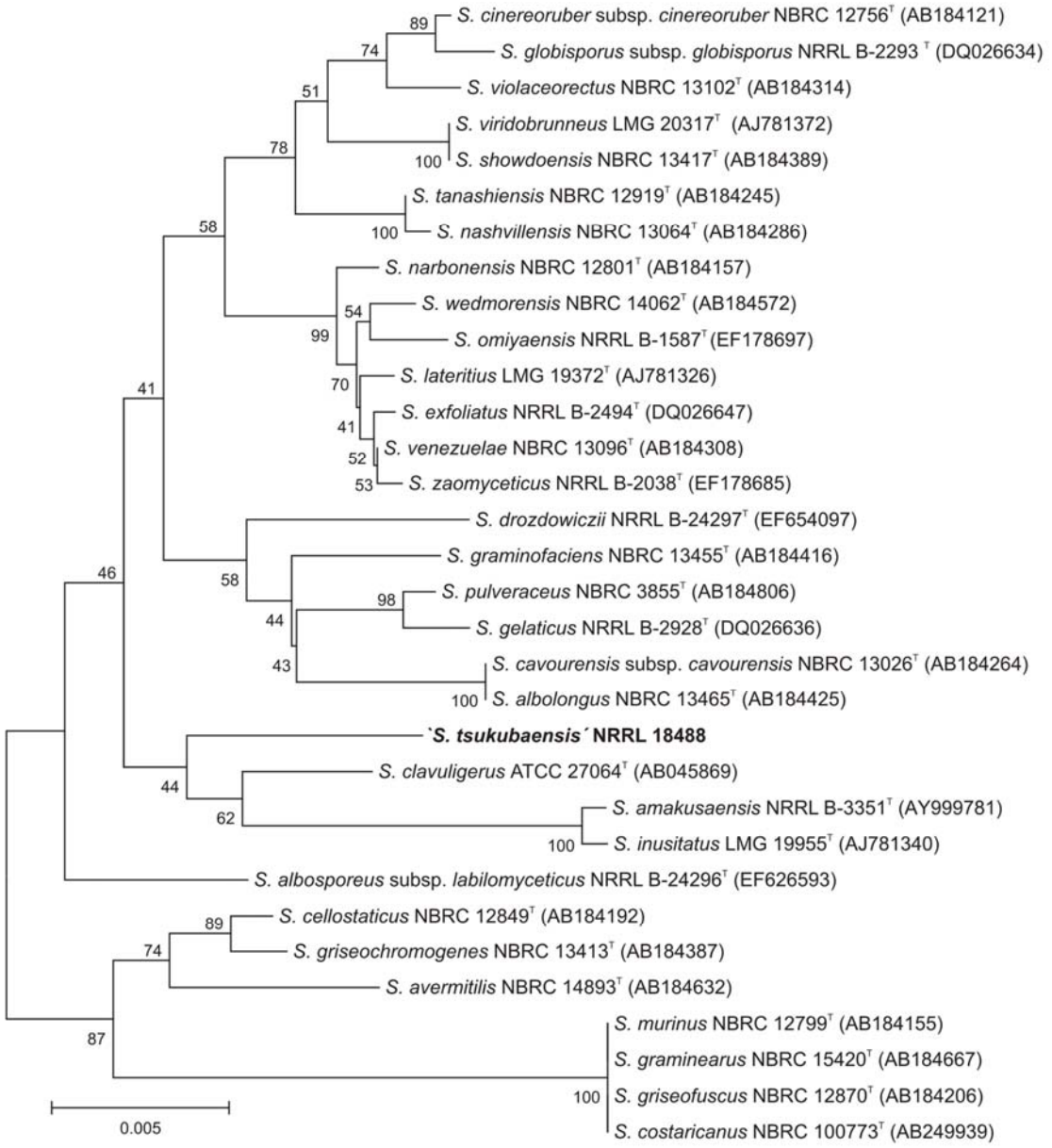


Figura 3.5: Árbol filogenético basado en la secuencia del ARNr 16S. Árbol filogenético construido mediante el método de *neihgbour-joining* que muestra la relación de *`S. tsukubaensis´* NRRL 18488 con las especies tipo del género *Streptomyces* más cercanas filogenéticamente. Entre paréntesis aparece el número de acceso en el GenBank de las respectivas secuencias de ARNr 16S. Los números que aparecen en los nodos de las ramas representan el valor de *Bootstrap* en porcentaje, basado en un análisis de 1000 réplicas (sólo se muestran los valores superiores al 50 %). La barra en la parte inferior izquierda marca la longitud correspondiente a 0,005 sustituciones por nucleótido.

Se seleccionaron las especies cuya secuencia presentaba una identidad igual o mayor al 97,5 % con la secuencia del ARNr 16S de *`S. tsukubaensis´*. La búsqueda mediante la herramienta informática Blast (EBI) sólo resultó en tres especies tipo con una identidad mayor o igual al 98 % respecto a la secuencia del ARNr 16S de *`S. tsukubaensis´*; por lo que se tuvo que bajar el umbral de identidad para poder realizar un árbol filogenético más

completo, el cual finalmente se compuso con 31 especies tipo más la especie objeto de estudio *`S. tsukubaensis´*.

La construcción del árbol se realizó únicamente mediante el algoritmo de *neighbour-joining*, ya que la utilización del algoritmo de máxima verosimilitud requiere de una gran capacidad computacional y por tanto de mucho tiempo. La realización del árbol con un valor de 1000 replicas de *Bootstrap* es suficiente para asegurar la robustez del mismo.

Las especies filogenéticamente más cercanas a *`S. tsukubaensis´* son ***Streptomyces clavuligerus***, ***Streptomyces amakusaensis*** y ***Streptomyces inusitatus*** presentando el siguiente grado de identidad en relación a la secuencia del ARNr 16S:

	S. clavuligerus	*S. amakusaensis*	*S. inusitatus*
`S. tsukubaensis´	98,4 %	97,8 %	97,7 %

Una vez determinadas las especies tipo más cercanas filogenéticamente, se realizaron los estudios de caracterización fenotípica y fisiológica, así como hibridación ADN-ADN con el objetivo de confirmar que *`S. tsukubaensis´* NRRL 18488 es una especie nueva.

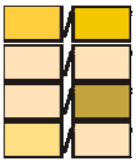
Características fenotípicas y fisiológicas en diferentes medios de cultivo sólidos

El estudio realizado incluyó las mismas características que en el caso anterior de *Streptomyces* sp. ATCC 55098. En la figura 3.6 se muestra el aspecto fenotípico en ISP2 de las cuatro especies de *Streptomyces* con las que se va a realizar este análisis comparativo.

Figura 3.6: Características fenotípicas en ISP2. A modo de ejemplo de las pruebas fenotípicas, se muestra una fotografía de cultivos de *`S. tsukubaensis´* y las cepas filogenéticamente más cercanas *S. clavuligerus*, *S. amakusaensis* y *S. inusitatus* en medio ISP2 tras 14 días de incubación a 28ºC.

En la tabla 3.2 se recogen los rasgos que diferencian a *`S. tsukubaensis´* de las especies *S. clavuligerus, S. amakusaensis* y *S. inusitatus*.

Tabla 3.2: Características fenotípicas y fisiológicas diferentes entre especies. Rasgos que diferencian a *`S. tsukubaensis´* NRRL 18488 de las especies filogenéticamente más cercanas. Los nombres de las especies se citan de manera abreviada: *`S. tsukubaensis´* como *S. tsuku, S. clavuligerus* como *S. clavu, S. amakusaensis* como *S. amaku* y *S. inusitatus* como *S. inu.*

Característica	*S. tsuku*	*S. clavu*	*S. amaku*	*S. inu*
Esporulación				
ISP2	pobre	pobre	pobre	pobre
ISP3	pobre	ausente	pobre	pobre
ISP4	abundante	abundante	pobre	pobre
ISP5	pobre	pobre	pobre	pobre
Color micelio aéreo/sustrato*				
ISP2				
ISP3				
ISP4				
ISP5				
Fuentes de carbono 1 %**				
D-glucosa	±	-	+	+
L-arabinosa	-	-	±	-
D-fructosa	-	-	-	+
Lactosa	-	±	±	±
Sacarosa	-	±	±	-
D-xilosa	±	-	±	±
D-manitol	-	±	-	±
D-inositol	±	±	-	-
D-manosa	-	+	±	±
Fuentes de nitrógeno 0,1 %**				
L-asparagina	±	+	+	±
L-fenilalanina	±	+	±	±
L-valina	-	±	±	-
L-cisteína	-	-	-	±
L-histidina	-	+	-	-
L-treonina	-	+	±	±
Tolerancia a NaCl	5 %	3 %	5 %	5 %
Crecimiento a 37ºC	si	si	no	no
Crecimiento a pH 5	si	si	no	no
Resistencia a antibióticos				
Penicilina G (50 µg/ml)	si	si	no	no
Tioestreptona (15 µg/ml)	si	no	no	no
Kanamicina (15 µg/ml)	no	no	si	si
Gentamicina (15 µg/ml)	si	no	no	no
Cloranfenicol (50 µg/ml)	no	si	si	si
Ampicilina (50 µg/ml)	si	si	no	no

* La gama de colores está tomada de *NBS-ISCC Colour System* (www.anthus.com).

** Asimilación positiva (+), significa que hay crecimiento en la fuente ensayada. Asimilación dudosa (±), significa que el crecimiento no es muy abundante. Asimilación negativa (-), cuando no se observa crecimiento en la fuente ensayada.

La producción de melanina es negativa para todas las especies en los medios ISP6 e ISP7. En todos los casos se obtuvo crecimiento utilizando como única fuente de carbono D maltosa. No se observó crecimiento en ninguna de las cepas cuando se utilizó como única fuente de carbono D-ramnosa y como única fuente de nitrógeno: L hidroxiprolina o DL 2 ácido aminobutírico. Todas las cepas tienen la capacidad de crecer a un pH comprendido entre 7 y 9 y a una temperatura entre 16ºC y 30ºC, mientras que a 4ºC y 45ºC no se observa crecimiento en ninguno de los casos. Todas las especies de *Streptomyces* analizadas presentan sensibilidad a novobiocina (15 µg/ml), tetraciclina, (15 µg/ml) y clortetraciclina (20 µg/ml) y resistencia a estreptomicina (100 µg/ml) y tacrolimus (100 µg/ml).

- **Hibridación ADN-ADN**

Este experimento se realizó únicamente entre *`S. tsukubaensis´* y *S. clavuligerus* especie con la que presenta la mayor identidad de secuencia del ARNr 16S. Los niveles de relación ADN-ADN de las especies en estudio se muestran como media de los análisis realizados por duplicado:

	S. clavuligerus
`S. tsukubaensis´	10,1 %

3.1.4. Conclusiones

Streptomyces sp. ATCC 55098 es una nueva especie del género *Streptomyces,* y así ha sido reconocida por *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Martínez-Castro *et al.*, 2010). A esta nueva especie se le ha otorgado el nombre de *Streptomyces tacrolimicus* debido a que esta descrito como productor de tacrolimus (Dumont *et al.*, 1992; Yoon y Choi, 1997) aunque presenta deficiencias para su producción, de ahí la descripción de dicha especie como mal productor (*low producer*) del inmunosupresor tacrolimus. La especie *S. tacrolimicus* se encuentra depositada en dos colecciones de cultivo tipo, en *American Type Culture Collection* con el número de referencia ATCC 55098^T y en la Colección de Cultivos Tipo Española con el número CECT 7664^T.

Por otra parte *`S. tsukubaensis´* es una nueva especie del género *Streptomyces* como así lo demuestran los resultados de las pruebas taxonómicas. La validación del nombre de esta especie se encuentra pendiente debido a restricciones de patentes.

Capítulo II

3.2. Construcción y organización de la librería génica de *S. tacrolimicus* y `*S. tsukubaensis*´ en SuperCos 1

3.2.1. Introducción

Una librería génica es una herramienta útil para el aislamiento de fragmentos de ADN y genes de interés, y en muchos casos, el primer paso para la secuenciación completa de un genoma. Además en la especie *S. coelicolor* se ha optimizado un procedimiento para la deleción de genes basado en el uso de cósmidos, REDIRECT© el cual también ha sido aplicado con éxito en otras especies del género *Streptomyces*. Estas consideraciones nos llevaron a la construcción de sendas librerías génicas en cósmidos de las especies *S. tacrolimicus* y `*S. tsukubaensis*´.

Los **cósmidos** son plásmidos que funcionan como vehículos de clonación con capacidad para aceptar grandes fragmentos de ADN. Básicamente, son plásmidos que contienen los **extremos cohesivos (*cos*)** del bacteriofago λ. La región *cos* es esencial para el empaquetamiento del ADN de λ en la cápsida. Así, siempre que las regiones *cos* disten de 37 a 50 kb (límites de la capacidad de empaquetamiento del fago λ), el ADN puede ser incorporado y propagado como partículas de ADN fágico (Hohn, 1975). La formación de moléculas de cósmidos recombinantes se realiza ligando fragmentos de ADN genómico, de aproximadamente 30-42 kb, con el vector en condiciones que favorezcan la formación de concatémeros constituidos por el vector/ADN genómico/vector. Después de la infección de *E. coli,* el ADN recombinante se circulariza replicando como un plásmido de gran tamaño. Dado el tamaño del ADN clonado, los cósmidos son vectores ideales para el estudio de **regiones genómicas extensas**. No obstante, presentan algunos inconvenientes, ya que ciertas secuencias son inestables y aparecen deleciones resultantes de procesos de recombinación independientes de *rec*A. Estos problemas se pueden resolver parcialmente mediante el uso de fósmidos, pero de éstos se desconoce su uso en REDIRECT©. La principal exigencia para la construcción de una genoteca representativa es la obtención de ADN total de alto peso molecular en gran concentración y elevado grado de pureza.

3.2.2. Construcción de la librería génica

La genoteca de ambas cepas de *Streptomyces* se construyó, según se describe en materiales y métodos (ver apartado 2.17), utilizando el cósmido SuperCos 1.

El **vector de clonación SuperCos 1** fue digerido con las enzimas *Xba*I y *Bam*HI. La digestión con estas dos enzimas genera dos fragmentos del cósmido (1,1 y 6,5 kb) con un sitio *cos* en cada uno.

La **extracción de ADN genómico** es un paso fundamental en este proceso ya que se ha de evitar la fragmentación de la molécula de ADN. El método *Salting out* (Kieser *et al.*, 2000) es sencillo y consta de pocos pasos, lo cual disminuye la manipulación del ADN, aunque con

el método de Kirby (Kieser *et al.*, 2000) se obtiene un ADN de mejor calidad, más puro (éste último método se ha optimizado tanto en tiempo como en facilidad gracias al uso de los tubos 15 ml *Phase Lock Gel Heavy*). Se probaron ambos métodos y con los dos se obtuvo ADN genómico adecuado para la construcción de la genoteca.

Tras la obtención del ADN genómico de calidad adecuada, se llevó a cabo una digestión parcial del mismo con la enzima *Sau*3AI, para obtener fragmentos de ADN de un tamaño adecuado para la construcción de la genoteca (30-42 kb). En primer lugar, se realizaron ensayos de **digestión a pequeña escala** (aproximadamente 10 µg de ADNt) con el objetivo de determinar las condiciones de digestión adecuadas. La digestión parcial del ADNt se puede conseguir optimizando el tiempo de digestión o la concentración de enzima.

Las pruebas para la optimización del **tiempo de digestión** se realizaron a 37ºC con una concentración de enzima de 0,01 U/µg de ADNt. Estos ensayos se llevaron a cabo en repetidas ocasiones variando el rango de tiempo (0-80 min) y los intervalos de digestión (cada 5 ó 10 min) sin obtenerse resultados reproducibles y además, en muchos de los casos, no se consiguió una digestión gradual según iba aumentando el tiempo de digestión. Debido a estos problemas de reproducibilidad se optó por la digestión con diferentes concentraciones de enzima.

Las **concentraciones de enzima** *Sau*3AI que se ensayaron, tanto para la solución de ADNt de *S. tacrolimicus* como de `*S. tsukubaensis*´, estaban comprendidas entre $1{,}56 \times 10^{-3}$ y 1 U/µg de ADNt para un tiempo de digestión de 30 minutos a 37ºC. La concentración óptima de *Sau*3AI para la digestión parcial resultó estar comprendida entre $3{,}12 \times 10^{-3}$ y $6{,}25 \times 10^{-3}$ U/µg de ADNt para ambas muestras de ADNt. En general, la concentración más adecuada depende de la muestra de ADNt por lo que es recomendable optimizar las condiciones de digestión para cada solución de ADNt.

El cambio de escala provoca que la digestión parcial con mayor cantidad de ADNt (aproximadamente100 µg) no se produzca exactamente en las mismas condiciones que a pequeña escala, por lo que es probable que la concentración de enzima más adecuada no sea exactamente la misma. Por lo cual, se realizó la digestión parcial a gran escala con las **concentraciones óptimas**: $3{,}12 \times 10^{-3}$ y $6{,}25 \times 10^{-3}$ U/µg de ADNt y una **concentración intermedia**: $4{,}7 \times 10^{-3}$ U/µg de ADNt

Tras la digestión a gran escala, se realizó una segunda selección de fragmentos mediante **ultracentrifugación en gradiente de sacarosa** (10 %-40 %) (Figura 3.7), según se especifica en materiales y métodos (apartado 2.17.2). Aunque este paso no es esencial, debido a que se ha realizado una selección de los fragmentos por digestión parcial, es muy recomendable su realización porque incrementa considerablemente la eficiencia del empaquetamiento, ya que se elimina una gran parte de los fragmentos que no presentan un tamaño adecuado (30-42 kb). Los fragmentos que no están comprendidos en este rango no

pueden ser empaquetados pero si pueden ser ligados al vector, por lo que reducen el número de moléculas de vector disponibles para la ligación con fragmentos de ADN de tamaño óptimo.

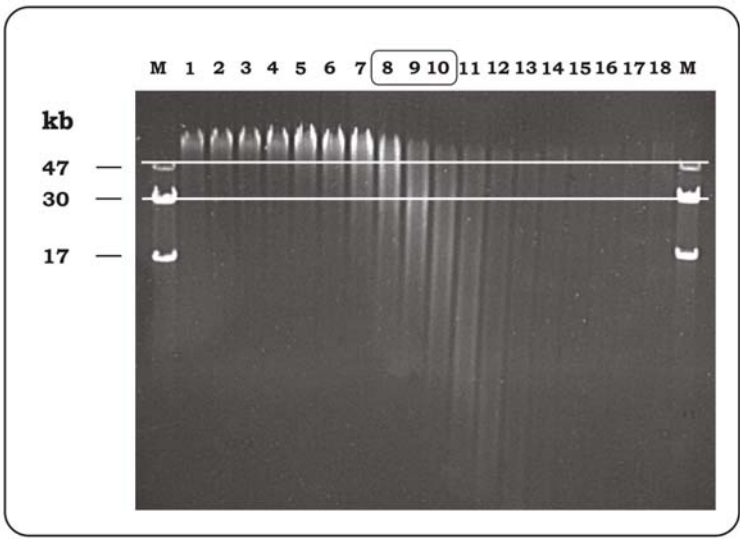


Figura 3.7: Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Electroforesis en gel de agarosa al 0,4 % de las diferentes fracciones de la digestión parcial del ADN total de *S. tacrolimicus* obtenidas mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. **M:** Marcador de peso molecular λ *Kpn*I; **1-18:** Fracciones de la digestión parcial. Las líneas rectas marcan el tamaño entre el cual tienen que estar comprendidos los fragmentos de ADN genómico. Las fracciones que se utilizaron para el empaquetamiento aparecen recuadradas.

El siguiente paso consistió en la **ligación** del ADNt/*Sau*3AI con el cósmido digerido *Bam*HI/*Xba*I. Tras la ligación, se obtiene una construcción lineal en la que los fragmentos de ADNt de *Streptomyces* se encuentran flanqueados por cada uno de los brazos del cósmido SuperCos 1, quedando los sitios *cos* en las zonas terminales de la construcción. a una distancia comprendida entre 38-50 kb.

Posteriormente, el producto de ligación fue **empaquetado** *in vitro* en fagos, por la adición de extractos crudos de células bacterianas que contienen todas las proteínas necesarias para ensamblar un fago completo (*Gigapack III XL Packaging extract,* Stratagene). El fago empaqueta el ADN digiriendo por los sitios *cos,* perdiéndose 1 kb del vector en este proceso. Estas partículas fágicas, que contienen los diferentes fragmentos del ADNt de *S. tacrolimicus* o `*S. tsukubaensis*´ clonados en SuperCos 1, son las encargadas de transferir dichas construcciones a las células de *E. coli* XL1 Blue hospedadoras, mediante infección de las mismas. Tras la infección, la construcción se recircularíza formando un plásmido de gran tamaño. En la siguiente figura (Figura 3.8) se muestra un esquema del proceso de construcción de la genoteca.

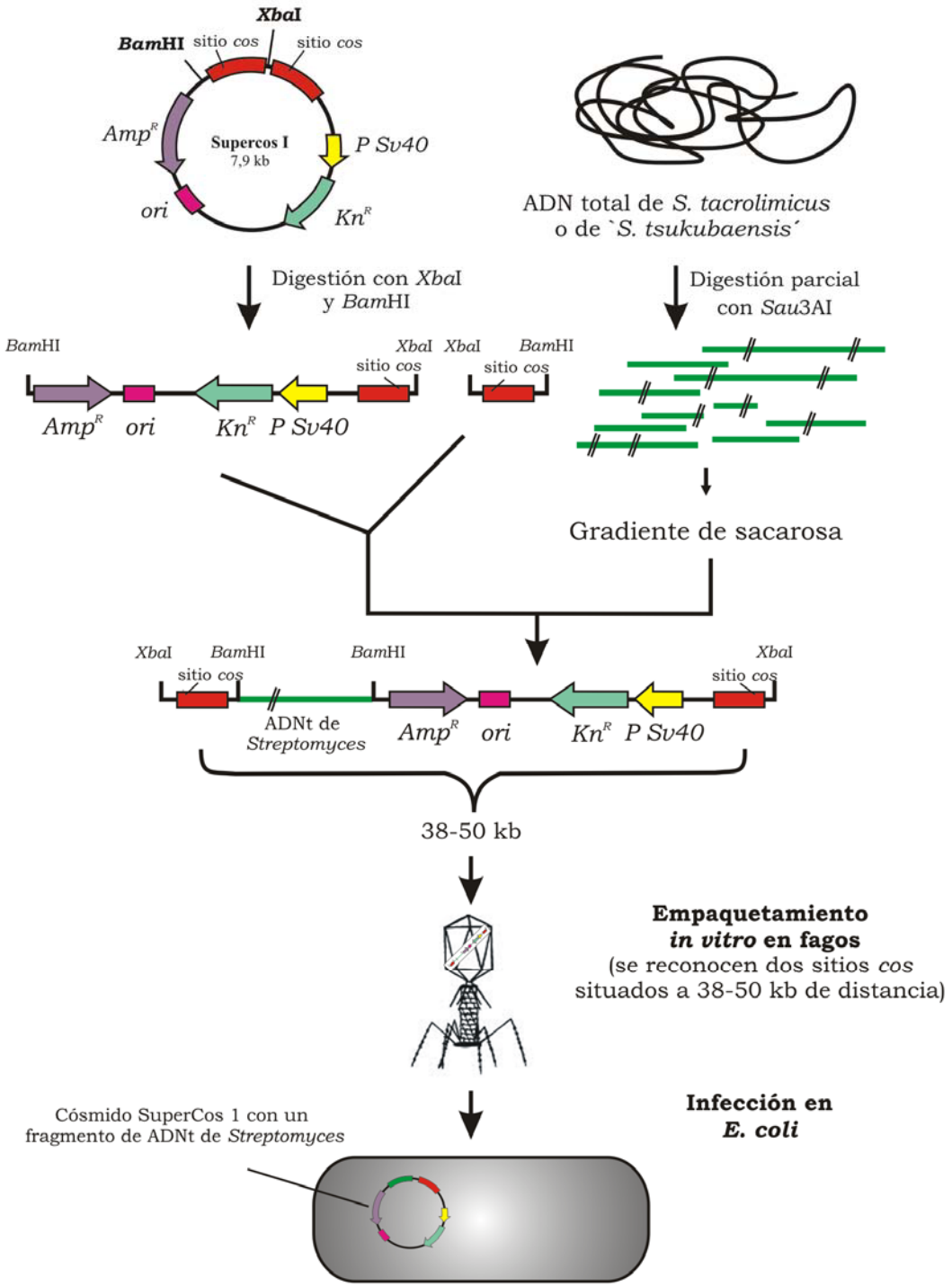


Figura 3.8: Construcción de librería génica en SuperCos 1. El vector SuperCos 1 se digiere con *Xba*I y *Bam*HI obteniéndose dos brazos con un sitio *cos* en cada uno. El ADN genómico de la correspondiente especie se digiere de forma parcial con *Sau*3AI, enzima compatible con *Bam*HI y posteriormente, se realiza una segunda selección de fragmentos mediante gradiente en sacarosa. La ligación de SuperCos 1 *Xba*I/*Bam*HI con ADNt/*Sau*3AI genera una construcción lineal con sitios *cos* en cada extremo, la cual es empaquetada en fagos. Mediante la infección de los fagos, los diferentes fragmentos de ADNt clonados en SuperCos 1 son transferidos a las células de *E. coli* XL1 Blue.

El producto de empaquetamiento se tituló en la construcción de ambas genotecas, con el objeto de comprobar que dicho producto era lo suficientemente rico en fagos como para obtener una genoteca representativa tanto del genoma total de *S. tacrolimicus* como de *`S. tsukubaensis´*. Esta titulación se realizó mediante una infección a pequeña escala (25 µl de diluciones 1:25 y 1:50 del producto de empaquetamiento) y recuento de diluciones seriadas de las colonias infectadas. En el caso de *S. tacrolimicus, e*l valor de la titulación obtenido fue de 1775 clones/µl de reacción de empaquetamiento, en un volumen final de 500 µl, lo que da un total de 887500 clones utilizando toda la mezcla de empaquetamiento. Mientras que en la titulación del empaquetamiento para la genoteca de *`S. tsukubaensis´* se obtuvo un valor de 630 clones/µl de reacción de empaquetamiento, dando un total de 315000 clones.

La representatividad de una librería génica viene dada por la ecuación de Clarke y Carbon (1976) que se presenta a continuación:

$$N = \frac{\ln (1 - P)}{\ln (1 - f)}$$

Donde **N** es el número de clones necesarios, ***P*** la probabilidad de que estén representadas todas las secuencias del genoma y ***f*** es el cociente entre el tamaño medio de los insertos de ADN clonados y el tamaño total del genoma.

Según los genomas de *Streptomyces* que se encontraban secuenciados en el momento de la construcción de las genotecas (*S. coelicolor, S. avermitilis* y *S. griseus* subsp. *griseus*), se estimó el tamaño del genoma de ambas especies de *Streptomyces* en aproximadamente 8700 kb. Siendo, el tamaño medio de los insertos que son incorporados en el cósmido SuperCos1 de 37,5 kb (Redenbach *et al.*, 1996); para que los genomas de *S. tacrolimicus* y *`S. tsukubaensis´* estén representados con un 99,9% de probabilidad se necesitan **1600** clones. Por lo tanto, la mezcla de empaquetamiento nos permite conseguir, en ambos casos, una genoteca representativa de cada uno de los genomas.

El último paso del proceso fue la amplificación de la genoteca, obteniéndose un título final de **12,1x10^{10} UFC/ml** para la genoteca de *S. tacrolimicus* y un valor de **2,3x10^{10} UFC/ml** para la genoteca de *`S. tsukubaensis´*.

3.2.3. Organización de la librería génica

Los métodos clásicos de rastreo de genotecas son, en su mayoría, muy laboriosos. El desarrollo de sistemas que faciliten el rastreo rápido y eficaz de la totalidad de una librería génica supone una importante ganancia de tiempo en el manejo de genomas completos. Por lo cual, una vez obtenida la genoteca de ambas especies de *Streptomyces* se procedió a la

organización de las mismas en placas de microtitulación de 96 pocillos mediante el siguiente procedimiento:

1. Se crecieron 1700 clones de manera individual en 1 ml de medio TB suplementado con ampicilina (100 μg/ml) en microtubos de 1,5 ml a 37ºC en agitación durante 20-24 horas.

2. Posteriormente, a cada tubo se le añadieron 350 μl de glicerol al 80 % (concentración final 20 %) y fue etiquetado con la posición en una de la placas de microtitulación (12 columnas numeradas: 1-12 y 8 filas designadas: A-H). Del cultivo de cada microtubo se colocaron 350 μl en la posición correspondiente de la placa, dejando las cuatro esquinas libres para controles. Así que, **1656** clones se colocaron de manera individual en 18 placas de microtitulación para tener representado completamente el genoma de *S. tacrolimicus* y de *`S. tsukubaensis´.*

3. Los clones pertenecientes a grupos de 6 placas, se mezclaron en una única placa, **Máster Parcial**, colocando en cada posición de esta placa 50 μl de los cultivos que ocupan la misma posición en las placas individuales. Finalmente, en cada posición se obtiene una mezcla de 6 clones en un volumen final de 300 μl.

4. Por último, las placas Máster Parcial se agruparon en una única placa **Máster Total**, con el objeto de tener la totalidad de los clones de la genoteca en una sola placa pero colocados en posiciones concretas de la misma (Figura 3.9). La placa Máster Total se obtuvo mezclando 100 μl de cada pocillo de las placas Máster Parcial, resultando en una mezcla de 18 clones por posición. Se realizaron replicas, tanto de las placas Máster Parcial como de la placa Máster Total, a modo de reserva.

5. En las cuatro esquinas de las placas Máster se colocaron diferentes controles:

A1 → ADNt de *S. tacrolimicus* o de *`S. tsukubaensis´* (50 ng/μl)

A12 → ADN del cósmido SuperCos 1 (5 ng/μl)

H1 → Cultivo en medio LB de *E. coli* XL1-Blue

H12 → Cultivo en medio LB de *E. coli* DH5α transformada con SuperCos 1

El resultado final de la organización comprende 1656 clones colocados de manera individual en 18 placas de microtitulación y en los correspondientes microtubos de 1,5 ml donde se realizó el cultivo (reserva de cada clon), 3 placas Martes Parcial con una mezcla de 6 clones por posición y 1 placa Máster Total con una mezcla de 18 clones por posición. Todo este material se conserva a -80ºC.

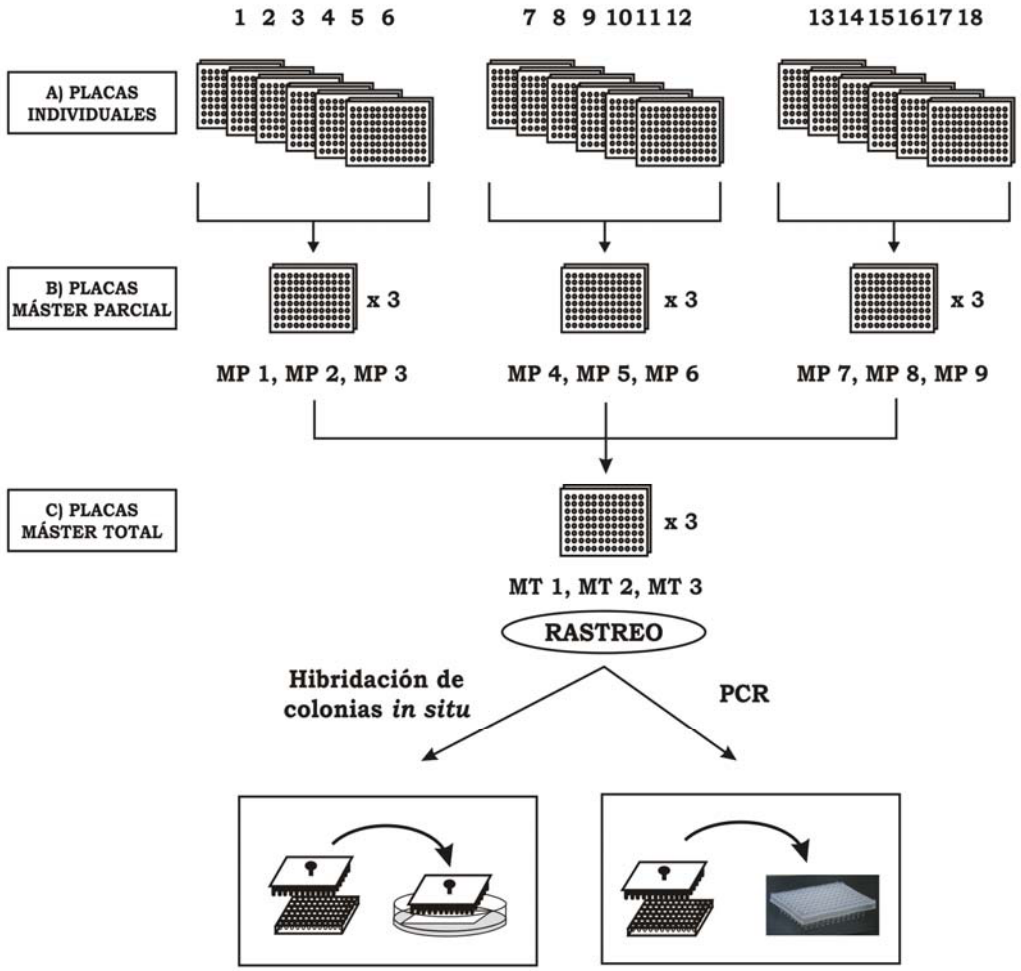


Figura 3.9: Esquema de organización piramidal de una librería génica en placas de microtitulación. A) Los 1656 clones necesarios se crecieron de manera individual y se colocaron en diferentes posiciones de las 18 placas de microtitulación. **B)** Los clones pertenecientes a grupos de 6 placas se mezclaron de manera ordenada (manteniendo cada clon la misma posición que tiene en las placas individuales) en una sola placa, Máster Parcial (MP). **C)** Las tres placas Máster Parcial se mezclaron en una sola placa, Máster Total (MT). En la parte inferior de la figura se indican las posibilidades de rastreo de la genoteca, bien por PCR o por hibridación de colonias *in situ*.

3.2.4. Rastreo de la librería génica

La organización de la genoteca en la disposición piramidal anteriormente descrita, facilita el rastreo de la misma que consta de **dos partes**. En primer lugar, se lleva a cabo la búsqueda en la placa Máster Total, la cual contiene una mezcla de 18 clones en cada posición. La segunda parte del rastreo consiste en determinar el clon positivo de entre esos 18.

Además la disposición en placas de microtitulación permite un **rastreo** bien por **PCR** o bien por **hibridación de colonias *in situ***, aunando las ventajas de ambas técnicas. Con el objeto de analizar la idoneidad de cada técnica de rastreo y la validez de la organización para

la búsqueda de secuencias determinadas, se llevó a cabo un estudio con la genoteca de *S. tacrolimicus* que fue la primera en contruirse (Martínez-Castro *et al.*, 2009).

Rastreo de la placa Máster Total

El rastreo por **PCR** permite realizar el rastreo completo de la placa Máster Total en muy poco tiempo (horas). Para la realización de este rastreo se coloca en una placa de 96 pocillos la mezcla de PCR sin ADN molde y se transfiere una pequeña parte de los cultivos de la placa Máster Total mediante un replicador de 96 puntas (gotas de las soluciones de los cultivos se quedan adheridas a las puntas por tensión superficial). El programa de PCR consta de los pasos de una típica reacción de PCR (ver apartado 2.13) pero con un tiempo más largo de desnaturalización inicial (10 minutos) con el objetivo de asegurar la rotura de las células de *E. coli* hospedadoras de la genoteca. El resultado de las 96 reacciones de PCR se analiza mediante electroforesis en agarosa.

La principal ventaja del rastreo mediante PCR es la **rapidez** de la técnica, pero presenta una serie de desventajas dependiendo del tipo de gen objeto de búsqueda. En este trabajo se llevó a cabo la búsqueda del gen *phoR* que codifica la quinasa sensora de un sistema de dos componentes implicado en la respuesta a la escasez de fosfato.

La disposición de la secuencia de *phoR* de *S. tacrolimicus* permitió el diseño de una pareja de cebadores específicos para esta especie de *Streptomyces* (phoRM1 y phoRM2). Para la obtención de la secuencia se amplificó por PCR un fragmento interno de 1050 pb de *phoR* de *S. tacrolimicus* utilizando cebadores específicos para la secuencia de *phoR* de *S. coelicolor* (phoR-1 y phoR-2, diseñados por A. Sola-Landa). Dicho fragmento se clonó en el vector pGEM-Teasy (pGEMT-phoR) y se secuenció utilizando los cebadores universales SP6 y T7 y los propios cebadores utilizados para la amplificación.

Previo a la realización del rastreo, se comprobó la especificidad de los cebadores phoRM1 y phoRM2 con los que se obtuvó una sola banda del tamaño esperado (635 pb) para *S. tacrolimicus* mientras que utilizando ADNt de *E. coli* como molde el resultado era negativo.

Con el objeto de analizar la reproducibilidad de la técnica, el rastreo de la placa Máster Total se repitió varias veces obteniéndose resultados positivos en todos los casos, aunque no siempre se obtenía el mismo número de posiciones positivas, es decir en un experimento de rastreo de toda la placa se obtuvieron cuatro posiciones positivas mientras que en otro sólo dos. Esto es debido a que los restos celulares presentes en cada pocillo interfieren en la eficiencia de la reacción de PCR. Se ha comprobado que, en general, los diferentes genes de un genoma de *Streptomyces* se encuentran contenidos en varios clones de la genoteca; por lo que a pesar de que sensibilidad de la PCR para el rastreo no es la óptima permite encontrar siempre alguno de los clones positivos. Finalmente, mediante el rastreo por PCR se detectaron cinco posiciones positivas (Figura 3.10).

La situación es diferente si el rastreo se centra en un gen del que no se conoce su secuencia y que presenta baja conservación entre diferentes especies. Siendo en este caso, necesario el uso de cebadores degenerados con los que no se obtiene una señal específica, por lo que se obtendrán numerosos falsos positivos mediante el rastreo por PCR. Esto se puede evitar realizando el rastreo mediante **hibridación de colonias *in situ*** (ver apartado 2.12)**.** Esta técnica es más laboriosa y requiere de más tiempo que el rastreo por PCR pero presenta una mayor **sensibilidad y reproducibilidad**, permitiendo localizar los genes de interés cuando no es recomendable la detección mediante PCR.

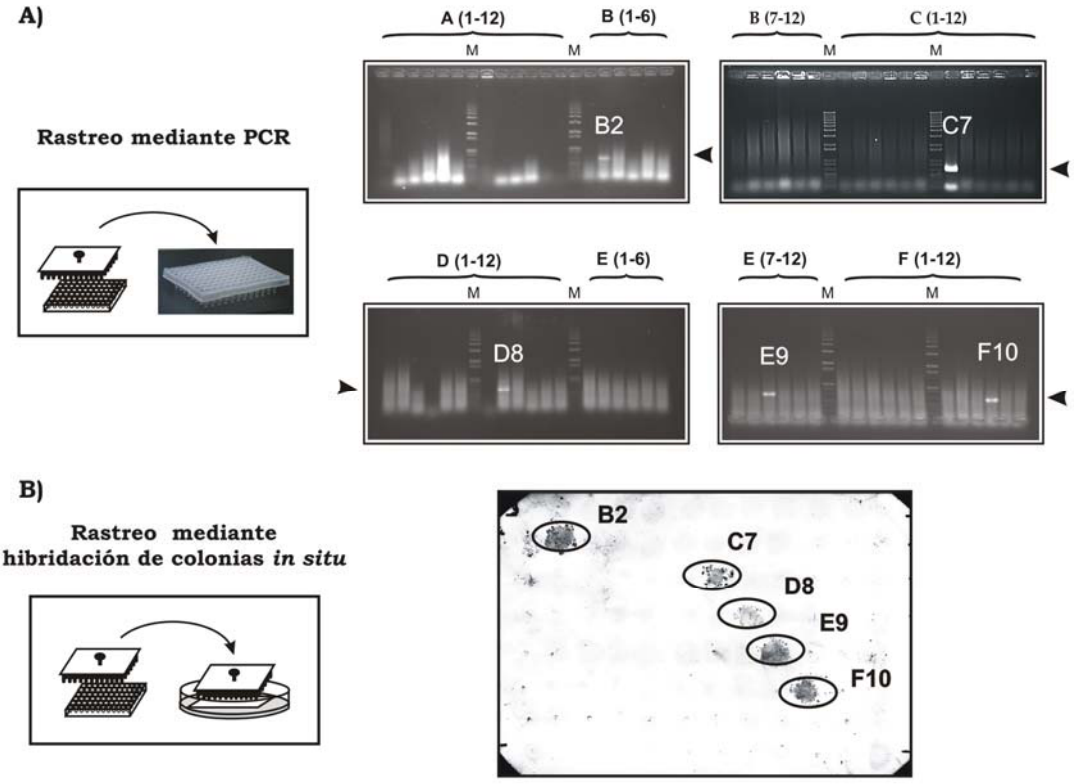


Figura 3.10: Resultados del rastreo de *phoR* en la librería génica de *S. tacrolimicus*. A) Rastreo por PCR de la placa Máster Total. Las bandas amplificadas presentan el tamaño esperado de 635 pb. M: marcador de peso molecular *1kb Plus DNA ladder*. Cada posición positiva aparece marcada mediante cabezas de flechas y con la localización en la placa de microtitulación. **B)** Rastreo de la placa Máster Total mediante hibridación de colonias *in situ*. Las posiciones positivas aparecen resaltadas con un círculo y marcadas con la localización en la placa de microtitulación.

La sonda de hibridación (fragmento interno a *phoR* de *S. tacrolimicus*, sonda phoR: 1050 pb) utilizada en el rastreo mediante hibridación de colonias *in situ* se obtuvo por digestión con *Eco*RI de la construcción pGEMT-phoR y posterior purificación y marcaje con digoxigenina. Mediante el rastreo de la placa Máster Total por esta técnica se detectaron las mismas posiciones positivas que en el rastreo por PCR (Figura 3.10).

Con el objeto de agilizar el rastreo mediante hibridación de colonias *in situ* y evitar la congelación y descongelación de las placas Máster en repetidas ocasiones, proceso que

acelera la muerte celular, se prepararon varias **membranas de la placa Máster Total** listas para hibridar. Estas membranas contienen inmovilizado el ADN correspondiente a cada posición de la placa Máster Total (ver apartado 2.12.1) y se pueden conservar a 4ºC durante largos periodos de tiempo (**años**).

Como conclusión, siempre que se puedan diseñar unos cebadores específicos, que den una señal clara para el gen objeto de búsqueda, se puede realizar el rastreo de la placa Máster Total de forma rápida por PCR. Si no es posible el rastreo por PCR la hibridación de colonias *in situ*, aunque más laboriosa, ofrece una excelente sensibilidad y reproducibilidad.

- **Detección del clon positivo**

Una vez detectadas las posiciones positivas de la placa Máster Total, con 18 clones cada una; el segundo paso del rastreo consiste en la detección del cósmido positivo.

Los clones se mantienen almacenados de manera individual en microtubos de 1,5 ml a -80ºC. Se refrescaron mediante siembra en placas de medio LA suplementado con ampicilina (100 µg/ml) los 18 clones correspondientes a cada posición positiva detectada en la primera parte del rastreo. Los clones positivos se detectaron mediante PCR de colonias (extracción del ADN mediante hervido de las colonias) utilizando los cebadores PhoRM1 y PhoRM2. Así, finalmente se localizaron los cósmidos que habían acomodado una región del genoma de *S. tacrolimicus* donde se localiza el gen *phoR*.

3.2.5. Conclusión

La genoteca de *S. tacrolimicus* ATCC 55098 organizada en disposición piramidal en placas de microtitulación ha sido utilizada para la localización, tanto por PCR como mediante hibridación de colonias *in situ*, de genes conservados y no conservados, con sondas homólogas o heterólogas (comunicación personal Z. Salehi y E. Solera); lo que valida la utilidad de la organización para un rastreo rápido y eficiente. La posibilidad de rastreo mediante dos técnicas diferentes ofrece las ventajas de ambas: la rapidez de la PCR y la sensibilidad de la hibridación de colonias *in situ.* Resultando, en un rastreo positivo independientemente de las condiciones de cada secuencia objeto de búsqueda.

La genoteca de `*S. tsukubaensis*´ fue organizada de la misma manera y, al igual que en el caso anterior, se han realizado numerosos rastreos con éxito (comunicación personal Z. Salehi, E. Solera, C. Cañibano y M. Ordoñez). Además, esta librería génica también ha sido utilizada para la secuenciación del genoma de esta especie (comunicación personal C. Barreiro y J.F. Martín); así algunos de los cósmidos de la misma han sido utilizados para la confirmación del ensamblado final de las secuencias que conforman el genoma.

Como se ha demostrado, las librerías génicas siguen siendo de gran utilidad en los estudios de Biología Molecular de una especie microbiana por lo que constituyeron el primer paso de los trabajos realizados con las especies *S. tacrolimicus* y `*S. tsukubaensis*´.

Capítulo III

3.3. Control por fosfato en la biosíntesis de tacrolimus por la especie S. tacrolimicus ATCC 55098

3.3.1. Introducción

El fosfato, uno de los elementos nutricionales esenciales para los microorganismos, ejerce un control negativo sobre la producción de metabolitos secundarios. La respuesta a la escasez de fosfato está controlada por el sistema de dos componentes PhoR-P; el cual ha sido caracterizado por primera vez en una especie del género *Streptomyces* en el 2003 (Sola-Landa *et al.*, 2003).

La deleción del regulador de respuesta PhoP produce efectos contrarios sobre la producción de metabolitos secundarios dependiendo de la especie del género *Streptomyces* de la que se trate; así en *`S. lividans´* y en *S. natalensis* se ha comprobado que los mutantes delecionados producen en mayor cantidad actinorrodina y prodigiosina o pimaricina, respectivamente, en medios complejos ricos en fosfato (Sola-Landa *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2007); mientras que en el caso de *S. coelicolor* se ha observado una disminución en la producción de metabolitos secundarios en condiciones limitantes de fosfato (Santos-Beneit *et al.*, 2009a).

Además de su acción sobre el metabolismo secundario, la concentración de fosfato en el medio tiene efectos sobre el crecimiento y la diferenciación morfológica (Chater y Bibb, 1997). En la actualidad se conocen muchos de los genes controlados por PhoP, la mayoría implicados en la obtención de fosfato de una manera más eficiente o de fuentes alternativas y se ha descrito una disminución en el crecimiento en cepas delecionadas en PhoP en medio con bajo contenido en fosfato (Sola-Landa *et al.*, 2003; Santos-Beneit *et al.*, 2008) pero poco se conoce de la relación entre el sistema PhoR-P y la diferenciación morfológica en el género *Streptomyces*.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta parte del trabajo nos planteamos la caracterización y análisis funcional del sistema de dos componentes PhoR-P en *S. tacrolimicus,* así como el estudio del efecto del fosfato sobre la producción de tacrolimus y la diferenciación morfológica en esta especie.

3.3.2. El sistema de dos componentes PhoR-P de *S. tacrolimicus*

El primer paso para poder llevar a cabo el estudio del sistema de dos componentes PhoR-P en *S. tacrolimicus* es la secuenciación y análisis de la región genómica que contiene dichos genes.

Localización de los cósmidos de la librería génica de *S. tacrolimicus* que contienen los genes *phoRP*

La localización de los cósmidos que acomodan los genes *phoRP* se realizó mediante dos técnicas de rastreo diferentes, hibridación de colonias *in situ* y PCR (ver apartado 3.2.4).

Tanto en el rastreo por hibridación como por PCR, se llevó a cabo la búsqueda del gen *phoR*. Previamente se había comprobado mediante hibridación tipo Southern (resultados no mostrados) que *phoR* y *phoP* se localizan próximos en el genoma, al igual que ocurre en el resto de especies de *Streptomyces* en las que se ha analizado este sistema de dos componentes.

El rastreo de la genoteca permitió la localización de cinco cósmidos positivos para *phoR*, los cuales fueron confirmados por hibridación tipo Southern (Figura 3.11). Para ello, el ADNt de *S. tacrolimicus* (como control positivo) y el ADN cosmídico se digirió con la enzima *Bam*HI. La hibridación se realizó con la sonda phoR (1050 pb), utilizada anteriormente en el rastreo de la genoteca, obteniéndose bandas positivas para todos los cósmidos seleccionados. Se eligieron los cósmidos 7E9 y 10D8 para la posterior subclonación y secuenciación debido a que la banda de hibridación positiva presentaba el mismo tamaño que la banda detectada para el ADN total de *S. tacrolimicus*. El hecho de que el resto de cósmidos presentase una banda de hibridación positiva de diferente tamaño puede ser debido a una reorganización del fragmento de ADNt introducido en el cósmido o que el cósmido hubiese incorporado sólo una parte del fragmento de ADNt (debido a la generación de la genoteca con cortes *Sau*3AI) correspondiente a la digestión *Bam*HI utilizada para la realización del Southern.

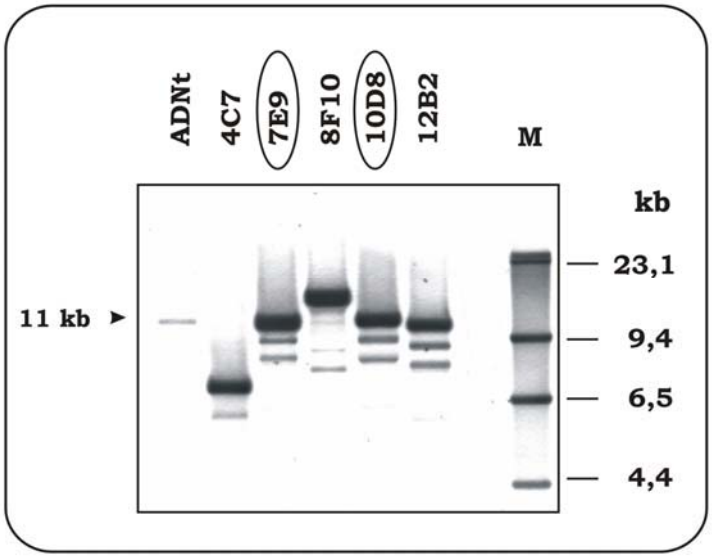


Figura 3.11. Hibridación tipo Southern de los cósmidos positivos para el gen *phoR*. En la parte superior se indican las muestras correspondientes a cada carril. Marcados con un ovalo se resaltan los cósmidos cuya banda de hibridación positiva es del mismo tamaño que la banda obtenida para el ADN total de *S. tacrolimicus*. A la izquierda se indica el tamaño de la banda de hibridación positiva correspondiente al ADNt. A la derecha de la figura se incluyen los tamaños de las bandas del marcador de tamaño molecular (M) *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled*.

Secuenciación de la región genómica de *S. tacrolimicus* que contiene los genes *phoRP*

El proceso de secuenciación no pudo realizarse usando las construcciones en cósmidos como ADN molde; por lo que fue necesaria una posterior subclonación de un fragmento con los genes *phoRP* y así obtener una construcción de menor tamaño. Los cósmidos 7E9 y 10D8 se digirieron con diferentes combinaciones de enzimas de restricción y se analizaron por hibridación tipo Southern con las sondas phoR y phoP, con el objetivo de seleccionar un fragmento, que contuviese ambos genes, adecuado para la posterior subclonación en el vector pBluescript SK$^+$ y su secuenciación (Figura 3.12). La sonda phoP se obtuvo de manera similar a la sonda phoR; en primer lugar se amplificó un fragmento interno a *phoP* de 680 pb utilizando los cebadores, diseñados sobre la secuencia de *phoP* de *S. coelicolor*, PhoP-3 y PhoP-2 (diseñados por A. Sola-Landa). Dicho fragmento se clonó en el vector pGEM-Teasy obteniéndose la construcción pGEM-phoP; la cual fue digerida con *Eco*RI para la purificación de la banda de 680 pb que posteriormente fue marcada con digoxigenina (Sonda phoP: 680 pb).

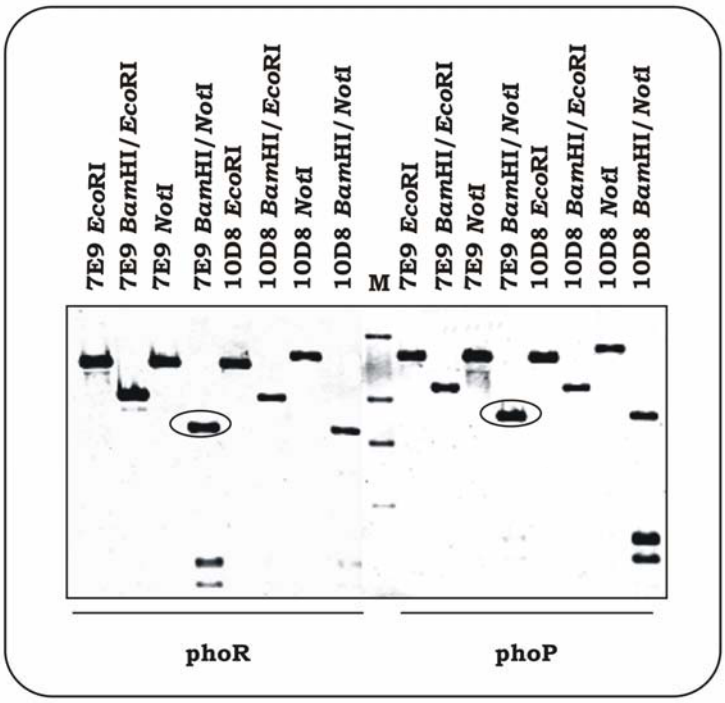


Figura 3.12: Selección de los fragmentos para subclonar y secuenciar la región *phoRP* de *S. tacrolimicus*. Hibridación de tipo Southern de los cósmidos 7E9 y 10D8 digeridos con diferentes combinaciones de enzimas de restricción (detalladas en la parte superior de cada carril). Se realizaron dos hibridaciones en paralelo utilizando las sondas phoR (parte izquierda) y phoP (parte derecha). Marcado con un ovalo se destaca el fragmento de 8,5 kb seleccionado para la posterior subclonación en el vector pBluescript SK+. (M) marcador de tamaño molecular *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled*.

Mediante la digestión *Bam*HI/*Not*I de cualquiera de los dos cósmidos se obtuvo un fragmento positivo tanto para *phoR* como para *phoP* de un tamaño de 8,5 kb (tamaño no excesivo para la clonación pero suficientemente grande para contener toda la zona de interés) (Figura 3.12). El cósmido 7E9 fue digerido con *Bam*HI/*Not*I, la correspondiente banda de 8,5 kb fue extraída de gel mediante el procedimiento "*freeze-squeze*" (ver materiales y métodos 2.8.1) y clonada en el plásmido comercial pBluescript SK$^+$.

La secuenciación de los fragmentos clonados se realizó mediante el procedimiento de "*chromosome walking*" que consiste en el diseño de cebadores a medida que se va determinando la secuencia problema.

Tras un primer análisis de la secuencia se localizó el sitio de corte de *Bam*HI a 117 pb del extremo 5´ de de *phoR* por lo que el gen *phoU* (posiblemente implicado en la respuesta a la escasez de fosfato) no estaba incluido en el fragmento subclonado (suponiendo que se mantiene la misma sintenia que en otras especies de *Streptomyces*). Por lo tanto, se realizó otro experimento de hibridación tipo Southern del cósmido 7E9 digerido con diferentes combinaciones de enzimas de restricción (Figura 3.13). Como sonda se utilizó un fragmento de 1200 pb de *S. coelicolor* en el que se localiza el gen *phoU*, obtenido mediante digestión *Xba*I/*Xho*I de la construcción pBS-phoU (Sonda phoU: 1200 pb; obtenida por A. Sola-Landa). Así, se seleccionó un fragmento de 4,5 kb resultado de la digestión *Eco*RV/*Eco*RI el cual también fue clonado en pBluescript SK$^+$ y secuenciado.

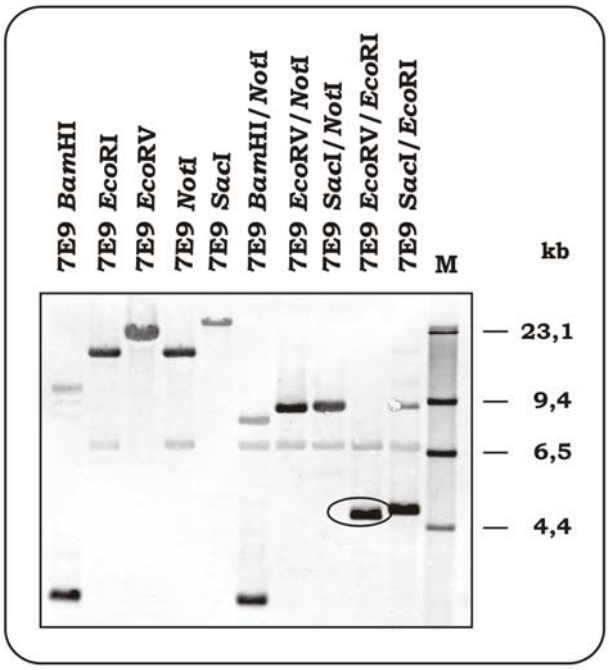


Figura 3.13: Selección de un fragmento del cósmido 7E9 en el que se localiza *phoU*. Hibridación tipo Southern del cósmido 7E9 digerido con diferentes combinaciones de enzimas de restricción (detalladas en la parte superior de cada carril). Marcado con un ovalo se destaca el fragmento de 4,5 kb seleccionado para la posterior subclonación en pBluescript SK+. A la derecha se detalla el peso molecular de las bandas del marcador comercial *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled*.

La secuenciación de los dos fragmentos (8,5 y 4,5 kb) de *S. tacrolimicus* clonados (Figura 3.14) se realizó mediante el uso de los cebadores universales SP6 y T7 y cebadores específicos para *S. tacrolimicus* que se fueron diseñando a medida que se conocía la secuencia: phoRP-D, PHO1, PHO2, R-Prom, phoP-M4, PHOPRev1, PHOPRev2, PHOEco1, PHORU2, PHOBSF, PHOBSR, PHOPD3, PHOBst1, PHOPD4, PHORU3, PHORU4, PHORU5, PHOEco2, PHOEco3, PHOEco4, PHOEco5, PHOBst2, PHOBSF2, PHOBSR2, PHOBSF3.

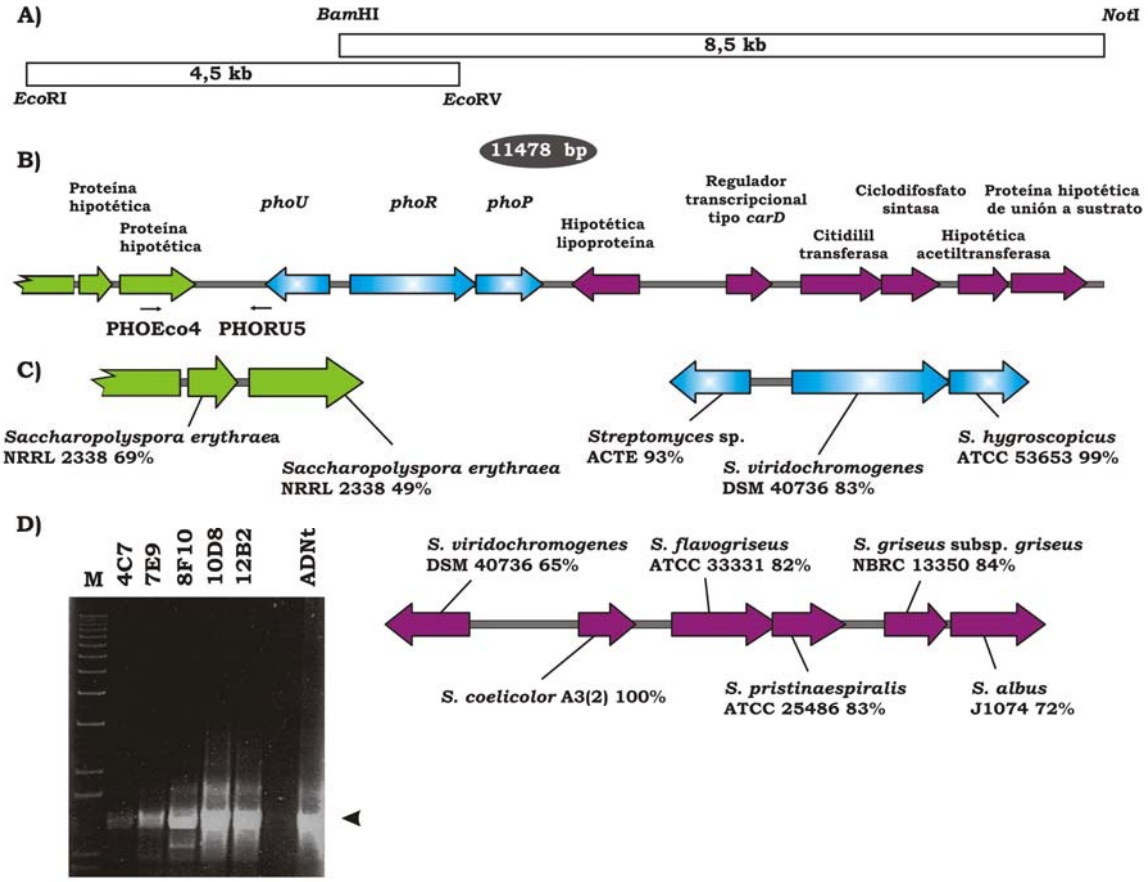


Figura 3.14: Región genómica de *S. tacrolimicus* en la que se localizan los genes *phoRP*. A) Esquema de los fragmentos clonados en el vector pBluescript SK⁺ para llevar a cabo la secuenciación. **B)** Organización génica de la región de 11478 pb secuenciada del genoma de *S. tacrolimicus*. En azul se recogen los genes *phoRP* y *phoU*, miembros del regulón *pho*; en verde los genes que se localizan corriente arriba y en morado los que se localizan corriente abajo. En la parte superior de cada gen se recoge el nombre del mismo o la función de la proteína que codifica. **C)** Proteínas ortólogas en otras especies con las que presentan una mayor identidad (en porcentaje) según el análisis mediante Blast (NCBI) de las proteínas codificadas por los genes presentados en el panel B). **D)** Resultado de la PCR realizada con los cebadores PHOEco4 y PHORU5 cuya localización se indica en el panel B). En la parte superior de cada carril se indica la correspondiente muestra que fue utilizada como molde de la PCR. M: Marcador comercial *1kb Plus DNA Ladder*.

Finalmente, se obtuvo la secuencia de una región de 11478 pb en la que se encuentran los genes del sistema de dos componentes *phoRP* de *S. tacrolimicus*. Estos genes se localizan en la misma orientación, solapando el codón de inicio de *phoP* con el codón de fin de *phoR,* tomando como referencia el inicio descrito en *phoP* de *`S. lividans´* (Ghorbel *et al.*, 2006a). Corriente arriba del gen *phoR* y en sentido contrario se localiza el gen *phoU*. Las proteínas codificadas por estos genes guardan una alta identidad con sus ortólogas en otras especies del mismo género (80-99 %) (Figura 3.14).

Así como, la región localizada corriente abajo de *phoP* mantiene una organización similar a la encontrada en otras especies de *Streptomyces*, no ocurre lo mismo en la región adyacente a *phoU*. En la cual, las proteínas que presentan una mayor identidad pertenecen a la especie *Saccharopolyspora erythraeae,* no estando conservada la sintenia entre diferentes especies de *Streptomyces* (Figura 3.14-C). Con el objetivo de comprobar que no se hubiese producido una reorganización génica afectando a esa parte del cósmido, se realizó una PCR utilizando los cebadores PHORU5 y PHOEco4 sobre ADNt de *S. tacrolimicus* y los cósmidos positivos para *phoRP.* Al obtenerse el mismo tamaño en los productos de PCR se puede descartar la reorganización génica dando por correcta la secuencia obtenida (Figura 3.14-D).

Análisis de la secuencia de PhoR y PhoP

Proteína PhoR

La proteína deducida de la secuencia del gen *phoR* de *S. tacrolimicus* se compone de 444 aminoácidos y presenta todas las características propias de las proteínas sensoras histidina quinasas de los sistemas de dos componentes (Stock *et al.*, 1990; Stewart, 2010). Este tipo de proteínas presentan una arquitectura modular con diferentes dominios: i) en la zona amino terminal se localizan **hélices transmembrana** que sirven de anclaje a la membrana citoplásmatica, ii) en la zona central un **domino fosfoaceptor** y iii) en la zona carboxilo terminal un **dominio de unión a ATP** (Figura 3.15). Ante una determinada señal se produce la transferencia de un grupo fosfato desde la molécula de ATP a un residuo de histidina. La autofosforilación se lleva a cabo en forma de dímero, así uno de los monómero recibe al grupo fosfato que se encontraba unido a la zona carboxilo terminal del otro monómero.

La proteína PhoR de *S. tacrolimicus* contiene secuencias con un alto grado de conservación, especialmente en la zona central y en la zona carboxilo terminal (Figura 3.15), como son la **caja H** (fenilalanina 159 hasta leucina 176, caja en la que se incluye el posible sitio de fosforilación histidina 165), la **caja N** (asparagina 267 hasta tirosina 285), la **caja D/F** (isoleucina 315 hasta aspártico 342) y la **caja G** (glicina 351 hasta valina 370). Las tres últimas se organizan en la estructura terciaria de la proteína de tal manera que forman la superficie de unión a ATP.

Proteína PhoP

La proteína deducida de la secuencia del gen *phoP* de *S. tacrolimicus* se compone de 227 aminoácidos y pertenece a la familia de reguladores de respuesta OmpR/PhoB. Este tipo de proteínas se componen de un dominio receptor y un dominio efector con actividad de unión a ADN. El **dominio receptor** se encuentra en la región amino terminal (aminoácidos 1-113), el cual recibe la señal procedente de la proteína quinasa sensora mediante la fosforilación en el residuo aspártico 49. En la región carboxilo terminal se localiza el **dominio de unión a ADN**

(leucina 190 hasta isoleucina 201) del tipo hélice-vuelta-hélice alado que caracteriza a la familia OmpR de reguladores de respuesta (Figura 3.15).

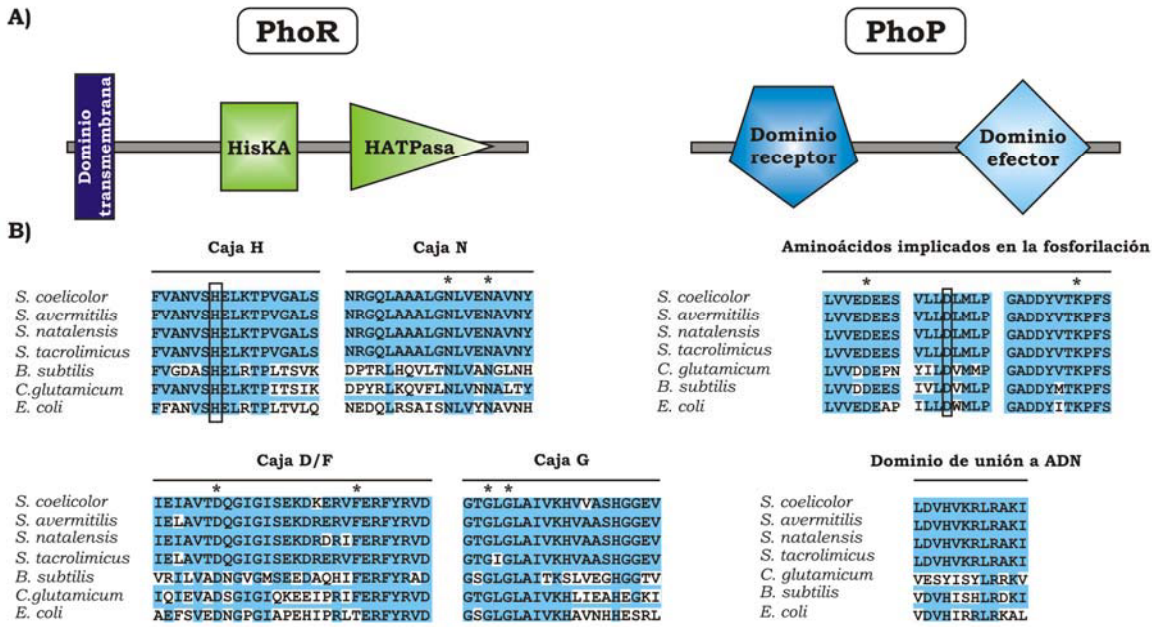


Figura 3.15: Dominios de las proteínas del sistema de dos componentes PhoR-P de *S. tacrolimicus*. A) Predicción de los dominios de PhoR (izquierda) y PhoP (derecha) de *S. tacrolimicus* mediante el servidor Smart. PhoR presenta un dominio transmembrana, un dominio de dimerización y fosfoaceptor (HisKA) y dominio de unión a ATP (HATPasa), mientras que PhoP se divide en un dominio receptor y un dominio efector. **B)** Dominios conservados de la secuencia aminoacídica de PhoR y PhoP comparados con diferentes microorganismos. En una caja se resaltan los residuos en los que se produce la fosforilación y con un asterisco los aminoácidos que presentan un alto grado de conservación y dan nombre a las cajas en el caso de PhoR o residuos importantes para la fosforilación en el caso de PhoP.

3.3.3. Estudio funcional del sistema PhoR-P de *S. tacrolimicus*

Deleción de *phoRP* y *phoP* mediante REDIRECT©

La inactivación del sistema de dos componentes *phoR-P* de *S. tacrolimicus* se llevó a cabo mediante la tecnología REDIRECT© (ver apartado 2.18); la cual fue desarrollada y optimizada para la especie *S. coelicolor* por Gust y colaboradores (2003). Dicha técnica se ha aplicado y adaptado para la deleción integra de las secuencias codificantes de *phoP* y *phoRP* en *S. tacrolimicus*.

Cada deleción realizada mediante REDIRECT© precisa del diseño de una pareja de cebadores específicos (ver apartado 2.18.2) para la obtención de un casete de resistencia [Apr^R-*oriT*] flanqueado por secuencias homólogas a las secuencias flanqueantes de la secuencia que se va a delecionar. Para la obtención del mutante Δ*phoP* se diseñaron los

cebadores RDPF y RDPR y para el mutante Δ*phoRP* la pareja RDRF y RDPR. Estas parejas de cebadores se utilizaron en sendas reacciones de PCR con una polimerasa de alta fidelidad de copia Platinum® Pfx sobre una banda *Hin*dIII/*Eco*RI del plásmido pIJ774 de 1370 pb como ADN molde. Se comprobó mediante electroforesis en agarosa que no se habían generado bandas inespecíficas por lo que ambos productos de PCR de 1440 pb (RD-P para la deleción de *phoP* y RD-RP para la deleción de *phoRP*) fueron purificados directamente desde la solución con el kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit.*

Posteriormente, los productos de PCR, RD-P y RD-RP se utilizaron para la sustitución de los genes de interés localizados en un cósmido. Este proceso que se da por recombinación doble entre el cósmido y el producto de PCR se produce en la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790, la cual previamente había sido transformada, mediante choque térmico, con el cósmido 7E9 (utilizado en la secuenciación de la región génica *phoRP*) de la librería génica de *S. tacrolimicus*. Es importante analizar mediante electroforesis en agarosa que las colonias obtenidas han incorporado correctamente el cósmido (si el cósmido contiene zonas homólogas es posible que se produzcan eventos de recombinación en el mismo) y la presencia del plásmido pIJ790 (esencial para el proceso de recombinación).

Las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790/7E9 fueron electroporadas con 125 y 250 ng de los productos de PCR, RD-P o RD-RP, con los parámetros descritos en materiales y métodos (ver apartado 2.18.5). Las colonias en las que se produjo la sustitución del gen de interés (*phoP* o *phoRP*) por el casete de resistencia se seleccionaron por resistencia a apramicina. Las construcciones obtenidas se analizaron mediante PCR utilizando dos cebadores externos a los genes a delecionar (phoRM3/PHORev2 para *phoP* y R-Prom/PHORev2 para *phoRP*) y otra pareja formada por un cebador interno al gen de resistencia a la apramicina y otro externo a los genes a delecionar (ApraA2/PHORev2 tanto para *phoP* como para *phoRP*). Así, si se ha producido la sustitución de forma correcta, la PCR con cebadores externos debe resultar en una banda de diferente tamaño en los cósmidos recombinantes (Δ*phoP* y Δ*phoRP*) respecto al cósmido silvestre y usando la segunda combinación de cebadores sólo se debe obtener banda en los cósmidos recombinantes. Como se puede ver en la figura 3.16, las construcciones analizadas presentaron el patrón esperado.

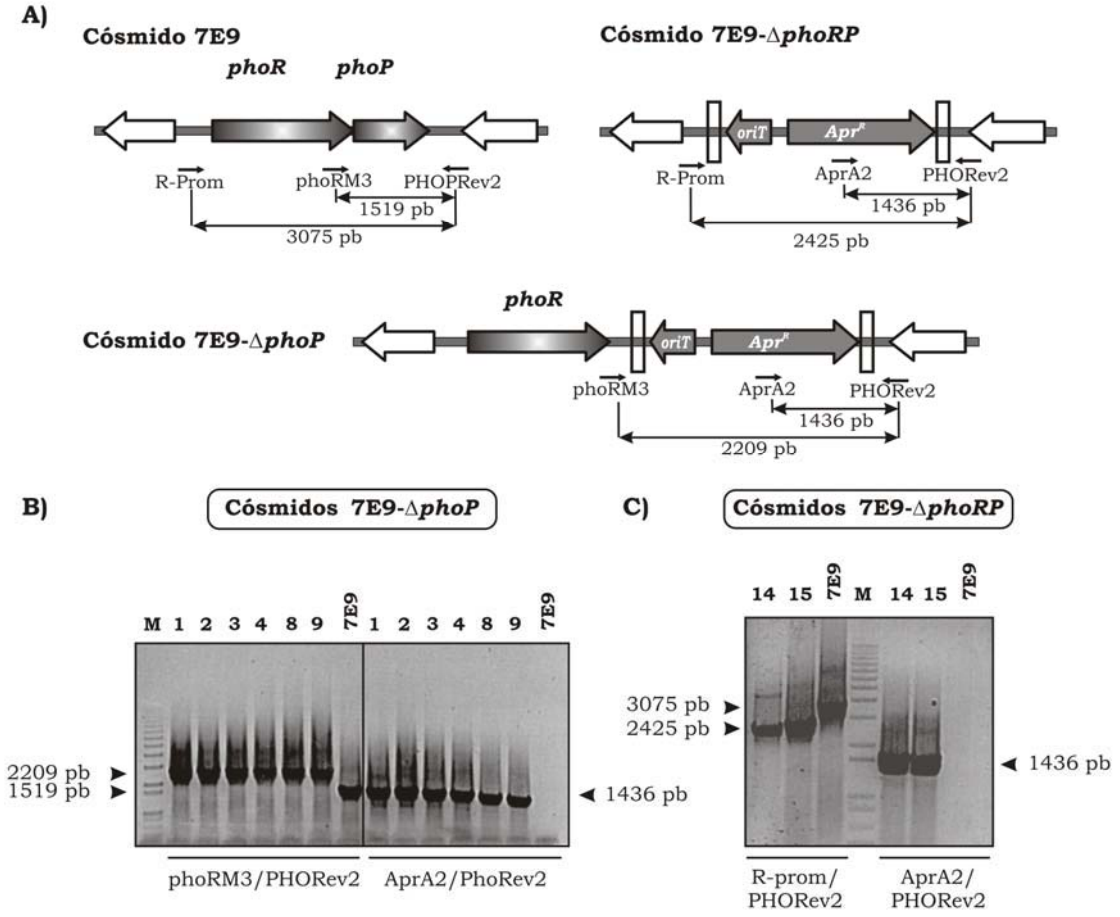


Figura 3.16: Comprobación mediante PCR de la sustitución en el cósmido 7E9 de los genes de interés por el casete de resistencia a apramicina. **A)** Cebadores utilizados en la PCR y su localización en el cósmido 7E9 y en los cósmidos recombinantes. Mediante flechas de una punta se indica la localización del cebador y mediante flechas de dos puntas el tamaño del producto de PCR. **B)** y **C)** Resultado del análisis mediante PCR de los cósmidos en los que se ha producido la sustitución de *phoP* y *phoRP*, respectivamente. En la parte superior se cada panel se indica la construcción utilizada: con números se indican los cósmidos recombinantes. Como control se utilizó el cósmido original 7E9. En la parte inferior se indica la pareja de cebadores utilizada y a los lados se especifican los tamaños de los productos de PCR. M: Marcador comercial *1kb Plus DNA Ladder*.

Los cósmidos recombinantes son transferidos a las células de *Streptomyces* mediante conjugación. Dicho proceso de conjugación entre las células *E. coli* ET12567/pUZ8002/7E9-Δ*phoP* o *E. coli* ET12567/pUZ8002/7E9-Δ*phoRP* y *S. tacrolimicus* se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.15.2 de materiales y métodos con algunas modificaciones respecto al protocolo optimizado para *S. coelicolor*. La mezcla de conjugación se compuso de $1x10^8$ esporas resuspendidas en 0,5 ml de 2xTY y sometidas a un choque térmico a 50ºC durante 10 minutos con 0,5 ml de una suspensión de las correspondientes células de *E. coli*. La solución de células de *E. coli* procedía de la concentración de 25 ml de cultivo de DO_{600} próxima a 0,4 en 1 ml final. Dicha mezcla se sembró en MS suplementado con 10 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y 10 mM de K_2HPO_4/KH_2PO_4. El

fosfato se añade debido a que la deleción tanto de *phoP* como de *phoRP* puede causar problemas en el transporte de fosfato al interior celular y por tanto interferir en el crecimiento de los exconjugantes. Tras 16-20 horas de incubación a 28ºC se añadió una cobertera con ácido nalidíxico y apramicina, para impedir el crecimiento de *E. coli* y para la selección de las células de *Streptomyces* recombinantes, respectivamente.

Los exconjugantes obtenidos se analizaron por resistencia a antibióticos. Así, los clones que crecieron en apramicina (Apr^R) pero no lo hicieron en kanamicina+apramicina (Kn^S) indicaron una doble recombinación y por tanto la sustitución de los genes de interés por el casete de resistencia en el genoma de *S. tacrolimicus*. Mientras que, el crecimiento en presencia de ambos antibióticos, indicó la integración del cósmido 7E9 recombinante en el cromosoma de *S. tacrolimicus* mediante una recombinación simple, siendo el ADN perteneciente al SuperCos 1 el que aporta la resistencia a kanamicina (Figura 3.17).

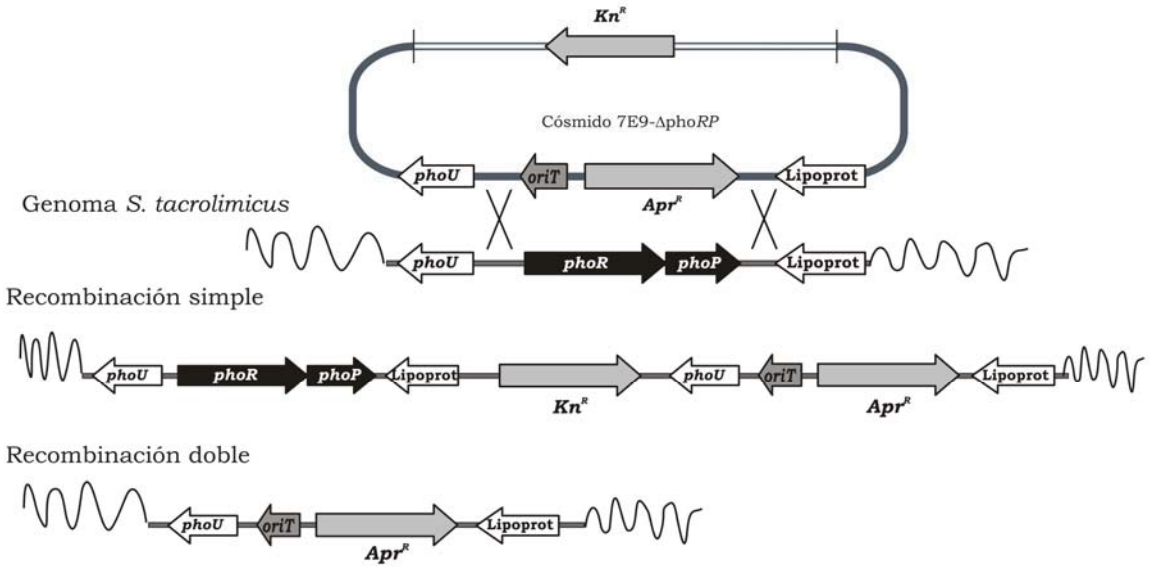


Figura 3.17: Procesos de recombinación en la formación del mutante Δ*phoRP*. A modo de ejemplo se presenta un esquema de los tipos de procesos de recombinación que se pueden producir entre el cósmido 7E9-Δ*phoRP* y el genoma de *S. tacrolimicus*. Las aspas indican cada evento de recombinación. Se señalan en gris los genes de resistencia a antibióticos que van a permitir la selección de los exconjugantes. Apr^R: gen de resistencia a apramicina y Kn^R: gen de resistencia a kanamicina.

De esta forma, se obtuvieron 13 exconjugantes para la deleción de *phoP*, de los cuales 5 eran dobles recombinantes (T2, T3, T9, T10 y T11) y 8 exconjugantes para la deleción de *phoRP*, de los cuales 2 dieron el fenotipo de dobles recombinantes (T5 y T8). Los dobles recombinantes se sembraron en césped en medio de esporulación TBO suplementado con sales de fosfato (10 mM) con el objetivo de amplificar la biomasa. Es importante destacar que si no se añade fosfato al medio prácticamente no se observa crecimiento de los mutantes de *S. tacrolimicus* Δ*phoP* y Δ*phoRP*. Posteriormente, se realizó una nueva ronda de esporulación, esta vez con siembra en estría con el objetivo de seleccionar colonias individuales y de esta

manera asegurar un cultivo puro. Una vez seleccionadas las colonias correspondientes a cada mutante se volvió a comprobar la resistencia a antibióticos en medio TSA.

Todos los mutantes obtenidos fueron comprobados mediante hibridación tipo Southern (Figura 3.18), para lo cual el ADNt de la cepa silvestre y de los mutantes delecionados se digirió con la enzima *Bam*HI y se hibridó con sondas para la detección de la presencia de *phoP* (Sonda phoP: 680 pb) o del gen de resistencia a apramicina *aac(3)IV* (Sonda Apr^R: 935 pb). Esta última sonda se obtuvo mediante PCR, para lo cual se utilizó como molde el vector pULVK2A que porta el gen de resistencia a la apramicina (Kumar *et al.*, 1994) con los cebadores Apr-SaI y Apr-A2. En el caso de las cepas delecionadas sólo aparece una banda de hibridación positiva con la sonda de la apramicina, ya que el gen *phoP* ha sido reemplazado por el casete de resistencia y, por el contrario, en la cepa silvestre sólo se obtuvo señal de hibridación positiva con la sonda para *phoP*.

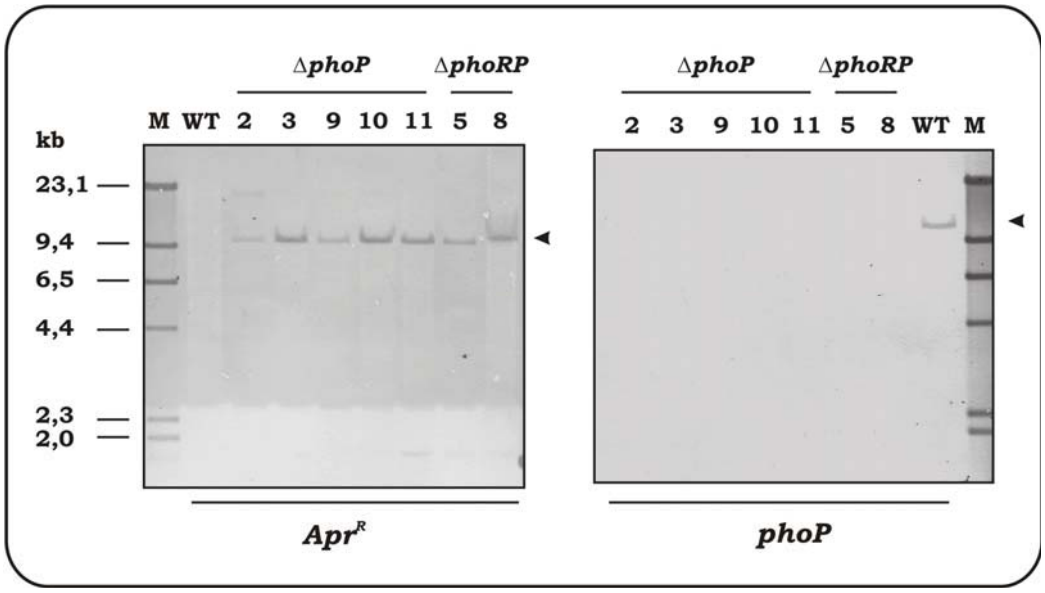


Figura 3.18: Comprobación mediante hibridación tipo Southern de la deleción de *phoP* y *phoRP* en *S. tacrolimicus*. Patrones de hibridación de ADN total digerido con *Bam*HI de los mutantes delecionados Δ*phoP* (2, 3, 9 10 y 11) y Δ*phoRP* (5 y 8) en comparación con la cepa parental *S. tacrolimicus* (WT) utilizando como sondas Apr^R y phoP. A la derecha de cada panel se indica con una cabeza de flecha la posición de las bandas de hibridación. El marcador de tamaño molecular (M) es *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled*, cuyos tamaños se muestran a la izquierda.

Complementación de los mutantes Δ*phoP* y Δ*phoRP*

El efecto que produce la eliminación de un gen se puede confirmar mediante la complementación del mismo, que consiste en la introducción en la cepa mutante de una copia funcional de la secuencia que previamente se ha delecionado. El efecto producido por la eliminación del gen en la cepa delecionada debe ser revertido en la cepa complementada.

La construcción de complementación se realizó en el vector pRAneo, plásmido integrativo conjugativo que presenta las resistencias a apramicina [gen *aac(3)IV*] y a kanamicina (gen *neo*); necesarias para la selección en la cepa *E. coli* ET12567/pUZ8002 y en los mutantes Δ*phoP* y Δ*phoRP,* respectivamente.

Para poder restaurar el sistema de dos componentes PhoR-P delecionado se seleccionó un fragmento de 2,6 kb del genoma de *S. tacrolimicus* que incluye los genes *phoRP* y la zona promotora y terminadora a dichos genes. En `*S. lividans´* se ha demostrado que los genes *phoR* y *phoP* se transcriben unidos (transcrito bicistrónico) aunque *phoP* también se transcribe solo encontrándose la zona promotora en la región 3´ de *phoR* (Ghorbel *et al.*, 2006a). La zona promotora del posible operón *phoRP* de *S. tacrolimicus* se localizaría en la región intergénica entre *phoR* y *phoU* (Figura 1.9). Además, mediante una búsqueda informática se localizaron en dicha región intergénica dos posibles cajas PHO (zona de unión de PhoP al ADN) lo que se corresponde con el hecho de que PhoP autorregula su propia expresión, como ya se ha comprobado en *S. coelicolor* y *S. natalensis* (Sola-Landa *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2007). También se localizó una posible zona terminadora del operón *phoR-P* mediante la búsqueda de secuencias repetidas e invertidas que pudiesen formar estructuras en horquillas típicas de los terminadores (Figura 3.19), para lo cual se utilizó la herramienta informática disponible en la dirección: www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/. Teniendo en cuenta estas consideraciones se seleccionó el fragmento de complementación de manera que se asegurase la expresión de los genes *phoR* y *phoP* bajo su propio promotor.

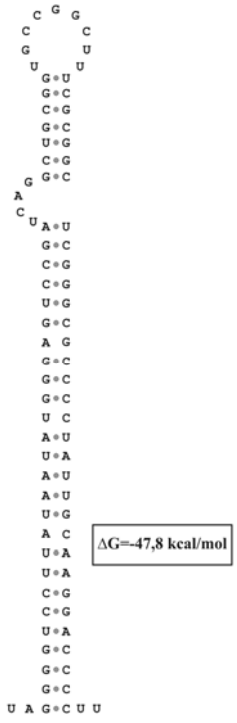


Figura 3.19: Terminador transcripcional de *phoR-P* de *S. tacrolimicus.* Estructura secundaria de ARNm en forma de horquilla localizada en la región 3´ adyacente a *phoP* que posiblemente constituye el terminador transcripcional de *phoRP*. En un recuadro se indica la energía libre de Gibbs.

La banda de complementación se obtuvo a partir del ADN total de *S. tacrolimicus* mediante PCR utilizando una polimerasa de alta fidelidad de copia Phusion® y los cebadores CPHOU2-PvuI y CPHOD-BglII. Este producto de PCR fue digerido con las enzimas *Pvu*I y *Bgl*II y clonado en el vector pRAneo digerido con las mismas enzimas (Figura 3.20). Una vez obtenida la construcción pRAneoPHO se secuenció con el objeto de comprobar la fidelidad en la amplificación por PCR.

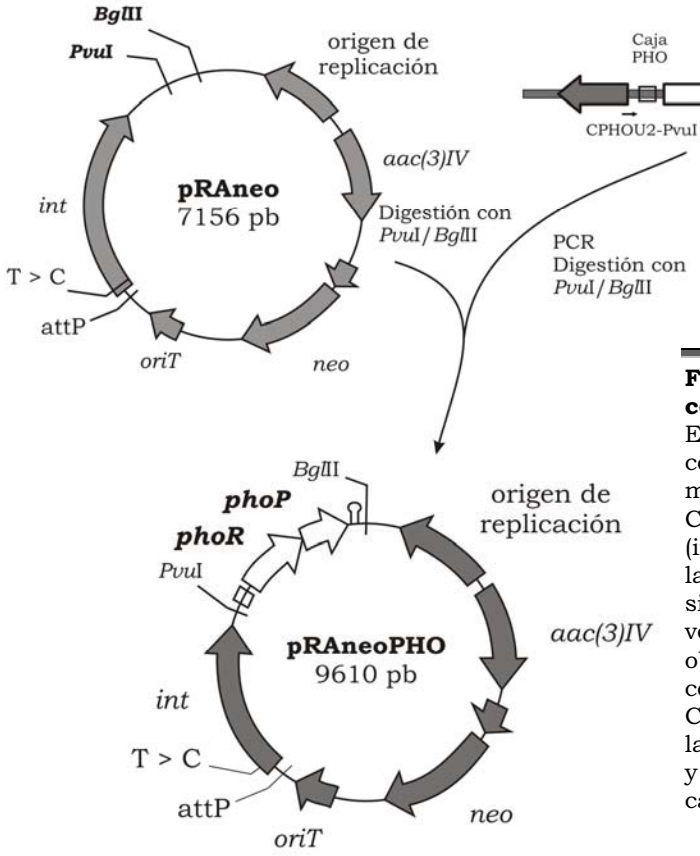


Figura 3.20: Construcción de complementación de *phoRP*. El fragmento de complementación se obtuvo mediante PCR con los cebadores CPHOU2-PvuI y CPHOD-BglII (indicados con flechas finas en la figura) y fue clonado en los sitios de corte *Pvu*I/*Bgl*II del vector conjugativo pRAneo, obteniéndose la construcción de complementación pRAneoPHO. Con el símbolo Ω se representa la región terminadora de *phoRP* y con un cuadrado la posible caja PHO.

La construcción pRAneoPHO fue transformada en la cepa de *E. coli* ET12567/pUZ8002 para poder llevar a cabo la transferencia de dicha construcción a la cepa silvestre *S. tacrolimicus* y los mutantes de la misma Δ*phoRP* (T5 y T8) y Δ*phoP* (T3 y T9) mediante conjugación intergenérica. El proceso de conjugación se realizó como se describe en materiales y métodos (2.15.2), utilizando en la cobertera apramicina (para la selección de la deleción) y kanamicina (para la selección de la construcción de complementación) además de ácido nalidíxico. Las colonias obtenidas fueron sembradas en TSA suplementado con los correspondientes antibióticos para obtener una mayor cantidad de biomasa y posteriormente se sembraron en TBO para la obtención de esporas. Se seleccionaron dos cepas complementadas para cada mutante delecionado y otras dos colonias de la cepa silvestre con la construcción pRAneoCPHO (cepa suplementada en una copia de la región *phoRP*).

Las cepas complementadas fueron comprobadas mediante PCR (Figura 3.21). Utilizando la pareja de cebadores AprA2/PhoRev2 se confirmó la sustitución de *phoP* o de *phoRP* por el casete de resistencia a apramicina en todas la colonias seleccionadas mientras que con la pareja phoPM1/phoRPD se comprobó la presencia del gen *phoP* en las cepas Δ*phoP*-pRAneoPHO y con la pareja phoRM1/phoRPD la presencia de los genes *phoRP* en las cepas Δ*phoRP*-pRAneoPHO. Es decir, las cepas complementadas deben presentar el patrón de PCR

correspondiente a las cepas delecionadas más el correspondiente a la cepa silvestre, ya que proceden de la cepa delecionada con la construcción pRAneoPHO integrada en el genoma.

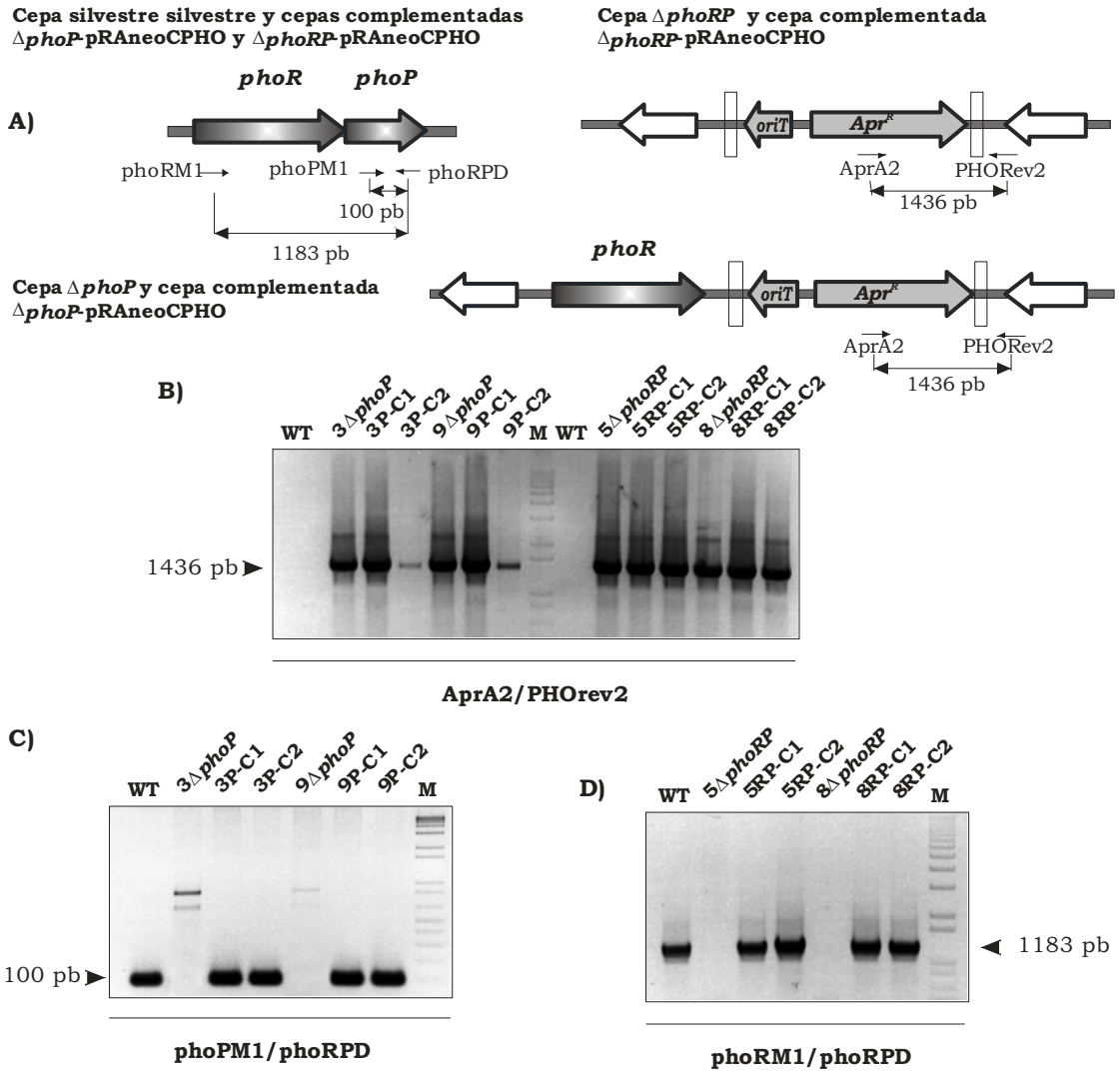


Figura 3.21: Comprobación mediante PCR de las cepas complementadas. A) Organización génica en las cepas que son analizadas por PCR. Con flechas de una punta se indica la localización de los cebadores utilizados y con flechas de dos puntas la longitud del producto de PCR. **B), C) y D)** Resultado de las PCR realizadas con los cebadores indicados en la parte inferior de cada panel sobre ADNt de las cepas indicadas en la parte superior de cada carril (WT: cepa silvestre *S. tacrolimicus*; 3Δ*phoP* y 9Δ*phoP*: cepas delecionadas en *phoP* y sus correspondientes cepas complementadas: 3P-C1y2 y 9P-C1y2; 5Δ*phoRP* y 8Δ*phoRP*: cepas delecionadas en *phoRP* y sus correspondientes cepas complementadas: 5RP-C1y2 y 8RP-C1y2). M: marcador comercial de *1kb Plus DNA Ladder.*

Caracterización de la deleción del sistema de dos componentes PhoR-P y su complementación. Efecto en la esporulación

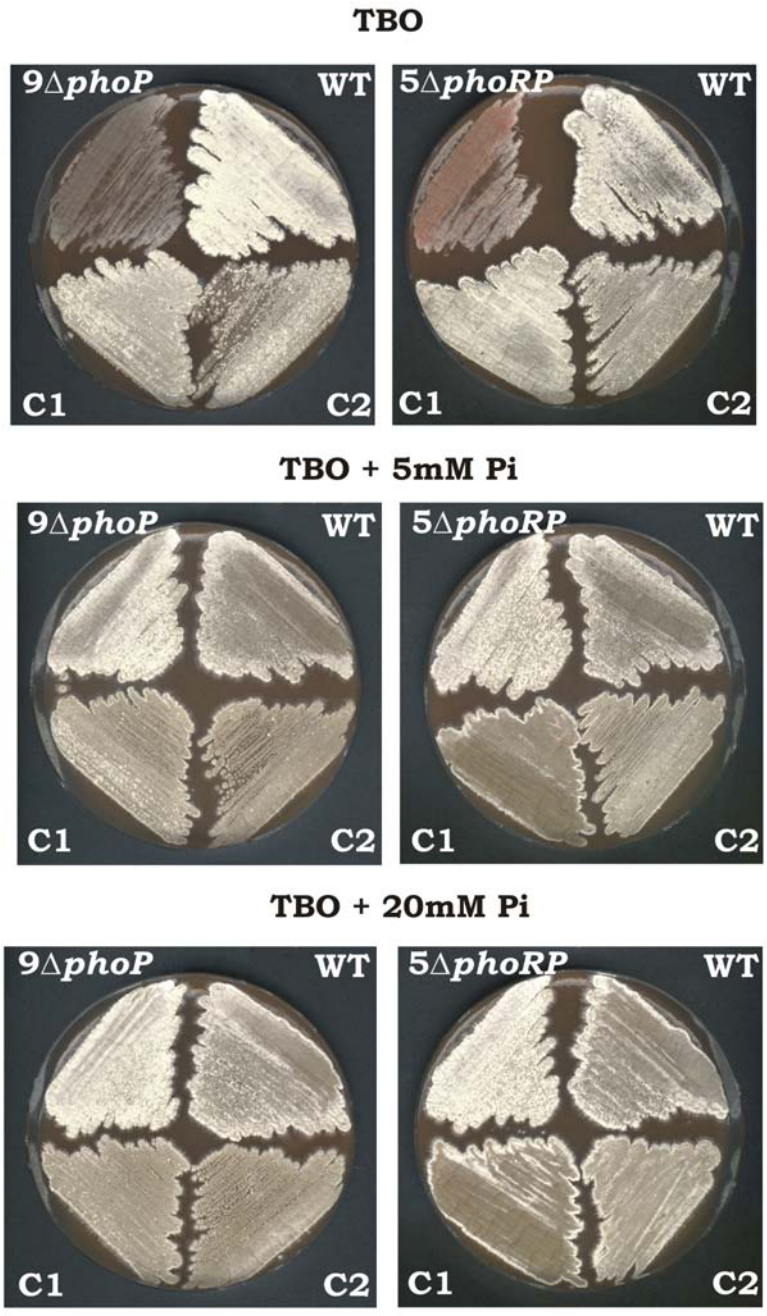


Figura 3.22: Efecto en la esporulación de la deleción de los genes phoR-P en *S. tacrolimicus*. Esporulación en medio TBO y en medio TBO suplementado con fosfato (5 mM y 20 mM) a los 15 días de incubación a 28ºC de la cepa silvestre (WT), los mutantes delecionados 9-Δ*phoP* y 5-Δ*phoRP* y las cepas complementadas (dos para cada mutante: C1 y C2). La especie *S. tacrolimicus* presenta una esporulación de color blanquecino no muy abundante, así cuanto más blanco se torne el cultivo más abundante será la esporulación.

La inactivación de *phoRP* en *S. tacrolimicus* produce cambios en los patrones de esporulación de dicha especie dependiendo de la cantidad de fosfato que contenga el medio. Así, en medio TBO no se observa esporulación en los mutantes Δ*phoP* y Δ*phoRP* mientras que

la cepa silvestre presenta una moderada esporulación a partir de los 5 días de incubación a 28ºC (la esporulación de esta especie es menos abundante que en otras especies, como por ejemplo *S. coelicolor*). Cuando el medio es suplementado con sales de fosfato se observa una inversión en el comportamiento, los mutantes presentan una rápida y más abundante esporulación mientras que la cepa silvestre presenta una esporulación más escasa que en el medio sin suplementar (Figura 3.22). La introducción de una copia funcional de la región *phoRP* en los mutantes delecionados Δ*phoP* y Δ*phoRP* revierte la capacidad de esporulación a lo observado en la cepa silvestre, es decir buena esporulación en medio TBO y esporulación deficiente si se le adiciona fosfato al medio. En conclusión, la inactivación del sistema de dos componentes *phoR-P* en *S. tacrolimicus* provoca deficiencias en la esporulación en medio TBO; sin embargo se recupera y se produce una esporulación más abundante si el medio es suplementado con fosfato; lo que indica una posible relación entre el mecanismo a la respuesta de escasez de fosfato y la diferenciación morfológica en *S. tacrolimicus*.

La cepa silvestre también ha sido transformada con la construcción de complementación pRAneoPHO con el objetivo de analizar los posibles efectos de la propia construcción. En relación a la esporulación la copia extra de la región *phoRP* no afecta al comportamiento de *S. tacrolimicus* (figura no mostrada).

3.3.4. Análisis del efecto de la concentración de fosfato en la producción de tacrolimus por la especie *S. tacrolimicus*

El estudio del efecto del fosfato en la producción de tacrolimus precisa un medio en el que se pueda controlar la concentración de este elemento por lo que se decidió comenzar el estudio por la optimización de un medio definido para la producción de tacrolimus por la especie *S. tacrolimicus*.

Producción en medios definidos

La composición de estos medios se desarrolló tomando como referencia el medio descrito por **Yoon y Choi** (1997) específicamente diseñado para ***Streptomyces* sp. MA6858,** renombrado en este trabajo como *S. tacrolimicus,* y el medio optimizado por **Kojima y colaboradores** (1995) para la producción de rapamicina por ***S. hygroscopicus***; ya que la biosíntesis de tacrolimus y rapamicina sigue una ruta similar.

Medio optimizado por Yoon y Choi

Preinóculo	(1 litro)
Almidón	20,0 g
Glucosa	20,0 g
Extracto de levadura	20,0 g
KNO_3	1,0 g
NaCl	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,025 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,005 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,02 g

pH 7,0

Medio de producción	(1 litro)
Almidón	20,0 g
Glucosa	10,0 g
Leucina	2,64 g
Na-Lactato (60%)	5,6 g
K_2HPO_4	0,5 g
MOPS	10,0 g
NaCl	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,025 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,005 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,02 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,003 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,003 g

pH 6,8

Nota: Según los autores, en este medio la producción de tacrolimus por *S. tacrolimicus* se encuentra alrededor de 20 µg/ml.

Modificaciones

Además, este medio se suplementó con lisina (precursor en la biosíntesis de tacrolimus) a una concentración final de 10 g/l; debido a que en la producción de rapamicina por *S. hygroscopicus* se ha observado que la adición de lisina a los caldos de cultivo provoca un aumento de hasta 2,5 veces en la producción (Cheng *et al.*, 1995b).

Condiciones de fermentación

El medio de producción fue inoculado con un volumen correspondiente al 10 % de un cultivo preinóculo (inoculado con $1x10^7$ esporas/ml) incubado en agitación durante 38 horas.

Tanto el cultivo de preinóculo como el de producción se incubaron a 28ºC y 220 rpm.

Medio definido por Kojima y colaboradores (1 litro)

D-fructosa	20,0 g
D(+)manosa	5,0 g
Na-L-aspartato	1,5 g
L-arginina	0,5 g
L-histidina·HCl	0,5 g
MES	21,3 g
NaCl	5,0 g
K_2HPO_4	2,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$MgCl_2·6H_2O$	0,51 g
Na_2SO_4	0,36 g
$MgSO_4·7H_2O$	0,256 g

pH 6,0

Elementos traza	
$FeSO_4·7H_2O$	0,1 g
$ZnSO_4·7H_2O$	0,06 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}·H_2O$	0,018 g
$MnSO_4·H_2O$	0,012 g
$Na_2B_4O_7·10H_2O$	0,010 g
$CoCl_2·6H_2O$	0,010 g
$CuCl_2·2H_2O$	0,0013 g

Modificaciones

Sobre la base de este medio de producción se realizaron diferentes modificaciones:

1. Valor del pH=7,0; ya que los medios complejos utilizados por Dumont y colaboradores (1992) son ajustados a valores de pH comprendidos entre 6,8 y 7,2.

2. Concentración de $FeSO_4·7H_2O$ 0,01 g/l.

3. Adición de lisina a una concentración de 10 g/l.

Condiciones de fermentación

El inoculo de este medio se realizó con un 5 % de cultivo en medio YEME + 17 % sacarosa incubado durante 48 horas a 30ºC y 250 rpm.

El cultivo de producción se incubó a 28ºC y 220 rpm.

A pesar de que se obtuvo un buen crecimiento de *S. tacrolimicus* en estos dos medios (y sus correspondientes modificaciones), en ninguna de las condiciones ensayadas se ha detectado por bioensayo (ver materiales y métodos 2.21.2) la producción de sustancias con características inmunosupresoras.

Medios complejos

La ausencia de producción de tacrolimus en estos dos medios definidos (con las correspondientes modificaciones) puede ser debida a la carencia o baja concentración de algún componente esencial, por lo que se ensayaron medios complejos para la fermentación de *S. tacrolimicus.*

Las condiciones de fermentación se establecieron tomando como base lo descrito en la **patente** para la producción de FK506 por la especie *S. tacrolimicus* (Dumont *et al.*, 1992).

Preinóculo: **BASA**	(1 litro)
Glucosa	20 g
Extracto de levadura	20 g
KNO_3	2,0 g
Hidrolizado de caseína	20 g
NaCl	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,025 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,005 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,02 g

pH 7,0

Medio de fermentación: **FKA**	(1 litro)
Almidón	45 g
Líquido de maceración del maíz	10 g
Levadura seca	10 g
F-2000 (antiespumente)	1 ml
$CaCO_3$	1 g

pH 6,8

Modificaciones

Sobre la base del medio de fermentación FKA se realizaron diferentes modificaciones:

1. Sustitución de la levadura seca por extracto de levadura, la levadura seca se lisa durante el proceso de fermentación por lo que no permite la medida del crecimiento mediante la determinación del peso seco.

2. Ensayo de diferentes marcas de almidón: Merck, Prolabo y Scharlau.

3. Adición de MOPS como tampón. A pesar de que en el documento de patente (Dumont *et al.*, 1992) describen que los componentes del medio FKA son capaces de mantener el pH durante la fermentación se observó un aumento de pH a lo largo de la fermentación hasta alcanzar valores comprendidos entre 9,0-9,5.

4. Adición de glucosa y pharmamedia (Shafiee *et al.*, 1994).

5. Diferentes valores de pH comprendidos en el rango 6,0-8,0.

Además se ensayaron diferentes condiciones de fermentación y de cultivo de preinóculo: tipo de matraz (liso o indentado), volúmenes de cultivo de fermentación (50 ml ó 100 ml), temperatura de preinóculo y fermentación (25-28ºC), agitación orbital (220 rpm ó 250 rpm), cantidad de esporas para el inóculo del medio de preinóculo (10^6, 10^7 ó 10^8 UFC/ml) y proporción de preinóculo utilizado para el inóculo del medio de fermentación [4 % u 8 %].

Mediante bioensayo se detectó la producción de una sustancia con posibles características inmunosupresoras en unas condiciones muy determinadas:

Preinóculo **BASAm**: sustitución del hidrolizado de caseína por mezcla de peptonas [extracto de carne 25 %, extracto de levadura 25 %, peptona de carne 20 %, peptona de caseína 20 % y NaCl 12 % (Biomedics S.L.)].

Medio de fermentación **FKAm** (1 litro)

Almidón (Prolabo)	45 g
Líquido de maceración del maíz (Sigma)	10 g
Levadura seca (Sensient)	10 g
MOPS	10 g
$CaCO_3$	1 g
pH 6,4	

Se observaron halos de inhibición tanto con almidón de Merck como de Prolabo, pero éste último presentó mejor solubilidad por lo que fue el utilizado. En este medio la sustitución de levadura seca por extracto de levadura provoca la perdida de producción (algunos antifúngicos parecen inducidos por paredes celulares). Así mismo, la relación volumen de cultivo/tamaño del matraz es muy importante, en matraces de 500 ml se detectaron halos de inhibición con 50 ml de volumen de medio de fermentación pero no así con un volumen de 25 ml ó 100 ml.

Condiciones de fermentación

El preinóculo se realizó en 50 ml de medio BASAm en matraces indentados de 500 ml y una suspensión de esporas a una concentración final de 10^7 UFC/ml. El cultivo se incubó durante 48 horas a 25ºC y 220 rpm.

La fermentación se llevó a cabo en 50 ml de medio FKAm en matraces lisos de 500 ml inoculados con un 8% del preinóculo crecido en BASAm, a 28ºC y 220 rpm.

Resultados de producción

El análisis de los caldos de fermentación a los 5 días de cultivo mediante bioensayo frente a *S. cerevisiae* TB23 como microorganismos sensible, resultó en pequeños halos de inhibición, lo que indica la producción de una sustancia que pudiera tener características inmunosupresoras (Figura 3.23). El análisis mediante bioensayo también detecta sustancias con características antifúngicas contra cepas de *S. cerevisiae* sensibles a tacrolimus, por lo que para confirmar los resultados de producción se precisa de una técnica más específica. Así, se optimizó un método de cromatografía líquida de alta resolución, HPLC (ver materiales y métodos 2.21.2) con una mejor detección, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo. Además, el método optimizado permitió la separación de sustancias muy similares al tacrolimus, como la ascomicina gracias al uso de metilterbutileter en la fase móvil.

En el análisis de las muestras de fermentación de *S. tacrolimicus* mediante HPLC no se detectó ningún pico correspondiente a tacrolimus o al análogo ascomicina (Figura 3.23).

Durante la realización de este trabajo se publicó una nueva especie, *Streptomyces durmitorensis,* productora de un compuesto similar a tacrolimus (Savic *et al.*, 2007). Con el objetivo de comprobar si *S. tacrolimicus* produce algún compuesto del mismo tipo que el metabolito secundario producido por *S. durmitorensis*, se llevó a cabo una fermentación de

esta especie en las mismas condiciones en las que se había obtenido producción de *S. tacrolimicus*. El análisis mediante HPLC de los caldos de fermentación de *S. durmitorensis* resulta en un compuesto cuyo tiempo de retención no coincide ni con tacrolimus ni con ascomicina, ni tampoco con ninguno de los picos presentes en los caldos de fermentación de *S. tacrolimicus* (Figura 3.23).

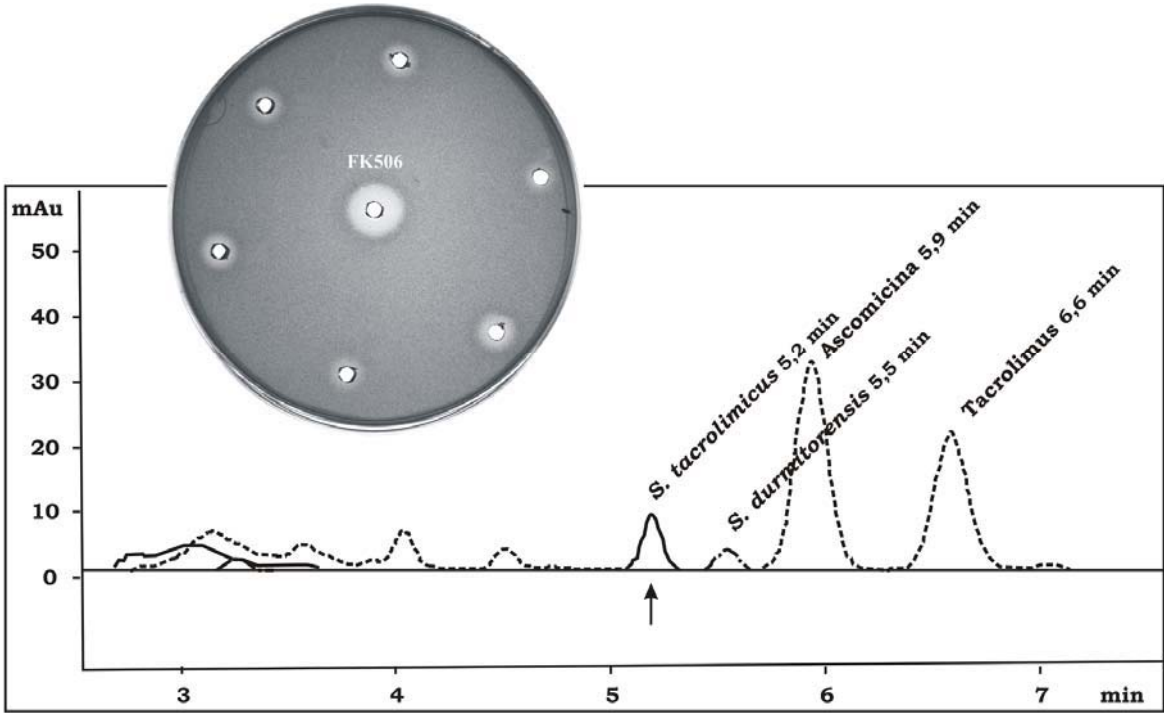


Figura 3.23: Análisis de fermentación mediante bioensayo y HPLC. En la parte superior se muestra una placa de bioensayo. El halo del pocillo central corresponde a tacrolimus puro (5 µg/ml) utilizado como control positivo y los halos de los pocillos laterales corresponden a caldos de fermentación de *S. tacrolimicus*. En la parte inferior se muestra un cromatograma de los caldos de fermentación de *S. tacrolimicus* (línea continua) y *S. durmitorensis* (línea de puntos y rayas) y de los patrones puros de tacrolimus y ascomicina (línea discontinua). En el cromatograma de los caldos de fermentación de *S. tacrolimicus* aparece un pico a 5,2 minutos (indicado con una flecha) que no corresponde ni con el metabolito producido por *S. durmitorensis* ni con los picos correspondientes a los patrones de tacrolimus y ascomicina.

También se analizó la producción del compuesto desconocido (pico 5,2 minutos) del mutante de *S. tacrolimicus* Δ*phoP* en las condiciones de fermentación optimizadas, en las cuales no se detectó producción mientras que si se detecta para la cepa silvestre. La falta de producción presentada por la cepa delecionada puede ser debida a una deficiencia en el crecimiento. Sin embargo, si el medio es suplementado con fosfato (30 mM) el mutante presenta una producción ligeramente superior (área 1,6 veces superior) a la presentada por la cepa silvestre en las mismas condiciones (Figura 3.24). Estos resultados, aunque poco concluyentes, indican que la deleción de *phoP* en *S. tacrolimicus* provoca un ligero aumento de la producción del metabolito secundario desconocido.

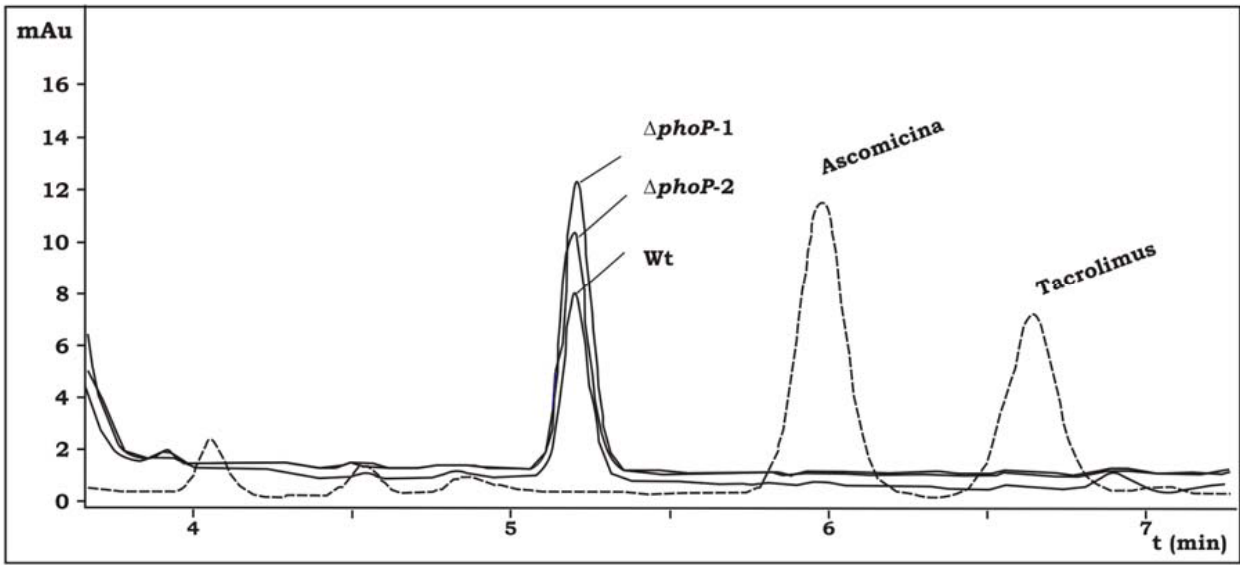


Figura 3.24: Cromatograma de los caldos de fermentación en medio FKAm suplementado con fosfato (30 mM) de mutantes Δ*phoP* de *S. tacrolimicus* en comparación con la cepa silvestre. En línea discontinua se muestra el cromatograma de los patrones tacrolimus y ascomicina. Los cromatogramas correspondientes a la cepa silvestre (Wt) de *S. tacrolimicus* y los dos cultivos (Δ*phoP*-1 y Δ*phoP*-2) de la cepa 3Δ*phoP* se indican en línea continua.

La producción de la sustancia con posibles características inmunosupresoras en la fermentación de *S. tacrolimicus* se da en cantidades muy bajas o la actividad que presenta es muy débil (se obtienen halos de inhibición casi imperceptibles y difíciles de analizar). Además, hasta el momento no se ha podido comprobar si el pico detectado en el HPLC corresponde a dicha sustancia ni el tipo de compuesto. Un estudio riguroso del efecto de la inactivación del sistema PhoR-P sobre la producción de metabolitos secundarios en *S. tacrolimicus* precisa resolver, en primer lugar, estos interrogantes.

3.3.5. Estudio de la regulación por PhoP: búsqueda de cajas PHO

Ante una situación de escasez de fosfato, el sistema de dos componentes PhoR-P regula la respuesta de la célula mediante la unión del regulador de respuesta PhoP a la zona promotora de ciertos genes, activando o reprimiendo su expresión.

La zona correspondiente al dominio de unión a ADN (DBD) de la proteína PhoP de *S. coelicolor* presenta una afinidad por el ADN similar a la proteína completa (Sola-Landa *et al.*, 2005). Así, los estudios de unión de PhoP realizados en *S. coelicolor* se llevaron a cabo con la proteína truncada a partir del residuo isoleucina 109; es decir, el extremo carboxilo terminal donde se localiza el dominio de unión a ADN.

El alto grado de conservación (98,7 % de similitud, figura 3.25) existente entre PhoP de *S. tacrolimicus* y de *S. coelicolor* permitió el uso de la proteína de fusión PhoP^{DBD}-GST de *S. coelicolor* en los estudios de unión de PhoP en *S. tacrolimicus*. Previamente, en *S. coelicolor* se había comprobado que la proteína GST por sí sola no presentaba unión con la molécula de ADN. La proteína de fusión PhoP^{DBD}-GST de *S. coelicolor* (purificada por A Sola-Landa) será denominada PhoP^{DBD} en el resto del trabajo.

Figura 3.25: Similitud entre la proteína PhoP de *S. tacrolimicus* y PhoP de *S. coelicolor*. Con asteriscos se indican los aminoácidos conservados. Nótese que sólo aparecen 4 aminoácidos no conservados. La flecha indica el residuo de isoleucina a partir del cual se ha truncado la proteína PhoP de *S. coelicolor* y con un recuadro se destaca el dominio de unión a ADN.

La zona de unión de PhoP al ADN, conocida como caja PHO, se compone de unidades de repetición directa (DRus) de 11 nucleótidos que se disponen en tándem. Con la información resultante al alineamiento de 37 DRus, las cuales forman el núcleo (C) de los respectivos sitios de unión de PhoP en *S. coelicolor* (ver introducción 1.3.2), se construyó una matriz de puntuación correspondiente al modelo I (Sola-Landa *et al.*, 2008). Dicha matriz otorga un valor a la aparición de cada base en una posición concreta de la unidad de repetición; valor que se relaciona con el grado de conservación. Así, cuanto mayor sea el grado de conservación de una base en una determinada posición mayor será la puntuación en la matriz.

Ensayos de retraso de la movilidad electroforética (EMSA)

La matriz de puntuación del modelo I fue utilizada para el rastreo de la región de 11,5 kb de *S. tacrolimicus* en la que se localizan los genes *phoRP* mediante la herramienta informática RSA Tools. Así, se identificaron dos posibles zonas con cajas PHO: la **zona intergénica de *phoU-RP*** y la zona promotora de un posible regulador transcripcional de la familia CarD (***carD***). Con el fin de confirmar la unión de PhoP a estas zonas se realizaron ensayos de retraso de movilidad electroforética (EMSA) en geles de poliacrilamida.

El fragmento de ADN de las zonas promotoras fue obtenido mediante PCR a partir de ADNt con la pareja de cebadores phoRU2/pURP-U para la amplificación de la zona intergénica *phoU-R* (353 pb) y la pareja pcarD-U/pcarD-D para la amplificación de la zona promotora de *carD* (204 pb). La PCR se realizó con la polimerasa *Taq* para posteriormente clonar los fragmentos amplificados en el vector pGEMT-easy, obteniéndose las construcciones pGEMT-pPHO y pGEMT-pcarD. La zona promotora clonada en ambas construcciones fue secuenciada usando los cebadores universales SP6 yT7 para asegurar la fidelidad en el proceso de amplificación por PCR. Los fragmentos promotores fueron obtenidos de las anteriores construcciones mediante digestión con la enzima *Eco*RI y marcados en su extremo 3´ con digoxigenina (*DIG Oligonucleotide 3´-End Labeling Kit, 2nd Generation),* ver materiales y métodos (apartado 2.19.1).

Las reacciones de unión se llevaron a cabo en 12,5 µl de volumen final conteniendo el tampón de unión, la proteína PhoP^{DBD}-GST, poli dI-dC y la sonda marcada (ver materiales y métodos 2.19.1). Por un lado se preparó la solución mezcla de sonda (1,2 ng por reacción de unión) con el resto de componentes excepto la proteína, en un volumen final suficiente para cuatro reacciones de unión con diferentes concentraciones de proteína y dos reacciones control, una sin proteína y la otra con exceso (500 veces la cantidad de sonda) de sonda sin marcar (sonda fría). Las diluciones de proteína se prepararon en un volumen final de 10 µl, para posteriormente añadir 7,5 µl por reacción de unión dando una concentración final comprendida entre 0,06-0,5 µM.

Las reacciones de unión, la electroforesis de dichas muestras y la posterior transferencia a membrana y detección mediante el uso de CDP-Star se realizó según se describe en materiales y métodos (apartado 2.19.1).

Los resultados obtenidos muestran la formación de dos complejos de unión entre la proteína PhoP^{DBD} y la región intergénica *phoU-R*. La unión es específica ya que no se observa retraso con sonda fría. En cambio, no se ha detectado unión en el caso de la zona promotora de *carD* (Figura 3.26).

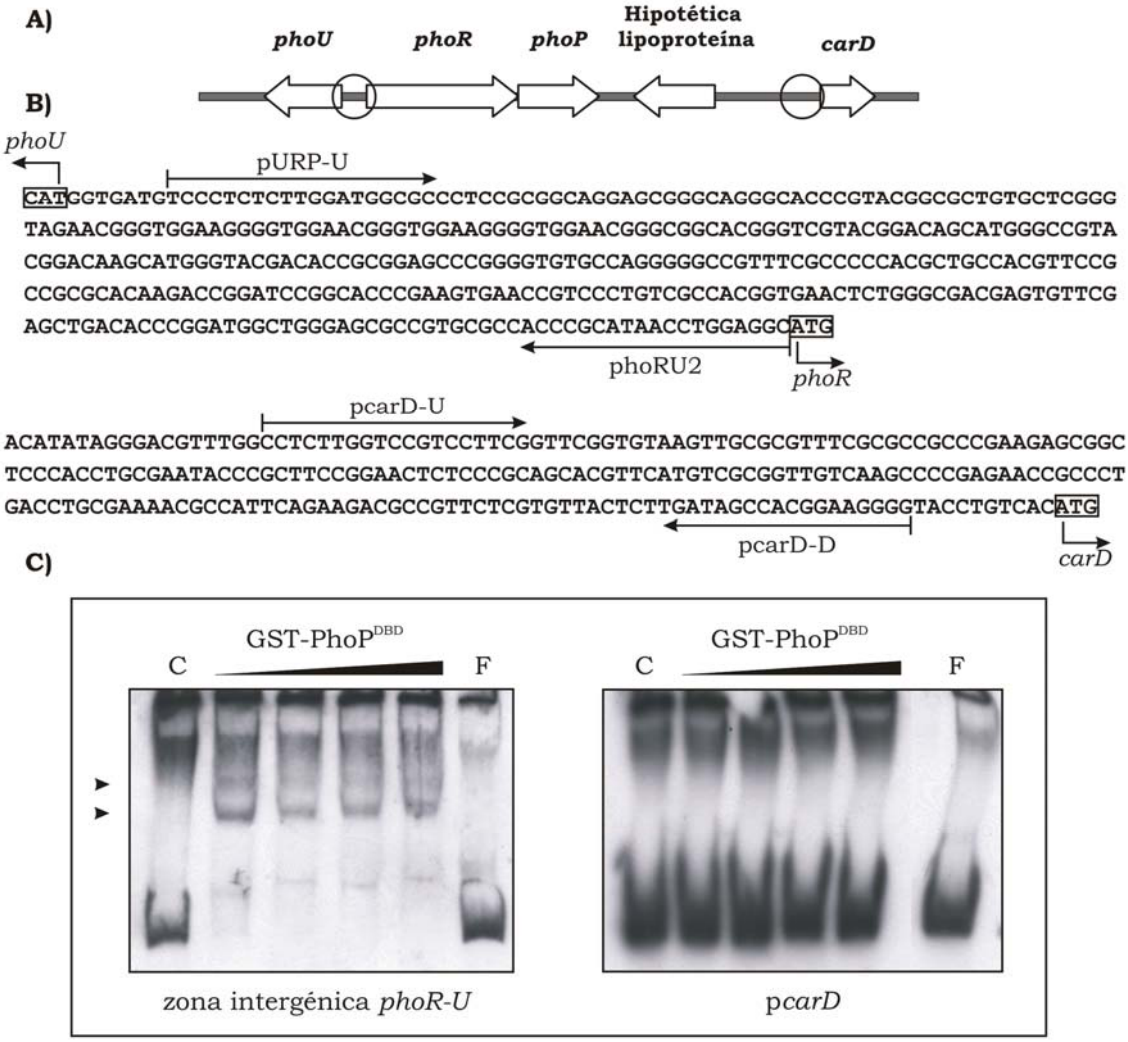


Figura 3.26: Análisis mediante EMSA de posibles zonas de cajas PHO en *S. tacrolimicus*. A) Localización en la región de 11,5 kb secuenciada del genoma de *S. tacrolimicus* de las posibles zonas de cajas PHO. **B)** Posición de los cebadores utilizados para la amplificación de las zonas promotoras. Con un recuadro se muestra el codón de inicio de los distintos genes. La secuencia de los diferentes cebadores aparece indicada con flechas. **C)** Resultado de los experimentos de EMSA con PhoP^{DBD} de la región intergénica *phoR-U* (panel izquierdo) y de la zona promotora de *carD* (panel derecho). Se utilizaron concentraciones crecientes de proteína (0,06, 0,12, 0,25 y 0,5 μM). C: sonda sin proteína y F: sonda fría. Con cabezas de flecha se indican los dos complejos de retraso que se observan en el panel izquierdo demostrando la unión entre PhoP^{DBD} a la zona intergénica *phoR-U*.

Ensayos de protección frente a ADNasa I

Una vez confirmada la unión de PhoP^{DBD} a la región intergénica entre *phoRP* y *phoU* se realizó un estudio de protección frente a ADNasa I para poder identificar exactamente la secuencia de unión.

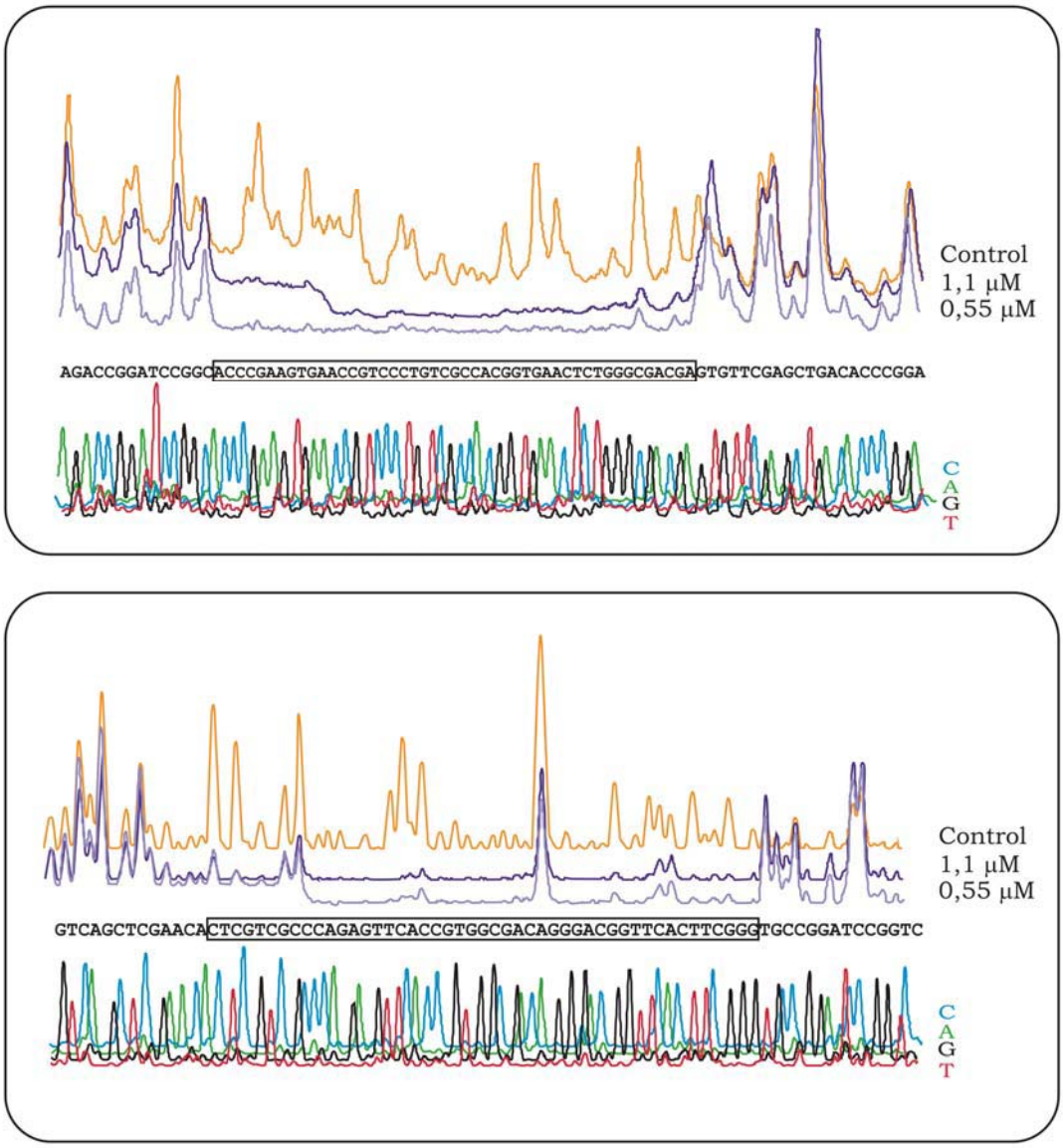


Figura 3.27: Ensayos de protección con PhoP^{DBD} de la zona intergénica *phoRP-U* de *S. tacrolimicus*. En el panel superior se recoge el resultado correspondiente a la cadena codificante del gen *phoR* y en el panel inferior la cadena complementaria (sentido de *phoU*). En la parte superior de cada panel se comparan los electroforegramas del ensayo de protección, en naranja reacción control sin proteína y en morado reacciones con dos concentraciones de proteína: 0,55 y 1,1 µM. En la zona central se indica mediante un recuadro la secuencia de la zona protegida y en la zona inferior se muestran los electroforegramas correspondiente a la secuenciación de la zona analizada.

El fragmento de la zona intergénica *phoRP-U* se marcó con el fluoróforo 6FAM mediante una reacción de PCR sobre la construcción pGEMT-pPHO usando las parejas de cebadores 6FAM-SP6/Directo y SP6/6FAM-Directo (cada producto de PCR tiene una de las cadenas marcada). Con cada producto de PCR se realizaron tres reacciones: control sin proteína y dos concentraciones diferentes de PhoP^{DBD}: 1,1 y 0,55 µM.

El ensayo consistió en una primera reacción de unión en un volumen final de 42 µl, utilizando una concentración de ADN de 9,3 nM y la correspondiente dilución de proteína y

posteriormente, digestión con ADNasa I (ver materiales y métodos 2.19.2). Los fragmentos obtenidos de la digestión fueron secuenciados y los electroforegramas obtenidos se analizaron mediante el programa Peak Scanner™. La zona de unión presenta un electroforegrama plano lo que permite identificar dicha zona (Figura 3.27). Además para identificar la secuencia de la región protegida también se llevo a cabo la secuenciación de la zona promotora mediante el kit *Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing* (ver materiales y métodos 2.19.2). La zona protegida abarca 47 nucleótidos en la cadena sentido para *phoR* (desde la posición -108 hasta -62 en relación al codón de inicio). Prácticamente la misma región está protegida en la cadena complementaria (47 nucleótidos comprendidos entre las posiciónes -107 hasta -61).

La zona de unión de PhoP en la región intergénica de *phoU-R* de *S. tacrolimicus* comprende cuatro unidades de repetición directa de 11 nucleótidos, es decir cuatro sitios de unión de cuatro monómeros de PhoP, en la cadena sentido de *phoU*. El análisis del contenido de información individual de cada unidad de repetición (R_i), que proporciona una estimación del grado de conservación, se realizó con la matriz de puntuación del modelo I. Dicho análisis se realizó mediante una aplicación Excel basada en la teoría de la información (Schneider, 1997) diseñada por A. Rodríguez García. Así, según lo descrito en el modelo I, valores R_i por encima de 8 bits corresponden a DRu muy conservadas, siendo el valor máximo 14,63 bits, y valores R_i negativos corresponden a DRus muy poco conservadas. El valor R_i total de un sitio de unión real de PhoP (suma de los valores R_i de todas las DRus que componen el sitio) debe ser positivo (Sola-Landa *et al.*, 2008).

Las cuatro DRus presentes en la región intergénica *phoU-R* de *S. tacrolimicus* presentan los siguientes valores de información: 3,2; 10,3; -4,5 y 8,2 bits (DRu1-4, respetivamente) (Figura 3.28).

Según el modelo I definido para la unión de PhoP al ADN en *S. coelicolor* (ver introducción 1.3.2) las dos primeras repeticiones están conservadas constituyendo el núcleo de la unión, a las cuales se unen simultáneamente dos monómeros de PhoP, en primer lugar. La tercera unidad de repetición presenta un grado de conservación muy bajo (R_i -4,5 bits) por lo que constituye una repetición inestable (E_U), la unión a ésta se ve facilitada por la presencia de otra unidad de repetición (DRu-4) con un mayor grado de conservación (R_i 8,2 bits), repetición de extensión de apoyo (E_S). Esto se corresponde con los dos complejos de unión detectados mediante el análisis de EMSA (Figura 3.26). En un primer momento se da la unión de dos monómeros de PhoP a las repeticiones núcleo formándose un complejo de unión. El aumento de la concentración de proteína provoca la unión de otros dos monómeros a las repeticiones E_U y E_S formando otro complejo de unión constituido por cuatro monómeros de PhoP por lo que presenta un mayor retraso de la movilidad electroforética que el primer complejo.

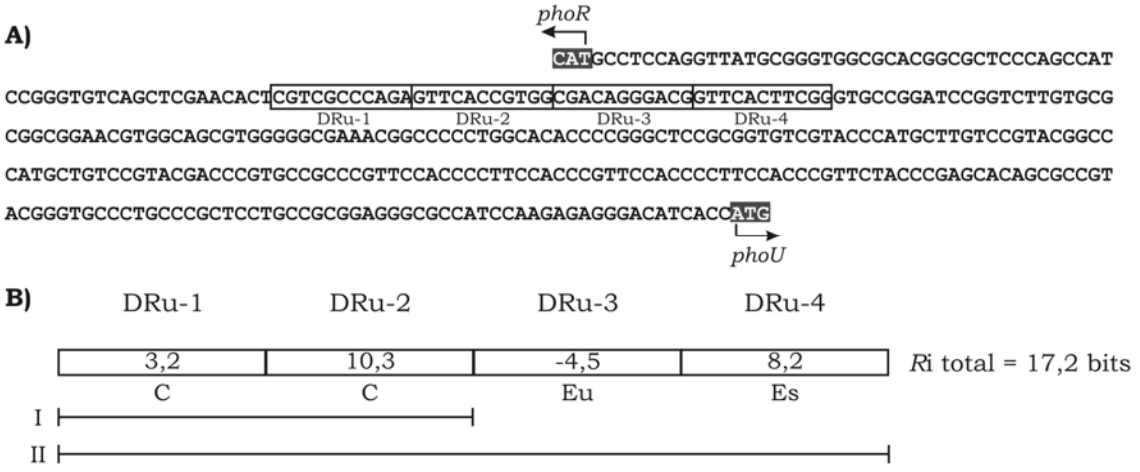


Figura 3.28: Análisis de la conservación de los sitios de unión de PhoP en la zona intergénica de *phoRP-U* en *S. tacrolimicus*. A) Secuencia de la región intergénica *phoRP-U*. Mediante cajas se indican las unidades de repetición directa reconocidas por PhoP (DRu1-4). En un recuadro negro se indica el codón de inicio de *phoR* y *phoU*. **B)** Contenido en información (*Ri*) en bits de cada unidad de repetición que se representa con un rectángulo. En la parte inferior de cada repetición se especifica la estructura de la misma; así C: núcleo, E_U: extensión inestable y E_S: extensión de soporte. Las barras con número romanos indican las DRus que abarcan los dos complejos de unión que se forman entre monómeros de la proteína PhoP y la zona intergénica *phoRP-U.*

Este resultado nos indica que PhoP regula la expresión de *phoRP* y de *phoU* en *S. tacrolimicus*, seguramente activando la expresión de los mismos como se ha visto que ocurre en *S. coelicolor* (Sola-Landa *et al.,* 2008).

Capítulo IV

3.4. Control por fosfato de la biosíntesis de tacrolimus por la especie `S. tsukubaensis´

3.4.1. Estabilización génica de *`S. tsukubaensis´*

El género *Streptomyces* presenta una alta tasa de inestabilidad génica, rasgo que le permite una rápida adaptación a las adversas y variables condiciones de su medio natural, que es el suelo (ver introducción 1.2.2). La tasa de inestabilidad es dependiente de la especie presentando alguna de ellas variaciones muy rápidas, como es el caso de *`S. tsukubaensis´*. Aunque la inestabilidad génica suponga un rasgo ventajoso para la adaptación al medio, supone una característica indeseable para la realización de un estudio riguroso a nivel de Biología Molecular de esta especie. Así, el primer trabajo realizado consistió en la obtención de una cepa estable de la especie *`S. tsukubaensis´*.

El cultivo original de la especie *`S. tsukubaensis´* fue obtenido de la colección de cultivo *Agricultural Research Service* (ARS) en la que se encuentra depositada con el número NRRL 18488. Los primeros estudios realizados con la misma se basaron en la determinación de medios de crecimiento y de esporulación, encontrándose que el medio ISP4 es uno de los pocos medios en el que se consigue una abundante formación de esporas. En el medio ISP4 se obtuvieron diversas morfologías para esta cepa, de manera mayoritaria se observaron colonias con una abundante formación de esporas de color gris intenso y en menor medida colonias blancas con esporulación deficiente (Figura 3.29). En algunos cultivos también se observó la presencia de colonias calvas debido a perdida de la capacidad de producción de micelio aéreo.

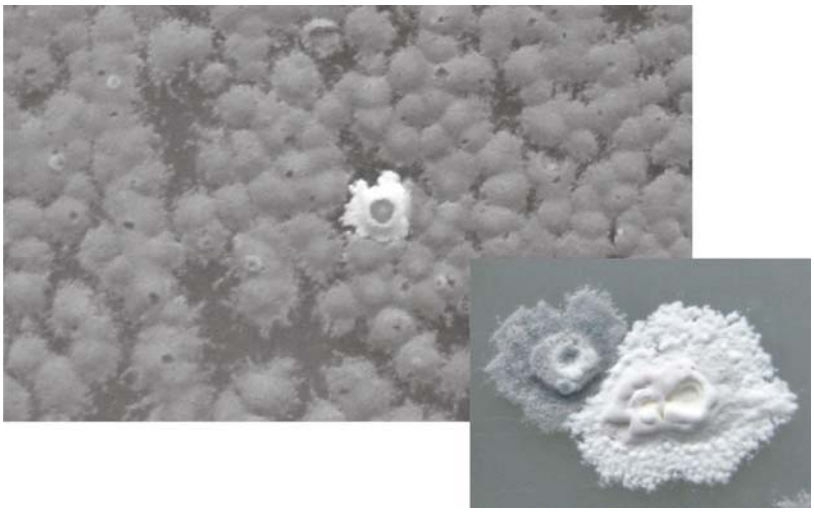


**Figura 3.29: Aspecto morfológico de la especie *`S. tsukubaensis´* en ISP4.** Cultivos en ISP4 de *`S. tsukubaensis´* durante 10 días a 28ºC. En la fotografía de la izquierda se pueden observar las diferencias morfológicas presentadas por diferentes cepas de *`S. tsukubaensis´,* así como la mayor proporción de colonias grises. A la derecha, los dos tipos de morfologías mayoritarias aisladas.

Con el objetivo de seleccionar una cepa de *`S. tsukubaensis´* genéticamente estable se realizaron rondas de esporulación en medio ISP4 (incubación a 28ºC durante al menos 10 días). Se fueron seleccionando colonias que mantuvieran una determinada morfología y se eligieron aquellas colonias que mantenían dicha morfología en sucesivas rondas. Así, se seleccionaron diferentes colonias que presentaban la formación de esporas de coloración

grisácea y algunas colonias que presentan el fenotipo blanco. Finalmente, se eligió una de las colonias de fenotipo gris para los trabajos posteriores, ya que era el fenotipo mayoritario en el cultivo original y se comprobó mediante fermentación en medio líquido que dicha cepa presentaba la capacidad para la producción de tacrolimus y también de ascomicina, aunque en menor proporción (aproximadamente un 10 % pero es dependiente del medio de producción). En la figura 3.30 se puede observar la heterogeneidad morfológica presentada por los primeros cultivos de *`S. tsukubaensis´* en ISP4 y la mayor homogeneidad presentada tras la estabilización de la cepa.

Todas las suspensiones de esporas preparadas han sido analizadas fenotípicamente, de manera que se ha mantenido el fenotipo gris durante todo el trabajo realizado con esta especie.

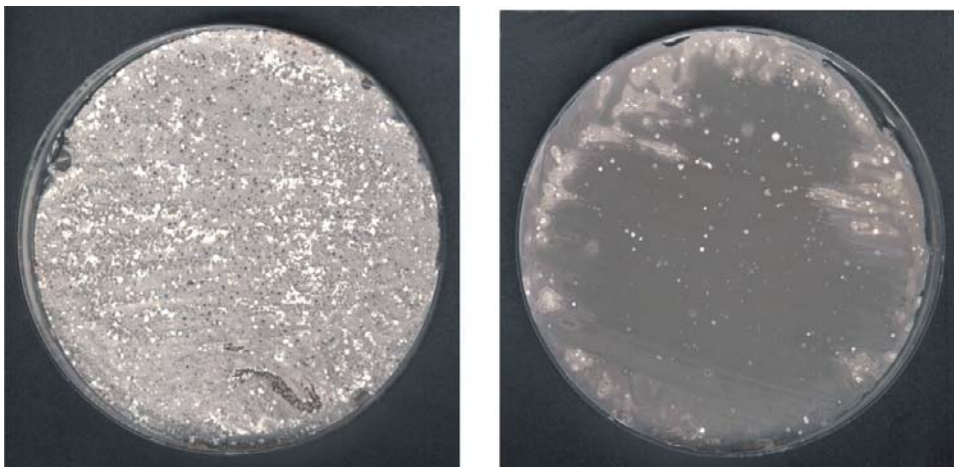


**Figura 3.30: Estabilización genética de la especie *`S. tsukubaensis´*.** En el panel de la izquierda se recoge un cultivo en ISP4 de la cepa original de *`S. tsukubaensis´* y en el panel de la derecha un cultivo en ISP4 tras la selección de una cepa más estable de esta especie.

3.4.2. Optimización de medios para la producción de tacrolimus por la especie *`S. tsukubaensis´* : influencia de la concentración de fosfato

El control exacto de la concentración de fosfato existente en el medio de producción sólo se puede llevar a cabo en medios definidos. Además este tipo de medios, por lo general, se compone de ingredientes con mejor solubilidad que los compuestos que integran los medios complejos por lo que ofrecen muestras de micelio más limpias para estudios de transcriptómica o proteómica. Así, se planteó el desarrollo de un medio definido para la producción de tacrolimus por *`S. tsukubaensis´* como base para la realización de posteriores estudios con esta cepa.

Primeros análisis: Optimización de medios definidos.

Los primeros ensayos de producción en medio definido se llevaron a cabo en el medio desarrollado por Yoon y Choi (1997) (ver resultados 3.3.4) y en medio **SA** optimizado para

S. clavuligerus, especie muy cercana filogenéticamente a *`S. tsukubaensis´*. En medio SA (Aidoo *et al.*, 1994) el crecimiento de *`S. tsukubaensis´* es muy pobre; en cambio en el medio desarrollado por Yoon y Choi (**YC**) se observa un buen crecimiento y una producción de tacrolimus del orden de 5 µg/ml. Sobre este último medio se realizaron ligeras modificaciones con el objetivo de mejorar la producción y analizar el efecto del fosfato sobre la misma:

- Aumento de la cantidad de almidón a 60 g/l.
- Adición de L-lisina·HCl a una concentración de 2,5 g/l (Goranovic *et al.*, 2010).
- Análisis de diferentes concentraciones de fosfato. El fosfato se añade en forma de mezcla de sales K_2HPO_4/KH_2PO_4, de manera que la adición del mismo (tras el autoclavado de los medios) no varíe el pH.

Condiciones de fermentación

- Todos los cultivos se realizan en matraces lisos ya que las indentaciones provocan la formación de una gran cantidad de espuma.
- La adición de glucosa, de $FeSO_4·7H_2O$ y de las sales de fosfato se realiza tras el proceso de autoclavado; para lo cual previamente las soluciones son esterilizadas por filtración.
- Cultivo de preinóculo → 100 ml de medio (en matraces de 500 ml) se inocularon con una suspensión de esporas de *`S. tsukubaensis´* a una concentración final de 10^7 UFC/ml. El cultivo se incubó a 28ºC en agitación orbital a 220 rpm durante 38 horas. El crecimiento se analizó mediante medida de la densidad óptica (DO) a 600nm.
- Cultivo de producción → 100 ml de medio (en matraces de 500 ml) se inocularon con el volumen de cultivo de preinóculo necesario para conseguir una DO_{600} final de 1. El cultivo se incubó a 28ºC durante 5 días. Los cultivos de producción se realizaron por duplicado (ya que son pruebas de optimización) inoculando ambos cultivos con el mismo cultivo de preinóculo.

Efecto de la lisina

La lisina es uno de los precursores (formación del ácido pipecólico) del anillo macrólido que conforma la molécula de tacrolimus, por lo que es lógico esperar que la suplementación de los medios de fermentación con este aminoácido suponga un incremento de la producción. En los cultivos de *`S. tsukubaensis´* en medio YC la adición de lisina (2,5 g/l) supone un ligero aumento del crecimiento del microorganismo y un aumento de la producción de tacrolimus en un 100 %, pasando de valores de producción de 4 µg/ml a valores de 8 µg/ml (Datos no mostrados).

Efecto de la concentración de fosfato

Una vez comprobado el efecto positivo de la lisina sobre la producción de tacrolimus por *`S. tsukubaensis´*, los ensayos con diferentes concentraciones de fosfato se realizaron por duplicado sobre el medio YC con 2,5 g/l de lisina (**YCL**). La concentración de fosfato definida inicialmente para el medio YC (2,9 mM de fosfato) se tomó como referencia de concentración baja y se analizaron otras dos concentraciones más altas, 15 y 30 mM (Figura 3.31). Se

eligieron estos valores ya que en otras especies de *Streptomyces* como *S. coelicolor* y *S. ambofaciens*, concentraciones de fosfato de 5 mM y 15 mM respectivamente, producen inhibición de la producción de metabolitos secundarios (Doull y Vining, 1990; Lounès *et al.*, 1996).

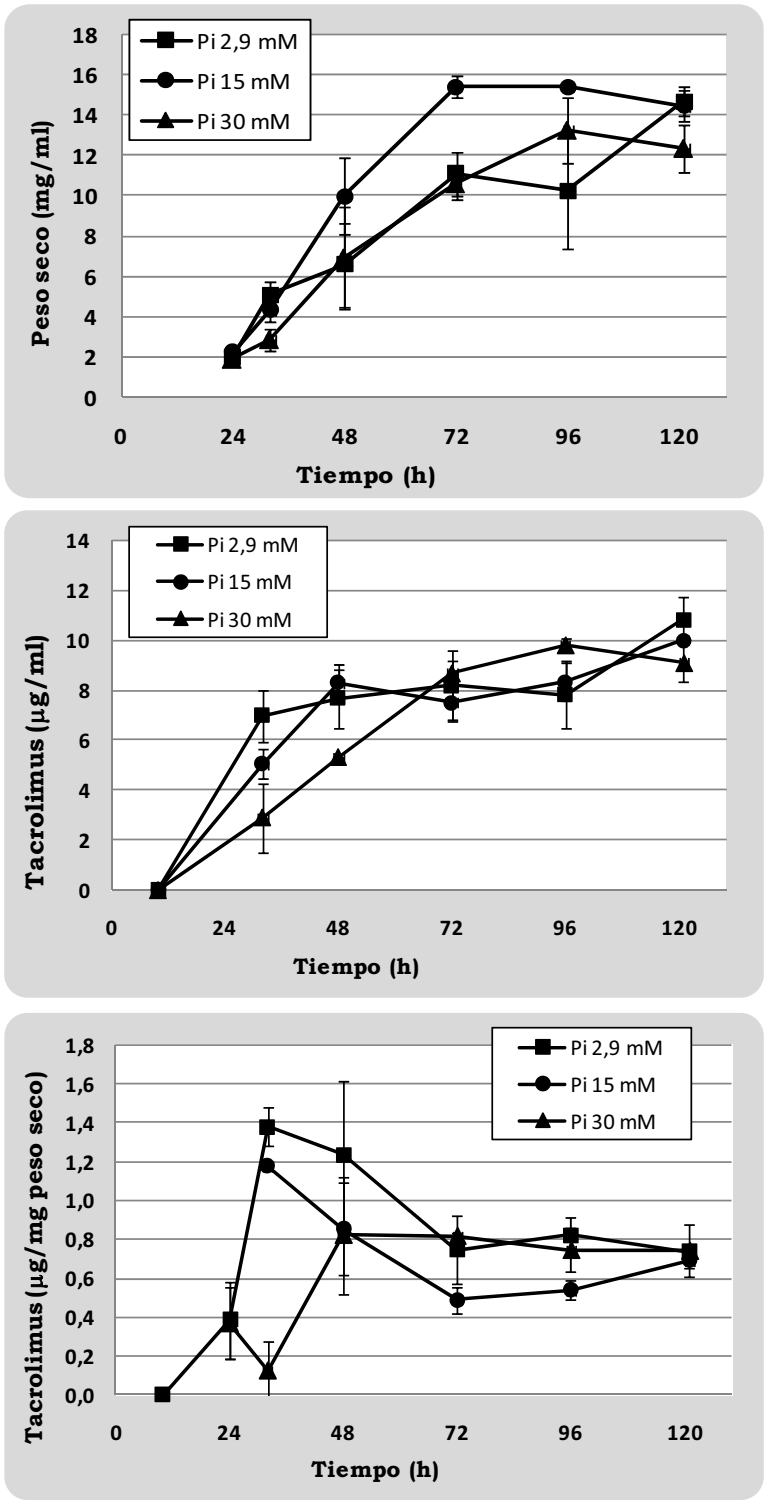


Figura 3.31: Efecto de la concentración de fosfato en medio YCL sobre la producción de tacrolimus. Análisis del crecimiento [peso seco (mg/ml)] y producción de tacrolimus volumétrica [Tacrolimus (µg/ml)] y producción específica [Tacrolimus (µg/mg peso seco)] en medio YCL con diferentes concentraciones de fosfato 2,9 mM, 15 mM y 30 mM por la especie *`S. tsukubaensis´*. Se indica la desviación estándar de cada punto mediante líneas verticales.

En general, el aumento de la concentración de fosfato tiene un efecto negativo en la producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, en la producción de tacrolimus por *`S. tsukubaensis´* en medio YCL sólo se observa este efecto del fosfato a tiempos muy

tempranos de fermentación igualándose los valores de producción a las 96 horas. El efecto negativo del fosfato en la producción de tacrolimus puede estar enmascarado por la carencia de algún otro elemento en el medio que provoque la entrada en fase exponencial sin alcanzar condiciones limitantes de fosfato o por la existencia de una regulación cruzada entre el fosfato y otro elemento que mitigue el efecto inhibitorio de este último.

Análisis del medio MG para la producción de tacrolimus. Efecto del fosfato

Según los resultados anteriores, el medio YCL no es el adecuado para los estudios de control por fosfato. La concentración de fosfato no ejerce un claro efecto regulador sobre la producción de tacrolimus en medio YCL por lo que se propuso el estudio de otros medios definidos. Así, se seleccionó el medio MG que es el medio utilizado en los estudios de regulación por fosfato en el organismo modelo *S. coelicolor* (Rodríguez-García *et al.*, 2007). El medio MG se compone de las siguientes sustancias (1 litro):

Almidón (Scharlau)	50 g
Ácido glutámico (Sigma)	8,83 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
$CaCl_2$	1 mg
NaCl	1 mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	9 mg
MOPS ácido (Sigma)	21 g
Elementos traza 10X	0,45 ml

pH 6,5 con NaOH

Elementos traza (para 10 ml de 100X)	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	39,0 mg
H_3BO_3	5,7 mg
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	3,7 mg
$MnSO_4 \cdot 1H_2O$	6,1 mg
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	880,0 mg

El **almidón** es una sustancia que presenta diferentes propiedades dependiendo del proveedor, por lo que se ensayaron diferentes almidones (Scharlau, Difco y Panreac) con el objeto de encontrar las mejores condiciones para la producción de tacrolimus por `*S. tsukubanesis*´.

Condiciones de fermentación

- La adición de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ tras el proceso de autoclavado; para lo cual previamente la solución es esterilizada por filtración.
- Inóculo del medio directamente con esporas (10^7 esporas/ml) sin cultivo de preinóculo.
- Cultivos de 100 ml en matraces lisos de 500 ml (28ºC en agitación orbital a 220 rpm).

El crecimiento en MG es mucho más lento de lo observado en YC debido a que el cultivo se inicia desde esporas, las cuales necesitan un tiempo más largo para germinar y alcanzar una alta concentración de biomasa. Debido a un crecimiento más lento, la producción también se da a tiempos más tardíos de fermentación.

El tipo de almidón ejerce una acusada influencia en la producción de tacrolimus en el medio MG. Así, en la fermentación en medio MG preparado con almidón de Difco en lugar de almidón de Scharlau (MG control) se consiguió una producción 4 veces superior (Figura 3.32).

Los posteriores estudios de la influencia de fosfato en la producción de tacrolimus se realizaron en medio MG modificado preparado con **almidón Difco** (**MGm**); el resto de componentes se mantuvo como en el medio MG especificado al comienzo de este apartado.

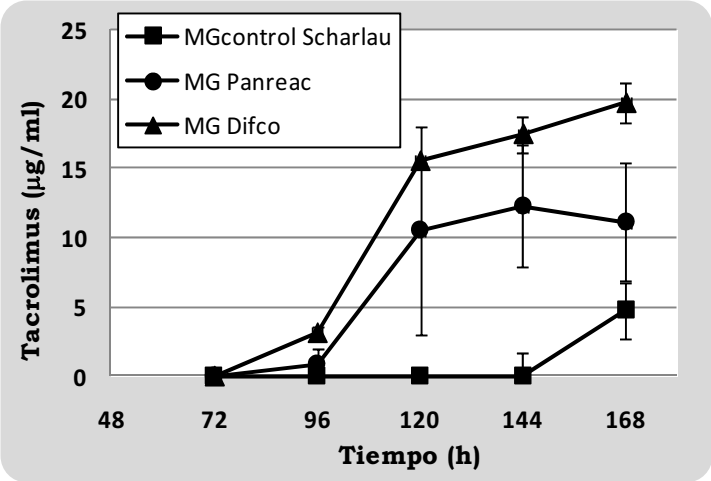


**Figura 3.32: Efecto del tipo de almidón utilizado en el medio MG sobre la producción de tacrolimus por la especie *`S. tsukubaensis´*.** Análisis de producción volumétrica de tacrolimus por la especie *`S. tsukubaensis´* en medio MG con almidones de diferentes proveedores. Se indica la desviación estándar de cada punto mediante líneas verticales.

Influencia del fosfato en la producción de tacrolimus

Se analizaron tres concentraciones diferentes de fosfato en el medio MGm: 2,5 mM se eligió como condición limitante de fosfato tomando como referencia lo observado en *S. coelicolor* (Doull y Vining, 1990; Santos-Beneit *et al.*, 2008) y dos concentraciones más altas 10 y 20 mM (concentraciones a las cuales se ha observado un efecto negativo de fosfato en la producción de metabolitos secundarios en otras especies de *Streptomyces*). Cada condición se analizó por triplicado (Figura 3.33).

Condiciones de fermentación

- La adición las soluciones filtradas de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y de las sales de fosfato se realiza tras el proceso de autoclavado.
- La mezcla de sales de fosfato se preparó de tal manera que el pH de la mezcla sea similar al pH del medio de forma que la adición no provoque un cambio de pH en el medio. Se comprobó, experimentalmente, que la mezcla K_2HPO_4 0,45 M/KH_2PO_4 0,55 M presenta un valor de pH próximo a 6,5.
- Los valores de potasio fueron compensados antes de ajustar el pH, así los medios de concentraciones de fosfato 2,5 y 10 mM fueron suplementados con KOH, de manera que todos los medios de producción tuviesen la misma concentración final de potasio.
- Cultivos de 100 ml en matraces lisos de 500 ml.
- Incubación a 28ºC en agitación orbital a 220 rpm.

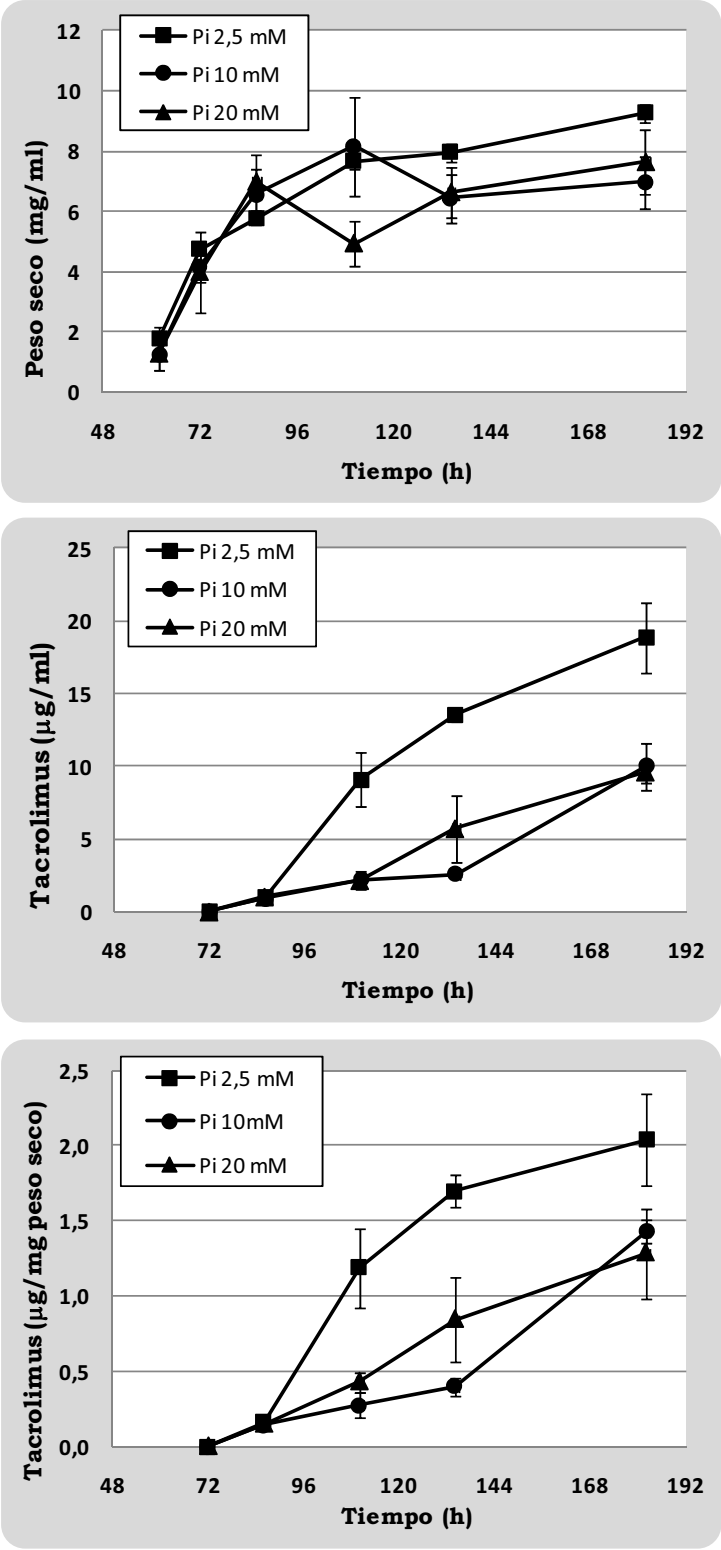


**Figura 3.33: Efecto de la concentración de fosfato en la producción de tacrolimus en el medio MGm por la especie *`S. tsukubaensis´*.** Análisis del crecimiento [peso seco (mg/ml)] y la producción volumétrica de tacrolimus (µg/ml) y específica (µg/mg de peso seco) por la especie *`S. tsukubaensis´* en medio MGm con diferentes concentraciones de fosfato: 2,5, 10 y 20 mM. Se indica la desviación estándar de cada punto mediante líneas verticales.

Como se observa en las gráficas, un **aumento** de la concentración de **fosfato** en el medio MGm provocó una **represión** de la producción de **tacrolimus** por *`S. tsukubaensis´*. Así, a una concentración de 10 mM la producción se redujo a la mitad de los valores obtenidos a una concentración de 2,5 mM. La reducción de la producción fue similar para los valores de fosfato de 10 y 20 mM, lo que indica que una concentración de 10 mM de fosfato ya supone un exceso del mismo.

Además, en las fermentaciones de *`S. tsukubaensis´* se observó una producción de pigmentos dependiente de la concentración de fosfato; en la condición de fosfato de 2,5 mM (condición de mayor producción de tacrolimus) se detectó un pigmento de color verde grisáceo muy intenso que no se produjo en el resto de condiciones (Figura 3.34). La aparición del pigmento coincidió en el tiempo con el inicio de la producción de tacrolimus.

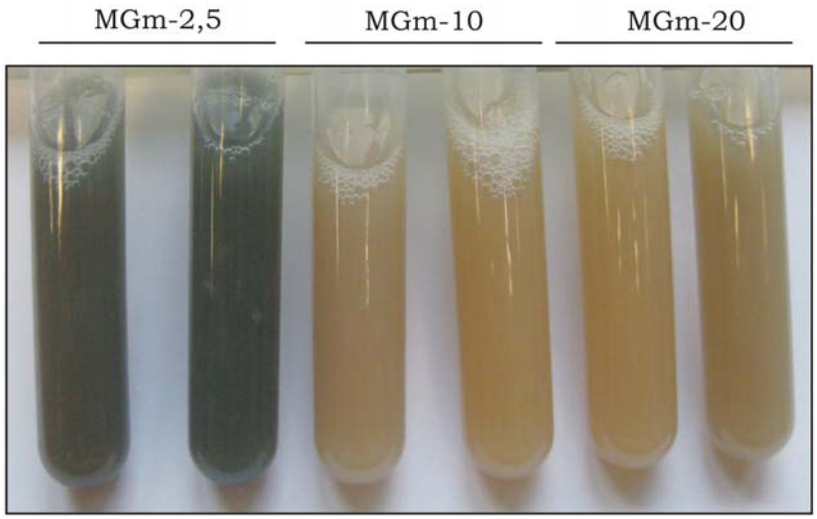


**Figura 3.34. Color de los caldos de cultivo de *`S. tsukubaensis´* en el medio MGm.** La especie *`S. tsukubaensis´* produce en medio MGm con 2,5 mM de fosfato (MGm-2,5) un pigmento que oscurece intensamente el medio, mientras que si la concentración de fosfato es de 10 mM (MGm-10) o de 20 mM (MGm-20) dicho pigmento no aparece.

Teniendo en cuenta los anteriores resultados se puede establecer la concentración de fosfato de **2,5 mM** (MGm-2,5) como **condición limitante** y la concentración de **10 mM** (MGm-10) como **condición de exceso**. Con el objetivo de confirmar estas condiciones se analizó el patrón de consumo de fosfato por *`S. tsukubaensis´*, para lo cual se determinó la cantidad de fosfato inorgánico presente en cada tiempo de muestreo mediante el método colorimétrico de verde malaquita (ver materiales y métodos 2.20).

En la condición MGm-2,5 el fosfato se consume casi en su totalidad (Figura 3.35), descendiendo hasta valores por debajo de 0,1 mM, en unas 86 horas de fermentación. Este tiempo coincide con la entrada en fase exponencial y el inicio de producción de tacrolimus. En el momento en que se produce la situación de escasez de fosfato se inicia una respuesta general de la célula probablemente mediada por el sistema de dos componentes PhoR-P. Sin embargo, en la condición de MGm-10 el fosfato no llega a consumirse por completo por lo que no se alcanza una situación de escasez de fosfato. Así que, la escasez de algún otro nutriente será el desencadenante de la producción de tacrolimus aunque no llega a valores tan altos como en la condición de escasez de fosfato (MGm-2,5). El medio MGm permite un análisis preciso de la regulación debida la escasez de fosfato ya que se ha podido determinar con exactitud las condiciones limitantes y de exceso de fosfato.

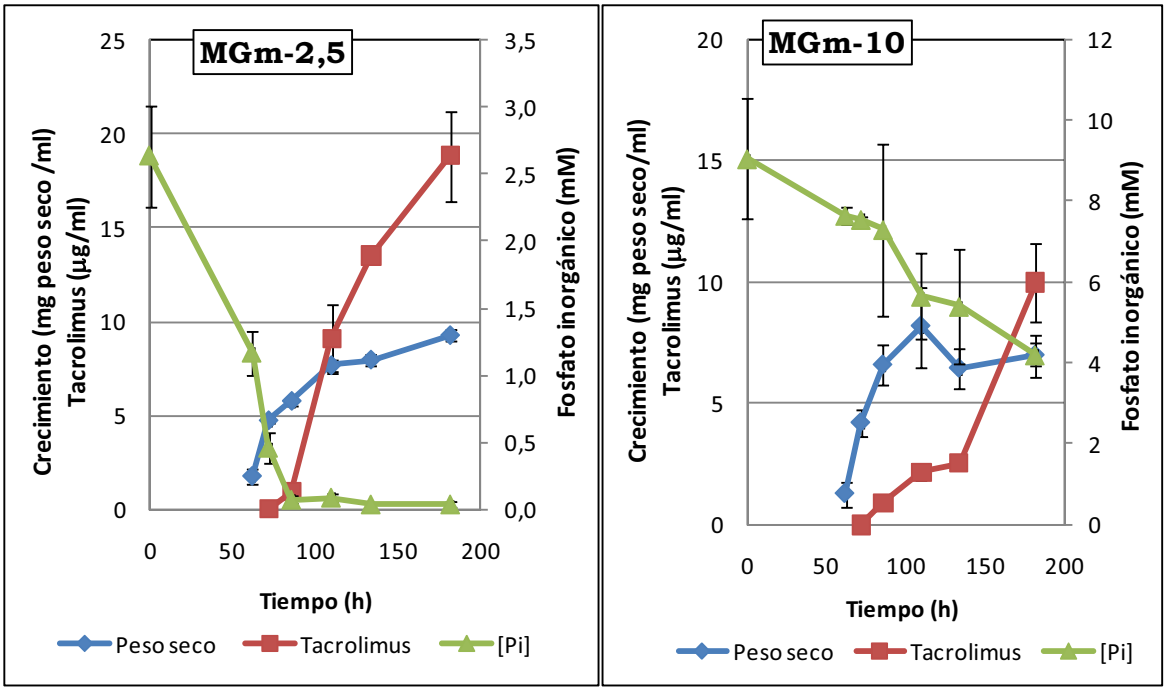
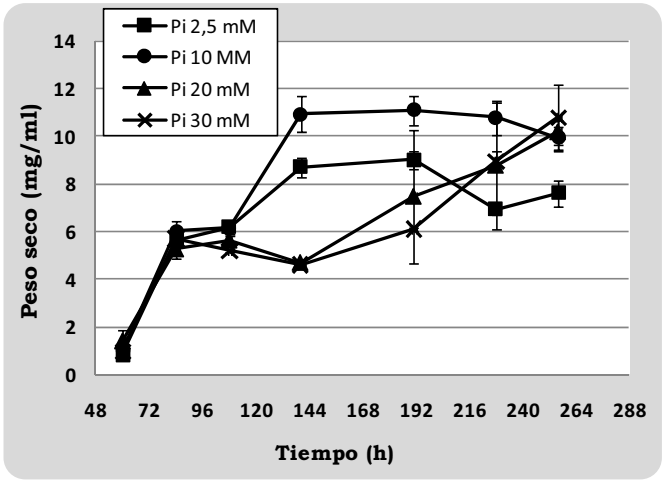


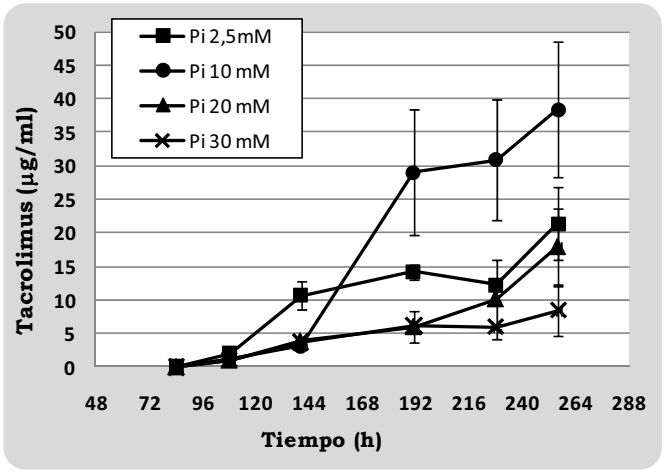
Figura 3.35. Consumo de fosfato en medio MGm. Análisis de la concentración de fosfato inorgánico [Pi] existente en el medio durante la fermentación de `*S. tsukubaensis*´ en medio MGm suplementado con dos concentraciones diferentes de fosfato 2,5 mM (MGm-2,5) y 10 mM (MGm-10). El patrón de consumo de fosfato se representa en relación al crecimiento [peso seco (mg/ml)] y la producción de volumétrica de tacrolimus (µg/ml). Se indica la desviación estándar de cada punto correspondiente a tres medidas mediante líneas verticales.

Regulación cruzada fosfato/lisina

La lisina es un precursos del anillo macrólido que forma la molécula de tacrolimus, así como también lo es de la rapamicina. Se ha demostrado que la adición de lisina a medios de cultivo de *S. hygroscopicus* provoca un aumento de la producción de rapamicina (Cheng *et al.*, 1995b). Teniendo en cuenta estos datos se planteó el análisis de la influencia de la lisina sobre la producción de tacrolimus por la especie `*S. tsukubaensis*´ a diferentes concentraciones de fosfato.

Los cultivos se realizaron por triplicado en medio MGm suplementado con 2,5 g/l de L-lisina·HCl [cantidad optimizada en el trabajo de Goranovic y colaboradores (2010)] y cuatro concentraciones diferentes de fosfato: 2,5 mM, 10 mM, 20 mM y 30 mM (Figura 3.36). Las condiciones de fermentación son las mismas que las descritas en el anterior apartado.





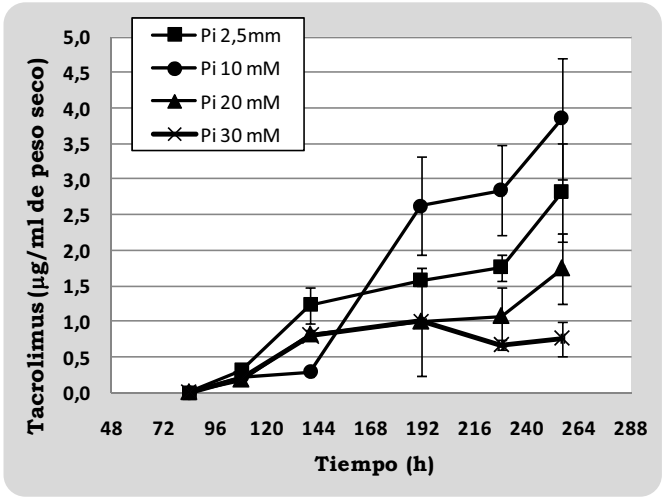


Figura 3.36: Regulación cruzada por fosfato/lisina. Análisis del crecimiento [peso seco (mg/ml)] y la producción volumétrica (µg/ml) y específica (µg/mg de peso seco) de tacrolimus por *`S. tsukubaensis´* en medio MGm suplementado con lisina (2,5 g/l). Se indica la desviación estándar de cada punto mediante líneas verticales.

La adición de **lisina** al medio MGm provocó un **aumento de la producción de tacrolimus** pasando de una producción máxima entorno a 20 µg/ml (ver figura 3.33) a unos valores del orden de 30 µg/ml (ver figura 3.36) en el mismo tiempo de fermentación (192 horas). Además, también se observó un **cambio en el patrón de regulación del fosfato**. Así,

en medio sin lisina a una concentración de fosfato de 2,5 mM se obtienen los mayores valores de producción mientras que a valores más altos como 10 mM de produce un descenso de producción. En cambio, la presencia de lisina en el medio mitiga el efecto inhibitorio del fosfato obteniéndose la mayor producción a 10 mM de fosfato y un descenso de producción a una concentración de 20 mM.

La lisina y el fosfato se pueden unir mediante enlaces por puente de hidrógeno $N^{+}H\cdots\cdots O^{-}P$ (Burget y Zundel, 1986), de manera que la presencia de lisina provoca que el fosfato presente en el medio asimilable por el organismo sea menor ya que una parte se encuentra unido a dicho aminoácido. Esto puede explicar que la adición de lisina provoque un aumento de la concentración de fosfato con efecto represivo sobre la producción.

Efecto de agentes estresantes en la producción de tacrolimus

La especie *`S. tsukubaensis´* experimenta cambios morfológicos ante ciertas situaciones de estrés. Así, tras largos periodos de incubación en medio sólido ISP4, en ocasiones se observa la aparición de un pigmento de color rosa debido probablemente a un estrés nutricional. Dicho pigmento también se ha observado provocado por un aumento de pH de 7 a 9 o en cultivos con concentraciones subinhibitorias de antibióticos, como la apramicina.

Es probable, que tanto la producción del pigmento rosa como la producción de tacrolimus estén reguladas por mecanismos similares de control del metabolismo secundario. Con el objetivo de analizar la influencia del estrés en la producción de tacrolimus se realizaron fermentaciones de *`S. tsukubaensis´* en medios suplementados con agentes estresantes: **dimetilsulfóxido** (DMSO), sustancia que estimula el metabolismo secundario en varias especies de *Streptomyces* mediante un mecanismo desconocido (Chen *et al.*, 2000; Butler y Cundliffe, 2001) y **tiosulfato de sodio** (Na_2SO_3), sustancia implicada en el metabolismo del azufre que provoca un aumento de producción en *S. clavuligerus* (Nardiz *et al.,* 2010).

Los cultivos se realizaron por duplicado en medio MGm con una concentración de fosfato de 2,5 mM en las condiciones anteriormente detalladas (página 198). Se analizaron dos concentraciones diferentes de las dos sustancias estresantes: DMSO (1,5 y 3%) y tiosulfato de sodio (3 y 5 mM). La adición de DMSO y tiosulfato se realizó a las 72 horas del inicio de la fermentación, en plena fase exponencial para evitar la toxicidad de estos compuestos sobre las etapas inciales del crecimiento.

Como se puede observar en las siguientes gráficas (Figura 3.37) tanto el DMSO como el tiosulfato de sodio estimulan la producción de tacrolimus por *`S. tsukubaensis´*, efecto que no depende de un aumento de biomasa. La adición de un 1,5 % de DMSO al medio de fermentación provoca un aumento de producción cercano al 100 % mientras que el efecto del tiosulfato de sodio es más débil aumentando la producción en un 25 %. El DMSO también

provoca la aparición del pigmento rosa característico de `*S. tsukubaensis*´ en situaciones de estrés (Figura 3.38), relacionándose una situación de estrés con la activación del metabolismo secundario.

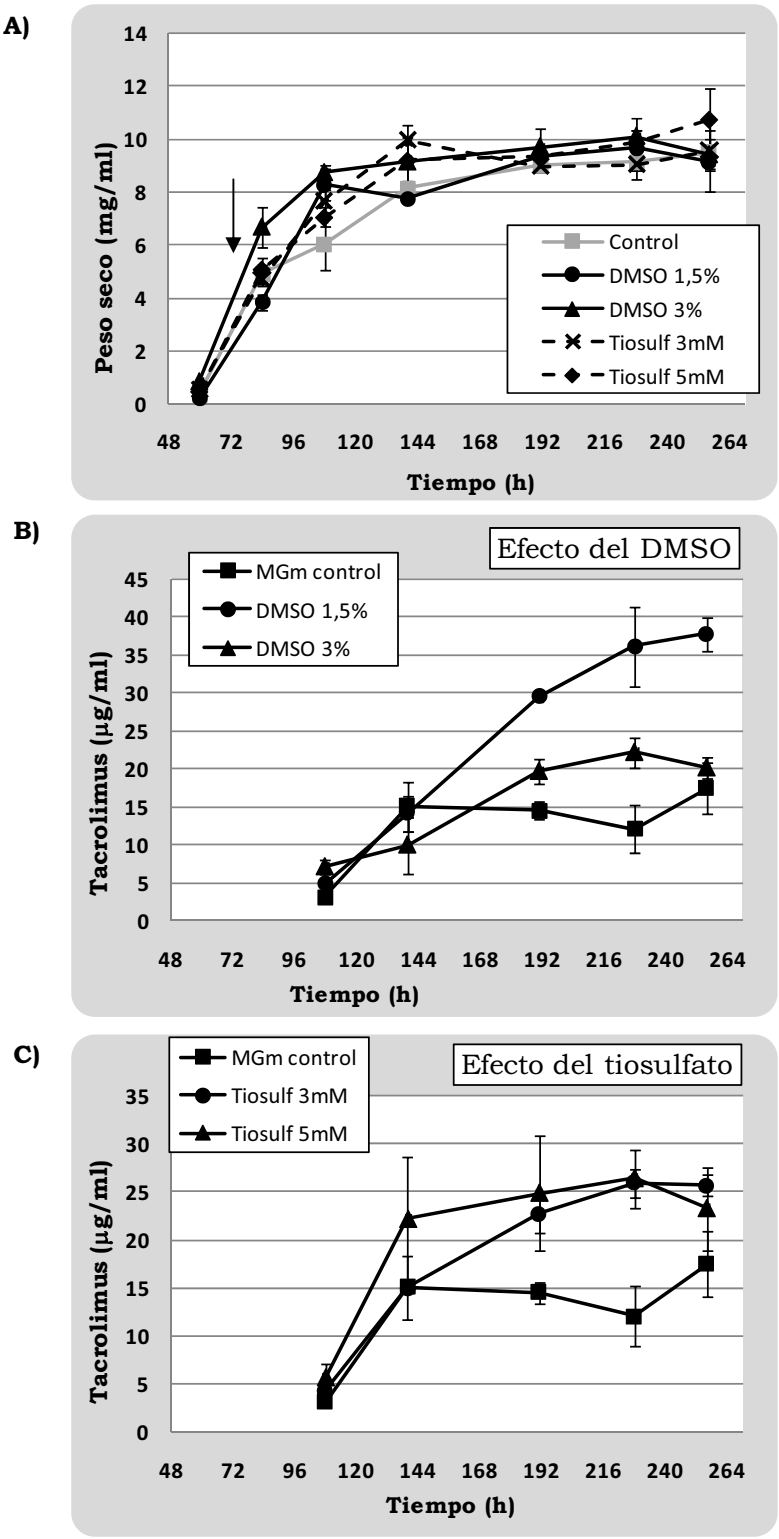


Figura 3.37. Efecto del DMSO y el tiosulfato en el crecimiento y producción de tacrolimus por la especie `*S. tsukubaensis*´. A)** Análisis del crecimiento [peso seco (mg/ml)] de `*S. tsukubaensis*´ en medio MGm suplementado con DMSO (1,5 y 3 %) o con tiosulfato (3 y 5 mM). Con una flecha se indica el momento (fase exponencial) en el que el cultivo es suplementado con el agente estresante. **B) Análisis de la producción volumétrica de tacrolimus en el medio MGm suplementado con DMSO (1,5 y 3 %). **C)** Análisis de la producción volumétrica de tacrolimus en el medio MGm suplementado con Tiosulfato (3 y 5 mM). Se indica la desviación estándar de cada punto mediante líneas verticales.

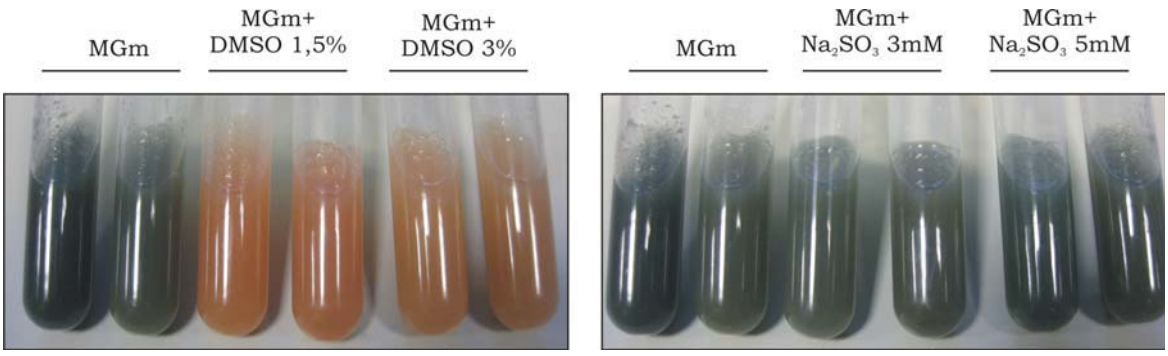


**Figura 3.38. Color de los caldos de cultivo de `*S. tsukubaensis*´ en medio MGm suplementado con DMSO o tiosulfato de sodio.** La especie `*S. tsukubaensis*´ produce en medio MGm suplementado con dimetilsulfóxido (DMSO) un pigmento que tiñe el medio de color rojizo. En cambio la adición de tiosulfato de sodio (Na_2SO_3) no provoca ningún cambio de color en el medio en relación al cultivo control MGm.

3.4.3. El sistema de dos componentes PhoR-P en `*S. tsukubaensis*´

Análisis de la secuencia de PhoR y PhoP

La secuencia de la región génica que contiene los genes *phoRP* se obtuvo del proyecto de secuenciación del genoma de `*S. tsukubaensis*´ llevado a cabo en el Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC). Al igual que en otras especies de *Streptomyces*, los genes *phoRP* se encuentran adyacentes en el genoma en el mismo sentido, solapando el codón de inicio de *phoP* con el codón de fin de *phoR*. También *phoU* mantiene la misma sintenia localizándose en sentido contrario en posición 5´ de *phoR*. El sistema PhoR-P está muy conservado presentando PhoR la máxima identidad con su ortólogo en *Streptomyces pristinaespiralis* (86 %) y PhoP con sus ortólogos en *Streptomyces albus* y *S. clavuligerus* (98 %). La proteína PhoR presenta los dominios característicos de las proteínas sensoras quinasas y PhoP los característicos de los reguladores de respuesta de la familia OmpR/PhoB.

La zona adyacente en 3´ de *phoP* presenta la misma sintenia en todas las especies de *Streptomyces* que se han analizado (Figura 3.39). En cambio, en la región en 3´ de *phoU* se observan diferentes organizaciones génicas encontrándose algunos genes ortólogos entre varias especies.

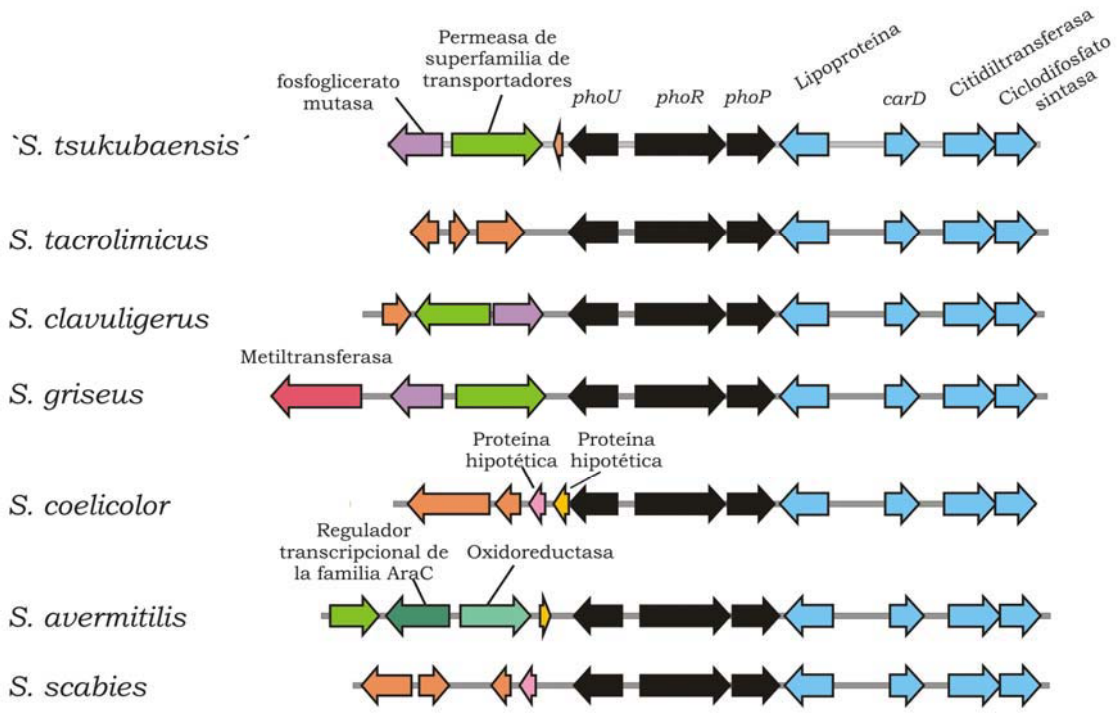


Figura 3.39. Organización génica en la región adyacente a los genes *phoRP*. Comparación de la organización génica en la región *phoRP* de *`S. tsukubaensis¨* con la de otras especies de *Streptomyces* (detalladas a la izquierda). En negro se indican los genes del regulón *pho*: *phoR*, *phoP* y *phoU*. En azul se recogen los genes que mantienen la misma sintenia en todas las especies. Los genes ortólogos aparecen del mismo color y en naranja se indican las proteínas hipotéticas de las que no se ha encontrado ortólogo en la región analizada.

3.4.4. Inactivación del sistema de dos componentes PhoR-P

Deleción de *phoP* y *phoR-P* mediante REDIRECT

Esta técnica se basa en la sustitución de los genes de interés en el genoma de *Streptomyces* por recombinación doble entre un cósmido recombinante y el genoma (ver materiales y métodos 2.18). Por lo tanto, el primer paso para llevar a cabo la deleción de los genes *phoP* y *phoRP* en *`S. tsukubaensis´* consistió en la localización de los cósmidos de la librería génica que hubiesen incorporado un fragmento de ADNt en el cual se encuentren dicho genes.

Localización de los cósmidos positivos para *phoRP* en la genoteca de *`S. tsukubaensis´*

La genoteca de *`S. tsukubaensis´* NRRL 18488 se construyó en SuperCos 1 y se organizó de manera piramidal en placas de microtitulación (ver resultados 3.2.3). El rastreo de la misma para la localización de los cósmidos positivos para *phoRP* se realizó mediante hibridación de colonias *in situ*. La sonda homóloga utilizada para la hibridación se obtuvo mediante PCR con la pareja de cebadores diseñados para *S. tacrolimicus* phoRM1/phoRPD

utilizando ADNt de *`S. tsukubaensis´* como molde. La sonda se compone de 936 pb de la región 3´ de *phoR* y 168 pb de la región 5´ de *phoP* dando un total de 1109 pb. El producto de PCR se purificó desde gel y se marcó con digoxigenina (Sonda phoRPt: 1109 pb).

La hibridación de la placa Máster Total resultó en cinco posiciones positivas: A3, B5, C5, C12 y H3, cada una de las cuales contiene una mezcla de 18 clones (Figura 3.9). Los clones de la genoteca están conservados de manera individual en microtubos de 1,5 ml a -80ºC, por lo que los clones correspondientes a las posiciones positivas (90 clones) fueron refrescados mediante cultivo individual en medio líquido LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) en los pocillos de una placa de microtitulación estéril e incubados durante 16-18 horas a 37ºC. Los cultivos fueron transferidos con un replicador de 96 puntas a una membrana de nailon colocada sobre una placa de medio LA suplementada con ampicilina e incubados durante 16-18 horas a 37ºC. La membrana con las colonias crecidas se separó de la placa y se eliminaron los restos celulares (según materiales y métodos 2.12.1); para finalmente, obtener el ADN correspondiente a cada colonia inmovilizado sobre la membrana. La hibridación de la membrana correspondiente a los clones individuales también se realizó con la sonda phoRPt resultando en los clones positivos **4A3, 6B5, 16C12, 3H3 y 12H3**.

Los clones positivos fueron confirmados mediante hibridación tipo Southern (Figura 3.40), para lo cual el ADNt de *`S. tsukubaensis´* y el ADN cosmídico, aislado mediante lisis alcalina, fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI. La sonda utilizada se obtuvo mediante PCR con la pareja de cebadores específica para *`S. tsukubaensis´* phoRtF/phoRtR utilizando como molde ADNt de *`S. tsukubaensis´*. El producto de PCR se purificó desde gel y se marcó con digoxigenina (Sonda phoRt: 688 pb). Como se observa en la figura 3.40 todos los cósmidos presentan una banda de hibridación positiva con la sonda phoRt y excepto en el caso de 4A3, todas las bandas positivas son del mismo tamaño que la presentada por el ADNt de *`S. tsukubaensis´*.

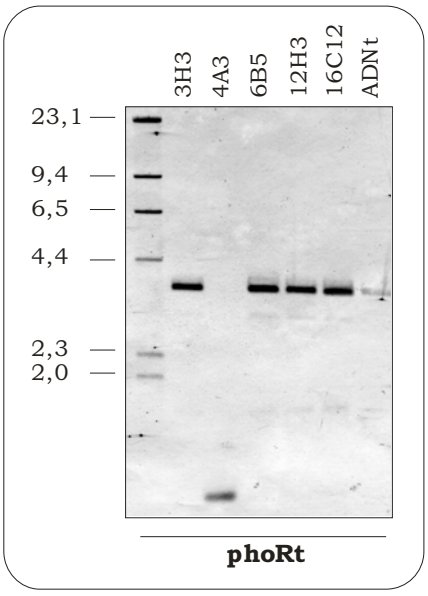


**Figura 3.40: Confirmación mediante hibridación tipo Southern de los cósmidos de *`S. tsukubaensis´* positivos para *phoRP*.** En la parte superior de cada carril se indica el cósmido analizado y el ADNt de *`S. tsukubaensis´* como control. Se utilizó la sonda phoRt para la hibridación. En la parte izquierda se indican los tamaños de las bandas del marcador de tamaño molecular (M) *DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-labeled*.

En este punto del trabajo, se disponía de la secuencia casi completa del genoma de *`S. tsukubaensis´* y se había optimizado en el laboratorio la secuenciación a partir de ADN cosmídico. Por lo tanto, se llevó a cabo la secuenciación de los extremos de los fragmentos de ADN incorporados en los cósmidos positivos para *phoRP* con el fin de determinar exactamente el fragmento acomodado en cada cósmido y por tanto la posición de los genes de interés *phoR* y *phoP* en dicho fragmento. La secuenciación se realizó con los cebadores T3-cos y T7-cos, los cuales hibridan en los extremos del cósmido permitiendo secuenciar los extremos del fragmento incorporado. Como molde se utilizó ADN cosmídico aislado mediante lisis alcalina y purificado con el kit comercial *QIAEX® II Gel Extraction Kit.*

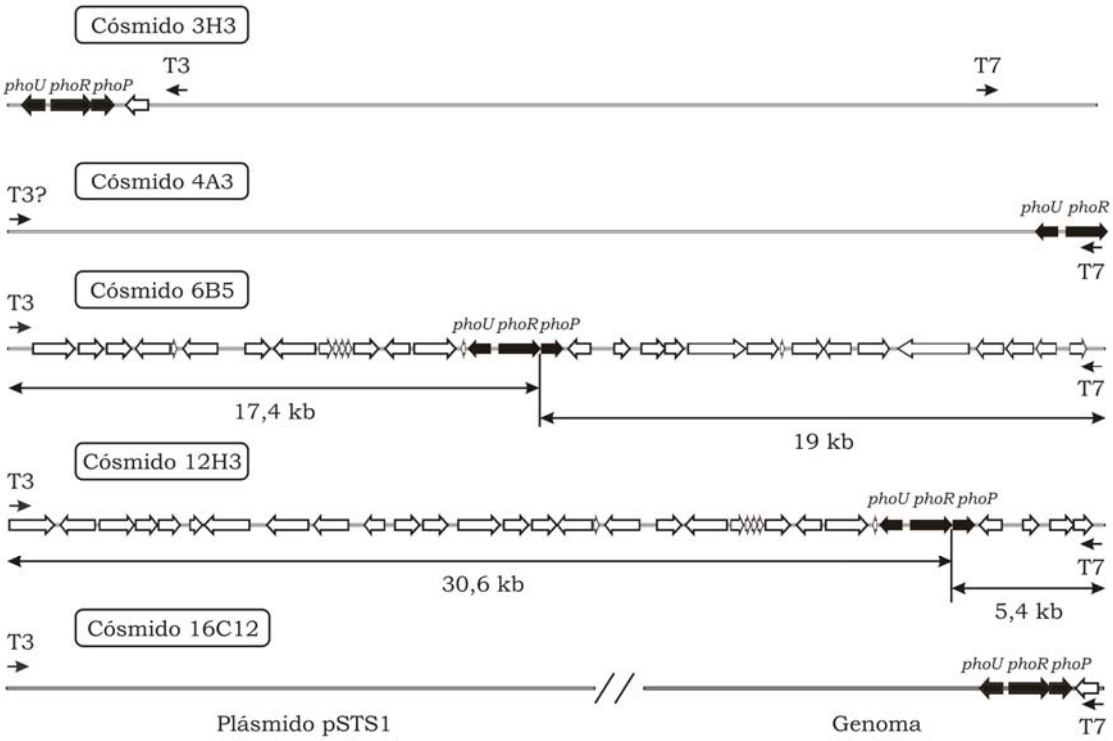


Figura 3.41: Fragmentos del genoma de *`S. tsukubaensis´* **incorporados en los cósmidos positivos para *phoRP*.** Los genes del regulón *pho, phoRP* y *phoU* se indican en negro mientras que el resto de genes aparecen en blanco. La posición de la secuencia de los extremos (T7 o T3) se indica mediante una flecha. Con flechas de doble punta se marca la distancia que existe entre el inicio de *phoP* y cada uno de los extremos del fragmento incorporado en el cósmido correspondiente. En el cósmido 16C12 con el símbolo // se diferencia la parte correspondiente al genoma de la parte correspondiente al plásmido.

La localización de las secuencias de los extremos se realizó mediante alineamiento frente al genoma de *`S. tsukubaensis´*. Así, se localizó el cósmido **6B5** en el que los **genes *phoRP* se localizan centrados** en el fragmento incorporado (a 17,4 y 19 kb de los extremos, respectivamente) (Figura 3.41). En el cósmido 12H3 los genes se localizan cercanos al extremo T7, a una distancia de 5,4 kb mientras que el otro extremo se encuentra a 30,6 kb. De la secuencia del extremo T7 del cósmido 4A3 se deduce que sólo ha incorporado los genes

phoR y *phoU* quedando *phoP* fuera del fragmento incorporado por lo que no fue necesaria la secuenciación del otro extremo; esto explica el menor tamaño de la banda de hibridación de este cósmido (Figura 3.40) ya que ha incorporado parte del fragmento (debido a la presencia de un sitio *Sau*3AI interno) de digestión *Bam*HI/*Eco*RI del ADNt de *`S. tsukubaensis´*. En los cósmidos 3H3 y 16C12 se han producido eventos de reorganización génica; en el primero se ha reorganizado el propio fragmento de ADNt incorporado mientras que en el segundo, en el proceso de construcción de la genoteca, se han ligado al azar dos fragmentos de digestión *Sau*3AI diferentes, ya que uno de los extremos secuenciados se localiza en la región genómica de *`S. tsukubaensis´* y el otro en uno de los plásmidos que presenta esta especie.

Inactivación del sistema de dos componentes PhoR-P en *`S. tsukubaensis´* mediante REDIRECT

El cósmido 6B5 fue elegido para llevar a cabo la deleción de los genes *phoP* y *phoRP* mediante REDIRECT© debido a la localización centrada de dichos genes en el fragmento de ADNt incorporado por el cósmido.

La deleción precisa del diseño de cebadores específicos para cada secuencia a delecionar (ver materiales y métodos 2.18.2). Para la obtención del mutante Δ*phoP* se diseñaron los cebadores RDPF_ts y RDPR_ts y para el mutante Δ*phoRP* la pareja RDRF_ts y RDPR_ts. Estas parejas de cebadores se utilizaron para obtener el casete de resistencia (Apr^R-*oriT*) que se va a utilizar en la sustitución de las secuencias de interés en el cósmido 6B5 (Se procedió de la misma manera que en el caso de *S. tacrolimicus*, ver resultados 3.3.3).

Por otro lado, se transformó, mediante choque térmico, la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790 con el cósmido 6B5 de la librería génica de *`S. tsukubaensis´*. El ADN de las colonias obtenidas fue aislado, digerido y analizado mediante electroforesis para comprobar la correcta transformación del cósmido y la presencia del plásmido pIJ790. Posteriormente, las colonias de *E. coli* BW25113/pIJ790/6B5 fueron electroporadas con 180 ng de los productos de PCR, RD-Pts y RD-RPts, según se describe en materiales y métodos (ver apartado 2.18.5).

Las colonias en las que se produjo la sustitución del gen de interés (*phoP* o *phoRP*) por el casete de resistencia se seleccionaron por resistencia a apramicina. Las construcciones obtenidas se analizaron mediante patrones de digestión y PCR. Para la comprobación por PCR de la sustitución de *phoP* se utilizó la pareja de cebadores RDPR_ts/phoRt-F y de la sustitución de *phoRP* la misma pareja de cebadores utilizada para la obtención del casete de resistencia RDRF_ts/RDPR_ts. En ambos casos, sólo se debe obtener una banda de PCR si se ha producido la sustitución de los respectivos genes por el casete de resistencia (Figura 3.42).

Los cósmidos recombinantes 6B5-Δ*phoP* y 6B5-Δ*phoRP* se transfirieron a las células de *`S. tsukubaensis´* mediante conjugación intergenérica utilizando como vehículo de

transferencia la cepa de *E. coli* ET12567/pUZ8002. El proceso de conjugación se realizó siguiendo el mismo procedimiento utilizado en el caso de *S. tacrolimicus* (ver resultados 3.3.3) no obteniéndose ningún exconjugante de *`S. tsukubaensis´*.

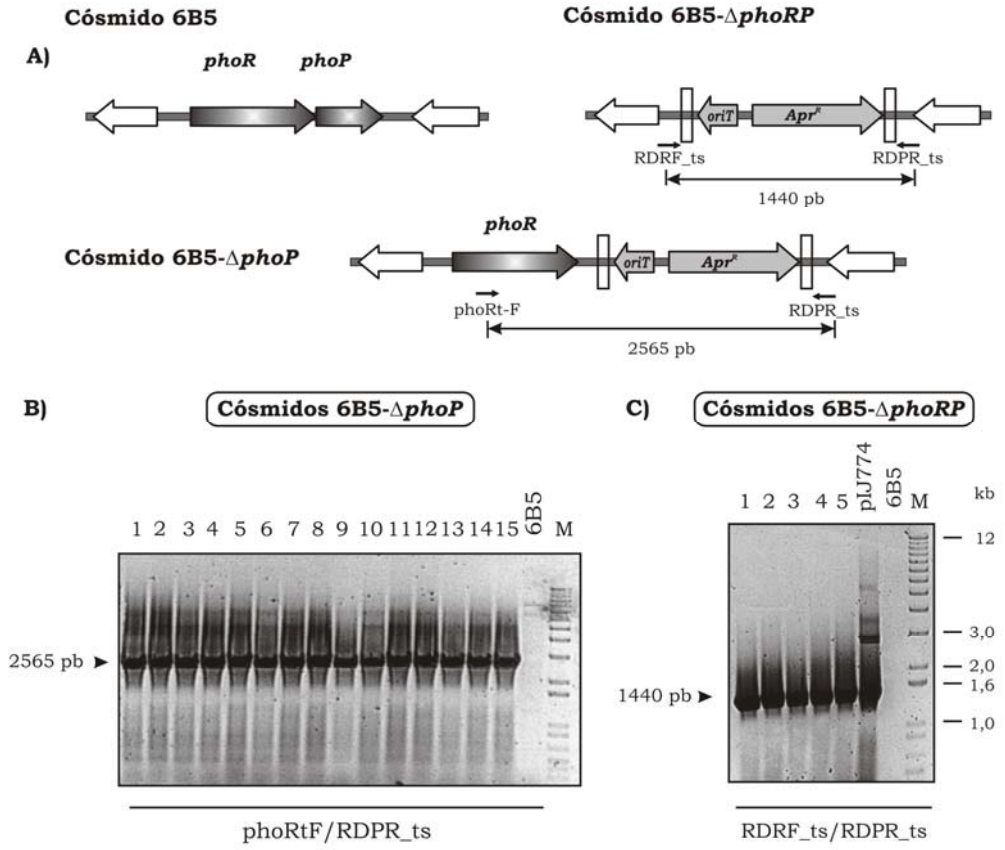


Figura 3.42: Comprobación mediante PCR de la sustitución en el cósmido 6B5 de los genes de interés por el casete de resistencia. A) Cebadores utilizados en la PCR y su localización en el cósmido 6B5 y en los cósmidos recombinantes 6B5-Δ*phoP* y 6B5-Δ*phoRP*. Mediante flechas de una punta se indica la localización del cebador y mediante flechas de dos puntas el tamaño del producto de PCR. **B)** y **C)** Resultado del análisis por PCR de los cósmidos en los que se ha producido la sustitución de *phoP* y *phoRP,* respectivamente. En la parte superior de cada panel se indica la construcción utilizada: con números se indican los cósmidos recombinantes, como control negativo se utilizó el cósmido original 6B5 y como control positivo el plásmido pIJ774. En la parte inferior de cada panel se indica la pareja de cebadores utilizada y a la izquierda se especifican los tamaños de los productos de PCR. M: Marcador comercial *1kb Plus DNA Ladder*, el tamaño de algunas de sus bandas se indica a la derecha del panel C.

A pesar de que el proceso de conjugación es ampliamente utilizado en la manipulación génica de *Streptomyces*, algunas de las especies de este género presentan una alta dificultad para su manipulación (Eustáquio *et al.*, 2005) por lo que es preciso la adaptación del procedimiento a dichas especies. Basándonos en los procedimientos estándar de conjugación (Kieser *et al.*, 2000) y las modificaciones descritas para ciertas especies de *Streptomyces* (Galm *et al.*, 2008; Guan y Pettis, 2009; Alexander *et al.*, 2010) se llevaron a cabo diferentes ensayos de conjugación intergenérica entre *E. coli* ET12567/pUZ8002/6B5-recombinante y

`*S. tsukubaensis*´ con el objetivo de aumentar la eficiencia de dicho proceso. Los parámetros modificados se recogen en la siguiente lista:

- Esporas de `*S. tsukubaensis*´: $1x10^8$-$5x10^{10}$. Al aumentar la concentración de esporas aumenta la eficiencia de conjugación.

- Cultivo de *E. coli*: se aumentó la concentración de células de *E. coli*, utilizando por mezcla (*Streptomyces* + *E. coli*) de conjugación 0,5 ml obtenidos de la concentración de un cultivo de 100 ml de DO_{600} próxima a 0,4 en 1 ml de volumen final.

- Choque térmico: 45-50ºC. Las temperaturas de choque térmico ensayadas no mostraron una notable diferencia en la eficiencia de conjugación por lo que se optó por la temperatura de 50ºC que es la utilizada en el caso de *S. coelicolor* (Kieser *et al.*, 2000).

- Tiempo de incubación antes de añadir la cobertera: se alargó hasta 24 horas con el objetivo de alargar el tiempo para que se produzca la doble recombinación.

- Medio sólido de crecimiento:

  MS (Hobbs *et al.*, 1989)

  ISP4 (Shirling y Gottlieb, 1966)

  ISP4 suplementado con 0,05 % extracto de levadura y 0,1 % de triptona (Galm *et al.*, 2008)

  TBO (Higgens *et al.*, 1974)

  Medio A (2,1 % MOPS, 0,5 % glucosa, 0,05 % extracto de levadura, 0,05 % extracto de carne, 0,1 % casaminoácidos, 2 % agar, pH 7,0)

  Medio Bennett (1 % glucosa, 0,1 % peptona, 0,1 % extracto de levadura, 0,2 % triptona, 2 % agar)

Se obtuvieron exconjugantes en los medios MS, ISP4 e ISP4 suplementado, por lo que tanto el medio MS como el medio ISP4 se han utilizado en los experimentos de transferencia por conjugación en `*S. tsukubaensis*´.

- Utilización de micelio de `*S. tsukubaensis*´: se utilizó micelio obtenido por cultivo en medio sólido TSA durante 24 horas a 28ºC (ver materiales y métodos 2.15.2) en lugar de esporas en la mezcla de conjugación. En alguno de los ensayos se obtuvo una alta eficiencia de conjugación pero no se consiguieron eficiencias reproducibles.

- Concentración de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ en el medio sólido de crecimiento: se utilizaron diferentes concentraciones 10, 15 y 20 mM obteniéndose un ligero incremento de la eficiencia utilizando la concentración más alta.

- Estado de la suspensión de esporas: se observó que los ciclos de congelación y descongelación influían en la eficiencia de conjugación, siendo ésta mayor si las esporas sólo habían sido congeladas en una ocasión.

Teniendo en cuenta las observaciones anteriormente descritas, se obtuvo un **mayor rendimiento de transferencia de construcciones de gran tamaño**, como son los cósmidos,

entre *E. coli* ET12567/pUZ8002 y *`S. tsukubaensis´*. A pesar de que se consiguió incrementar la eficiencia de conjugación intergenérica; los valores obtenidos, en torno a $1x10^{-9}$-$1x10^{-10}$ exconjugantes/espora, se encontraban muy por debajo de los obtenidos en las mismas condiciones para *S. coelicolor*, $1x10^{-3}$-$1x10^{-4}$ exconjugantes/espora (Gust *et al.*, 2003).

Todos los exconjugantes obtenidos en numerosos ensayos de conjugación, en torno a 600, se analizaron por resistencia a antibióticos presentando en todos los casos el fenotipo Apr^R y Kn^R, que indica una recombinación simple (Figura 3.17). Además, parte de los mismos fueron analizados mediante PCR, para confirmar los resultados obtenidos por resistencia a antibióticos.

Con el objetivo de **forzar la doble recombinación** se llevaron a cabo ciclos de crecimiento en medio líquido TSB suplementado con apramicina (50 µg/ml) y KH_2PO_4/K_2HPO_4 (10 mM), para lo cual tras 48 horas de incubación a 28ºC y 220 rpm se reinoculaba medio fresco con 1 % del cultivo de los exconjugantes de *`S. tsukubaensis´*. Tras 3-4 ciclos de crecimiento se aislaron colonias individuales mediante siembra de diluciones seriadas en TSA suplementado con apramicina (50 µg/ml) y KH_2PO_4/K_2HPO_4 (10 mM) y dichas colonias se analizaron por resistencia a antibióticos. Al mismo tiempo, también se realizaron ciclos de crecimiento/esporulación en medio ISP4 suplementado con apramicina (50 µg/ml) y KH_2PO_4/K_2HPO_4 (10 mM), para lo cual tras 6 días de incubación a 28ºC se recogían la esporas de los exconjugantes y se volvían a sembrar en el mismo medio. El análisis del tipo de recombinación se realizó de la misma manera que el descrito para los ciclos en medio líquido. Tras 40 ciclos en medio líquido TSB y 6 ciclos en medio sólido ISP4 no se obtuvo ninguno doble recombinante.

Debido a los problemas encontrados en la obtención de dobles recombinantes, se repitió desde el inicio del procedimiento REDIRECT para la obtención de los cósmidos recombinantes 6B5 con los genes *phoP* y *phoRP* sustituidos por el casete de resistencia. A la par, se siguió el mismo procedimiento para la obtención de dichas sustituciones en el cósmido 12H3 (Figura 3.41), el cual presentaba la localización de los genes *phoRP* en uno de los extremos del fragmento de ADNt de *`S. tsukubaensis´* incorporado en el cósmido. Tanto las nuevas construcciones de 6B5-Δ*phoP* y 6B5-Δ*phoRP* como las construcciones 12H3-Δ*phoP* y 12H3-Δ*phoRP* fueron confirmadas mediante PCR. La conjugación entre *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformada con las nuevas construcciones en 6B5 y 12H3 y *`S. tsukubaensis´* volvió a resultar en recombinantes simples en todos los casos.

Interrupción de *phoP* de *`S. tsukubaensis´* mediante recombinación simple

El principal escollo para la obtención de la deleción de *phoP* y *phoRP* de *`S. tsukubaensis´* se presentaba en la obtención de la doble recombinación. Por lo que se

planteó como alternativa, la interrupción de *phoP* mediante la integración de un plásmido en dicho gen, proceso que sólo precisa de un evento de recombinación.

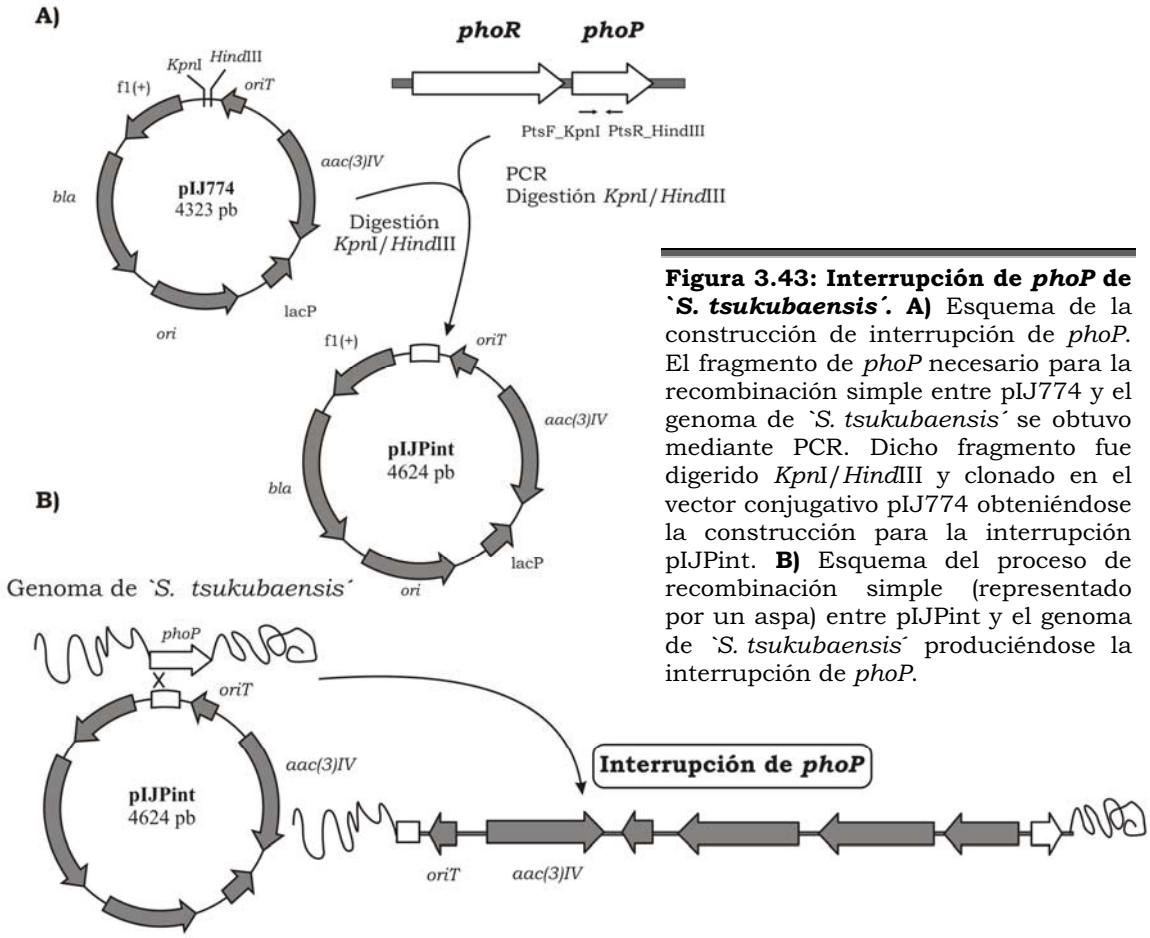


Figura 3.43: Interrupción de *phoP* de `*S. tsukubaensis*´. A)** Esquema de la construcción de interrupción de *phoP*. El fragmento de *phoP* necesario para la recombinación simple entre pIJ774 y el genoma de `*S. tsukubaensis*´ se obtuvo mediante PCR. Dicho fragmento fue digerido *Kpn*I/*Hind*III y clonado en el vector conjugativo pIJ774 obteniéndose la construcción para la interrupción pIJPint. **B) Esquema del proceso de recombinación simple (representado por un aspa) entre pIJPint y el genoma de `*S. tsukubaensis*´ produciéndose la interrupción de *phoP*.

El plásmido pIJ774, con resistencia a apramicina, es un vector conjugativo no replicativo en *Streptomyces*. Así, mediante la clonación de un fragmento de *phoP* en el plásmido pIJ774 es posible dirigir la integración del plásmido en el gen *phoP* interfiriendo en la expresión de dicho gen. Para llevar a cabo la interrupción de *phoP* se amplificó mediante PCR un fragmento de 301 pb (Pint) localizado en la posición 5´ de dicho gen utilizando la pareja de cebadores PtsF_KpnI y PtsR_HindIII sobre ADNt de `*S. tsukubaensis*´ como molde. El fragmento Pint fue digerido con las enzimas de restricción *Kpn*I/*Hind*III, cortes presentes en los cebadores, y clonado en el plásmido pIJ774, previamente digerido con los mismas enzimas. Dicha construcción denominada pIJPint (Figura 3.43-A) fue transformada en *E. coli* DH5α y analizada por patrón de digestión; para posteriormente ser transformada en *E. coli* ET12567/pUZ8002. El proceso de conjugación se desarrolló siguiendo las observaciones detalladas en el anterior apartado, y a pesar de repetir dicho procedimiento en varias ocasiones, no se obtuvo ningún exconjugante resistente a apramicina (Figura 3.43-B).

La dificultad para la interrupción de *phoP* de *`S. tsukubaensis´* puede ser debida a la pequeña longitud (301 pb) del fragmento clonado de *phoP* ya que la probabilidad de que se produzca la recombinación aumenta con la longitud de las secuencias homólogas. Sin embargo, el tamaño del fragmento clonado en pIJ774 no puede ser mayor debido a que un incremento de dicho fragmento puede provocar, tras la recombinación, la expresión de gran parte de la proteína, la cual es codificada por un gen de 672 pb. La expresión de gran parte de la proteína puede dar lugar a un fenotipo en *`S. tsukubaensis´* que no es el correspondiente a la inactivación de *phoP.*

Análisis del posible carácter esencial de *phoP* de *`S. tsukubaensis´*

Debido a las dificultades planteadas en la deleción de los genes *phoR* y *phoP* en *`S. tsukubaensis´* se planteo la hipótesis del posible carácter esencial del gen *phoP*; por lo que su deleción supondría la incapacidad de microorganismo para el crecimiento. Con el objetivo de comprobar el posible carácter esencial de PhoP en *`S. tsukubaensis´* se suplementaron las cepas recombinantes simples con copias extras de la región génica de *phoRP* para posteriormente volver a intentar forzar la doble recombinación.

La construcción de sobreexpresión de *phoRP* se realizó en el plásmido pAMB1 (AM. Botas, sin publicar), vector multicopia conjugativo con varias resistencia a antibióticos entre ellas a tioestreptona. Esta resistencia es necesaria para la selección de la construcción con una copia adicional de *phoRP* en los recombinantes simples de *`S. tsukubaensis´*, los cuales ya presentan resistencia a apramicina y a kanamicina. Un fragmento 2306 pb, en el cual se localizan los genes *phoRP,* se obtuvo mediante PCR con una polimerasa de alta fidelidad de copia (Phusion®), utilizando la pareja de cebadores CPHOtF-EcoRI y CPHOtR-EcoRI sobre ADNt de *`S. tsukubaensis´* como molde. Para el diseño de los cebadores se siguieron las mismas consideraciones que en el caso de la complementación de los mutantes delecionados de *S. tacrolimicus* (ver resultados 3.3.3), de tal manera que se asegurase la expresión de dichos genes. El producto de PCR fue digerido con *Eco*RI y clonado en el plásmido pAMB1, el cual previamente había sido digerido con la misma enzima, obteniéndose la construcción pA1-PHOts (Figura 3.44). Dicha construcción fue secuenciada utilizando los cebadores phoRt-F, phoRP-1, phoRP-2, phoRP-3, phoRP-4 y phoRP-6 para asegurar la correcta amplificación de la secuencia.

Una vez comprobada la secuencia, la construcción pA1-PHOts fue transformada en *E. coli* ET12567/pUZ8002 para la posterior transferencia por conjugación a las cepas recombinantes simples de *`S. tsukubaensis´.* Los exconjugantes fueron seleccionados por resistencia a apramicina, para asegurar la presencia del casete de resistencia procedente del cósmido 6B5-Δ*phoP,* y a tioestreptona para asegurar la incorporación de la construcción pA1-PHOts. Las colonias obtenidas fueron analizadas por resistencia antibióticos para comprobar si se mantenía la recombinación simple o se había producido una recombinación

doble, resultando en recombinantes simples. Con el objeto de forzar la doble recombinación se realizaron 6 ciclos de crecimiento de 48 horas en medio líquido TSB suplementado con apramicina (50 µg/ml) y tioestreptona (25 µg/ml). Se aislaron colonias individuales mediante siembra de diluciones seriadas en TSA suplementado con apramicina (50 µg/ml) y tioestreptona (25 µg/ml), las cuales fueron analizadas por resistencia a antibióticos obteniéndose de nuevo recombinantes simples.

La obtención de recombinantes simples indica que la dificultad para la obtención de la deleción de *phoP* o de *phoRP* no es debida al carácter esencial de PhoP sino a la falta de un proceso de doble recombinación entre las secuencias flanqueantes a dichos genes. Es posible, que en alguna de estas secuencias se localice una estructura secundaria que impida la recombinación.

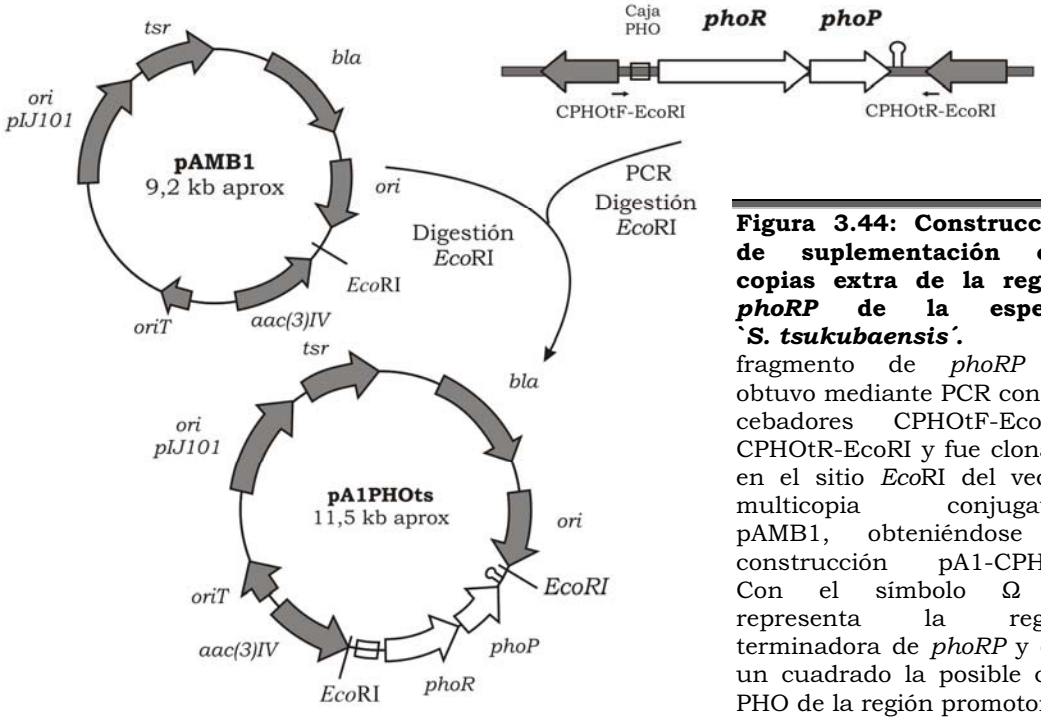


Figura 3.44: Construcción de suplementación con copias extra de la región *phoRP* de la especie `*S. tsukubaensis*´. El fragmento de *phoRP* se obtuvo mediante PCR con los cebadores CPHOtF-EcoRI/ CPHOtR-EcoRI y fue clonado en el sitio *Eco*RI del vector multicopia conjugativo pAMB1, obteniéndose la construcción pA1-CPHOt. Con el símbolo Ω se representa la región terminadora de *phoRP* y con un cuadrado la posible caja PHO de la región promotora.

3.4.5. El regulón *pho* en `*S. tsukubaensis*´

La proteína PhoP, regulador de respuesta del sistema de dos componentes PhoR-P, desencadena la respuesta a la escasez de fosfato mediante el control de la expresión de ciertos genes, que integran el denominado regulón *pho*. En la especie *S. coelicolor* se ha definido el modelo de unión de PhoP a la molécula de ADN (modelo I; Sola-Landa *et al.*, 2008), determinándose la secuencia que es reconocida por dicho regulador, la cual se compone de unidades de repetición directa (DRus) de 11 nucleótidos que se disponen en tándem. De acuerdo con este modelo se han descrito dos tipos de DRus, unidades que constituyen el núcleo de la unión (denominadas C del inglés *core*) y otras unidades adyacentes que permiten la extensión de la unión (denominadas E del inglés *extension*). El

núcleo constituye la secuencia mínima para que se produzca la unión y se compone de dos o tres DRus. Una vez ocupado el núcleo, la unión a las unidades de extensión se produce al aumentar la concentración de proteína (ver introducción 1.3.2).

La matriz de puntuación del modelo I obtenida con la información resultante del alineamiento de 37 DRus tipo núcleo permite la búsqueda informática de posibles cajas PHO. Así, se llevó a cabo una búsqueda de posibles zonas de unión de PhoP al ADN en *`S. tsukubaensis´*, mediante la herramienta RSA Tools, con el objetivo de analizar la función de PhoP en este microorganismo. Las zonas de unión de PhoP al ADN identificadas informáticamente han sido confirmadas mediante ensayos de retraso de movilidad electroforética (EMSA). En el análisis también se ha incluido la zona promotora de genes que por su función es muy probable que estén regulados por PhoP, a pesar de que la búsqueda informática no haya detectado una caja PHO en esa zona.

Las zonas promotoras de los distintos genes fueron amplificadas mediante PCR utilizando cebadores específicos, estando uno de ellos marcado con un fluoróforo en el extremo 5´. Este tipo de marcaje permite detectar por fluorescencia el resultado del ensayo tras la electroforesis en geles de poliacrilamida (ver materiales y métodos 2.19.1). De esta forma se eliminan los pasos de transferencia a membrana de nailon y la detección por quimioluminiscencia, necesarios en el marcaje con digoxigenina reduciéndose notablemente el tiempo requerido para el experimento.

El regulador de respuesta PhoP presenta una alta similitud entre especies (98,7 % entre *S. coelicolor* y *`S. tsukubaensis´*), por lo que, al igual que en los estudios con *S. tacrolimicus* (ver resultados 3.3.5) los ensayos de EMSA se realizaron con la fracción carboxilo terminal de PhoP de *S. coelicolor*, en la cual se localiza el dominio de unión a ADN ($PhoP^{DBD}$).

Autorregulación del sistema de dos componentes PhoR-P

En varias especies de *Streptomyces, S. coelicolor* (Sola-Landa *et al.*, 2005), *S. natalensis* (Mendes *et al.*, 2007) y S. *tacrolimicus*, se ha demostrado que el propio regulador de respuesta PhoP controla la expresión del sistema *phoRP*. Así, se inició el estudio del regulón *pho* en *`S. tsukubaensis´* con la región intergénica entre *phoU* y *phoRP*, en la cual se detectó la presencia de posibles cajas PHO mediante búsqueda informática.

El fragmento de ADN correspondiente a la **región intergénica** fue amplificado mediante PCR utilizando ADNt de *`S. tsukubaensis´* como molde con los cebadores URPt-U/URPt-D, estando el primero de ellos marcado con Cy3 en el extremo 5´. La **sonda fría** (fragmento sin marcar) se obtuvo también mediante PCR utilizando los cebadores CPHOtF-EcoRI/URPt-D. Además, se amplificó por PCR un **fragmento de ADN cualquiera**, en este caso la región α del ARNr 16S con los cebadores 16S-sense/16S-ant. Tanto la sonda fría como la región α son controles de la unión de PhoP al ADN y se añaden a la mezcla de unión (zona promotora/$PhoP^{DBD}$), en exceso respecto al ADN correspondiente a la zona promotora. El

control con sonda fría permite detectar la especificidad de la unión por una secuencia determinada no apareciendo banda de retraso, debido a que la proteína se ha unido a la sonda fría que se encuentra en exceso. Mientras que el control con un fragmento inespecífico de ADN permite determinar, si aparece banda de retraso, que PhoP no es una proteína de unión a ADN independiente de secuencia, ya que se produce retraso de manera específica.

Las reacciones de unión se prepararon en un volumen final de 10 µl según se especifica en materiales y métodos 2.19.1. El ADN correspondiente a los controles se añadió en un exceso de 600 veces con respecto a la sonda. Tras la reacción de unión las mezclas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 5 % y el resultado fue detectado por fluorescencia, directamente en el gel, mediante un escáner de fluorescencia (ver materiales y métodos 2.19.1).

El análisis bioinformático detectó cuatro DRus en la zona intergénica *phoU-pho*RP, las cuales fueron confirmadas por la detección de dos complejos de retraso en el EMSA (Figura 3.45), es decir se forman dos complejos de unión entre PhoP y la región intergénica *phoU-phoRP* de *`S. tsukubaensis´*. Además, los resultados obtenidos en los carriles control de sonda fría y fragmento de ADN, demuestran que PhoP^{DBD} se une de manera específica a la secuencia de ADN.

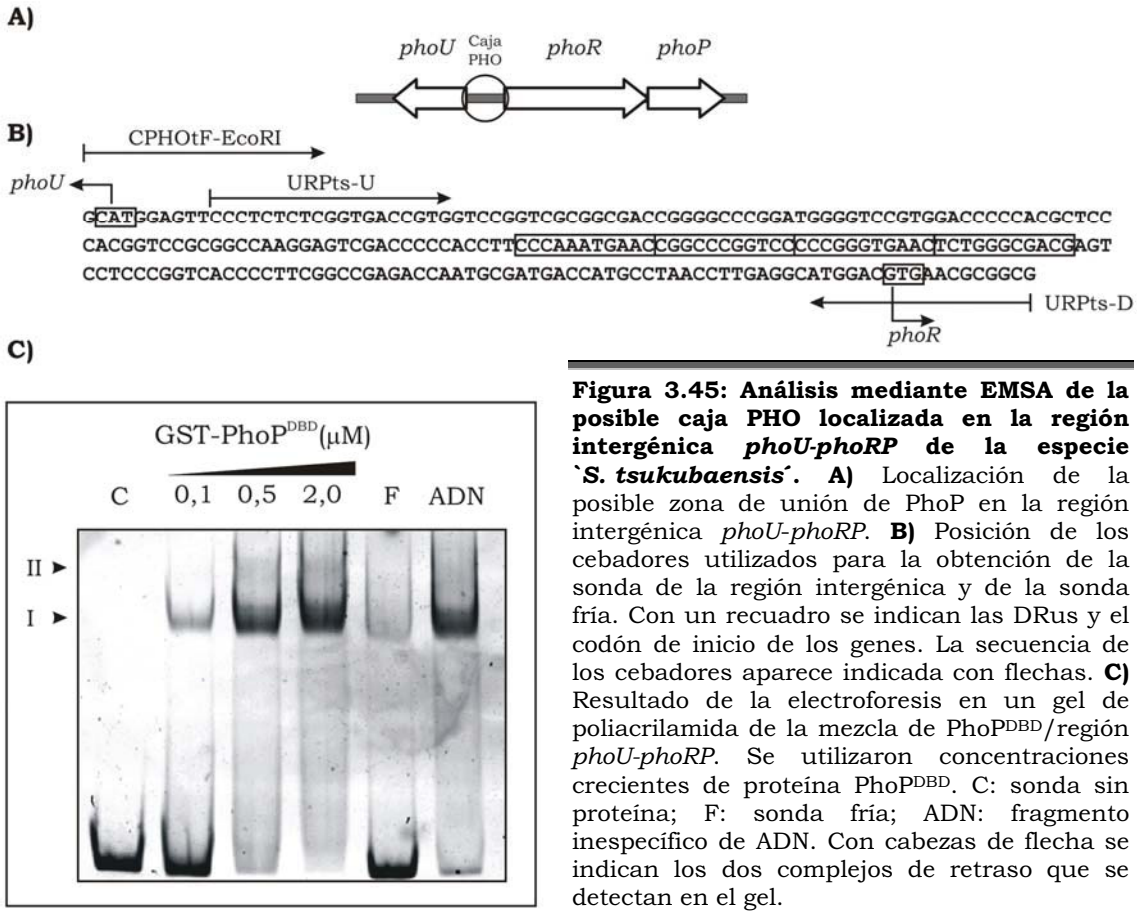


Figura 3.45: Análisis mediante EMSA de la posible caja PHO localizada en la región intergénica *phoU-phoRP* de la especie *`S. tsukubaensis´*. A) Localización de la posible zona de unión de PhoP en la región intergénica *phoU-phoRP*. **B)** Posición de los cebadores utilizados para la obtención de la sonda de la región intergénica y de la sonda fría. Con un recuadro se indican las DRus y el codón de inicio de los genes. La secuencia de los cebadores aparece indicada con flechas. **C)** Resultado de la electroforesis en un gel de poliacrilamida de la mezcla de PhoP^{DBD}/región *phoU-phoRP*. Se utilizaron concentraciones crecientes de proteína PhoP^{DBD}. C: sonda sin proteína; F: sonda fría; ADN: fragmento inespecífico de ADN. Con cabezas de flecha se indican los dos complejos de retraso que se detectan en el gel.

El análisis del grado de conservación de las diferentes DRus presentes en la región intergénica respecto al modelo I definido para *S. coelicolor* se realizó de la misma manera que en el caso de *S. tacrolimicus* (ver resultados 3.3.5). Para lo cual, se utilizó de nuevo la aplicación Excel diseñada por A. Rodriguez-García basada en la teoría de la información (Schneider, 1997). Mediante esta teoría, utilizando la matriz de contenido de información del modelo I, se otorga un valor de información (R_i) a cada unidad de repetición lo que permite estimar el grado de conservación. El **valor máximo** de información, presentado por la secuencia consenso en *S. coelicolor*, es de **14,63 bits** y se consideran repeticiones **muy conservadas** aquellas que presentan un valor R_i por encima de **8 bits**. Valores **negativos** indican muy **poca conservación** y los **huecos** entre DRus (los cuales actúan como repeticiones de extensión inestables, Eu) tienen un valor de **-6,4 bits**. Finalmente, los sitios reales de unión de PhoP presentan un **total de información** (suma de los valores R_i de todas las DRus) **positivo** (Sola-Landa *et al.*, 2008).

El operador de la región intergénica *phoU-RP* de `*S. tsukubaensis*´ se encuentra en dirección *phoU* y presenta una estructura compleja compuesta por dos DRus conservadas (DRu-1 y 2) adyacentes a otras dos DRus, de las cuales una presenta muy bajo grado de conservación DRu-3 (Figura 3.46). Inicialmente, PhoP se une a las secuencias núcleo (C) formando un complejo de unión y un aumento de concentración permite la unión cooperativa de los monómero de PhoP a las otras dos DRus, facilitada por la DRu-4 (E_S) la cual compensa la inestabilidad presentada por la baja conservación de la DRu-3 (E_U), formando un complejo de unión de mayor tamaño que el anterior. Este operador es del mismo tipo que el definido en la región intergénica *phoU-RP* de *S. tacrolimicus* (ver resultados 3.3.5).

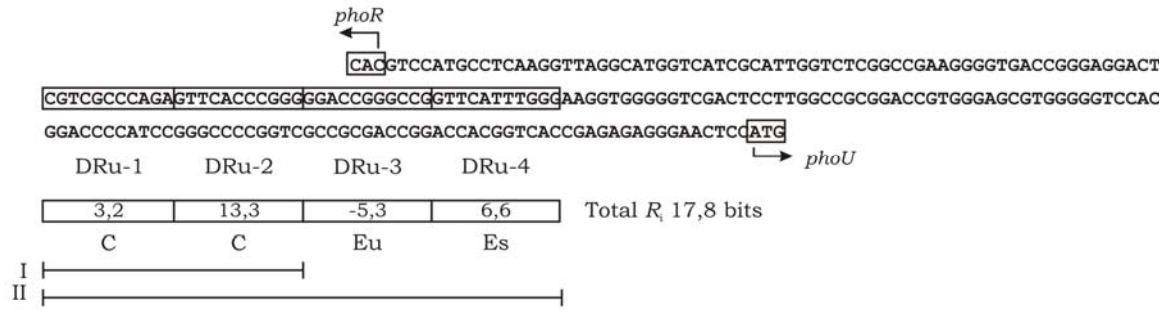


Figura 3.46: Análisis de la conservación de los sitios de unión de PhoP en la zona intergénica de *phoRP-U* en `*S. tsukubaensis*´. Mediante cajas se indican las DRus reconocidas por PhoP (DRu1-4) en la región intergénica *phoU-RP*. En la parte inferior de cada unidad de repetición se indica el contenido de información (*Ri*) y la estructura de las mismas según el modelo I (C: núcleo, E_U: extensión inestable y E_S: extensión de soporte). También se indica el total de información de toda la zona reconocida por PhoP. Las barras con números romanos indican los dos complejos de unión (Figura 3.45) que se forman entre monómeros de la proteína PhoP y las cuatro DRus de la zona intergénica *phoRP-U*.

El análisis del resto de genes del regulón *pho* de *`S. tsukubaensis´* se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento con un ligero cambio: se usó el fluoróforo 6FAM para el marcaje de las sondas con el objeto de usar éstas en futuros ensayos de protección frente a ADNasa I. Inicialmente, las concentraciones de proteína ensayadas se encontraban en el mismo rango (0,1-2,0 μM) que las utilizadas en el análisis de la región intergénica *phoU-phoRP*. Los ensayos que resultaron negativos fueron repetidos con concentraciones más altas de proteína para confirmar la falta de unión de PhoP a estas zonas promotoras.

Respuesta primaria a la escasez de fosfato

Obtención de fosfato inorgánico a partir de fosfato orgánico

Las **fosfatasas alcalinas** han sido de los primeros miembros del regulón *pho* de *Streptomyces* en ser caracterizados (Moura *et al.*, 2001; Apel *et al.*, 2007). Una de las estrategias de la célula, para sobrevivir a una situación de escasez de fosfato, es la obtención de fosfato inorgánico de compuestos orgánicos complejos presentes en el medio, mediante la acción de las fosfatasas alcalinas extracelulares.

En el genoma de *`S. tsukubaensis´* se identificaron dos posibles fosfatasas alcalinas mediante una búsqueda comparativa con las secuencias de PhoA, PhoC y PhoD de *S. coelicolor*, presentando una similitud del 73,0 % en caso de PhoA y del 78,3 % para PhoD. La fosfatasa PhoC sólo se ha identificado en algunas especies de *Streptomyces,* por lo que no es extraño que no se haya localizado un ortólogo en el genoma de *`S. tsukubaensis´*.

En la secuencia promotora de ***phoA*** de *`S. tsukubaensis´* no se identificó una posible caja PHO mediante la búsqueda informática; sin embargo, se llevó a cabo el análisis mediante EMSA. En otras especies como *S. griseus* se había confirmado la regulación de PhoA por fosfato y en *S. coelicolor* se había demostrado que dicho gen pertenece al regulón *pho*. La falta de una banda de retraso en el ensayo de EMSA (Figura 3.47) confirma que PhoP no se une a la zona promotora de *phoA* de *`S. tsukubaensis´* por lo que esta proteína no está directamente regulada por PhoP.

La proteína PhoA mantiene una alta similitud entre las diferentes especies (70-75 %) y, en principio, es una proteína extracelular secretada mediante la ruta Tat aunque en algunas especies no es predicha por el servidor TatP (Widdick *et al.*, 2006) disponible en la dirección: www.cbs.dtu.dk/services/TatP/. Sin embargo, el control directo por PhoP parece que no está conservado, ya que un análisis bioinformático de la zona promotora de *phoA* en diferentes especies de *Streptomyces,* como: *S. avermitilis*, *S, clavuligerus*, *S. griseus* y *S. scabies*, sólo ha permitido localizar una posible caja PHO, similar a la descrita en *S. coelicolor*, en el caso de *S. griseus* y *S. scabies* (ver anexo).

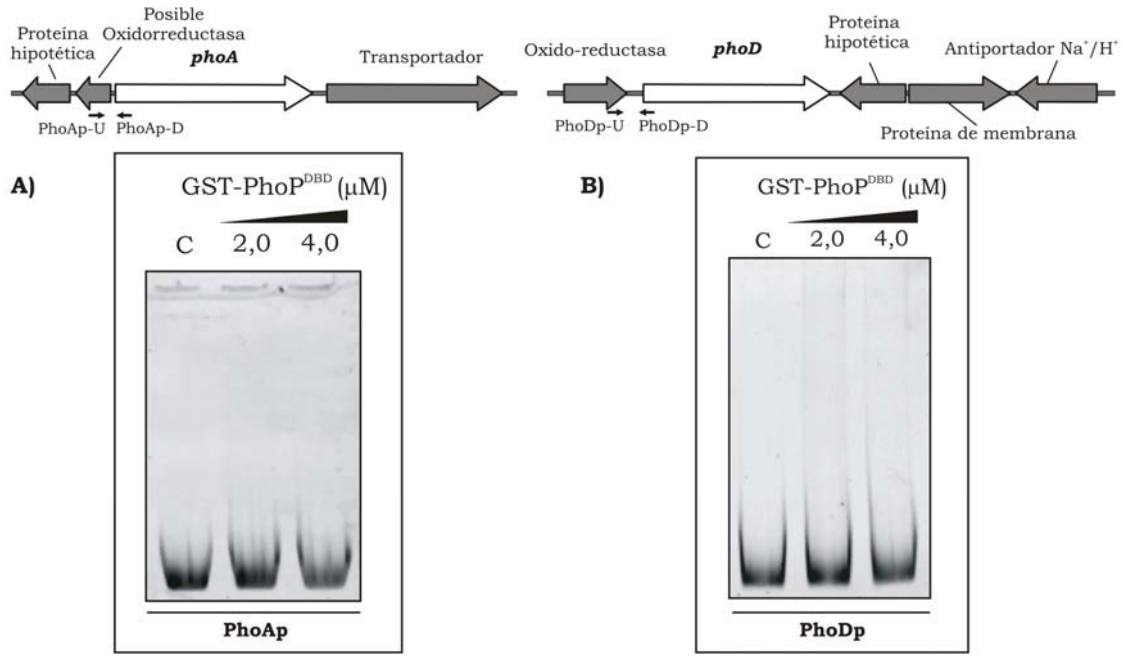


Figura 3.47: Análisis mediante EMSA de la unión de PhoP^{DBD} a la zona promotora de *phoA* y *phoD* de `*S. tsukubaensis*´. En la parte superior de cada panel se indica la organización génica de la zona en la que se localizan los genes de interés. Las flechas indican la posición de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR de la región promotora. Resultado del ensayo de retraso en gel (EMSA), en el cual se han utilizado concentraciones crecientes de PhoP^{DBD} **A)** Región promotora *phoA* y **B)** Región promotora *phoD.* C: sonda libre sin proteína.

En la región promotora de ***phoD*** se detectó mediante la búsqueda informática una posible caja PHO aunque compuesta de unidades de repetición con bajo grado de conservación (en relación al modelo I de *S. coelicolor*) y localizada a una amplia distancia del inicio de traducción.

La comparación de la región promotora de *phoD* en varias especies de *Streptomyces* muestra que la estructura operadora definida en *S. coelicolor* no está conservada (Figura 3.48). En el caso de *S. avermitilis* se localizan posibles zonas de unión de PhoP con la misma estructura que en la región promotora de *S. coelicolor.* Las unidades de repetición directa localizadas en la cadena codificante solapan con la región -10 y -35, elementos identificados experimentalmente en el caso de *S. coelicolor*. Sin embargo en *S. clavuligerus* y en *S. scabies* se han localizado dos posibles cajas PHO, una en sentido a *phoD* y la otra en la cadena complementaria a una distancia comprendida entre 20-30 nucleótidos de la posible caja -10. En la región promotora de *phoD* de `*S. tsukubaensis*´ también se localizan dos posibles cajas PHO solapantes pero a una distancia de 120 nucleótidos de la posible caja -10, estructura operadora a la cual no se produce la unión de PhoP como se ha demostrado mediante el ensayo de retraso en gel (Figura 3.47).

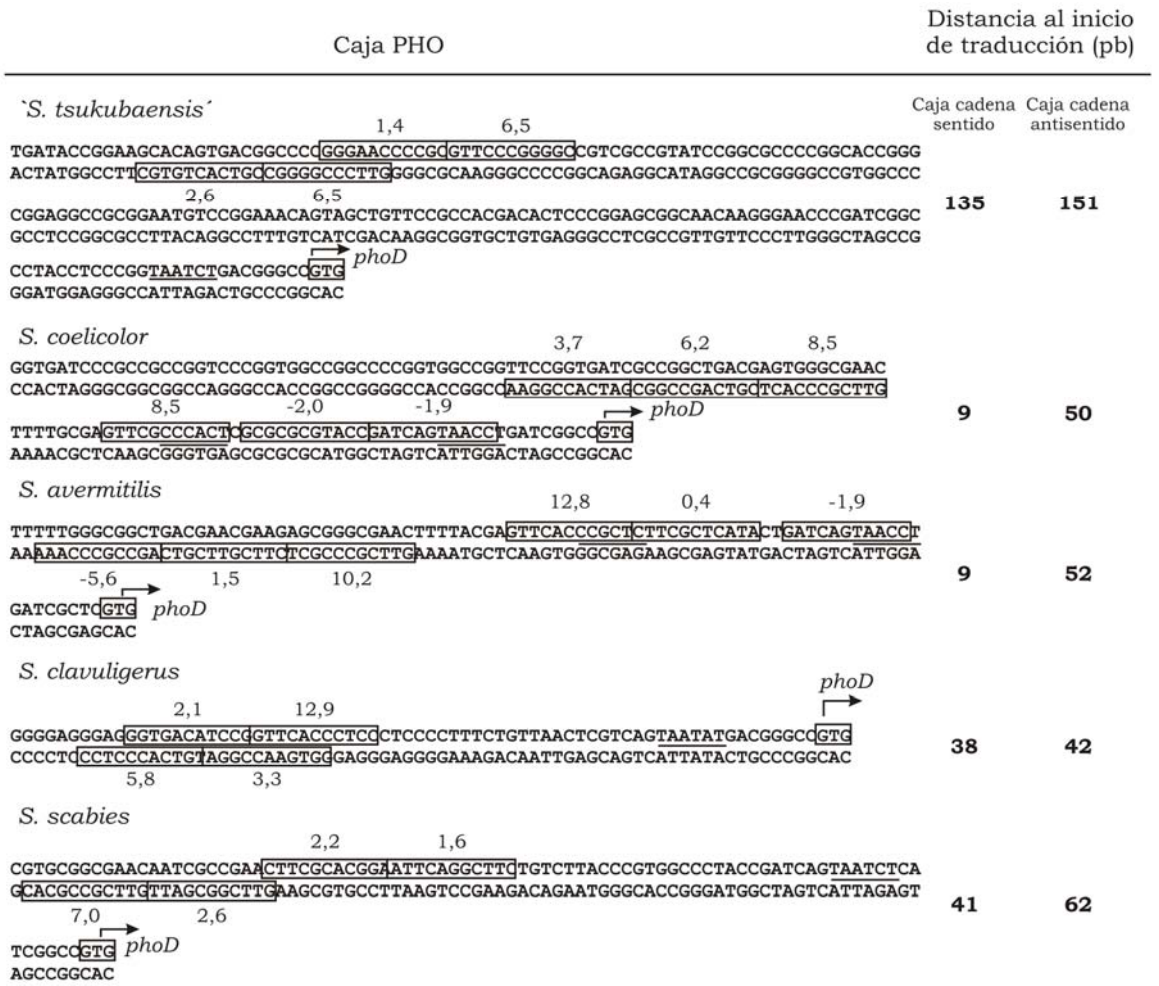


Figura 3.48: Análisis de posibles cajas PHO en la región promotora de *phoD* en diferentes especies de *Streptomyces*. Las unidades de repetición directa aparecen indicadas en una caja y el valor de información individual (*Ri)* se recoge en la parte superior o inferior de cada DRu. El inicio de traducción que coincide con el del transcripción (comprobado experimentalmente en el caso de *S. coelicolor*) aparece recuadrado y una flecha en la parte superior del mismo indica el sentido de la transcripción/traducción. Las posibles caja -10 y -35 (sólo localizadas experimentalmente en *S. coelicolor*) aparecen subrayadas. En la parte derecha se indica la distancia (pb) a la que se localizan las cajas PHO del codón de inicio de traducción.

En el análisis del regulón *pho* de *`S. tsukubaensis´* también se identificó una posible **fosfatasa del tipo PhoX** cuya expresión podría estar bajo el control directo de PhoP, lo cual fue confirmado por EMSA al detectarse la aparición de un complejo de retraso (Figura 3.49). La secuencia de esta fosfatasa se encuentra muy conservada entre las diferentes especies de *Streptomyces* analizadas, presentado una similitud comprendida entre 82-92 %. Esta fosfatasa tipo PhoX de *`S. tsukubaensis´* es una proteína secretada (predicho mediante el servidor SignalP disponible en la dirección: www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) seguramente mediante la vía Tat como ocurre en el caso de *S. coelicolor* (Widdick *et al.*, 2006).

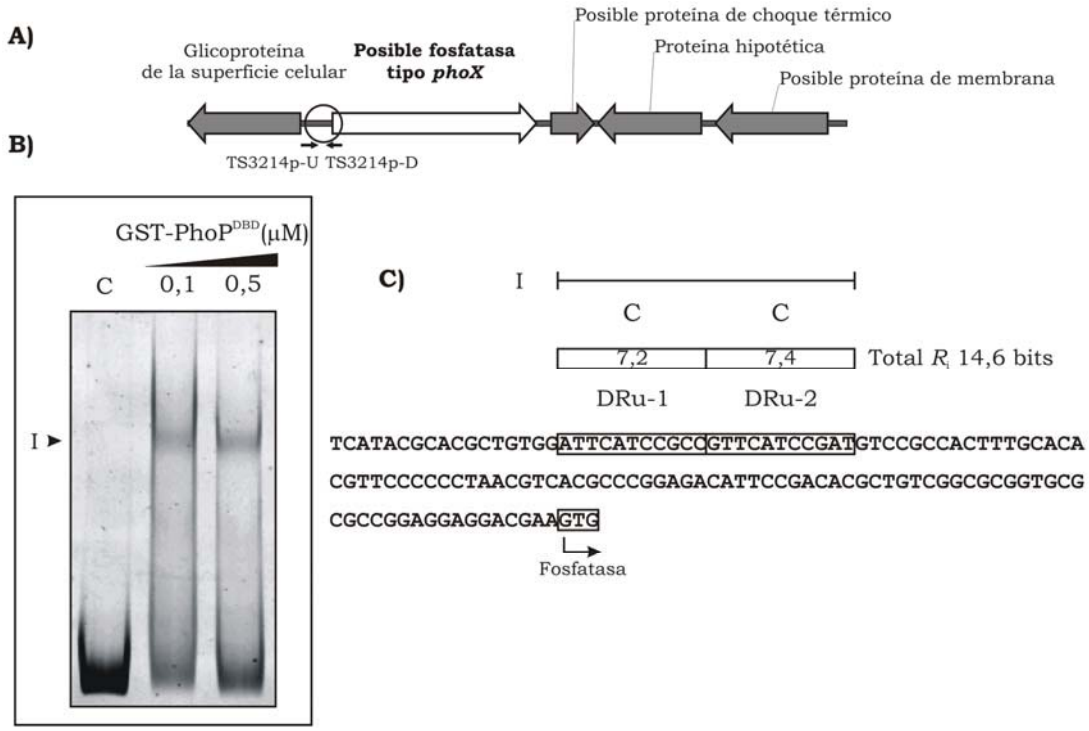


Figura 3.49: Estructura operadora de la fosfatasa tipo PhoX de `*S. tsukubaensis*´. A) Organización génica de la zona en la que se localiza la fosfatasa tipo PhoX. **B)** Resultado del ensayo de retraso en gel (EMSA), en el cual se han utilizado concentraciones crecientes de $PhoP^{DBD}$, C: sonda libre sin proteína. La punta de flecha y el número romano indican la detección de un complejo de retraso. **C)** Secuencia de la zona promotora de la fosfatasa tipo PhoX. Las unidades de repetición directa aparecen indicadas en una caja y el valor de información individual (*Ri*) se recoge en la parte superior también incluido en una caja; además se indica el valor de información total. El tipo de estructura operadora se detalla mediante iniciales: C, significa núcleo. La barra con un número romano indica el complejo de unión que se forma entre monómeros de la proteína PhoP y las dos DRus identificadas, el cual se detecta mediante una banda de retraso en el ensayo de EMSA.

Los fosfolípidos de membrana son una fuente de fosfato aprovechada a través de la acción de las fosfolipasas como PhoD y de las **glicerofosfodiéster fosfodiesterasas** (GDPDs, del inglés *glycerophosphodiester phosphodiesterases*) (ver introducción 1.3.3). En *S. coelicolor* se han localizado siete GDPSs, cuatro citosólicas y tres extracelulares; de estas últimas dos de ellas GlpQ1 y GlpQ2 muestran una activación dependiente de PhoP en condiciones de escasez de fosfato (Santos-Beneit *et al.*, 2009b). Tanto GlpQ1 y GlpQ2 son enzimas conservadas presentes en diferentes especies de *Streptomyces.* Sin embargo, en el genoma de `*S. tsukubaensis*´ sólo se han localizado con claridad las cuatro GDPDs citosólicas que muestren similitud con las definidas en *S. coelicolor*. No presentando ninguna de ellas péptido señal. En la región promotora de estas GDPDs citosólicas no se detecta bioinformáticamente la presencia de cajas PHO al igual que ocurre en *S. coelicolor*.

La secuencia de GlpQ1 puede encontrarse en una región incompleta del genoma, ya que se han localizado los genes adyacentes flanqueando una secuencia desconocida.

Pero parece que `*S. tsukubaensis*´ no presenta un ortólogo de GlpQ2 ya que se han localizado los genes adyacentes en una región completa y entre los mismos no se encuentra la secuencia de GlpQ2.

Transporte de fosfato al interior celular

En los microorganismos el transporte de fosfato al interior celular es desempeñado por diferentes sistemas de transporte dependiendo de la concentración de fosfato. Así, en *S. coelicolor* PitH1 es el principal transportador en condiciones de exceso de fosfato mientras que el sistema Pst y PitH2 actúan cuando este elemento es limitante (Santos-Beneit *et al.*, 2008). En el genoma de `*S. tsukubaensis*´ se han localizado zonas de unión de PhoP en los regiones promotoras de ***pitH2*** y de ***pstS***, las cuales han sido confirmadas mediante ensayos de retraso en gel (Figura 3.50). Las estructuras operadoras de estas cajas PHO son similares a las definidas en *S. coelicolor* (Sola-Landa *et al.*, 2008; Santos-Beneit *et al.*, 2008).

La estructura operadora de *pstS* es del mismo tipo que la definida en la región intergénica *phoRP-U*, es decir es una estructura compleja. La unión de PhoP a la región promotora de *pstS* se da en primer lugar en la unidades de repetición DRu-3 y DRu-4, las cuales forman el núcleo, dando lugar a un complejo de retraso (I). Tras la ocupación del núcleo se produce la unión de otro dos monómeros a las DRu-1 y DRu-2, facilitada por el mayor grado de conservación que presenta la DRu-1 (E_S) frente a la DRu-2 (E_U), dando un segundo complejo de retraso (II).

La estructura operadora presente en la región promotora de *pitH2* aún muestra una mayor complejidad. Aunque en el ensayo de retraso se han detectado cuatro complejos de unión, al igual que en el caso de *S. coelicolor*, se propone una estructura operadora ligeramente diferente basada en los valores de conservación (R_i) de cada unidad de repetición. En *S. coelicolor* se han definido seis DRus las cuales presentan la siguiente estructura operadora: $E_S[1]E_SE_UCC[2]E_S$ (donde los números entre corchetes indican los nucleótidos de separación entre unidades de repetición). En la región promotora de *pitH2* de `*S. tsukubaensis*´ se propone la existencia de cinco unidades de repetición con la estructura $EECC[2]E_S$, ya que el grado de conservación de la DRu-2 no es muy bajo (2,2 bits) (en el operador de *pitH2* de *S. coelicolor* esta DRu tiene un valor de información de **-**6,10 bits) por lo que es más probable que sea una unidad de extensión poco conservada (E) que una unidad de extensión inestable (E_U) como en el caso de *S. coelicolor.* A pesar del cambio de estructura se mantiene en `*S. tsukubaensis*´ la regulación dual (como activador y represor) de PhoP sobre la expresión de *pitH2* definida *S. coelicolor* (Santos-Beneit *et al.*, 2008). Así, si nos fijamos en las posibles secuencias -10 y -35 (determinadas en `*S. tsukubaensis*´ a semejanza de las localizadas en *S. coelicolor* de manera experimental), el núcleo del sitio de unión de PhoP en el operador de *pitH2* solapa con la caja -35, lo que es esencial para que se produzca la expresión de *pitH2*. Por el contrario, la DRu-A solapa con la caja -10, por lo tanto la unión

de PhoP a esta unidad inhibe la expresión de *pitH2*. Así, en un primer momento se produce la unión de PhoP al núcleo del operador provocando la activación de la expresión de *pitH2*. Posteriormente, al aumentar la concentración de PhoP, se produce la unión a las unidades de extensión, entre ellas DRu-A, provocando la supresión de la actividad promotora.

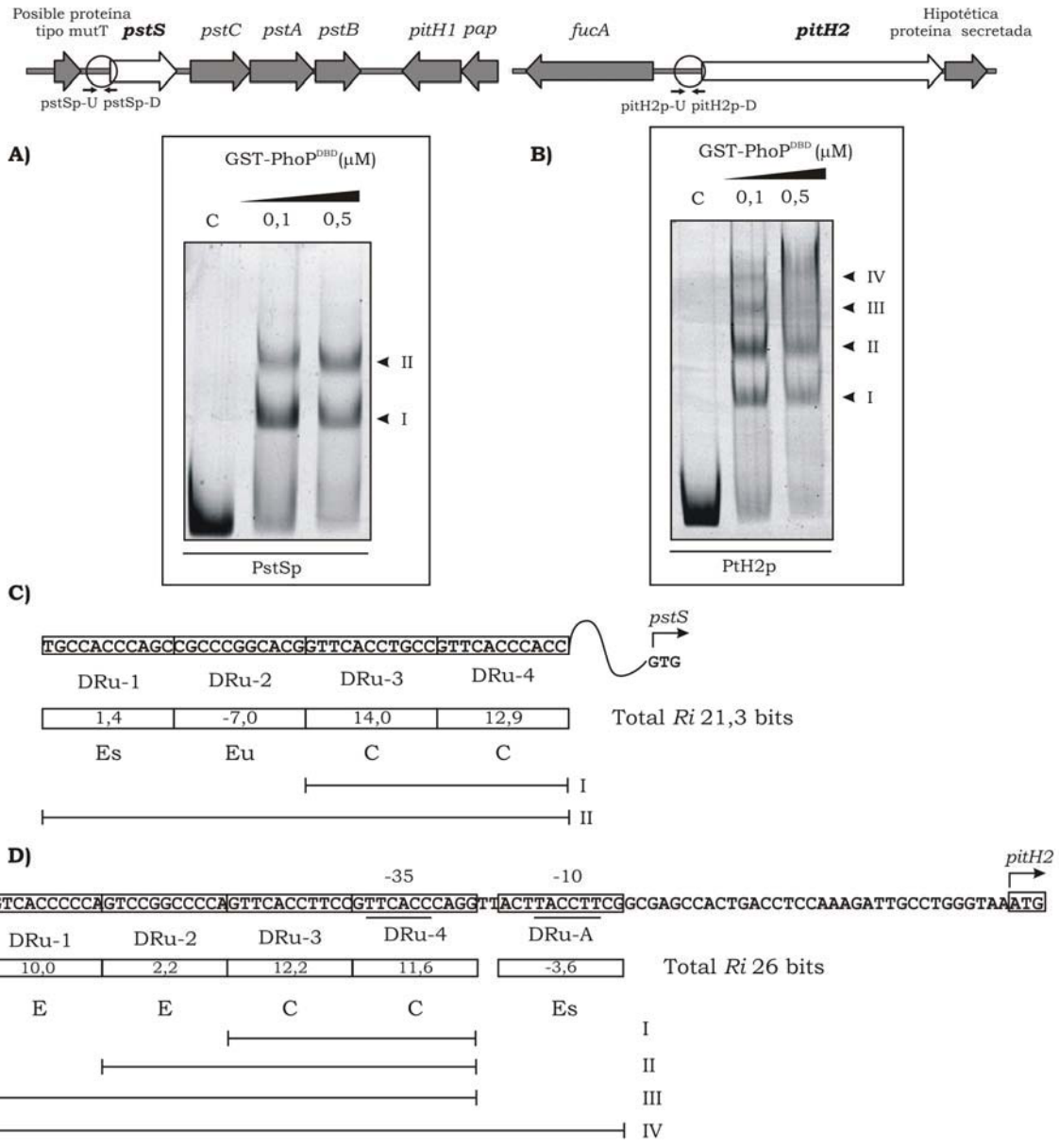


Figura 3.50: Estructura operadora de la región promotora de *pstS* y *pitH2* de `*S. tsukubaensis´*.** El esquema de la figura sigue el mismo patrón que en las anteriores figuras. **A)** y **B)** Localización de *pstS* y *pitH2*, respectivamente, en el genoma de `*S. tsukubaensis´* y resultado de los ensayo de EMSA. **C) y **D)** Localización de las cajas PHO en los operadores de *pstS* y *pitH2*, respectivamente. Para cada DRu se indica el valor información (*Ri*) y el tipo de unidad. Las barras con número romanos indican las DRus que forman cada complejo de unión observado en los EMSA. En el caso del operador de *pitH2* se indican subrayadas las secuencias que constituyen las posibles cajas -10 y -35.

Consumo de material de almacenamiento

La célula bacteriana acumula polifosfatos como reserva de fosfato y energía. En condiciones de escasez de fosfato, estos polímeros son hidrolizados para formar ATP, en una reacción catalizada por la enzima PpK.

En *`S. lividans´* se ha demostrado que la enzima PpK se encuentra bajo el control positivo de PhoR-P (Ghorbel *et al.*, 2006b) aunque no se ha probado el control directo de PhoP sobre la expresión de *ppK*. En cambio, en *`S. tsukubaensis´* se detecta un complejo de retraso (Figura 3.51) en el análisis mediante EMSA de la unión de PhoP a la región promotora de *ppK* demostrándose el control directo del regulador PhoP sobre la expresión de este gen.

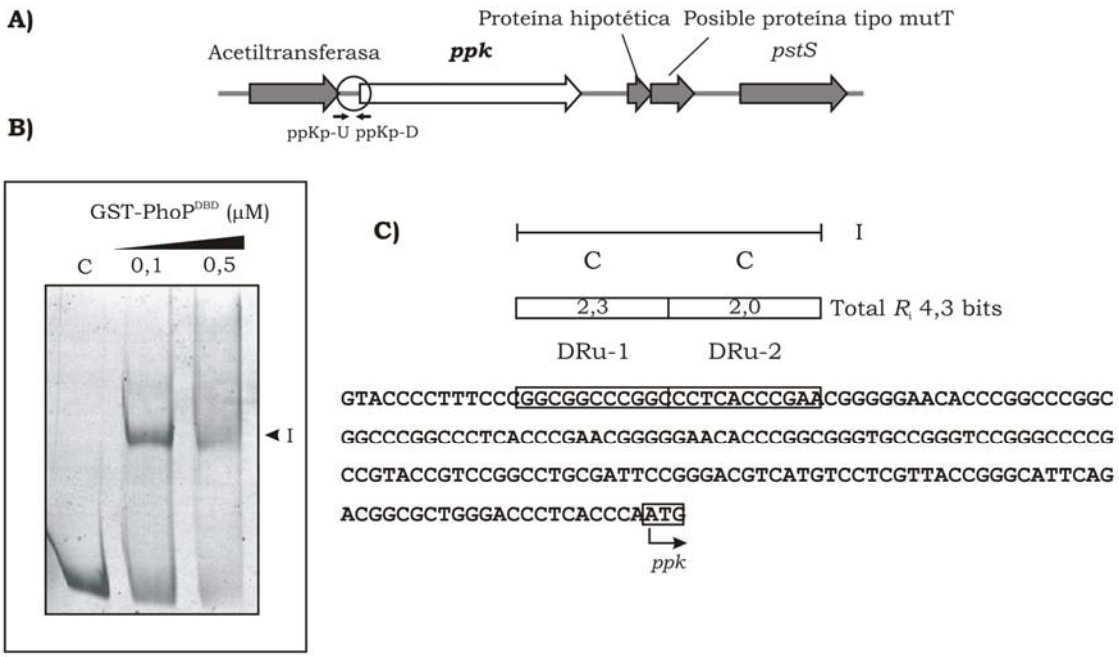


Figura 3.51: Estructura operadora de la región promotora de *ppK* de *`S. tsukubaensis´*.** El esquema de la figura sigue el mismo patrón que en las anteriores figuras. **A)** Localización de *ppK* en el genoma de *`S. tsukubaensis´*. **B) Resultado del ensayo de EMSA. **C)** Localización de la caja PHO en la zona promotora de *ppK*. Para cada DRu se indica el valor de información (*Ri*) (recuadrado) y el tipo de unidad. La barra indica que la unión de dos monómero de PhoP a las dos DRus núcleo (C) constituye el complejo de retraso observado en el EMSA.

Interacción entre el metabolismo del fosfato y del nitrógeno

En *S. coelicolor* se ha demostrado que PhoP ejerce un fino control sobre el metabolismo del nitrógeno mediante dos mecanismos; ya que reprime la expresión del regulador global del metabolismo del nitrógeno *glnR* y además controla la expresión de genes implicados en dicho metabolismo como las glutamina sintetasas *glnA* y *glnII* y el operón *amtB-glnK-glnD*, el cual codifica un transportador de amonio y dos posible proteínas sensoras/reguladoras (Rodríguez-García *et al.*, 2009). PhoP provoca una represión de la expresión de estos genes, en parte interfiriendo con la acción de GlnR.

Al igual que el fosfato, el nitrógeno es un elemento esencial para la célula microbiana. Así, encontramos que las proteínas implicadas en el metabolismo del nitrógeno y su regulación están altamente conservadas entre las especies del género *Streptomyces* e incluso en el orden de los Actinomycetales (Tiffert *et al.*, 2008).

En la región promotora de *glnR* de *`S. tsukubaensis´* se identificó mediante búsqueda informática un posible caja PHO en la cadena antisentido a 82 pb del inicio de traducción de *glnR*. Mediante el análisis por EMSA de esta zona promotora no se detectó un complejo de unión, a pesar de que las unidades de repetición presentan un alto grado de conservación (Figura 3.52). Cabe destacar, que la posible caja PHO localizada bioinformáticamente presenta una estructura operadora totalmente diferente a la identificada en la región promotora de *glnR* de *S. coelicolor* (Rodríguez-García *et al.,* 2009). Además, mediante análisis bioinformático de la región promotora de *glnR* en otras especies de *Streptomyces* no se detectó ninguna estructura operadora similar a la definida en *S. coelicolor* por lo que es probable que el control, a dos niveles, de PhoP sobre el metabolismo del nitrógeno no esté conservado en diferentes especies del género *Streptomyces*.

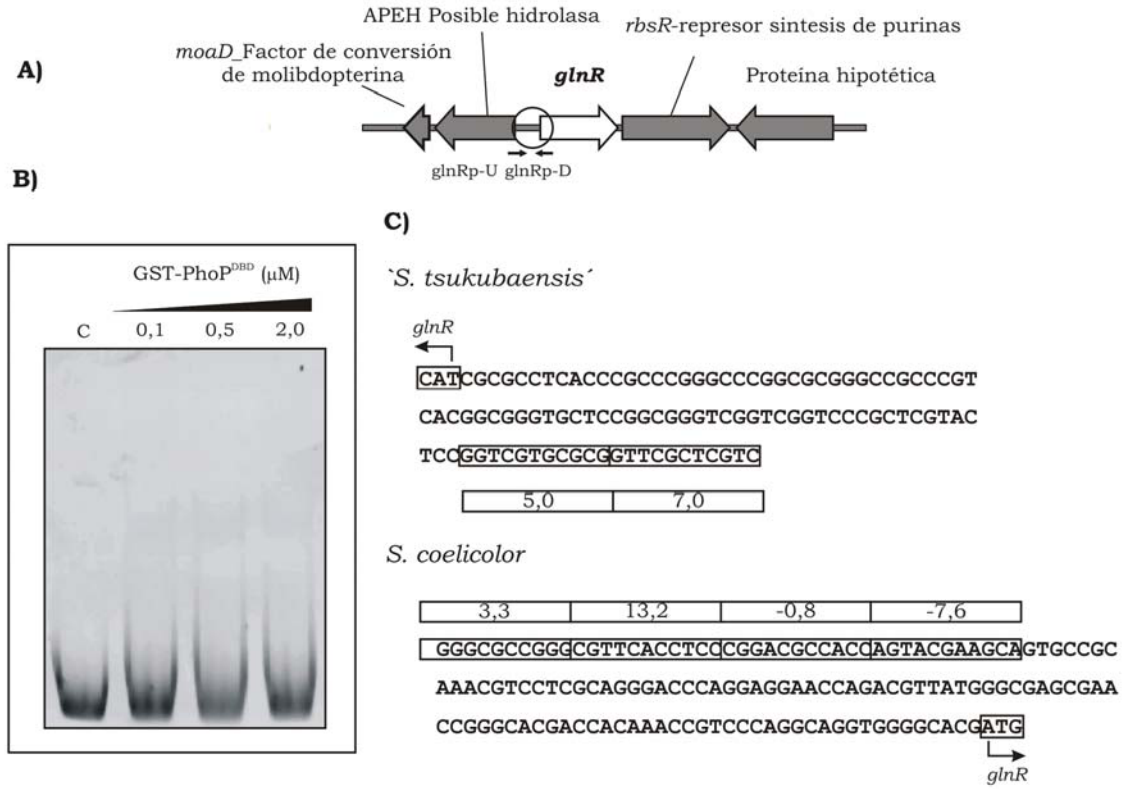


Figura 3.52: Análisis mediante EMSA de la región promotora de *glnR* de *`S. tsukubaensis´*.** El esquema de la figura sigue el mismo patrón que en las anteriores figuras. **A)** Organización génica de la región del genoma de *`S. tsukubaensis´* en la que se localiza *glnR*. **B) Resultado del análisis mediante EMSA de la unión de PhoP^{DBD} a la región promotora de *glnR*. **C)** Comparación de la posible caja PHO localizada en la región promotora de *glnR* de *`S. tsukubaensis´* con la estructura operadora definida en el caso de *S. coelicolor*.

El análisis mediante EMSA de los genes implicados en el metabolismo de nitrógeno *glnA*, *glnII* y *amtB* de `*S. tsukubaensis*´ resultó en claros complejos de retraso en el caso de *glnA* y *amtB*, no así para *glnII* (Figuras 3.53 y 3.54).

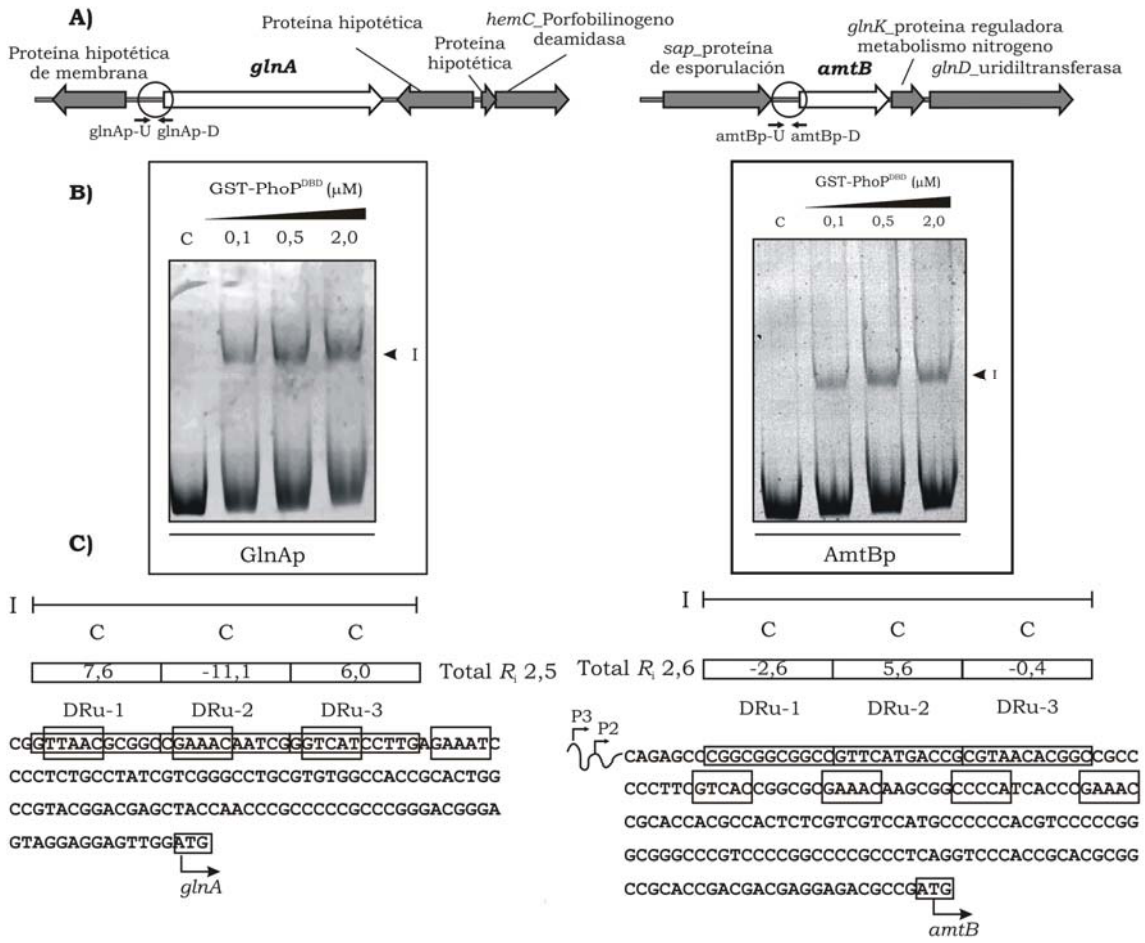


Figura 3.53: Unión de PhoP a la región promotora de los genes *glnA* y *amtB* de `*S. tsukubaensis*´**. La figura se esquematiza como las anteriores figuras y además se indican los sitios de unión de GlnR mediante cuadrados más anchos que las cajas PHO. **A)** Organización génica de la región del genoma de `*S. tsukubaensis*´ en la que se localiza *glnA y amtB,* respectivamente. **B) Resultado de los experimento de EMSA. **C)** Estructura operadora para *glnA* y *amtB*. Para cada DRu se indica el valor de contenido en información (*Ri*) y el tipo de unidad; en este caso son todas unidades núcleo (C). Con una barra se indica los complejos de retraso que se corresponden con lo observado en el EMSA. En el caso de la región promotora de *amtB* se indica la posición de los posibles promotores P2 y P3 en relación a las cajas PHO.

La interacción entre PhoP y GlnR en la expresión de *glnA* y *amtB* se ha analizado comparando la posición de los posibles sitios de unión de GlnR, los cuales se encuentran muy conservados entre *S. coelicolor* y `*S. tsukubaensis*´, y la localización de las cajas PHO (Figura 3.53). La regulación cruzada entre PhoP y GlnR mantiene el mismo mecanismo que en el caso de *S. coelicolor*. Así, PhoP reprimiría la expresión de *glnA* interfiriendo con la unión

de GlnR a la zona promotora de este gen (los sitios de unión de PhoP y GlnR solapan en la región promotora de *glnA*) mientras que en el caso de *amtB* (los sitios de unión de PhoP y GlnR no coinciden), se propone que PhoP inhibe la transcripción mediante un mecanismo denominado "*road-block*". Este mecanismo consiste en el bloqueo de la acción de la ARN polimerasa por parte de PhoP interponiéndose entre los promotores P2 y P3 (que se situarían corriente arriba de la caja PHO) y la zona codificante (Rodríguez-García *et al.*, 2009).

En el caso de *glnII* no se puede establecer con seguridad que sea un miembro del regulón *pho* debido a que el ensayo EMSA resulta en una leve banda de retraso. Sin embargo, se pueden localizar cinco unidades de repetición con la misma estructura operadora de la región promotora de *glnII* de *S. coelicolor* (Figura 3.54). La dificultad para la detección del complejo de unión puede ser debida a la baja conservación de estas unidades de repetición que presenta un total de información de 1,3 bits y por lo tanto muy baja afinidad de PhoP por esta región promotora, si es que es una unión real.

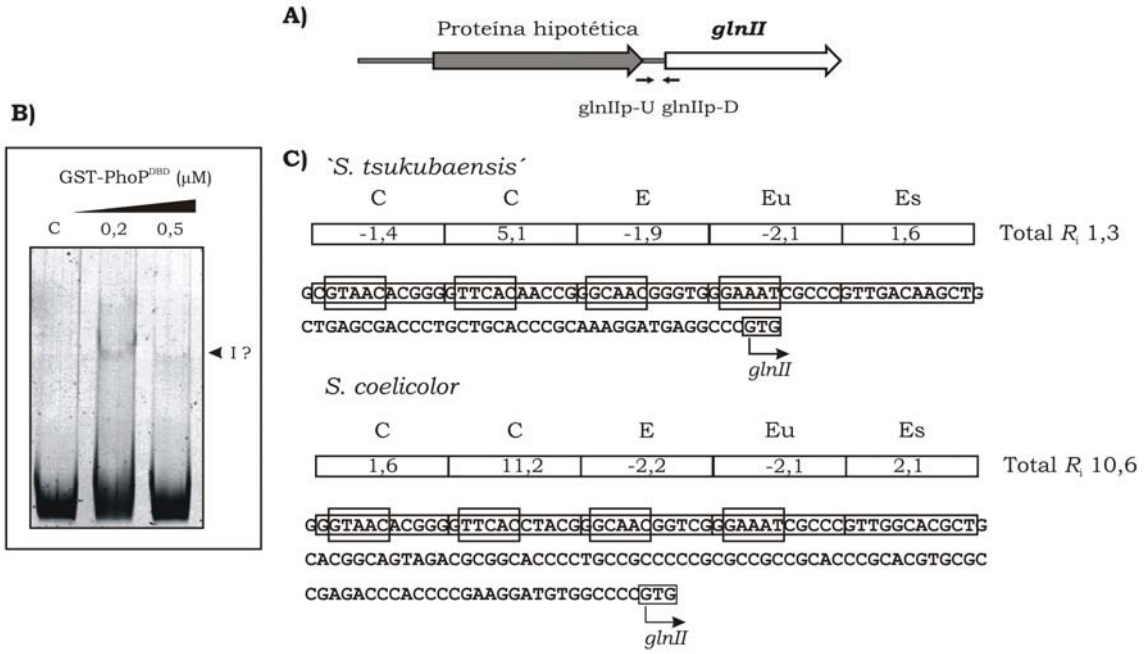


Figura 3.54: Análisis mediante EMSA de la unión de PhoP a la región promotora de *glnII* de *`S. tsukubaensis´*.** Esquema similar al de figuras anteriores. **A)** Organización génica de la región del genoma de *`S. tsukubaensis´* en la que se localiza el gen *glnII*. **B) Resultado del análisis mediante EMSA de la unión de PhoP^{DBD} a la región promotora de *glnII*. **C)** Comparación de la posible caja PHO localizada en la región promotora de *glnII* de *`S. tsukubaensis´* con la estructura operadora de la caja PHO definida en el caso de *S. coelicolor*.

Otros miembros del regulón *pho* de `*S. tsukubaensis*´

También se han localizado posibles dianas de PhoP en regiones promotoras de otros genes, los cuales han sido definidos como miembros del regulón *pho* en *S. coelicolor*, pero su implicación en la respuesta a la escasez de fosfato es desconocida. Mediante EMSA se ha podido confirmar la presencia de una caja PHO en la región intergénica entre los genes codificantes de una acetoacetil-CoA sintetasa y una glicosil hidrolasa. Por el contrario, el análisis de la región intergénica entre los genes codificantes de una proteína reguladora del catabolismo de las purinas y una deshidrogenasa (*coxM*) ha resultado negativo (Figura 3.55).

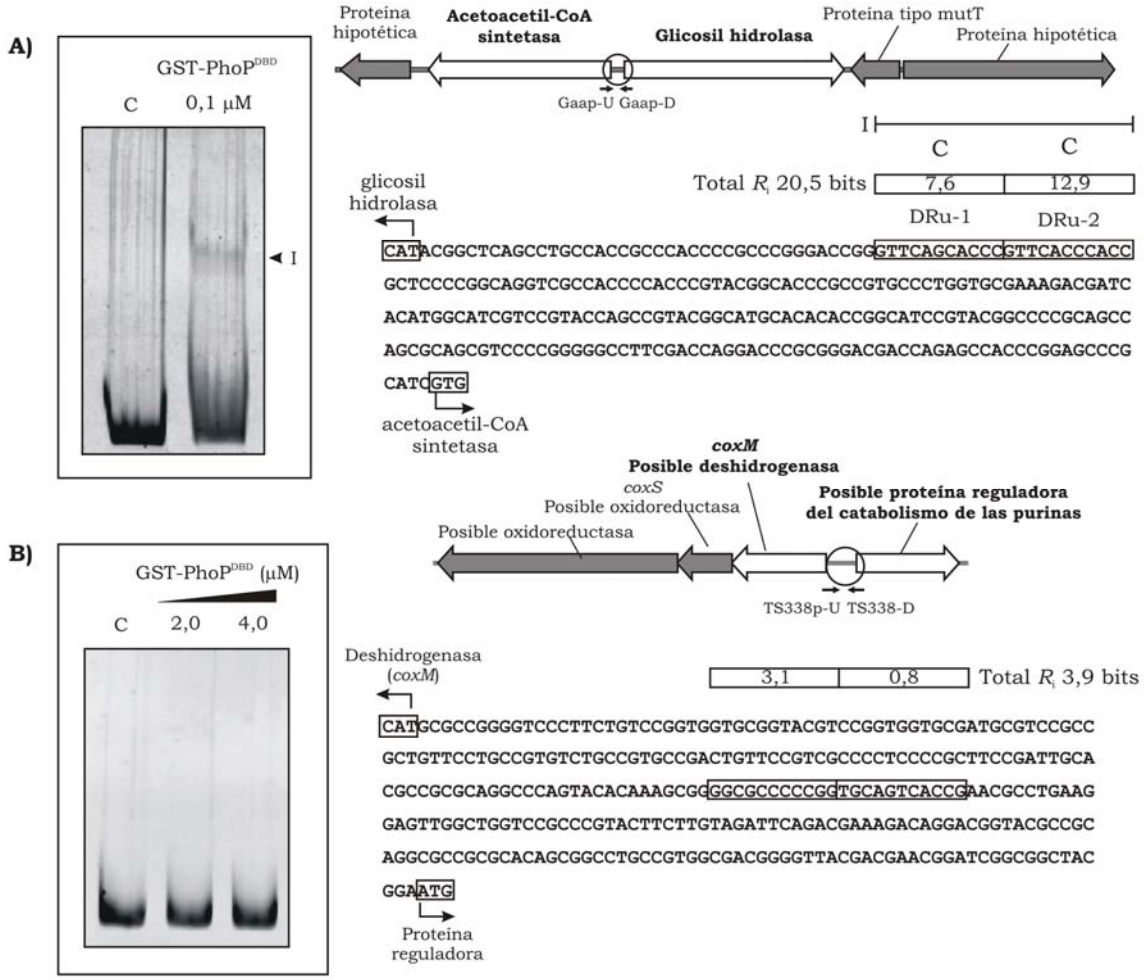


Figura 3.55: Análisis mediante EMSA de otros posibles miembros del regulón *pho* en `*S. tsukubaensis*´. La figura sigue el mismo esquema de las anteriores. **A)** Resultados de la región intergénica entre una glicosil hidrolasa y una acetil-CoA sintetasa. En el ensayo de EMSA se marca con una punta de flecha el complejo de retraso detectado. En la secuencia de la región intergénica se indican las DRus que forman la caja PHO, así como el tipo de repetición y el valor de contenido de información (*Ri*) de las mismas. **B)** Análisis de la unión de PhoP a la región intergénica entre una proteína reguladora del catabolismo de las purinas y una posible deshidrogenasa (*coxM*). No se detecta ningún complejo de retraso.

Metabolismo secundario

El análisis bioinformático de la agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus no permitió localizar ninguna posible zona de unión de PhoP que presentase un alto grado de conservación. Sin embargo, al igual que se ha observado en *S. coelicolor* (Santos-Beneit *et al.*, 2009a), sí que se localizó una posible caja PHO en la zona promotora de *afsS*, gen implicado en el metabolismo secundario. En *S. coelicolor* se ha demostrado que el regulador global AfsR controla la expresión de los genes de biosíntesis de undecilprodigiosina y actinorrodina mediante la activación de los reguladores específicos *actII*-ORF4 y *redD* (Floriano y Bibb, 1996). Hasta el momento, la única diana conocida de AfsR es un pequeño gen tipo factor sigma localizado en 3´ conocido como *afsS.*

La unión de PhoP a la región promotora de *afsS* en *`S. tsukubaensis´* ha sido confirmada mediante ensayos de retraso en gel aunque la unión de PhoP parece ser débil (Figura 3.56). La estructura operadora, formada por dos unidades de repetición tipo núcleo, es del mismo tipo que la definida en *S. coelicolor* (Santos-Beneit *et al.,* 2009a). Mediante esta ruta PhoP interviene de manera indirecta en la regulación del metabolismo secundario.

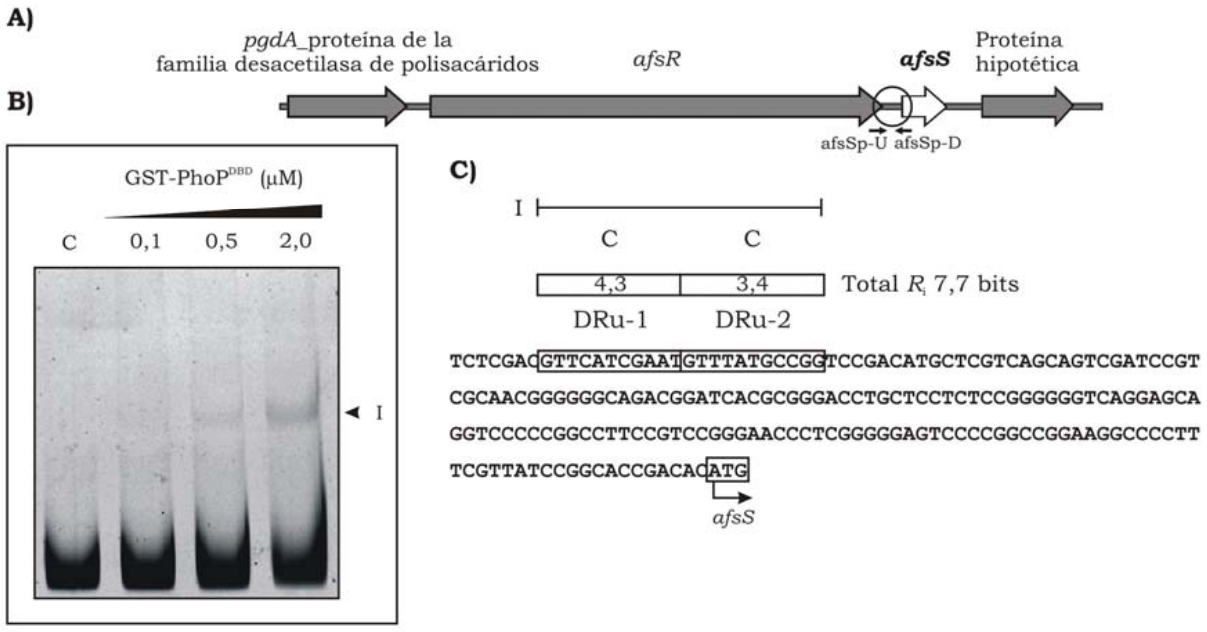


Figura 3.56: Estructura operadora de la región promotora de *afsS* de *`S. tsukubaensis´*.** Se sigue el mismo esquema que en figuras anteriores. **A)** Organización génica de la región del genoma de *`S. tsukubaensis´* en la que se localizan *afsR* y *afsS*. **B) Resultado del ensayo de retraso en gel. Se indica el complejo de unión detectado. **C)** Estructura operado de la zona de unión de PhoP en la región promotora de *afsS*. El valor de contenido de información de cada DRu se indica en una caja y en la parte superior de las mismas también se indica el tipo de repetición, en este caso tipo núcleo (C). La barra indica las DRus que forman el complejo de unión detectado en B).

Discusión general

4.1. Estudios preliminares de las especies *S. tacrolimícus* y *`S. tsukubaensís´*

4.1.1. Especies de *Streptomyces* productoras de tacrolimus

La ciclosporina, de origen fúngico, fue el primer compuesto inmunosupresor utilizado en el tratamiento del rechazo al órgano trasplantado. A pesar de su eficacia contra el rechazo también presenta una serie de efectos no deseados como nefrotoxicidad, hepatoxicidad y leves perturbaciones del sistema nervioso central. Con el objetivo de descubrir nuevos fármacos más potentes y menos tóxicos se llevaron a cabo estudios de fermentación con diferentes microorganismos y así el 1984 se descubrió el tacrolimus, compuesto macrólido producido por una especie del género *Streptomyces* (Kino *et al.*, 1987a; Kino y Goto, 1993).

Además de la ciclosporina y del tacrolimus, actualmente existen otros compuestos aprobados para su uso como inmunosupresores para evitar el rechazo tras el trasplante de órganos como el micofenolato y la rapamicina. Pero hasta el momento, el tacrolimus ha resultado el fármaco más eficaz suponiendo unas ventas durante el año 2009 por valor de 2253 millones de dólares en todo el mundo (www.evaluatepharma.com).

Debido al importante interés económico del tacrolimus, tras el descubrimiento de *`S. tsukubaensis´* como microorganismo productor por científicos de Fujisawa (ahora Astellas Pharma), otras compañías farmacéuticas se lanzaron a la búsqueda de nuevas especies de *Streptomyces* productoras. Así, a principios de los años 90 aparecieron dos nuevas especies productoras patentadas por Merck, *Streptomyces* sp. MA6548 y MA6858. Ambas son depositadas en la ATCC, la primera bajo patente, por lo tanto con acceso restringido, con el número ATCC 53770 y la segunda como ATCC 55098 de acceso público. Los pocos trabajos de Biología Molecular con cepas de *Streptomyces* productoras de inmunosupresores que se han realizado hasta el momento se llevaron a cabo por científicos de la compañía Merck; en un principio con las dos cepas (Shafiee *et al.*, 1994; Motamedi *et al.*, 1996) pero finalmente los principales genes de la agrupación génica de biosíntesis de tacrolimus fueron secuenciados y analizados en la cepa MA 6548 (ATCC 53770) (Shafiee *et al.*, 1997; Motamedi *et al.*, 1997; Motamedi y Shafiee, 1998). Teniendo en cuenta estos antecedentes, la especie *Streptomyces* sp. ATCC 55098 (MA 6858) fue elegida para el estudio de la producción de tacrolimus debido a que en el inicio de este trabajo era la especie de acceso público con la que se había realizado cierto trabajo de Biología Molecular.

Además de las especies anteriormente mencionadas, recientemente se han definido como productoras de tacrolimus las especies *Streptomyces* sp. MA 6949 (Sigmund *et al.*, 2003), *S. kanamyceticus* KCC-S0436 (Muramatsu *et al.*, 2005), *Streptomyces glaucescens* (Kumar *et al.*, 2005), un mutante de *`S. clavuligerus* CKD 1119´ (Kim y Park, 2008) y otras

especies de *Streptomyces* sin caracterizar {*Streptomyces* sp. NJYH2618 y *Streptomyces* sp. T300 (CGMCC1779)] que han aparecido bajo patente (Yang *et al.*, 2009; Zhan *et al.*, 2009). Aunque las cepas mencionadas anteriormente han sido descritas como productoras de tacrolimus, en algunos casos no se ha podido encontrar ni publicación ni patente en la que se detalle el potencial de producción de dichas cepas, como ocurre con *Streptomyces* sp. MA6949 y en otros casos se confunden diferentes cepas, como sucede con MA 6548 (ATCC 53770) y MA 6858 (ATCC 55098), que son consideradas la misma cepa en el reciente trabajo de Goranovic y colaboradores (2010). Existe una cierta confusión entre las especies del género *Streptomyces* productoras de tacrolimus.

La mayor parte de los trabajos realizados con estas especies productoras de tacrolimus han ido encaminados especialmente a la optimización de la producción industrial del inmunosupresor; dedicándose pocos esfuerzos a la caracterización taxonómica de las mismas. Por lo tanto, como primer punto en el trabajo realizado con *`S. tsukubaensis´* y *Streptomyces* sp. ATCC 55098, se llevaron a cabo estudios fenotípicos, genotípicos y filogenéticos con el objetivo de caracterizar de manera rigurosa, a ambas cepas, como especie única dentro del género *Streptomyces*. Así, *Streptomyces* sp. ATCC 55098 ha sido aceptada como especie única bajo el nombre de *S. tacrolimicus* (Martínez-Castro *et al.*, 2010). En el caso de *`S. tsukubaensis´* la publicación de estos resultados y por lo tanto la validación del nombre requiere certificados de depósito que se están gestionando en la actualidad. Debido a que es una cepa bajo patente la obtención de dichos certificados conlleva un proceso más largo que en el caso de cepas de acceso público.

Los únicos estudios a nivel taxonómico realizados previamente con especies productoras de tacrolimus y ascomicina han demostrado que no existe una relación filogenética entre estas especies (Garrity *et al.*, 1993; Muramatsu *et al.*, 2005) pero, hasta el momento, los únicos estudios de caracterización taxonómica de las especies productoras de tacrolimus *`S. tsukubaensis´* NRRL 18488 y *S. tacrolimicus* ATCC 55098^T (CECT 7664^T) son los presentados en esta tesis. Los cuales confirman, de nuevo, la falta de relación filogenética entre estas especies.

4.1.2. Características genéticas de *S. tacrolimicus* y *`S. tsukubaensis´*

La manipulación genética de la cepa de *S. tacrolimicus* para el estudio a nivel molecular de la producción de tacrolimus requiere disponer de un sistema de transformación eficiente. En este caso, se ha observado una relativa facilidad para la manipulación génica; así, en la transferencia de cósmidos por conjugación se han obtenido valores del orden de $2x10^{-7}$ exconjugantes/espora, eficiencia unas 1000 veces más baja que la observada en *S. coelicolor* (Gust *et al.*, 2003), similar a la obtenida en *S. natalensis* (Enríquez *et al.*, 2006) pero entre 100 y 1000 veces más alta que en el caso de *`S. tsukubaensis´*.

Es frecuente que cepas de carácter industrial sean muy refractarias a la manipulación génica (Matsushima y Baltz, 1989) y en ocasiones el desarrollo de un sistema eficiente de manipulación génica puede ser muy laborioso. Sin embargo, en el trabajo realizado con la especie *S. tacrolimus,* el principal obstáculo se presentó en la producción de tacrolimus. Tras el análisis de numerosos medios y condiciones de fermentación se ha conseguido producir una sustancia con posible actividad inmunosupresora (basado en análisis por bioensayo utilizando un mutante de *S. cerevisiae* sensible a tacrolimus), que mediante el análisis por HPLC ha resultado ser un compuesto diferente al tacrolimus o a la ascomicina y, por el momento, no se ha determinado el tipo de compuesto. Aunque *S. tacrolimicus* (ATCC 55098) es reconocido como una de las especies del género *Streptomyces* productoras de tacrolimus, los títulos de producción obtenidos con esta cepa son muy bajos en relación con *`S. tsukubaensis´* y *`S. clavuligerus* CKD 1119´ (Kim y Park, 2008; Singh y Behera, 2009). Por ello ante la dificultad para obtener una producción estable con la especie *S. tacrolimicus,* se llevó a cabo el estudio de los mecanismos de regulación de la biosíntesis de tacrolimus en otras especies productoras como *`S. tsukubaensis´*.

La perdida de la capacidad de producción de tacrolimus por la especie *S. tacrolimus* puede ser debida a la degeneración de la especie por la alta tasa de inestabilidad génica característica del género *Streptomyces.* En la bibliografía encontramos otro ejemplo muy similar como es el caso de *`S. hygroscopicus* subsp. *yakushimaensis´,* especie descrita como productora de ascomicina en publicaciones y patentes (Hatanaka *et al.*, 1988; Okuhara *et al.*, 1990); sobre la que se detalla una falta de producción de ascomicina en el trabajo por Garrity y colaboradores (1993). En este punto, sería interesante discernir las causas por las que la especie *S. tacrolimicus* ha perdido la capacidad de producción de tacrolimus lo que puede resultar muy útil en la estabilización de cepas con importancia industrial.

Existen diversos ejemplos de la perdida de producción de metabolitos secundarios en especies de *Streptomyces* debidos a cambios en el cromosoma. En la especie *S. ambofaciens* se ha demostrado que la amplificación de una parte inestable del cromosoma provoca la falta de producción de espiramicina (Aigle *et al.*, 1996). En esta amplificación se localiza la región codificante de una policétido sintasa, la cual puede interferir en la ruta de biosíntesis del macrólido espiramicina. Por otra parte, en *Streptomyces fradiae* se han identificado mutantes no productores de tilosina debido a la interrupción de la agrupación génica de biosíntesis por un fragmento de ADN compuesto por repeticiones en tándem (Beckmann *et al.*, 1989). Por lo general, los genes de biosíntesis de metabolitos secundarios se localizan en los brazos del cromosoma del género *Streptomyces*, los cuales presentan una mayor tasa de inestabilidad que el centro del cromosoma, en el cual se localizan los genes esenciales. Por ejemplo, se ha demostrado que la especie productora del antibiótico oxitetraciclina *S. rimosus* puede perder la capacidad de producción debido a una deleción en uno de los extremos del cromosoma en el que se localizan los genes de biosíntesis de dicho antibiótico (Pandza *et al.*, 1997).

La inestabilidad génica afecta especialmente a procesos no esenciales como: i) la producción de diferentes metabolitos secundarios; ii) la resistencia a antibióticos; iii) a la formación de micelio aéreo, como en el caso de variantes de *`Streptomyces cattleya´* (Usdin *et al.*, 1985) o *S. ambofaciens* (Catakli *et al.*, 2005); o iv) la esporulación como ocurre en *S. avermitilis* (Novák *et al.*, 1993) o en *`S. tsukubaensis´*. Así, las colonias de *`S. tsukubaensis´* presentan una abundante esporulación de color gris intenso, pero muy frecuentemente, se generan mutantes espontáneos que pierden la capacidad de esporulación. Por ello, la selección de colonias con capacidad de esporulación ha permitido estabilizar en cierta medida la cepa *`S. tsukubaensis´* la cual mantiene una abúndate esporulación y la capacidad reproducible de producción de tacrolimus y ascomicina. De manera general, la inestabilidad genética se da en mayor proporción en especies de *Streptomyces* industriales que en las especies silvestres utilizadas de manera rutinaria en el laboratorio (Gravius *et al.*, 1994). Esta característica que supone una ventaja adaptativa para el género *Streptomyces* implica una mayor dificultad para el estudio de este género a nivel molecular.

4.1.3. Desarrollo de herramientas moleculares para el estudio de *S. tacrolimicus* y *`S. tsukubaensis´*

Las librerías génicas son una herramienta útil en estudios de Biología Molecular de cualquiera microorganismo y así en el género *Streptomyces* son ampliamente utilizadas principalmente para i) el aislamiento de diferentes secuencias génicas (Kharel *et al.*, 2010); ii) en los proyectos de secuenciación de genomas para realizar el ensamblado final de la secuencia de los mismos (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003) y iii) en la obtención de mutantes delecionados mediante la tecnología REDIRECT (Gust *et al.*, 2003). Por lo que se planteó la construcción de sendas librerías génicas de las especies *S. tacrolimus* y *`S. tsukubaensis´* como un paso inicial para futuros estudios con estas especies. La construcción de las librerías génicas se realizó en el cósmido SuperCos 1 por ser el utilizado en la tecnología REDIRECT.

La construcción de la librería génica es un proceso relativamente optimizado (Manual: SuperCos 1 Vector Kit, Stratagene) que precisó de algunas modificaciones (optimización de la digestión del SuperCos 1 y de las digestiones parciales del ADN genómico y ultracentifugación en gradiente de sacarosa) en la construcción de la primera librería génica, lo que facilitó que el proceso fuese reproducible y de resultados satisfactorios. La principal complicación asociada a una librería génica es el rastreo de la misma. Así, los métodos tradicionales de rastreo conllevan el análisis de un número de clones tal, que estadísticamente esté representado todo el genoma, lo cual es muy laborioso y precisa de un notable gasto de material y tiempo. Con el objetivo de facilitar el rastreo de las librerías génicas se han desarrollado diferentes sistemas, basados en la búsqueda mediante PCR (Kim

et al., 2003), hibridación de colonias *in situ* (Weis, 2001) o combinación de ambas técnicas (Green y Olson, 1990; Zhao *et al.*, 2007).

La organización de genotecas realizada en esta tesis se diseño de tal manera que permitiese el rastreo por diferentes técnicas. Así, dependiendo de las características de la secuencia objeto de búsqueda (genes de secuencia conocida o desconocida, búsqueda de varias secuencias, etc) se puede optar por el rastreo por PCR o por hibridación de colonias *in situ*, lo que aporta una mayor funcionalidad a dicha organización. Los clones de las genotecas de *S. tacrolimicus* y *`S. tsukubaensis´* se han organizado en placas de microtitulación siguiendo una disposición piramidal facilitando un rastreo sistemático en dos pasos.

4.2. Relación entre la respuesta a la escasez de fosfato y la diferenciación morfológica en *S. tacrolimicus*

La deleción del sistema de dos componentes PhoRP o de PhoP, principal sistema implicado en la respuesta a la escasez de fosfato, en *S. tacrolimicus* provoca una alteración de los patrones de diferenciación morfológica respecto a la cepa silvestre. Dicha alteración desaparece al complementar los mutantes con una copia funcional de los genes *phoRP*. Los mutantes delecionados no generan micelio aéreo y por lo tanto no esporulan en medio TBO a los 5 días de incubación a 28ºC. Por el contrario la cepa silvestre presenta abundante micelio aéreo y una esporulación normal moderada. Sin embargo, si el medio es suplementado con una concentración de 5 mM de sales de fosfato (KH_2PO_4/K_2HPO_4) la cepa silvestre presenta una diferenciación morfológica más tardía que en medio TBO mientras que las cepas delecionadas muestran una capacidad de esporulación similar a la observada en la cepa silvestre en medio TBO sin suplementar (Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Diferenciación morfológica *de S. tacrolimicus* y las cepas delecionadas Δ*phoP* y Δ*phoRP* en medio TBO.

	TBO	**TBO + Pi**
S. tacrolimicus	Esporulación	Esporulación pobre tardía
S. tacrolimicus Δ*phoP* y Δ*phoRP*	Crecimiento vegetativo deficiente	Esporulación

La escasez de nutrientes es una de las principales señales que desencadenan la diferenciación morfológica en *Streptomyces* (Pope *et al.*, 1996; Karandikar *et al.*, 1997), es decir la formación de micelio aéreo y posteriormente la generación de formas de resistencia, conocidas como esporas. Las esporas permiten la supervivencia de la bacteria durante

periodos de escasez hasta que las condiciones nutricionales se recuperan produciéndose su germinación y la generación de micelio sustrato.

En medio **TBO** la esporulación de la **cepa silvestre** de *S. tacrolimicus* es moderada mientras que se observa un crecimiento vegetativo deficiente en el caso de las **cepas delecionadas;** lo que puede ser debida a la incapacidad para el aprovechamiento del bajo fosfato existente en el medio provocada por la inactivación del sistema de dos componentes PhoR-P. En varias especies del género *Streptomyces*, *`S. lividans´*, *S. natalensis* y en *S. coelicolor* se ha observado que la inactivación del sistema PhoR-P provoca deficiencias de crecimiento de las cepas mutadas respecto a las parentales, en medios con baja concentración de fosfato (Sola-Landa *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2007; Santos-Beneit *et al.*, 2008). Además, en *`S. lividans´* se ha demostrado que la inactivación del sistema PhoR-P provoca un transporte deficiente de fosfato inorgánico al interior celular lo que puede ser la causa del crecimiento deficiente.

Las bacterias han desarrollado dos tipos de transportadores de fosfato inorgánico: de baja afinidad, Pit y de alta afinidad, Pst. En *S. coelicolor* se han identificado tres de estos transportadores; de los cuales PitH1 actúa principalmente en condiciones de exceso de fosfato, mientras que los transportadores PitH2 y Pst se expresan bajo el control de PhoP en condiciones limitantes de fosfato (Santos-Beneit *et al.*, 2008). En las cepas delecionas de *S. tacrolimicus* Δ*phoP* y Δ*phoRP* sólo se puede expresar el transportador PitH1, el cual transporta eficientemente fosfato inorgánico al interior celular cuando dicho elemento se encuentra en exceso. Así, en medio TBO la captación de fosfato por parte de las cepas delecionadas es deficiente por lo que no pueden desarrollar un crecimiento normal y por lo tanto, tampoco se diferencian

En medio **TBO suplementado con fosfato** la **cepa silvestre** de *S. tacrolimicus* se encuentra en condiciones nutricionales plenas por lo que la diferenciación morfológica es más tardía que en el medio TBO, no se observa una esporulación normal incluso a los 15 días de incubación. Sin embargo, la **cepas delecionadas** en el sistema PhoRP no pueden desencadenar una respuesta a la escasez de fosfato normal, por lo que no se aprovechan los recursos para la obtención de fosfato en condiciones limitantes y por lo tanto se produce una diferenciación morfológica más temprana que en la cepa silvestre.

En conclusión, la **inactivación del sistema PhoR-P** en *S. tacrolimicus* provoca un **crecimiento deficiente** en condiciones de escasez de fosfato, que puede ser debido a deficiencias en el transporte de fosfato al interior celular (ya que está afectada la expresión de los transportadores *pitH2* y *pstSCAB*) y una **diferenciación morfológica precoz** en condiciones de alto fosfato.

Así como los efectos en el crecimiento vegetativo y en la producción de metabolitos secundarios han sido descritos en todos las cepas en las que se ha inactivado el sistema

PhoR-P (Sola-Landa *et al.*, 2003; Ghorbel *et al.*, 2006a; Mendes *et al.*, 2007; Santos-Beneit *et al.*, 2008) en ninguno de los casos se mencionan cambios en la diferenciación morfológica. Únicamente, en el trabajo de Rodríguez-García y colaboradores (2007) se describe una represión por PhoP sobre algunos genes implicados en la diferenciación morfológica, lo que coincide con la esporulación precoz en medio TBO con alto fosfato observada en los mutantes Δ*phoP* y Δ*phoRP* de *S. tacrolimicus*. La concentración de fosfato en el medio de crecimiento es uno de los factores nutricionales más importantes implicados en el crecimiento, en la diferenciación morfológica y en la biosíntesis de metabolitos secundarios en el género *Streptomyces* (Chater y Bibb, 1997), pero hasta el momento se ha profundizado especialmente en aspectos de metabolismo primario y producción de antibióticos y poco se conoce de los efectos del sistema PhoRP en la diferenciación morfológica.

La diferenciación morfológica es un proceso complicado y costoso para la célula por lo que antes de desencadenarse dicho proceso se agotan otra serie de alternativas, como puede ser la respuesta a la escasez de fosfato, en la cual la célula explota todo su potencial para la obtención de fosfato. En ***B. subtilis*** se ha demostrado que antes de iniciarse el proceso de esporulación se activan otra serie de funciones encaminadas a mantener la supervivencia como: i) un incremento de la motilidad, ii) la producción de antibióticos para eliminar a otros microorganismos competidores, iii) la secreción de enzimas hidrolíticas y iv) factores de competencia para facilitar la captación de ADN que, ocasionalmente, permite incorporar nueva información genética (Stephens, 1998). En la respuesta a la escasez de fosfato de esta bacteria se interconectan múltiples sistemas de dos componentes (ver introducción 1.3.1), entre los que se incluyen el sistema PhoR-P y el regulador de respuesta Spo0A, proteína que integra señales fisiológicas externas e internas para controlar el inicio de la esporulación. Ante una situación de escasez de fosfato, se activa el sistema PhoR-P desencadenándose cambios en la célula para sobrevivir a la falta de este elemento; pero si la limitación continúa en el tiempo, el regulador **Spo0A** reprime indirectamente la expresión de *phoRP* y provoca el inicio de la esporulación (Hulett, 1996).

En el género ***Streptomyces*** se ha definido un regulador global denominado **RamR** en *S. coelicolor* (Nguyen *et al.*, 2002) y **AmfR** en *S. griseus* (Yamazaki *et al.*, 2003) que actúa de manera similar a Spo0A. El regulador RamR/AmfR es activado por la cascada de genes *bld* (Keijser *et al.*, 2002) la cual integra diferentes factores como el balance energético, la densidad de hifas o señales de escasez nutricional (Claessen *et al.*, 2006). Cuando la señal es detectada por RamR se produce la activación de genes de diferenciación como el operón *ramCSAB*. Así, se acelera la formación de SapB, péptido derivado del producto de *ramS*, el cual recubre las hifas aéreas formando una capa hidrofóbica para poder romper la tensión superficial y por lo tanto importante en la formación del micelio aéreo (Kodani *et al.*, 2004). Al igual que Spo0A, RamR es el punto de integración de diferentes señales controlando el inicio de la formación de micelio aéreo, el paso previo a la esporulación en el género *Streptomyces*

(Nguyen *et al.*, 2002). Además se ha demostrado que **PhoP** ejerce un efecto represor sobre algunos genes de diferenciación morfológica, como el gen ***chpC***, codificante de una chaplina, molécula que también interviene en la formación de la capa hidrofóbica que recubre las hifas aéreas (Rodríguez-García *et al.*, 2007).

En resumen, ante una situación de escasez de fosfato en el medio, en primer lugar se desencadenaría la respuesta mediada por PhoR-P dirigida fundamentalmente a la obtención de fosfato, esencial para la supervivencia de la célula, mientras que los mecanismos necesarios para la diferenciación morfológica se encontrarían inhibidos. En el momento en que se agotasen los recursos para la obtención de fosfato, se activaría la acción de RamR inhibiendo la respuesta mediada por PhoR-P e iniciándose la diferenciación morfológica mediante la formación de SapB y de otras chaplinas que previamente se encontraban reprimidas por PhoP (Figura 4.1).

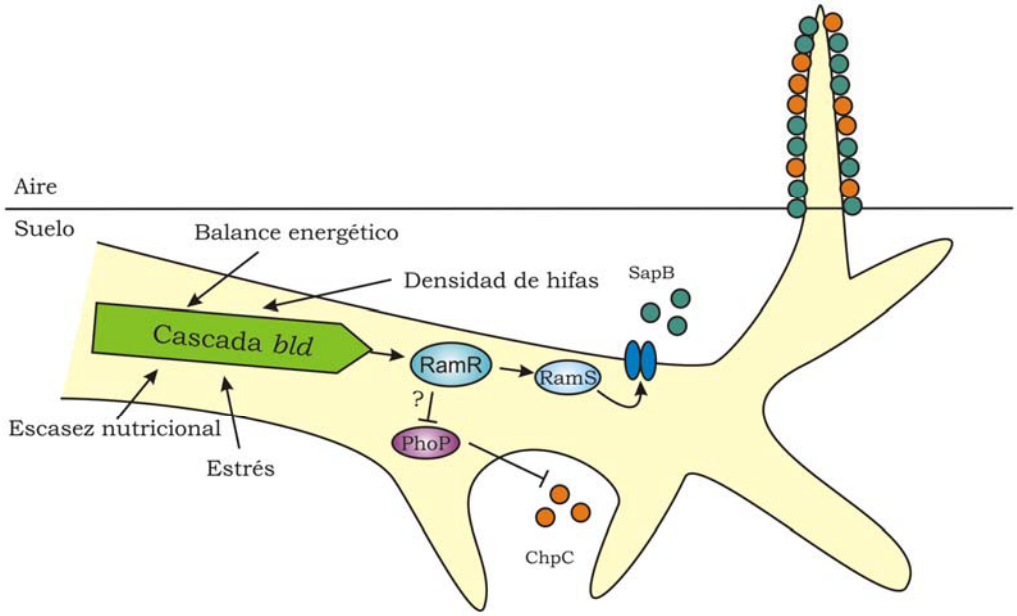


Figura 4.1: Posible implicación de PhoP en la diferenciación morfológica en *Streptomyces*. Modelo propuesto de modulación del sistema PhoR-P por el regulador RamR implicado en el control de la formación del micelio aéreo. Ante una situación de escasez de fosfato continua, el regulador RamR activado a través de la cascada *bld* inhibe la expresión de PhoP y activa la formación de SapB, necesario para la formación del micelio aéreo. Las flechas indican activación y las líneas truncadas indican represión. La inhibición de RamR sobre PhoP se marca con un interrogante ya que no ha sido demostrado.

En el género *Streptomyces* se ha estudiado en profundidad la respuesta que se desencadena tras la activación del sistema PhoR-P y las etapas que constituyen la diferenciación morfológica: los genes *bld* en la formación del micelio aéreo (Claessen *et al.*, 2006) y los genes *whi* (Chater, 2001). Sin embargo, se desconoce cómo se produce la captación de la señal de escasez de fosfato y la regulación de dicho sistema de dos

componentes. Es posible que este género se produzca una regulación similar a la definida en *B. subtilis* y el regulador RamR/AmfR provoque una represión del sistema PhoR-P tras una limitación continua de fosfato, frenándose la respuesta a la escasez de fosfato para iniciarse la diferenciación morfológica.

En el género *Streptomyces*, también se ha descrito otro regulador pleiotrópico implicado en el desencadenamiento de la diferenciación morfológica tras una escasez nutricional, **el factor de respuesta estricta ppGpp**. La expresión de este factor provoca la inhibición de genes de crecimiento rápido y la activación de genes implicados en el metabolismo secundario y la diferenciación morfológica (Hesketh *et al.*, 2007). En *S. coelicolor* se ha demostrado que la expresión de ppGpp es dependiente del tipo de escasez nutricional, en condiciones limitantes de carbono y nitrógeno la síntesis de ppGpp está regulada por RelA y en condiciones de escasez de fosfato existen discrepancias. En el trabajo de Sun y colaboradores (2001) se especula sobre un mecanismo independiente de ppGpp mientras que Ryu y colaboradores (2007) proponen que la regulación de la expresión de ppGpp en estas condiciones es mediada por RshA. La escasez de fosfato desencadena la diferenciación morfológica pero poco se conoce de los factores implicados en este proceso y el papel que desempeña el sistema PhoR-P en el mismo.

El regulador RamR/AmfR y el nucleótido ppGpp son factores que se activan ante una escasez nutricional general. Pero, ¿existe algún regulador específico del metabolismo del fosfato que conecte la señal de escasez de fosfato con el desencadenamiento de la diferenciación morfológica? Recientemente, se ha identificado en el género *Streptomyces* un regulador global **DasR** que conecta la detección de **N-acetilglucosamina** (**GlcNAc**) con la producción de metabolitos secundarios y posteriormente el inicio de la diferenciación morfológica (Rigali *et al.*, 2006; 2008). La N-acetilglucosamina es parte del peptidoglicano bacteriano y es el monómero del que se compone la quitina, uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza procedente del exoesqueleto de los artrópodos y de la pared celular de las hifas de los hongos. El **estado de polimerización** en el que se detecte a la N-acetilglucosamina es una señal para la célula de *Streptomyces* de las condiciones nutricionales. Si la GlcNAc se encuentra en forma de quitina es una señal de condiciones nutricionales plenas, por lo que la célula desarrolla un crecimiento vegetativo. En cambio si la GlcNAc se encuentra en forma monomérica, es debido a la lisis del propio peptidoglicano bacteriano, señal de escasez nutricional (se está produciendo la lisis del peptidoglicano para poder generar el micelio aéreo) y por lo tanto también se activa la producción de metabolitos secundarios. En el interior celular la GlcNAc es desacetilada formándose la glucosamina-6-fosfato la cual impide la unión de DasR a sus dianas desencadenándose la producción de antibióticos y la diferenciación morfológica. Es posible que exista un regulador tipo DasR que detecte la escasez de fosfato modulando la expresión del sistema PhoR-P y controlando la diferenciación morfológica y la producción de metabolitos secundarios.

4.3. El regulón *pho* en el género *Streptomyces*

La producción de un gran número de metabolitos secundarios está regulada negativamente por la concentración de fosfato en el medio. Esta represión por fosfato se ha observado en metabolitos tan dispares como la antraciclina (Dekleva *et al.*, 1985), la oxitetraciclina (McDowall *et al.*, 1999) o la espiramicina (Lounès *et al.*, 1996). De manera similar ocurre en la producción de tacrolimus por la especie *`S. tsukubaensis´;* así en medio MGm se ha observado una reducción del 50 %. Además se ha comprobado, en medio con bajo contenido en fosfato, que la producción de tacrolimus se desencadena en el mismo momento en el que se agota el fosfato (Figura 3.35).

El fosfato inorgánico, la única forma en la que el fósforo es directamente asimilable por los microorganismos, se encuentra en condiciones limitantes en la mayoría de los ecosistemas (Sundareshwar *et al.*, 2003; Elser *et al.*, 2007; Vitousek *et al.*, 2010). Por lo tanto los microorganismos han desarrollado estrategias para la supervivencia a la escasez de este elemento, entre ellas el sistema de control principal PhoR-P, el cual se encuentra conservado entre microorganismos tan distantes filogenéticamente y que se distribuyen en hábitats tan dispares como *E. coli* y *Streptomyces*. La situación de escasez de fosfato es común a muchos hábitats por lo que es lógico que el sistema PhoR-P se haya conservado a lo largo de la evolución microbiana.

Centrándonos en el género *Streptomyces,* encontramos valores muy altos de conservación entre los ortólogos de PhoR (similitud por encima del 80 %) y PhoP (similitud por encima del 90 %). El sistema PhoR-P está muy conservado pero ¿La respuesta a la escasez de fosfato es la misma en todas las especies de *Streptomyces*? ¿Está conservado el regulón *pho*? El estudio del regulón *pho* de *`S. tsukubaensis´* realizado en este trabajo aporta un punto de partida para el análisis de la conservación de la respuesta a la escasez de fosfato entre las diferentes especies de *Streptomyces*.

El modelo I de unión de PhoP al ADN definido en *S. coelicolor* (Sola-Landa *et al.*, 2008) es totalmente válido para el análisis del regulón *pho* en *`S. tsukubaensis´*, así encontramos la misma secuencia para la zona reconocida por PhoP en ambas especies y el mismo tipo de unidades de repetición, núcleo (C) o extensión (E); por lo que podemos concluir que el mecanismo de acción de PhoP se mantiene conservado. En la anterior tabla (Tabla 4.2) se recogen los miembros del regulón *pho* localizados en *`S. tsukubaensis´* clasificados según el modelo I (ver introducción 1.3.2).

Tabla 4.2: Promotores reconocidos por PhoP en `*S. tsukubaensis*´. Clasificación de los operadores según el modelo I definido para *S. coelicolor*. En cada operador se indica el contenido en información individual para cada DRu en cajas. El grado de conservación de cada DRu se indica con diferentes tonalidades de gris, teniendo en cuenta que el valor máximo de información en 14,6 bits, al cual le corresponde el negro y a valores muy bajos y negativos le corresponde el blanco. También se indica la estructura de las DRus (núcleo o extensión) el número de complejos de retraso detectados en los ensayos de EMSA y la distancia al codón de inicio de traducción.

Región promotora	Cajas PHO	Total *Ri* (bits)	Estructura operadora	Complejos EMSA	Distancia ATG
Clase I: Operadores con dos DRus conservadas					
phoX	7,2 7,4	14,6	CC	1	90
ppk	2,3 2,0	4,3	CC	1	115
Acetil-CoA sintetasa-Gaa	7,6 12,9	20,5	CC	1	196
afsS	4,3 3,4	7,7	CC	1	165
Clase II: Operadores con tres DRus conservadas					
glnA	7,6 -11,1 6,0	2,5	CCC	1	105
amtB	-2,6 5,6 -0,4	2,6	CCC	1	161
Clase III: Operadores complejos					
phoU-phoRP	3,2 13,3 -5,3 6,6	17,8	CCEuEs	2	111
pstS	1,4 -7,0 14,0 12,9	21,3	EsEuCC	2	146
pitH2	10,0 2,2 12,2 11,6 [2] -3,6	32,4	EECC[2]Es	4	34

Aunque la secuencia reconocida por PhoP es la misma, encontramos diferencias en el grado de conservación de cada posición de la secuencia, así en *S. coelicolor* las bases en posición 1, 3 y 4 se encuentran especialmente conservadas (ver introducción 1.3.2) mientras que en `*S. tsukubaensis*´ la mayor conservación se da en las posiciones 1, 3 y 5 (Figura 4.2). En ambos casos, se da una mayor conservación de las siete primeras posiciones que son las que entran en contacto con el surco mayor del ADN.

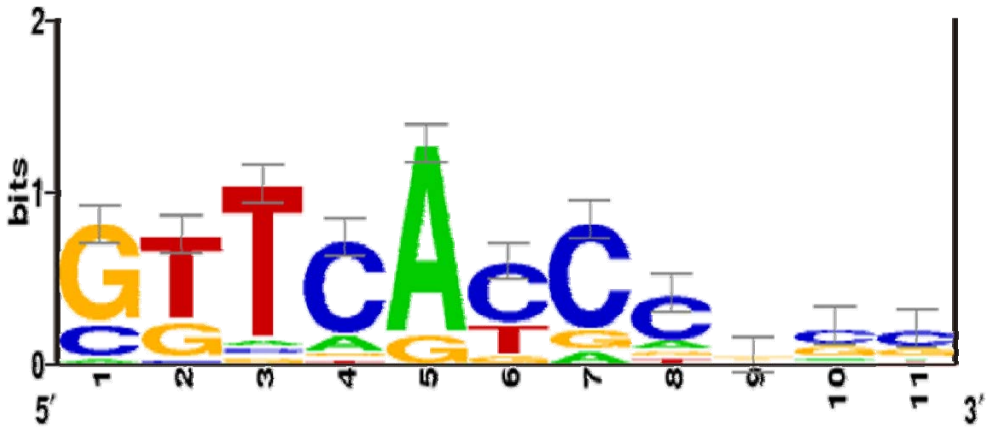


**Figura 4.2: Logotipo de la zona de unión con el ADN reconocida por PhoP en *`S. tsukubaensis´*.** Esta figura se ha realizado mediante la herramienta disponible *online* http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi, utilizando el alineamiento de 20 unidades de repetición tipo núcleo (C) localizadas en el genoma de *`S. tsukubaensis´*. El error de cada posición se indica con barras en la parte superior de las letras.

Analizados los aspectos comunes de la respuesta a la escasez de fosfato a partir de este punto nos encontramos con importantes diferencias empezando con la regulación del operón p*hoU-phoRP*. En general, la estructura operadora en la región intergénica está conservada; así, en *S. tacrolimicus* y en *`S. tsukubaensis´* (comprobado experimentalmente en este trabajo) y en otras especies de *Streptomyces* (búsqueda de cajas PHO de manera bioinformática) encontramos una zona de unión de PhoP con estructura tipo CCE_UE_S en dirección *phoU* al igual que la definida en *S. coelicolor*, lo que se corresponde con dos complejos de retraso en los experimentos de EMSA (Figura 4.3). Sin embargo, en la región intergénica *phoU-RP* de *S. natalensis* se detectaron tres complejos de retraso y se definieron dos zonas de cajas PHO separadas por 41 nucleótidos (Mendes *et al.*, 2007). Analizando el valor de información individual de cada unidad de repetición se podría suponer una estructura CCE_UE_S para cada zona de cajas PHO. La presencia de esta especial estructura operadora formada por cuatro cajas PHO separadas en dos zonas sugiere un control diferente de la respuesta a la escasez de fosfato en *S. natalensis* que se puede traducir en la fuerte represión por fosfato detectada en la producción de piramicina; así un incremento en la concentración de fosfato de 2 mM provoca la reducción de la producción en un 75 %.

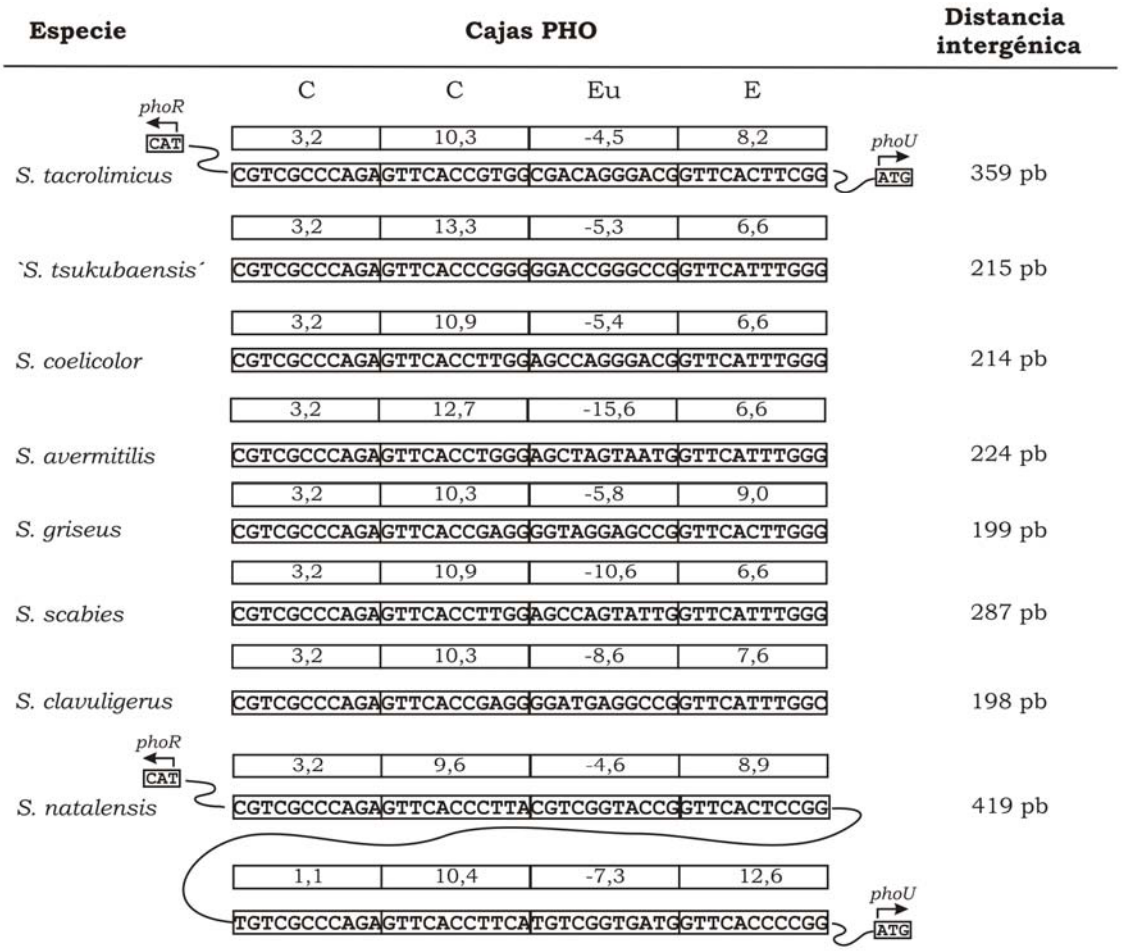


Figura 4.3: Cajas PHO en la región intergénica *phoU-RP* en diferentes especies de *Streptomyces*. La secuencia de las unidades de repetición que integran las caja PHO localizadas en cada especie de *Streptomyces* (detalladas a la izquierda) aparecen indicadas en una caja y en la parte superior de cada una se indica el valor de información individual (*Ri*). La dirección en la que se encuentran los genes *phoR* y *phoU* aparece indicada en las secuencias de *S. tacrolimicus* y en *S. natalensis*, encontrándose en el resto de secuencias en la misma dirección. En la parte derecha se indica la distancia intergénica; nótese que la región intergénica *phoU-RP* de *S. natalensis* que presenta una estructura diferente, también es la más larga.

En el análisis realizado del regulón *pho* de *`S. tsukubaensis´* se han encontrado varias diferencias respecto al regulón *pho* de *S. coelicolor*: i) algunos genes integrantes del regulón *pho* de *S. coelicolor* que no han sido localizados en el genoma de *`S. tsukubaensis´* (la glicerofosfodiesterasa *glpQ2*); ii) genes bajo el control de PhoP en *S. coelicolor* pero no en *`S. tsukubaensis´* (*phoA* o *glnR*) o iii) diferentes estructuras operadoras para el mismo gen (*glnA*). El análisis de los puntos comunes y divergentes en el regulón *pho* de *`S. tsukubaensis´* y *S. coelicolor* se realiza junto con las cajas PHO localizadas de manera informática en *S. griseus*, *S. avermitilis*, *S. scabies* y *S. clavuligerus* (especies cuya secuencia genómica se encuentra disponible *online* en http://strepdb.*Streptomyces*.org.uk). Las cajas PHO de los

diferentes genes del regulón *pho* de diferentes especies de *Streptomyces* se encuentran recogidas en el Anexo.

Obtención de fosfato mediante transporte más eficiente o a partir de fuentes alternativas

Las estructuras operadoras localizadas en las zonas promotoras de los genes *pstS* y *pitH2* de `*S. tsukubaensis*´ son las mismas que en los genes ortólogos en *S. coelicolor*. Además en todas las especies de *Streptomyces* analizadas informáticamente se encuentran cajas PHO en la zona promotora de estos genes. En el caso de *pstS* se localiza la misma estructura en todos los casos (E_SE_UCC) mientras que en *pitH2* se localizan diferentes estructuras operadoras. El gen *pstS* es uno de los más afectados por el control por PhoP (Sola-Landa *et al.*, 2008), regulación que parece conservarse en todas las especies de *Streptomyces,* mientras que *pitH2* parece estar sujeto a diferentes mecanismos de regulación por PhoP en las diferentes especies. Los genes *pstS* y *pitH2* son miembros conservados del regulón *pho*.

Por el contrario, entre las fosfatasas encontramos diferencias en cuanto al control por PhoP a pesar de que la secuencia aminoacídica de estas proteínas está muy conservada. Parece que solamente las fosfatasas alcalinas PhoA de *S. coelicolor,* de *S. griseus* y de *S. scabies* son integrantes del regulón *pho*, mientras que en el caso de PhoD (ver resultados 3.4.5) sólo lo sería en *S. coelicolor* y en *S. avermitilis.* Además dicha secuencia codificantes no se localiza en el genoma de *S. griseus*. Sin embargo, la posible fosfatasa tipo PhoX, es miembro del regulón *pho* en todas las especies de *Streptomyces* analizadas y además presenta una caja PHO con un alto valor de información por lo que la afinidad de PhoP por dicha secuencia es muy alta. Las fosfatasas son unos de los miembros más conservados del regulón *pho* en diferentes microorganismos, así ocurre en *E. coli* (Torriani, 1990), en *B. subtilis* (Eder *et al.*, 1996; Liu y Hulett, 1997), en *Sinorhizobium meliloti* (Yuan *et al.*, 2006) y en *C. glutamicum* (Schaaf y Bott, 2007) por lo que resulta extraño que en el género *Streptomyces* únicamente la posible fosfatasa PhoX sea un miembro conservado de dicho regulón, aunque es muy probable que el resto de fosfatasa en las que no se ha localizado una caja PHO también estén bajo el control de PhoP pero de manera indirecta. Es posible, que la función fosfatasa tenga otras implicaciones aparte de obtener fosfato inorgánico a partir de compuestos orgánicos, como puede ser participar en la autolisis del micelio sustrato para generar el micelio aéreo, por lo que la regulación de estas fosfatasas sería más compleja. En *B. subtilis*, en el cual se ha identificado una familia de fosfatasas, la inducción de las mismas se da por una escasez de fosfato, durante la esporulación o en ambos casos. Por ejemplo, la zona promotora de la fosfatasa alcalina PhoB contiene un promotor inducible en condiciones de escasez de fosfato y otro específico para la esporulación (Birkey *et al.*, 1994).

Concluyendo, el transporte de fosfato al interior celular, por el sistema de transporte PitH2 y especialmente por el sistema Pst, es un aspecto conservado de la respuesta a la

escasez de fosfato, mientras que no lo es tanto la estrategia para la obtención de fosfato inorgánico mediante la hidrólisis de compuestos orgánicos.

La utilización de polifosfatos intracelulares como fuente de fosfato es una respuesta relativamente conservada ante una situación de escasez de fosfato. Aunque ya se había demostrado que *ppK* se encuentra bajo el control positivo de PhoP en *`S. lividans´,* hasta el momento se pensaba en un control indirecto (Ghorbel *et al.*, 2006b). Durante el análisis del regulón *pho* de *`S. tsukubaensis´* se demuestra, por primera vez, el control directo de PhoP sobre la expresión de *ppK*. Además se localizan posibles cajas PHO en la región promotora de este gen en varias de las especies analizadas, excepto en el caso de *S. coelicolor* y *S. scabies*. Los valores de información individual de la unidades de repetición que constituyen estas cajas PHO son relativamente bajos, lo que indica una baja afinidad de PhoP por estos promotores. Así, la degradación de los polifosfatos constituiría una fase de la respuesta a la escasez de fosfato más tardía que el transporte de fosfato llevado a cabo por el sistema Pst y PitH2 al interior celular.

Interacción entre el metabolismo del nitrógeno y del fosfato

En la especie *S. coelicolor* se ha definido un control de PhoP sobre el metabolismo del nitrógeno a dos niveles (Rodríguez-García *et al.*, 2009). Así, PhoP reprime la expresión del regulador global *glnR* y además también interfiere en la expresión de los genes *glnA*, *glnII* y *amtB* implicados en el metabolismo del nitrógeno. En *`S. tsukubaensis´* sólo se ha detectado una clara unión de PhoP a la zona promotora de *glnA* y *amtB* mientras que la unión a la zona promotora de *glnII* es dudosa. En el resto de especies de *Streptomyces* analizadas bioinformáticamente en busca de cajas PHO encontramos el mismo patrón que en *`S. tsukubaensis´*: parece que GlnR no es regulado por PhoP en ninguno de los casos mientras que las estructuras operadoras de *glnA* y *amtB* están muy conservadas y en el caso de *glnII* se localizan cajas PHO en todas las especies excepto en *S. clavuligerus*. Esta última especie y *`S. tsukubaensis´* se encuentran muy próximos filogenéticamente por lo que es posible que en ninguno de los dos casos *glnII* sea un miembro del regulón *pho*. En resumen, *S. coelicolor* presenta una regulación negativa de PhoP sobre el metabolismo del nitrógeno mucho más compleja que en el resto de las especies analizadas en las cuales sólo se produce la represión sobre los genes directamente implicados en el metabolismo del nitrógeno.

Metabolismo secundario y diferenciación morfológica

La proteína AfsR es un regulador global bajo el control de múltiples quinasas AfsK, AfsL y PkaG lo que indica que AfsR es un punto clave en el que se integran diferentes señales. La fosforilación de AfsR provoca la unión de este regulador a la zona promotora de *afsS* (gen que codifica un proteina tipo factor sigma localizado corriente abajo de *afsR*) formando un complejo con la ARN polimerasa. La actividad ATPasa de AfsR aporta la suficiente energía para convertir el complejo cerrado que forman el propio regulador y la ARN polimerasa en un

complejo abierto permitiendo el inicio de la transcripción de *afsS*. Este gen estimula, mediante un mecanismo desconocido, la expresión de activadores específicos de los genes de biosíntesis de actinorrodina y undecilprodigiosina en *S. coelicolor* y en *`S. lividans´* (Horinouchi, 2003). Aunque AfsR es un regulador que se distribuye en diferentes especies del género *Streptomyces* sus efectos no están conservados; así, en *S. coelicolor* y en *Streptomyces venezuelae* influye en la producción de metabolitos secundarios (Horinouchi, 2003; Maharjan *et al.*, 2009) mientras que en *S. griseus* interviene en la formación de micelio aéreo en determinadas condiciones nutricionales (Umeyama *et al.*, 1999).

En *S. coelicolor* se ha definido una regulación cruzada entre AfsR y PhoP localizándose una caja PHO solapando el sitio de unión de AfsR a la zona promotora de *afsS* (Santos-Beneit *et al.*, 2009a). En *`S. tsukubaensis´* también se ha demostrado que *afsS* está bajo el control de PhoP y además se han podido localizar cajas PHO en la región promotora de este gen en todas las especies analizadas. La secuencia codificante de los ortólogos de *afsS* es muy heterogénea en las diferentes especies y no se sabe si la proteína AfsS está implicada en la diferenciación morfológica, en el metabolismo secundario o en ambos mecanismos. En cambio, la regulación por PhoP en la expresión de este gen está conservada en el género *Streptomyces.*

Conclusión

De manera general, podemos concluir que la respuesta a la escasez de fosfato está conservada en el género *Streptomyces*, ya que el sistema PhoR-P, principal regulador de esta respuesta es un sistema presente en todas las especies analizadas y además tanto PhoR como PhoP presentan un alto grado de homología. Además, el modelo de acción propuesto para PhoP de *S. coelicolor* es perfectamente aplicable a otras especies, como en este caso a *`S. tsukubaensis´* y también ha sido válido para el análisis informático de los genes del regulón *pho* de otras especies de este género. Sin embargo, ciertos aspectos de esta respuesta no son comunes a las diferentes especies de *Streptomyces*; mientras que el transporte de fosfato mediante los sistemas Pst y PitH2 es un rasgo conservado, la utilización de fuentes externas alternativas mediante la acción de fosfatasas y la degradación de polifosfatos intracelulares es dependiente de la especie. Además, aunque la interacción de PhoP sobre el metabolismo del nitrógeno parece conservada entre las diferentes especies, la complejidad de dicha interacción a dos niveles definida en *S. coelicolor* no se ha observado en otras especies. Esto puede ser debido a diferentes balances fosfato/nitrógeno en los medios en que se localizan las distintas especies. Por último, la regulación de *afsS* por PhoP es una respuesta conservada aunque los efectos pueden ser diferentes debido a las diferentes implicaciones de este gen, bien sobre el metabolismo secundario o sobre la diferenciación morfológica.

El género *Streptomyces* se localiza, salvo raros casos, en el suelo; hábitat muy heterogéneo y muy variable, en el que se suele dar una situación de escasez de fosfato. Así, es lógico que la respuesta a la escasez de fosfato mediada por el sistema PhoR-P se haya

mantenido en el género pero el resto de condiciones ambientales ha provocado que el regulón *pho* presente ciertas diferencias, como son las fosfatasas. Además, hasta el momento el único vínculo definido entre PhoP y el metabolismo secundario en *S. coelicolor* es el gen tipo factor sigma *afsS* y por lo que hemos visto este gen puede tener diferentes implicaciones en las diferentes especies. Teniendo en cuenta que la respuesta a la escasez de fosfato no es una respuesta totalmente conservada en el género *Streptomyces* se pueden explicar las diferencias sobre la producción de metabolitos secundarios que se han observado en diferentes mutantes del sistema PhoR-P. Así, en *`S. lividans´* y en *S. natalensis* (el cual presenta una regulación especial del propio sistema *phoRP*) se da una mayor producción en medios complejos al inactivar el sistema PhoR-P (Sola-Landa *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2007). Mientras que, en el caso de *S. coelicolor* la deleción de PhoP provoca un descenso de la producción en condiciones de escasez de fosfato y una producción similar a la cepa silvestre en condiciones de exceso de fosfato (Santos-Beneit *et al.*, 2009a).

La respuesta a la escasez de fosfato ha sido ampliamente estudiada en el género *Streptomyces* pero aún quedan puntos oscuros como la detección de la señal y la consiguiente activación del sistema PhoRP, la modulación de dicho sistema o la relación entre la respuesta a la escasez de fosfato y la diferenciación morfológica o la producción de metabolitos secundarios. Aunque la respuesta a la escasez de fosfato no esté totalmente conservada, en el género *Streptomyces* se produce de manera general una activación de la producción de metabolitos secundarios en el momento que se produce la limitación de fosfato. Por lo que sería de gran importancia industrial elucidar la ruta completa que va desde la detección de la señal de escasez de fosfato a la activación del metabolismo secundario, de manera que se pueda suprimir la represión sobre la producción que se produce a altas concentraciones de fosfato.

Conclusiones

1. *S. tacrolimicus* es una especie filogenéticamente única dentro del género *Streptomyces*.

2. Asimismo, `*S. tsukubaensis*´ es otra especie filogenéticamente única dentro del género *Streptomyces*.

3. La organización piramidal de las genotecas de *S. tacrolimicus* y `*S.tsukubaensis*´, en placas de microtitulación, es una herramienta útil para la búsqueda de secuencias génicas de forma rápida y sistemática.

4. *S. tacrolimicus,* a pesar de haber sido tradicionalmente descrito como productor de tacrolimicus, presenta serias deficiencias en la producción de este inmunosupresor en las distintas condiciones descritas en la bibliografía y ensayadas en el laboratorio.

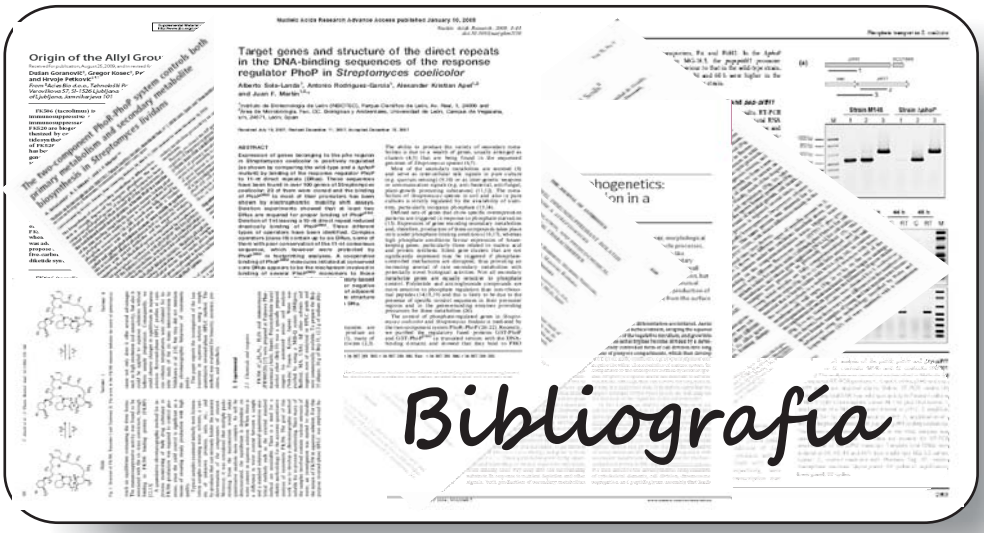
5. La especie *S. tacrolimicus* produce una sustancia con actividad antifúngica químicamente diferente del tacrolimus y de la ascomicina.

6. La deleción del sistema de dos componentes *phoR-P* de *S. tacrolimicus* provoca un adelanto de la esporulación en medio TBO suplementado con sales de fosfato y dificulta el desarrollo normal de micelio vegetativo en medio TBO sin suplementar con fosfato.

7. Los genes *phoU* y *phoRP* en *S. tacrolimicus* están controlados por el regulador PhoP.

8. La especie `*S. tsukubaensis*´ muestra un incremento de la producción de tacrolimus en condiciones limitantes de fosfato, en presencia de lisina o de DMSO.

9. El sistema de dos componentes PhoR-P y el modelo de unión descrito para PhoP en *S. coelicolor* está conservado en `*S. tsukubaensis*´; aunque no ocurre lo mismo con los distintos genes pertenecientes al regulón *pho*.


Origin of the Allyl Grou
The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in Streptomyces lividans
Target genes and structure of the direct repeats in the DNA-binding sequences of the response regulator PhoP in Streptomyces coelicolor
Bibliografía

A

Aharonowitz Y. 1980. Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Annu Rev Microbiol.* 34: 209-233.

Aharonowitz Y, Demain AL. 1979. Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Can J Microbiol.* 25(1): 61-67.

Aidoo KA, Wong A, Alexander DC, Rittammer RA, Jensen SE. 1994. Cloning, sequencing and disruption of a gene from *Streptomyces clavuligerus* involved in clavulanic acid biosynthesis. *Gene.* 147(1): 41-46.

Aigle B, Schneider D, Morilhat C, Vandewiele D, Dary A, Holl AC, Simonet JM, Decaris B. 1996. An amplifiable and deletable locus of *Streptomyces ambofaciens* RP181110 contains a very large gene homologous to polyketide synthase genes. *Microbiology.* 142 (Pt 10): 2815-2824.

Akimoto K, Kusunoki Y, Nishio S, Takagi K, Kawai S. 2008. Safety profile of tacrolimus in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 27(11): 1393-1397.

Alam MT, Merlo ME, Takano E, Breitling R. 2010. Genome-based phylogenetic analysis of *Streptomyces* and its relatives. *Mol Phylogenet Evol.* 54 (3): 763-772.

Alexander DC, Rock J, He X, Brian P, Miao V, Baltz RH. 2010. Development of a Genetic System for Lipopeptide Combinatorial Biosynthesis in *Streptomyces fradiae* and Heterologous Expression of the A54145 Biosynthetic Gene Cluster. *Appl Environ Microbiol.* 27: In press.

Amemura M, Makino K, Shinagawa H, Nakata A. 1990. Cross talk to the phosphate regulon of *Escherichia coli* by PhoM protein: PhoM is a histidine protein kinase and catalyzes phosphorylation of PhoB and PhoM-open reading frame 2. *J Bacteriol.* 172: 6300-6307.

Anderson AS, Wellington EMH. 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 797-814.

Antelmann H, Scharf C, Hecker M. 2000. Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *J Bacteriol.* 182(16): 4478-4490.

Apel K, Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Martín JF. 2007. Phosphate control of *phoA*, *phoC* and *phoD* gene expression in *Streptomyces coelicolor* reveals significant differences in binding of PhoP to their promoter regions. *Microbiology* 153: 3527-3537.

Arakawa K, Mochizuki S, Yamada K, Noma T, Kinashi H. 2007. gamma-Butyrolactone autoregulator-receptor system involved in lankacidin and lankamycin production and morphological differentiation in *Streptomyces rochei*. *Microbiology.* 153(Pt 6): 1817-1827.

Arias P, Fernández-Moreno MA, Malpartida F. 1999. Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein. *J Bacteriol.* 181(22): 6958-6968.

Arndt C, Cruz MC, Cardenas ME, Heitman J. 1999. Secretion of FK506/FK520 and rapamycin by *Streptomyces* inhibits the growth of competing *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology.* 145 (Pt 8): 1989-2000.

Arribas-Bosacoma R, Kim SK, Ferrer-Orta C, Blanco AG, Pereira PJ, Gomis-Rüth FX, Wanner BL, Coll M, Solà M. 2007. The X-ray crystal structures of two constitutively active mutants of the *Escherichia coli* PhoB receiver domain give insights into activation. *J Mol Biol.* 366: 626-641.

Asturias JA, Liras P, Martín JF. 1990. Phosphate control of *pabS* gene transcription during candicidin biosynthesis. *Gene.* 93(1): 79-84.

B

Bachhawat P, Swapna GV, Montelione GT, Stock AM. 2005. Mechanism of activation for transcription factor PhoB suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states. *Structure.* 13(9): 1353-1363.

Bai JP, Lesko LJ, Burckart GJ. 2010. Understanding the genetic basis for adverse drug effects: the calcineurin inhibitors. *Pharmacotherapy.* 30(2): 195-209.

Bao K, Cohen SN. 2003. Recruitment of terminal protein to the ends of *Streptomyces* linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear DNA replication. *Genes Dev.* 17(6): 774-785.

Baumann K, Emmer G. 1999. Heteroatoms-containing tricyclic compounds. US Patente 5,912,238

Beckmann RJ, Cox K, Seno ET. 1989. A cluster of tylosin biosynthetic genes is interrupted by a structurally unstable segment containing four repeated sequences. En *Genetics and molecular biology of industrial microorganisms*, ed. Queener SW, Hegeman G. Hershberger CL, 176-186. Washington, DC.: American Society for Microbiology.

Benson A, Barrett T, Sparberg M, Buchman AL. 2008. Efficacy and safety of tacrolimus in refractory ulcerative colitis and Crohn's disease: a single-center experience. *Inflamm Bowel Dis.* 14(1): 7-12.

Bentley SD, Brown S, Murphy LD, Harris DE, Quail MA, Parkhill J, Barrell BG, McCormick JR, Santamaria RI, Losick R, Yamasaki M, Kinashi H, Chen CW, Chandra G, Jakimowicz D, Kieser HM, Kieser T, Chater KF. 2004. SCP1, a 356,023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 51(6): 1615-1628.

Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417: 141-147.

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

Bibb MJ. 2005. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol.* 8(2): 208-215.

Bibb MJ, Molle V, Buttner MJ. 2000. BldN, an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 182: 4606-4616.

Bignell DR, Warawa JL, Strap JL, Chater KF, Leskiw BK. 2000. Study of the *bldG* locus suggests that an anti-anti-sigma factor and an anti-sigma factor may be involved in *Streptomyces coelicolor* antibiotic production and sporulation. *Microbiology.* 146: 2161-2173.

Birck C, Chen Y, Hulett FM, Samama JP. 2003. The crystal structure of the phosphorylation domain in PhoP reveals a functional tandem association mediated by an asymmetric interface. *J Bacteriol.* 185: 254-261.

Birkey SM, Sun G, Piggot PJ, Hulett FM. 1994. A *pho* regulon promoter induced under sporulation conditions. *Gene.* 147(1): 95-100.

Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6): 1513-1523.

Blanco G, Rodicio MR, Puglia AM, Méndez C, Thompson CJ, Salas JA. 1994. Synthesis of ribosomal proteins during growth of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 12(3): 375-385.

Blanco AG, Sola M, Gomis-Rüth FX, Coll M. 2002. Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure.* 10(5): 701-713.

Borris RP, Wicker LS, Zink DL, Lien TH. 1990. Novel immunosuppressant compound. EP19890309089

Bourret RB. 2010. Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Curr Opin Microbiol.* 13(2): 142-149.

Brennan RG. 1993. The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff. *Cell.* 74 (5): 773-776.

Breuder T, Hemenway CS, Movva NR, Cardenas ME, Heitman J. 1994. Calcineurin is essential in cyclosporin A- and FK506-sensitive yeast strains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(12): 5372-5376.

Bullock WO, Fernandez JM, Short JM. 1987. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA E.coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechinques.* 5(4): 376-378.

Burget U, Zundel G. 1986. Lysine—phosphate hydrogen bonds and hydrogen-bonded chains with large proton polarizability in polylysine—phosphate systems: ir investigations. *J Mol Struct.* 145 (1-2): 93-109.

Butler AR, Cundliffe E. 2001. Influence of dimethylsulfoxide on tylosin production in *Streptomyces fradiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 27(1): 46-51.

C

Carmany DO, Hollingsworth K, McCleary WR. 2003. Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. *J Bacteriol.* 185(3): 1112-1115.

Carmody M, Byrne B, Murphy B, Breen C, Lynch S, Flood E, Finnan S, Caffrey P. 2004. Analysis and manipulation of amphotericin biosynthetic genes by means of modified phage KC515 transduction techniques. *Gene.* 343(1): 107-115.

Cashion P, Holder-Franklin MA, McCully J, Franklin M. 1977. A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem.* 81(2): 461-466.

Catakli S, Andrieux A, Decaris B, Dary A. 2005. Sigma factor WhiG and its regulation constitute a target of a mutational phenomenon occurring during aerial mycelium growth in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877. *Res Microbiol.* 156(3): 328-340.

Cerdeño AM, Bibb MJ, Challis GL. 2001. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chem Biol.* 8(8): 817-829.

Chang HM, Chen MY, Shieh YT, Bibb MJ, Chen CW. 1996. The *cutRS* signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin. *Mol Microbiol.* 21(5): 1075-1085.

Chater KF. 2001. Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr Opin Microbiol.* 4(6): 667-673.

Chater K, Bibb M. 1997. Biotechnology: Products of Secondary Metabolism. Eds.: Kleinkauf H, von Dohren H. Vol 7:57–105. VCH, Weinheim, Germany.

Chater KF, Chandra G. 2006. The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol Rev.* 30 (5): 651-672.

Chater KF, Chandra G. 2008. The use of the rare UUA codon to define "expression space" for genes involved in secondary metabolism, development and environmental adaptation in *Streptomyces*. *J Microbiol.* 46(1): 1-11.

Chen CW. 1996. Complications and implications of linear bacterial chromosomes. *Trends Genet.* 12(5): 192-196.

Chen Y, Abdel-Fattah WR, Hulett FM. 2004. Residues required for *Bacillus subtilis* PhoP DNA binding or RNA polymerase interaction: alanine scanning of PhoP effector domain transactivation loop and alpha helix 3. *J Bacteriol.* 186(5): 1493-1502.

Chen Y, Birck C, Samama JP, Hulett FM. 2003. Residue R113 is essential for PhoP dimerization and function: a residue buried in the asymmetric PhoP dimer interface determined in the PhoPN three-dimensional crystal structure. 185: 262-273.

Chen CW, Huang CH, Lee HH, Tsai HH, Kirby R. 2002. Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. *Trends Genet.* 18(10): 522-529.

Chen CM, Ye QZ, Zhu ZM, Wanner BL, Walsh CT. 1990. Molecular biology of carbon-phosphorus bond cleavage. Cloning and sequencing of the *phn* (*psiD*) genes involved in alkylphosphonate uptake and C-P lyase activity in *Escherichia coli* B. *J Biol Chem.* 265(8): 4461-4471.

Chen G, Wang GY, Li X, Waters B, Davies J. 2000. Enhanced production of microbial metabolites in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Antibiot (Tokyo).* 53(10): 1145-1153.

Cheng YR, Fang A, Demain AL. 1995b. Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43(6): 1096-1098.

Cheng YR, Hauck L, Demain AL. 1995a. Phosphate, ammonium, magnesium and iron nutrition of *Streptomyces hygroscopicus* with respect to rapamycin biosynthesis. *J Ind Microbiol.* 14(5): 424-427.

Chouayekh H, Virolle MJ. 2002. The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol Microbiol.* 43(4): 919-930.

Claessen D, de Jong W, Dijkhuizen L, Wösten HA. 2006. Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol.* 14(7): 313-319.

Clarke L, Carbon J. 1976. A colony bank containing synthetic *Col El* hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. . *Cell.* 9(1): 91-99.

Clipstone NA, Crabtree GR. 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature.* 357(6380): 695-697.

Cortes J, Haydock SF, Roberts GA, Bevitt DJ, Leadlay PF. 1990. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature* 348(6297): 176-178.

D

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

Daza A, Martín JF, Dominguez A, Gil JA. 1989. Sporulation of Several Species of *Streptomyces* in Submerged Cultures after Nutritional Downshift. *J Gen Microbiol.* 135 (9): 2483-2491.

De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A. 1970. The quantitativa measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *European Journal of Biochemistry* 12: 133-142.

De Schrijver A, De Mot R. 1999. A subfamily of MalT-related ATP-dependent regulators in the LuxR family. *Microbiology.* 145(Pt 6): 1287-1288.

Dekleva ML, Titus JA, Strohl WR. 1985. Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can J Microbiol.* 31(3): 287-294.

Del Sol R, Pitman A, Herron P, Dyson P. 2003. The Product of a Developmental Gene, *crgA*, That Coordinates Reproductive Growth in *Streptomyces* Belongs to a Novel Family of Small Actinomycete-Specific Proteins. *J Bacteriol.* 185(22): 6678-6685.

Demain AL, Fang A. 1995. Emerging Concepts of Secondary Metabolism in Actinomycetes. *Actinomycetologica.* 9(2): 98-117.

Diaz M, Esteban A, Fernandez-Abalos JM, Santamaria RI. 2005. The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*. *Microbiology.* 151 (Pt 8): 2583-2592.

Doull JL, Vining LC. 1990. Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 32(4): 449-454.

Dumont F, Garrity GM, Fernandez IM, Matas TD. 1992. Process for producing FK-506. US Patent 5,116, 756.

Dumont FJ. 2000. FK506, an immunosuppressant targeting calcineurin function. *Curr Med Chem.* 7(7): 731-748.

Duncan MD, Wilkes DS. 2005. Transplant-related immunosuppression: a review of immunosuppression and pulmonary infections. *Proc Am Thorac Soc.* 2(5): 449-455.

E

Eder S, Shi L, Jensen K, Yamane K, Hulett FM. 1996. A *Bacillus subtilis* secreted phosphodiesterase/alkaline phosphatase is the product of a Pho regulon gene, *phoD*. *Microbiology.* 142(Pt 8): 2041-2047.

Elliot M, Damji F, Passantino R, Chater K, Leskiw B. 1998. The *bldD* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production. *J Bacteriol.* 180: 1549-1555.

Ellison DW, McCleary WR. 2000. The unphosphorylated receiver domain of PhoB silences the activity of its output domain. *J Bacteriol.* 182 (23): 6592-6597.

Elser JJ, Bracken ME, Cleland EE, Gruner DS, Harpole WS, Hillebrand H, Ngai JT, Seabloom EW, Shurin JB, Smith JE. 2007. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecol Lett.* 10(2): 1135-1142.

Enríquez LL, Mendes MV, Antón N, Tunca S, Guerra SM, Martín JF, Aparicio JF. 2006. An efficient gene transfer system for the pimaricin producer *Streptomyces natalensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 257(2): 312-318.

Esteban A, Díaz M, Yepes A, Santamaría RI. 1998. Expression of the pstS gene of *Streptomyces lividans* is regulated by the carbon source and is partially independent of the PhoP regulator. *BMC Microbiol.* 8: 201-212.

Eustáquio AS, Gust B, Galm U, Li SM, Chater KF, Heide L. 2005. Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters. *Appl Environ Microbiol.* 71(5): 2452-2459.

Euzéby JP. 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol.* 47 (2): 590-592.

Evans GA, Lewis K, Rothenberg BE. 1989. High efficiency vectors for cosmid microcloning and genomic analysis. *Gene.* 79(1): 9-20.

F

Feinberg AP, Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 132(1): 6-13.

Felsenstein J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. *Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.*

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39: 783–791.

Fiedler T, Mix M, Meyer U, Mikkat S, Glocker MO, Bahl H, Fischer RJ. 2008. The two-component system PhoPR of *Clostridium acetobutylicum* is involved in phosphate-dependent gene regulation. *J Bacteriol.* 190 (20): 6559-6567.

Fink D, Weißschuh N, Reuther J, Wohlleben W, Engels A. 2002. Two transcriptional regulators GlnR and GlnRII are involved in regulation of nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 46: 331–347.

Fischer G, Decaris B, Leblond P. 1997a. Occurrence of deletions, associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA. *J Bacteriol.* 179(14): 4553-4558.

Fischer G, Kyriacou A, Decaris B, Leblond P. 1997b. Genetic instability and its possible evolutionary implications on the chromosomal structure of *Streptomyces*. *Biochimie.* 79(9-10): 555-558.

Fisher SL, Jiang W, Wanner BL, Walsh CT. 1995. Cross-talk between the histidine protein kinase VanS and the response regulator PhoB. Characterization and identification of a VanS domain that inhibits activation of PhoB. *J Biol Chem.* 270: 23143-23149.

Flett F, Mersinias V, Smith CP. 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett.* 155(2): 223-229.

Floriano B, Bibb M. 1996. *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 21: 385–396.

Folcher M, Gaillard H, Nguyen LT, Nguyen KT, Lacroix P, Bamas-Jacques N, Rinkel M, Thompson CJ. 2001. Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 276(47): 44297-44306.

Formica RN Jr, Lorber KM, Friedman AL, Bia MJ, Lakkis F, Smith JD, Lorber MI. 2004. The evolving experience using everolimus in clinical transplantation. *Transplant Proc.* 36(2 Suppl): 495S-499S.

G

Galm U, Wang L, Wendt-Pienkowski E, Yang R, Liu W, Tao M, Coughlin JM, Shen B. 2008. In vivo manipulation of the bleomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces verticillus* ATCC15003 revealing new insights into its biosynthetic pathway. *J Biol Chem.* 283(42): 28236-28245.

Garg RP, Ma Y, Hoyt JC, Parry RJ. 2002. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the azoxy antibiotic valanimycin. *Mol Microbiol.* 46(2): 505-517.

Garrity GM, Heimbuch BK, Motamedi H, Shafiee A. 1993. Genetic relationships among actinomycetes that produce the immunosuppressant macrolides FK506, FK520/FK523 and rapamycin. *J Ind Microbiol.* 12(1): 42-7.

Garrity GM, Lilburn TG, Cole JR, Harrison SH, Euzéby J, Tindall BJ. 2007. Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea. Part 10 - The Bacteria: Phylum "Actinobacteria": Class Actinobacteria. *Release* 7.7: 399-539.

Gause GF, Preobrazhenskaya TP, Kudrina ES, Blinov NO, Ryabova ID, Sveshnikova MA. 1957. *Problems in the classification of Antagonistic Actinomycetes*. Moscu (Rusia): State Publishing House of Medical Literature. Medzig.

Ghorbel S, Kormanec J, Artus A, Virolle MJ. 2006a. Transcriptional studies and regulatory interactions between the *phoR-phoP* operon and the *phoU*, *mtpA*, and *ppk* genes of *Streptomyces lividans* TK24. *J Bacteriol.* 188(2): 677-686.

Ghorbel S, Smirnov A, Chouayekh H, Sperandio B, Esnault C, Kormanec J, Virolle MJ. 2006b. Regulation of *ppk* expression and in vivo function of Ppk in *Streptomyces lividans* TK24. *J Bacteriol.* 188(17): 6269-6276.

Gomez-Escribano JP, Martín JF, Hesketh A, Bibb MJ, Liras P. 2008. *Streptomyces clavuligerus relA*-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C: negative regulation of secondary metabolism by (p)ppGpp . *Microbiology.* 154(Pt 3): 744-755.

Goodfellow M. 1989. Suprageneric classification of actinomycetes. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.*, ed. Williams ST, Sharpe ME, Holt JG., 4:2333-2339. Baltimore: Williams & Wilkins,

Goranovic D, Kosec G, Mrak P, Fujs S, Horvat J, Kuscer E, Kopitar G, Petkovic H. 2010. Origin of the allyl group in FK506 biosynthesis. *J Biol Chem.* 285(19): In press.

Granozzi C, Billetta R, Passantino R, Sollazzo M, Puglia AM. 1990. A breakdown in macromolecular synthesis preceding differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol.* 136: 713-716.

Gravius B, Glocker D, Pigac J, Pandza K, Hranueli D, Cullum J. 1994. The 387 kb linear plasmid pPZG101 of *Streptomyces rimosus* and its interactions with the chromosome. *Microbiology.* 140(Pt 9): 2271-2277.

Green ED, Olson MV. 1990. Systematic screening of yeast artificial-chromosome libraries by use of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(3): 1213-1217.

Guan D, Pettis GS. 2009. Intergeneric conjugal gene transfer from *Escherichia coli* to the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoeae*. *Lett Appl Microbiol.* 49(1): 67-72.

Gummert JF, Ikonen T, Morris RE. 1999. Newer immunosuppressive drugs: a review. *J Am Soc Nephrol.* 10(6): 1366-1380.

Guo X, Dillman JF 3rd, Dawson VL, Dawson TM. 2001. Neuroimmunophilins: novel neuroprotective and neuroregenerative targets. *Ann Neurol.* 50(1): 6-16.

Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. 2003. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(4): 1541-1546.

Gust B, Chandra G, Jakimowicz D, Yuqing T, Bruton CJ, Chater KF. 2004. Lambda red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Adv Appl Microbiol.* 54: 107-128.

Gust B, Kieser T, Chater KF. 2002. REDIRECT© technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. John Innes Centre.

H

Hakenbeck R, Stock JB. 1996. Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Methods Enzymol.* 273: 281-300.

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166: 5557-5580.

Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. En: ed. Glover DM., 109-135. Oxford, UK.: IRL Press,

Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. 1983. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol.* 29: 319-322.

Hasegawa T, Yamanno T, Yoneda M. 1978. *Streptomyces inusitatus* sp. nov. *Int J Sys Bacteriol.* 28(3): 407-410.

Hatanaka H, Iwami M, Kino T, Goto T, Okuhara M. 1988. FR-900520 and FR-900523, novel immunosuppressants isolated from a *Streptomyces*. I. Taxonomy of the producing strain. *J Antibiot (Tokyo).* 41(11): 1586-1591.

Hatanaka H, Kino T, Asano M, Goto T, Tanaka H, Okuhara M. 1989. FK-506 related compounds produced by *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993. *J Antibiot (Tokyo).* 42: 620-622.

He W, Lei J, Liu Y, Wang Y. 2008. The LuxR family members GdmRI and GdmRII are positive regulators of geldanamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 17997. *Arch Microbiol.* 189(5): 501-510.

Hesketh A, Chen WJ, Ryding J, Chang S, Bibb M. 2007. The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genome Biol.* 8(8): R161.

Hickey JM, Hefty PS, Lamb AL. 2009. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the DNA-binding domain of a *Chlamydia trachomatis* OmpR/PhoB-subfamily response regulator homolog, ChxR. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 65 (Pt 8): 791-794.

Higgens CE, Hamill RL, Sands TH, Hoehn MM, Davis NE. 1974. The occurrence of deacetoxycephalosporin C in fungi and streptomycetes. *J Antibiot (Tokyo).* 27(4): 298-300.

Higgens CE, Kastner RE. 1971. *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a ß-lactam antibiotic producer. *Int J Syst Bacteriol.* 21: 326-331.

Higgins CF. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.* 8: 67-113.

Ho S, Clipstone N, Timmermann L, Northrop J, Graef I, Fiorentino D, Nourse J, Crabtree GR. 1996. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol.* 80(3 Pt 2): S40-45.

Hobbs GC, CM, Gardner DCJ, Cullum JA, Oliver SG. 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 272-277.

Hoch JA. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol.* 3 (2): 165-170.

Hodgson DA. 2000. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Miccrob Physiol.* 42: 47-238.

Hohn B. 1975. DNA as substrate for packaging into bacteriophage lambda, in vitro. *J Mol Biol.* 98(1): 93-106.

Holmes DS, Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.* 114(1): 193-197.

Hopwood DA. 2006. Soil To Genomics: The *Streptomyces* Chromosome. *Annu Rev Genet.* 40: 1-23.

Hopwood DA. 2007. *Streptomyces in nature and medicine*. Oxford University Press. Inc,

Hopwood DA, Sherman DH. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet.* 24: 37-66.

Horinouchi S. 2003. AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 30(8): 462-467.

Horinouchi S. 2007. Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71(2): 283-299.

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(1-2): 167-172.

Hsieh YJ, Wanner BL. 2010. Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Curr Opin Microbiol.* 13(2): 198-203.

Huang J, Lih CJ, Pan KH, Cohen SN. 2001. Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarray. *Genes Dev.* 15(23): 3183-3192.

Huang J, Shi J, Molle V, Sohlberg B, Weaver D, Bibb MJ, Karoonuthaisiri N, Lih CJ, Kao CM, Buttner MJ, Cohen SN. 2005. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 58(5): 1276-1287.

Hulett FM. 1996. The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 19(5): 933-939.

Hulett FM, Lee J, Shi L, Sun G, Chesnut R, Sharkova E, Duggan MF, Kapp N. 1994. Sequential action of two-component genetic switches regulates the PHO regulon in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 176(5): 1348-58.

Huss VA, Festl H, Schleifer KH. 1983. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol.* 4: 184-192.

Hutchings MI, Hoskisson PA, Chandra G, Buttner MJ. 2004. Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* 150(Pt 99: 2795-2806.

I

Ichinose K, Ozawa M, Itou K, Kunieda K, Ebizuka Y. 2003. Cloning, sequencing and heterologous expression of the medermycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces* sp. AM-7161: towards comparative analysis of the benzoisochromanequinone gene clusters. *Microbiology.* 149(P t7): 1633-1645.

Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotecnol.* 21(5): 526-531.

Ingram JR, Martin JA, Finlay AY. 2009. Impact of topical calcineurin inhibitors on quality of life in patients with atopic dermatitis. *Am J Clin Dermatol.* 10(4): 229-237.

Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96(1): 23-28.

Ishige T, Krause M, Bott M, Wendisch VF, Sahm H. 2003. The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses. *J Bacteriol.* 185 (15): 4519-4529.

J

Jensen HL. 1930. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 55: 231-249.

Jhang J, Wolfe S, Demain AL. 1989. Phosphate regulation of ACV synthetase and cephalosporin biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *FEMS Microbiol Lett.* 48(2): 145-150.

Jones KL. 1949. Fresh isolates of Actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J Bacteriol.* 57: 141-145.

Jung S, Moon S, Lee K, Park YJ, Yoon S, Yoo YJ. 2009. Strain development of *Streptomyces* sp. for tacrolimus production using sequential adaptation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36: 1467–1471.

K

Karandikar A, Sharples GP, Hobbs G. 1997. Differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) under nitrate-limited conditions. *Microbiology.* 143: 3581-3590.

Keijser BJ, van Wezel GP, Canters GW, Vijgenboom E. 2002. Developmental regulation of the *Streptomyces lividans ram* genes: involvement of RamR in regulation of the *ramCSAB* operon. *J Bacteriol.* 184(16): 4420-4429.

Kelly KS, Ochi K, Jones GH. 1991. Pleiotropic effects of a *relC* mutation in *Streptomyces antibioticus*. *J Bacteriol.* 173(7): 2297-2300.

Kerovuo J, Tynkkynen S. 2000. Expression of *Bacillus subtilis* phytase in *Lactobacillus plantarum* 755. *Lett Appl Microbiol.* 30(4): 325-329.

Kharel MK, Nybo SE, Shepherd MD, Rohr J. 2010. Cloning and characterization of the ravidomycin and chrysomycin biosynthetic gene clusters. *Chembiochem.* 11(4): 523-532.

Khodakaramian G, Lissenden S, Gust B, Moir L, Hoskisson PA, Chater KF, Smith MC. 2006. Expression of Cre recombinase during transient phage infection permits efficient marker removal in *Streptomyces*. *Nucleic Acids Res.* 34(3): e20.

Khokhlov AS, Tovarova II, Borisova LN, Pliner SA, Shevchenko LN, Kornitskaia EIa, Ivkina NS, Rapoport IA. 1967. The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*. *Dokl Akad Nauk SSSR.* 177(1): 232-235.

Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. 2000. *Practical Streptomyces Genetics.* Norwich, UK.: The John Innes Foundation.

Kieser T, Melton RE. 1988. Plasmid pIJ699, a multi-copy positive-selection vector for *Streptomyces*. *Gene.* 65: 83-91.

Kim CG, Fujiyama A, Saitou N. 2003. Construction of a gorilla fosmid library and its PCR screening system. *Genomics.* 82(5): 571-574.

Kim HS, Nihira T, Tada H, Yanagimoto M, Yamada Y. 1989. Identification of binding protein of *virginiae* butanolide C, an autoregulator in virginiamycin production, from *Streptomyces virginiae*. *J Antibiot (Tokyo).* 42(5): 769-778.

Kim HS, Park YI. 2008. Isolation and identification of a novel microorganism producing the immunosuppressant tacrolimus. *J Biosci Bioeng.* 105(4): 418-421.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 16(2): 111-120.

Kinashi H, Mori E, Hatani A, Nimi O. 1994. Isolation and characterization of linear plasmids from lankacidin-producing *Streptomyces* species. *J Antibiot (Tokyo).* 47(12): 1447-1455.

Kino T, Goto T. 1993. Discovery of FK-506 and update. *Ann N Y Acad Sci.* 685: 12-21.

Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H. 1987a. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo).* 40(9): 1249-1255.

Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Ochiai T. 1987b. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo).* 40(9): 1256-1265.

Kirby R, Hopwood DA. 1977. Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol.* 98(1): 239-252.

Klintmalm GB. 1994. FK 506: an update. *Clin Transplant.* 8 (2 Pt2): 207-210.

Kocan M, Schaffer S, Ishige T, Sorger-Herrmann U, Wendisch VF, Bott M. 2006. Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. *J Bacteriol.* 188(2): 724-732.

Kodani S, Hudson ME, Durrant MC, Buttner MJ, Nodwell JR, Willey JM. 2004. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(31): 11448-11453.

Kojima I, Cheng YR, Mohan V, Demain AL. 1995. Carbon source nutrition of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *J Ind Microbiol.* 14(6): 436-439.

Kónya A, Szabó Z, Láng I, Barta I, Salát J. 2008. Production of FK520 by *Streptomyces tubercidicus*. *Microbiol Res.* 163(6): 624-632.

Koo JY, Fleischer AB Jr, Abramovits W, Pariser DM, McCall CO, Horn TD, Gottlieb AB, Jaracz E, Rico MJ. 2005. Tacrolimus ointment is safe and effective in the treatment of atopic dermatitis: results in 8000 patients. *J Am Acad Dermatol.* 53(2 Suppl 2): S195-205.

Kumar CV, Coque JJ, Martín JF. 1994. Efficient Transformation of the Cephamycin C Producer *Nocardia lactamdurans* and Development of Shuttle and Promoter-Probe Cloning Vectors. *Appl Environ Microbiol.* 60(11): 4086-4093.

Kumar P, Sharma S, Shukla A, Kumar S, Maurya RK, Katial V, Mitra A, Gigras P. 2005. Production of tacrolimus (fk-506) using new *Streptomyces* species.

Kuscer E, Coates N, Challis I, Gregory M, Wilkinson B, Sheridan R, Petković H. 2007. Roles of *rapH* and *rapG* in positive regulation of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *J Bacteriol.* 189(13): 4756-4763.

L

Lamarche MG, Lamarche MG, 2008. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev.* 32(3): 461-473.

Langham CD, Williams, S. T., Sneath, P. H. A. & Mortimer, A. M. 1989. New probability matrices for identification of *Streptomyces*. *J Gen Microbiol.* 135: 121-133.

Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA. 1979. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem.* 100(1): 95-97.

Larson TJ, Ehrmann M, Boos W. 1983. Periplasmic glycerophosphodiester phosphodiesterase of *Escherichia coli*, a new enzyme of the *glp* regulon. *J Biol Chem.* 258 (9): 5428-5432.

Lawlor EJ, Baylis HA, Chater KF. 1987. Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genes Dev.* 1: 1305-1310.

Leblond P, Decaris B. 1994. New insights into the genetic instability of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett.* 123(3): 225-232.

Leblond P, Fischer G, Francou FX, Berger F, Guérineau M, Decaris B. 1996. The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA. *Mol Microbiol.* 19(2): 261-271.

Lebrihi A, Lamsaif D, Lefebvre G, Germain P. 1992. Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 37(3): 382-387.

Lechevalier MP, Lechavelier H. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol.* 20: 435-443.

Lee PC, Umeyama T, Horinouchi S. 2002. *afsS* is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 43 (6): 1413-1430.

Leskiw BK, Lawlor EJ, Fernandez-Abalos JM, Chater KF. 1991. TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental, antibiotic-negative, *Streptomyces* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(6): 2461-2465.

Leskiw BK, Mah R, Lawlor EJ, Chater KF. 1993. Accumulation of *bldA*-specified tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 175(7): 1995-2005.

Lin YS, Kieser HM, Hopwood DA, Chen CW. 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol.* 10(5): 923-933.

Liu W, Hulett FM. 1997. *Bacillus subtilis* PhoP binds to the *phoB* tandem promoter exclusively within the phosphate starvation-inducible promoter. *J Bacteriol.* 179 (20): 6302-6310.

Liu J, Lou Y, Yokota H, Adams PD, Kim R, Kim SH. 2005. Crystal structure of a PhoU protein homologue: a new class of metalloprotein containing multinuclear iron clusters. *J Biol Chem.* 280(16): 15960-1966.

Liu W, Eder S, Hulett FM. 1998a. Analysis of *Bacillus subtilis tagAB* and *tagDEF* expression during phosphate starvation identifies a repressor role for PhoP-P. *J Bacteriol.* 180 (3): 753-758.

Liu W, Qi Y, Hulett FM. 1998b. Sites internal to the coding regions of *phoA* and *pstS* bind PhoP and are required for full promoter activity. *Mol Microbiol.* 28 (1): 119-130.

Lloyd AB. 1969. Dispersal of Streptomycetes in air. *J Gen Microbiol.* 57: 35-40.

Locci R. 1989. *Streptomyces* and related genera. En *Bergey's manual of sistematic bacteriology*, ed. Williams ST, Sharpe ME, Holt JG. Baltimore: Williams & Wilkins.

Lodder J. 1970. *The Yeasts, a Taxonomic Study.* Amsterdam: North Holland Publishing Co.

Lombó F, Braña AF, Méndez C, Salas JA. 1999. The mithramycin gene cluster of *Streptomyces* argillaceus contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster. *J Bacteriol.* 181(2): 642-647.

Lomovskaya ND, Chater KF, Mkrtumian NM. 1980. Genetics and molecular biology of *Streptomyces* bacteriophages. *Microbiol Rev.* 44(2): 206-229.

Lounès A, Lebrihi A, Benslimane C, Lefebvre G, Germain P. 1996. Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: effects of glucose and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45(1-2): 204-211.

M

Mack TR, Gao R, Stock AM. 2009. Probing the roles of the two different dimers mediated by the receiver domain of the response regulator PhoB. *J Mol Biol.* 389(2): 349-364.

MacNeil DJ, Gewain KM, Ruby CL, Dezeny G, Gibbons PH, MacNeil T. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene.* 111: 61-68.

Maharjan S, Oh TJ, Lee HC, Sohng JK. 2009. Identification and functional characterization of an *afsR* homolog regulatory gene from *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439. *J Microbiol Biotechnol.* 19(2): 121-127.

Makarewicz O, Dubrac S, Msadek T, Borriss R. 2006. Dual role of the PhoP approximately P response regulator: *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 phytase gene transcription is directed by positive and negative interactions with the *phyC* promoter. *J Bacteriol.* 188(19): 6953-6965.

Makino K, Amemura M, Kim SK, Nakata A, Shinagawa H. 1993. Role of the σ70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 7: 149-160.

Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Nakata A. 1986. Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol.* 190(1): 37-44.

Manteca A, Pelaez AI, Zardoya R, Sanchez J. 2006. Actinobacteria cyclophilins: phylogenetic relationships and description of new class- and order-specific paralogues. *J Mol Evol.* 63 (6): 719-732,

Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yagüe P, Sanchez J. 2008. Mycelium Differentiation and Antibiotic Production in Submerged Cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol.* 74 (12): 3877-3886.

Manteca A, Sanchez J. 2009. *Streptomyces* Development in Colonies and Soils. *Appl Environ Microbiol.* 75(9): 2920-2924.

Martin JF. 1989. Molecular mechanism of the control by phosphate of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. En *Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes*, 213-237. CRC Press, Boca Ratón FL.

Martin JF. 2004. Phosphate Control of the Biosynthesis of Antibiotics and Other Secondary Metabolites Is Mediated by the PhoR-PhoP System: an Unfinished Story. *J Bacteriol.* 189(16): 5197–5201.

Martin JF, Demain AL. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev.* 44(2): 230-251.

Martín JF, Liras P, Demain AL. 1978. ATP and adenylate energy charge during phosphate-mediated control of antibiotic synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 83(3): 822-828.

Martín JF, Liras P. 2010. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol.* 13(3):263-73.

Martínez-Castro M, Barreiro C, Romero F, Fernández-Chimeno RI, Martín JF. 2010. *Streptomyces* tacrolimicus sp. nov. a low producer of the immunosuppressant FK506. *Int J Syst Evol Microbiol.* In press.

Martínez-Castro M, Solera E, Martín JF, Barreiro C. 2009. Efficient pyramidal arrangement of an ordered cosmid library: Rapid screening of genes of the tacrolimus-producer *Streptomyces* sp. ATCC 55098. *J Microbiol Methods.* 78(2): 150-154.

Martínez-Hackert E, Stock AM. 1997. Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J Mol Biol.* 269 (3): 301-312.

Matsumoto A, Hong SK, 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(1): 47-56.

Matsushima P, Baltz RH. 1989. *Streptomyces* lipmanii expresses two restriction systems that inhibit plasmid transformation and bacteriophage plaque formation. *J Bacteriol.* 171(6): 3128-3132.

Mazodier P, Petter R, Thompson C. 1989. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *J Bacteriol.* 171(6): 3583-3585.

McCleary WR, Stock JB. 1994. Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem.* 269 (50): 31567-31572.

McDowall KJ, Thamchaipenet A, Hunter IS. 1999. Phosphate control of oxytetracycline production by *Streptomyces rimosus* is at the level of transcription from promoters overlapped by tandem repeats similar to those of the DNA-binding sites of the OmpR family. *J Bacteriol.* 181(10): 3025-3032.

McKenzie NL, Nodwell JR. 2007. Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters. *J Bacteriol.* 189(14): 5284-5292.

Medema MH, Trefzer A, Kovalchuk A, van den Berg M, Müller U, Heijne W, Wu L, Alam MT, Ronning CM, Nierman WC, Bovenberg RA, Breitling R, Takano E. 2010. The sequence of a 1.8-mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol Evol.* 12 (2): 212-224.

Meier-Kriesche HU, Li S, Gruessner RW, Fung JJ, Bustami RT, Barr ML, Leichtman AB. 2006. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. *Am J Transplant.* 6(5 Pt 2): 111-1131.

Mendes MV, Tunca S, Antón N, Recio E, Sola-Landa A, Aparicio JF, Martín JF. 2007. The two-component phoR-phoP system of *Streptomyces natalensis*: Inactivation or deletion of *phoP* reduces the negative phosphate regulation of pimaricin biosynthesis. *Mettab Eng.* 9(2): 217-227.

Merrick MJ. 1976. A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 96: 299-315.

Merrick MJ, Edwards RA. 1995. Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 604–622.

Metzker ML. 2005. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res.* 15 (2): 1767-1776.

Miller JH. 1972. *Experiments in Molecular Genetics.* New York,: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor,

Mochizuki S, Hiratsu K, Suwa M, Ishii T, Sugino F, Yamada K, Kinashi H. 2003. The large linear plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an unusually condensed gene organization for secondary metabolism. *Mol Microbiol.* 48(6): 1501-1510.

Molle V, Buttner MJ. 2000. Different alleles of the response regulator gene *bldM* arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages. *Mol Microbiol 36: 1265±1278.* 36: 1265-1278.

Moss SJ, Wilkinson B, Martin CJ, Stanley AE, Schell UE. 2010. Novel compounds and methods for their production. WO/2010/004304

Motamedi H, Cai SJ, Shafiee A, Elliston KO. 1997. Structural organization of a multifunctional polyketide synthase involved in the biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506. *Eur J Biochem.* 244(1): 74-80.

Motamedi H, Shafiee A. 1998. The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506. *Eur J Biochem.* 256(3): 528-534.

Motamedi H, Shafiee A, Cai SJ, Streicher SL, Arison BH, Miller RR. 1996. Characterization of methyltransferase and hydroxylase genes involved in the biosynthesis of the immunosuppressants FK506 and FK520. *J Bacteriol.* 178/17): 5243-5248.

Moura RS, Martín JF, Martín A, Liras P. 2001. Substrate analysis and molecular cloning of the extracellular alkaline phosphatase of *Streptomyces griseus*. *Microbiology.* 147 (Pt 6): 1525-1533.

Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.

Muramatsu H, Mokhtar SI, Katsuoka M, Ezaki M. 2005. Phylogenetic Analysis of Immunosuppressant FK506-Producing Streptomycete Strains. *Actinomycetologica.* 19(2): 33-39.

Musialowski MS, Flett F, Scott GB, Hobbs G, Smith CP, Oliver SG. 1994. Functional evidence that the principal DNA replication origin of the *Streptomyces coelicolor* chromosome is close to the *dnaA-gyrB* region. *J Bacteriol.* 176(16): 5123-5126.

N

Nagatsu J, Ansai K, Ohkuma K, Suzuki S. 1963. Studies on a new antibiotic, tuberin. IV. Taxonoic studies on the tuberin producing organism, *Streptomyces amakusaensis*. *J Antibiot (Tokyo).* 16: 207-210.

Nakano MM, Zuber P, Glaser P, Danchin A, Hulett FM. 1996. Two component regulatory proteins ResD-ResE are required for transcriptional activation of fnr upon oxygen limitation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 178: 3796-3802.

Nárdiz N, Santamarta I, Lorenzana L, Martín J, Liras P. 2010. A rhodanese-like protein is highly overrepresented in the mutant *S. clavuligerus oppA2*::*aph*: Effect on holomycin and other secondary metabolites production. *Microbial Biotechnology*. In press.

Neuhaus P, Klupp J, Langrehr JM. 2001. mTOR inhibitors: an overview. *Liver Transpl.* 7(6): 473-484.

Nguyen KT, Willey JM, Nguyen LD, Nguyen LT, Viollier PH, Thompson CJ. 2002. A central regulator of morphological differentiation in the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 46(5): 1223-1238.

Nielsen JB, Hsu MJ, Byrne KM, Kaplan L. 1991. Biosynthesis of the immunosuppressant immunomycin: the enzymology of pipecolate incorporation. *Biochemistry*. 30(23): 5789-5796.

Nodwell JR, Losick R. 1998. Purification of an extracellular signalling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 180: 1334-1337.

Nodwell JR, Yang M, Kuo D, Losick R. 1999. Extracellular Complementation and the Identification of Additional Genes Involved in Aerial Mycelium Formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genetics.* 151: 569-584.

Novák J, Kopecký J, Kofronová O, Vaněk Z. 1993. Instability of the production of avermectins, sporulation, and pigmentation in *Streptomyces avermitilis*. *Can J Microbiol.* 39(2): 265-267.

Novotna J, Vohradsky J, Berndt P, Gramajo H, Langen H, Li XM, Minas W, Orsaria L, Roeder D, Thompson CJ. 2003. Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes. *Mol Microbiol.* 48(5): 1289-1303.

Núñez LE, Méndez C, Braña AF, Blanco G, Salas JA. 2003. The biosynthetic gene cluster for the beta-lactam carbapenem thienamycin in *Streptomyces cattleya*. *Chem Biol.* 10(4): 301-311.

O

Ochi K. 1990. *Streptomyces* relC mutants with an altered ribosomal protein ST-L11 and genetic analysis of a *Streptomyces griseus relC* mutant. *J Bacteriol.* 172(7): 4008-4016.

Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol.* 190(11): 4050-4060.

Ohnishi Y, Seo JW, Horinouchi S. 2002. Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett.* 216(1): 1-7.

Ohnishi Y, Yamazaki H, Kato JY, Tomono A, Horinouchi S. 2005. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69(3): 431-439.

Okuhara M, Tanaka H, Goto T, Kino T, Hatanaka H. 1990. Tricyclo compounds, a process for their production ana a pharmaceutical composition containing the same. US Patent 4,894,366.

Oliynyk M, Stark CB, Bhatt A, Jones MA, Hughes-Thomas ZA, Wilkinson C, Oliynyk Z, Demydchuk Y, Staunton J, Leadlay PF. 2003. Analysis of the biosynthetic gene cluster for the polyether antibiotic monensin in *Streptomyces cinnamonensis* and evidence for the role of *monB* and *monC* genes in oxidative cyclization. *Mol Microbiol.* 49(5): 1179-1190.

P

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

Pandza K, Pfalzer G, Cullum J, Hranueli D. 1997. Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. *Microbiology.* 143 (Pt 5): 1493-1501.

Panhorst M, Sorger-Herrmann U, Wendisch VF. 2010. The *pstSCAB* operon for phosphate uptake is regulated by the global regulator GlxR in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol.* In press.

Park SY, Moon MW, Subhadra B, Lee JK. 2010. Functional characterization of the *glxR* deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: involvement of GlxR in acetate metabolism and carbon catabolite repression. *FEMS Microbiol Lett.* 304 (2): 107-115.

Paul S, Birkey S, Liu W, Hulett FM. 2004. Autoinduction of *Bacillus subtilis phoPR* operon transcription results from enhanced transcription from *EsigmaA* and *EsigmaE*-responsive promoters by phosphorylated PhoP. *J Bacteriol.* 186: 4262-4275.

Pham VD, Shebelut CW, Jose IR, Hodgson DA, Whitworth DE, Singer M. 2006. The response regulator PhoP4 is required for late developmental evants in *Myxococcus xanthus*. *Microbiology.* 152(Pt 6): 1609-1620.

Pimentel-Elardo SM, Kozytska S, Bugni TS, Ireland CM, Moll H, Hentschel U. 2010. Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. *Mar Drugs.* 8 (2): 373-380.

Piret JM, Chater KF. 1985. Phage-mediated cloning of *bldA*, a region involved in *Streptomyces coelicolor* morphological development, and its analysis by genetic complementation. *J. Bacteriol.* 163: 965-972.

Pope MK, Green BD, Westpheling J. 1996. The *bld* mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell--cell signalling. *Mol Microbiol.* 19(4): 747-756.

Pope MK, Green B, Westpheling J. 1998. The *bldB* gene encodes a small protein required for morphogenesis, antibiotic production, and catabolite control in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* 180: 1556-1562.

Pospiech A, Neumann B. 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet.* 11(6): 217-218.

Powar VK, Jagannathan V. 1982. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 151 (3): 1102-1108.

Pridham TG, Hesseltine CW, Benedict RG. 1958. A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups; placement of strains in morphological sections. *Appl Microbiol.* 6(1): 52-79.

Puglia AM, Vohradsky J, Thompson CJ. 1995. Developmental control of the heat-shock stress regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 17(4): 737-746.

Q

Qi Y, Hulett FM. 1998. PhoP-P and RNA polymerase sigmaA holoenzyme are sufficient for transcription of Pho regulon promoters in *Bacillus subtilis*: PhoP-P activator sites within the coding region stimulate transcription in vitro. *28 (6)*: 1187-1197.

Qi Y, Kobayashi Y, Hulett FM. 1997. The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the *pho* regulon. *J Bacteriol.* 179(8): 2534-2539.

R

Ravel J, Wellington EM, Hill RT. 2000. Interspecific transfer of *Streptomyces* giant linear plasmids in sterile amended soil microcosms. *Appl Environ Microbiol.* 66(2): 529-534.

Recio E, Colinas A, Rumbero A, Aparicio JF, Martín JF. 2004. PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimaricin production in *Streptomyces natalensis*. *J Biol Chem.* 279(40):41586-93.

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

Reuther J, Wohlleben W. 2007. Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: transcriptional and post-translational regulation. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 12(1–2): 139–146.

Reynolds KA, Demain AL. 1997. Rapamycin, FK506 and Ascomycin-related compounds. En *Biotechnology of antibiotics*, ed. Strohl WR, 497-520. Segunda. MARCEL DEKKER, INC.

Rice CD, Pollard JE, Lewis ZT, McCleary WR. 2009. Employment of a promoter-swapping technique shows that PhoU modulates the activity of the PstSCAB2 ABC transporter in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 75(3): 573-582.

Rigali S, Nothaft H, Noens EE, Schlicht M, Colson S, Müller M, Joris B, Koerten HK, Hopwood DA, Titgemeyer F, van Wezel GP. 2006. The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development. *Mol Microbiol.* 61(5): 1237-1251.

Rodríguez-García A, Barreiro C, Santos-Beneit F, Sola-Landa A, Martín JF. 2007. Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a Delta*phoP* mutant. *Proteomics.* 7(14): 2410-2429.

Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Apel K, Santos-Beneit F, Martín JF. 2009. Phosphate control over nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: direct and indirect negative control of *glnR*, *glnA*, *glnII* and *amtB* expression by the response regulator PhoP. *Nucleic Acids Res.* 37(10): 3230-3242.

Romano A, Jensen MR, McAlpine J. 2010. Toward the optimization of stent-based treatment for coronary artery disease. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 13(2): 157-158.

Ryding NJ, Anderson TB, Champness WC. 2002. Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by absA, encoding a cluster-linked two-component system. *J Bacteriol.* 184(3): 794-805.

Ryu YG, Kim ES, Kim DW, Kim SK, Lee KJ. 2007. Differential stringent responses of *Streptomyces coelicolor* M600 to starvation of specific nutrients. *J Microbiol Biotechnol.* 17(2): 305-312.

S

Salah-Bey K, Blanc V, Thompson CJ. 1995. Stress-activated expression of a *Streptomyces pristinaespiralis* multidrug resistance gene (ptr) in various *Streptomyces* spp. and *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 17(5): 1001-1012.

Salituro GM, Dumont F, Garrity GM, Huang L, Jones ETT, Omstead MN, Fernandez IM Matas TD. 1993. Process for producing FK506. USt Patent 5.194,378

Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* New York,: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor,

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12): 5463-5467.

Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Sola-Landa A, Martín JF. 2009a. Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. *Mol Microbiol.* 72(1): 53-68.

Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Apel AK, Martín JF. 2009b. Phosphate and carbon source regulation of two PhoP-dependent glycerophosphodiester phosphodiesterase genes of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology.* 155(Pt6): 1800-1811.

Santos-Beneit F, Rodríguez-García A, Franco-Domínguez E, Martín JF. 2008. Phosphate-dependent regulation of the low- and high-affinity transport systems in the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology.* 154(Pt8): 2656-2370.

Savic M, Bratic I, Vasiljevic B. 2007. *Streptomyces durmitorensis* sp. nov., a producer of an FK506-like immunosuppressant. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57 (Pt 9): 2119-2124.

Schaaf S, Bott M. 2007. Target genes and DNA-binding sites of the response regulator PhoR from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 189(14): 5002-5011.

Schneider TD. 1997. Information content of individual genetic sequences. *J Theor Biol.* 189(4): 427-441.

Schwecke T, Aparicio JF, Molnar I, Konig A, Khaw LEE, Haydock SF, Oliynyk M, Caffrey P, Cortes J, Lester JB, Bohm GA, Staunton J, Leadlay PF. 1995. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 7839-7843.

Schweizer H, Boos W. 1984. Characterization of the ugp region containing the genes for the phoB dependent sn-glycerol-3-phosphate transport system of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 197(1): 161-168.

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(7): 2913-2916.

Seki T, Yoshikawa H, Takahashi H, Saito H. 1988. Nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis phoR* gene. *J Bacteriol.* 170(12): 5935-5938.

Shafiee A, Motamedi H, Chen T. 1994. Enzymology of FK-506 biosynthesis. *Eur J Biochem.* 225(2): 755-764.

Shafiee A, Motamedi H, Dumont FJ, Arison BH, Miller RR. 1997. Chemical and biological characterization of two FK506 analogs produced by targeted gene disruption in *Streptomyces* sp. MA6548. *J Antibiot (Tokyo).* 50(5): 418-423.

Sheldon PJ, Busarow SB, Hutchinson CR. 2002. Mapping the DNA-binding domain and target sequences of the *Streptomyces peucetius* daunorubicin biosynthesis regulatory protein, DnrI. *Mol Microbiol.* 44(2): 449-460.

Shirling SB, Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol.* 16: 313–340.

Shirling SB, Gottlieb D. 1972. Cooperative Description of Type Strains of *Streptomyces*. *Int J Syst Bacteriol.* 22(4): 265-394.

Sia EA, Kuehner DM, Figurski DH. 1996. Mechanism of retrotransfer in conjugation: prior transfer of the conjugative plasmid is required. *J Bacteriol.* 178(5): 1457-1464.

Siegele DA, Kolter R. 1992. Life after log. *J Bacteriol.* 174: 345-348.

Siekierka JJ, Staruch MJ, Hung SH, Sigal NH. 1989. FK-506, a potent novel immunosuppressive agent, binds to a cytosolic protein which is distinct from the cyclosporin A-binding protein, cyclophilin. *J Immunol.* 143(5): 1580-1583.

Sigmund JM, Clark DC, Rainey FA, Anderson AS. 2003. Detection of eubacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductases from natural populations of actinomycetes. *Microb Ecol.* 46(1): 106-112.

Singh BP, Behera BK. 2009. Regulation of tacrolimus production by altering primary source of carbons and amino acids. *Lett Appl Microbiol.* 49(2): 254-259.

Snel B, Huynen MA, Dutilh BE. 2005. Genome trees and the nature of genome evolution. *Annu Rev Microbiol.* 59: 191-209.

Solá M, Gomis-Rüth FX, Serrano L, González A, Coll M. 1999. Three-dimensional crystal structure of the transcription factor PhoB receiver domain. *J Mol Biol.* 285 (2): 675-687.

Sola-Landa A, Moura RS, Martín JF. 2003. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(10): 6133-6138.

Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Franco-Domínguez E, Martín JF. 2005. Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Mol Microbiol.* 56(5): 1373-1385.

Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Apel AK, Martín JF. 2008. Target genes and structure of the direct repeats in the DNA-binding sequences of the response regulator PhoP in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res.* 36(4): 1358-1368.

Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98(3): 503-517.

Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. 1997. Proposal for a New Hierarchic Classification System, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol.* 47 (2): 479-491.

Stephens C. 1998. Bacterial sporulation: a question of commitment? *Curr Biol.* 8(2): R45-8.

Stewart RC. 2010. Protein histidine kinases: assembly of active sites and their regulation in signaling pathways. *Curr Opin Microbiol.* 13(2): 133-141.

Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 69: 183-215.

Stock JB, Stock AM, Mottonen JM. 1990. Signal transduction in bacteria. *Nature.* 344(6265): 395-400.

Stock JB, Surette MG, Levit M, Park P. 1995. Two-Components Signal Transduction. En , ed. Hoch JA, Silhavy TJ, 25-52. Washington, DC: Am Soc Microbiol.

Sun J, Hesketh A, Bibb M. 2001. Functional analysis of *relA* and *rshA*, two *relA/spoT* homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol.* 183(11): 3488-3498.

Sun Y, Zhou X, Dong H, Tu G, Wang M, Wang B, Deng Z. 2003. A complete gene cluster from *Streptomyces nanchangensis* NS3226 encoding biosynthesis of the polyether ionophore nanchangmycin. *Chem Biol.* 10(5): 431-441.

Sundareshwar PV, Morris JT, Koepfler EK, Fornwalt B. 2003. Phosphorus limitation of coastal ecosystem processes. *Science.* 299 (5606): 563-565.

Surin BP, Dixon NE, Rosenberg H. 1986. Purification of the PhoU protein, a negative regulator of the *pho* regulon of *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol.* 168: 631–635.

T

Takano E. 2006. Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr Opin Microbiol.* 9(3): 287-294.

Takano E, Chakraburtty R, Nihira T, Yamada Y, Bibb MJ. 2001. A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 41(5): 1015-1028.

Tamaoka J, Komagata K. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett.* 25(1): 125-128.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24: 1596-1599.

Tartof KD, Hobbs CA. 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res Lab Focus.* 9: 12-14.

Tautz D, Renz M. 1983. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem.* 132(1): 14-19.

Tiffert Y, Supra P, Wurm R, Wohlleben W, Wagner R, Reuther J. 2008. The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes. *Mol Microbiol.* 67: 861–880.

Torriani A. 1990. From cell membrane to nucleotides: the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Bioessays.* 12(8): 371-376.

Trepanier NK, Nguyen GD, Leedell PJ, Leskiw BK. 1997. Use of polymerase chain reaction to identify a leucyl tRNA in *Streptomyces coelicolor*. *Gene.* 193(1): 59-63.

Tseng HC, Chen CW. 1991. A cloned ompR-like gene of *Streptomyces lividans* 66 suppresses defective *melC1*, a putative copper-transfer gene. *Mol Microbiol.* 5(5): 1187-1196.

Turło J, Gutkowska B, Gajzlerska W. 2006. Submerged cultivation of *Streptomyces tsukubaensis* in media composed of waste products of food industry. *Acta Pol Pharm* 63(5): 463-465.

U

Umeyama T, Lee PC, Ueda K, Horinouchi S. 1999. An AfsK/AfsR system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in *Streptomyces griseus*. *Microbiology.* 145 (Pt 9): 2281-2292.

Uri J, Bekesi I. 1958. Flavofungin, a new crystalline antifungal antibiotic: origin and biological properties. *Nature.* 181(4613): 908.

Usdin K, Christians KM, de Wet CA, Potgieter TD, Shaw CB, Kirby R. 1985. The loss of a large DNA fragment is associated with an aerial mycelium negative (Amy-) phenotype of *Streptomyces cattleya*. *J Gen Microbiol.* 131(4): 979-981.

V

Vaid S, Narula P. 2006. Process for producing tacrolimus (FK-506) using vegetable oil as sole source of carbon. WO/2006/011156

VanBogelen RA, Olson ER, Wanner BL, Neidhardt FC. 1996. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 178(15): 4344-4366.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* 60(2): 407-438.

van Veen HW, Abee T, Kortstee GJ, Konings WN, Zehnder AJ. 1994. Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 33 (7): 1766-1770.

Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D. 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71 (3): 495-548.

Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo).* 28(10): 721-726.

Vitousek PM, Porder S, Houlton BZ, Chadwick OA. 2010. Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen-phosphorus interactions. *Ecol Appl.* 20(1): 5-15.

Volff JN, Altenbuchner J. 1998. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Mol Microbiol.* 27(2): 239-246.

Volff JN, Altenbuchner J. 2000. A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiol Lett.* 186(2): 143-150.

W

Waksman SA. 1961. *The Actinomycetes-Classification, Identification and Description of Genera and Species*. 363 pp. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Wang XJ, Yan YJ, Zhang B, An J, Wang JJ, Tian J, Jiang L, Chen YH, Huang SX, Yin M, Zhang J, Gao AL, Liu CX, Zhu ZX, Xiang WS. 2010. Genome Sequence of the Milbemycins-producing Bacterium *Streptomyces bingchenggensis*. *J Bacteriol.* 25: In press.

Wanner BL. 1996. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. En *Escherichia coli and Salmonella: celular and molecular biology.*, ed. Neidhardt FC, Curtis R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umbarger HE., 1357–1381. 2º ed. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Wanner BL. 1997. Phosphate signaling and the control of gene expression in *Escherichia coli*. . En *In Metal Ions in Gene Regulation.*, ed. Silver S, William W. 104-128. Chapman & Hall, New York.

Wanner BL, Chang BD. 1987. The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 169(12): 5569-5574.

Wanner BL, Wilmes-Riesenberg MR. 1992. Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 174(7): 2124-2130.

Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* 176(5): 386-390.

Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Trüper HG. 1987. International Committee on Bacterial Systematics. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol.* 37: 463-464.

Weber T, Welzel K, Pelzer S, Vente A, Wohlleben W. 2003. Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *J Biotechnol.* 106(2-3): 221-232.

Weis JH. 2001. Plating and transferring cosmid and plasmid libraries. *Curr Protoc Mol Biol.* Chapter 6: Unit 6.2.

West AH, Stock AM. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci.* 26(6): 369-376.

Widdick DA, Dilks K, Chandra G, Bottrill A, Naldrett M, Pohlschröder M, Palmer T. 2006. The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(47): 17927-17932.

Widdick DA, Dodd HM, Barraille P, White J, Stein TH, Chater KF, Gasson MJ, Bibb MJ. 2003. Cloning and engineering of the cinnamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cinnamoneus* DSM 40005. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(7): 4316-4321.

Wiederrecht G, Lam E, Hung S, Martin M, Sigal N. 1993. The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Ann N Y Acad Sci.* 696: 9-19.

Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EMH, Sneath PHA, Sackin MJ. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol.* 129: 1743–1813.

Wilson DJ, Xue Y, Reynolds KA, Sherman DH. 2001. Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae*. *J Bacteriol.* 183(11): 3468-3475.

Willey 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.

Wösten MM, Parker CT, van Mourik A, Guilhabert MR, van Dijk L, van Putten JP. 2006. The *Campylobacter jejuni* PhosS/PhosR operon represents a non-classical phosphate-sensitive two component system. *Mol Microbiol.* 62(1): 278-291.

Wright F, Bibb MJ. 1992. Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* 113(1): 55-65.

Wu K, Chung L, Revill WP, Katz L, Reeves CD. 2000. The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus* (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. *Gene* 251: 81-90.

x

Xu J, Tozawa Y, Lai C, Hayashi H, Ochi K. 2002. A rifampicin resistance mutation in the *rpoB* gene confers ppGpp-independent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Genet Genomics.* 268(2): 179-189.

y

Yamazaki H, Takano Y, Ohnishi Y, Horinouchi S. 2003. *amfR*, an essential gene for aerial mycelium formation, is a member of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol.* 50(4): 1173-1187.

Yang W, Hu Y, Chen L. 2009. Method for purifying tacrolimus by biofermentation. CN101481715 (A)

Yoon YJ, Choi CY. 1997. Nutrient effects on FK-506, a new immunosuppressant, production by *Streptomyces* sp. in a defined medium. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83(6): 599-603.

Yuan ZC, Zaheer R, Morton R, Finan TM. 2006. Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic Acids Res.* 34 (9): 2686-2697.

z

Zhan P, Hu J, Pan D, Ye M; Ma H, Lin J, Bai H. 2009. Streptomycete, method for producing tacrolimus using the same and use thereof. CN101486975 (A)

Zhang CC. 1996. Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. *Mol Microbiol.* 20(1): 9-15.

Zhao Y, Zhang J, Tang Q, Shan Z, Fan Q. 2007. A PCR-based technology for rapid screening of genomic DNA library. *Bull Exp Biol Med.* 144(1): 69-72.

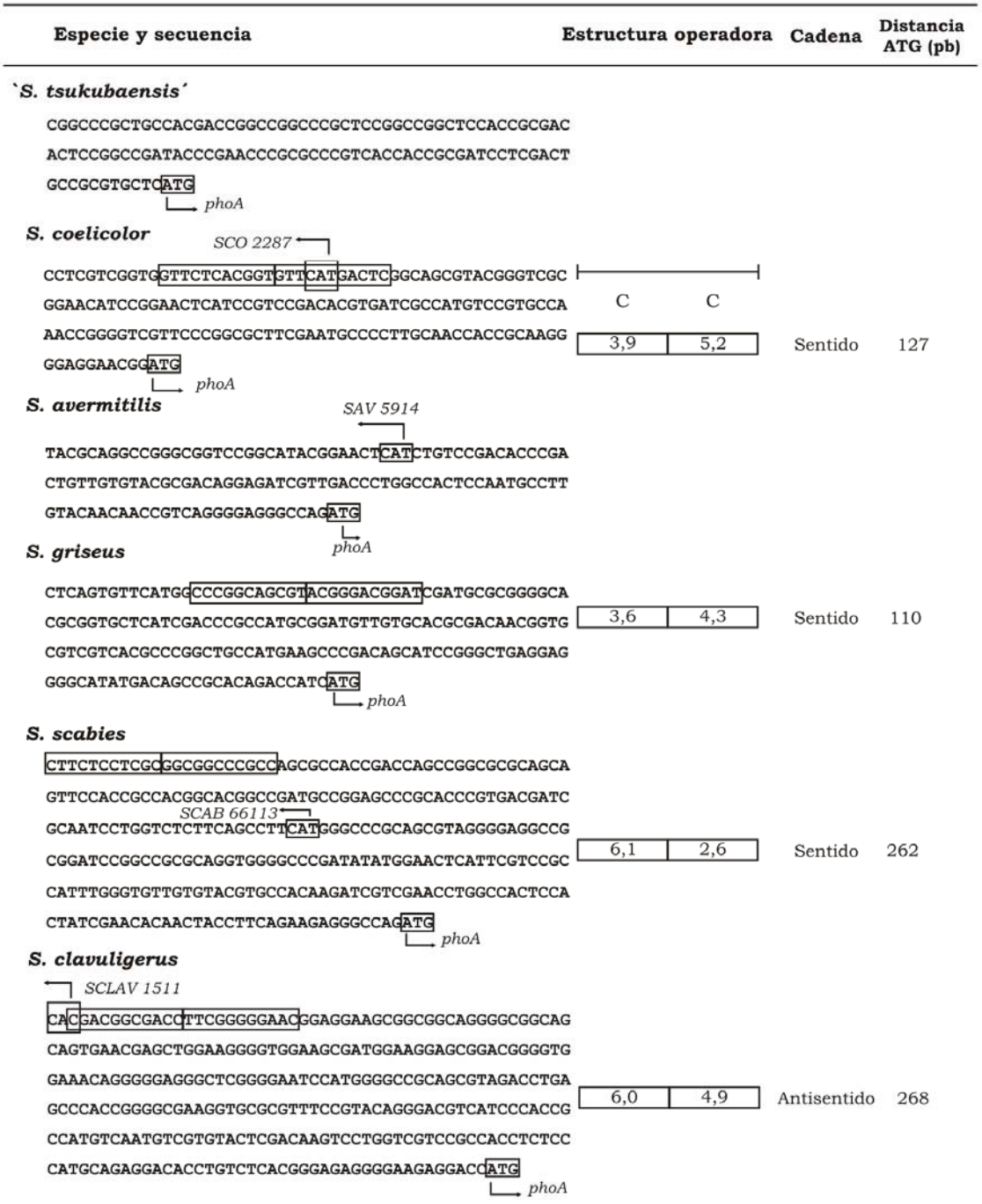
Zhou L, Gregori G, Blackman JM, Robinson JP, Wanner BL. 2005. Stochastic activation of the response regulator PhoB by noncognate histidine kinases. *Journal of Integrative Bioinformatics* 2 (11): Online Journal.

GTTCACCCGGCGTTCATTTACG
Anexo

7.1. Cajas PHO en Streptomyces

En este apartado se recogen las cajas PHO localizadas en las diferentes especies de *Streptomyces*. En el caso de *S. coelicolor* y `*S. tsukubaensis*´ la existencia de dichas zonas de unión de PhoP al ADN ha sido comprobado experimentalmente, de manera que se indica el tipo de unidades de repetición (núcleo o de extensión) además del valor individual de información de cada DRu y el número de complejos de retraso detectados en los ensayos de EMSA mediante barras horizontales. En el resto de especies la localización de las cajas PHO se ha realizado informáticamente utilizando la matriz de puntuación del modelo I definido en *S. coelicolor* (Sola-Landa *et al.*, 2008) y en este caso sólo se indican los valores de contenido de información individual obtenidos para cada unidad de repetición. La posición de las unidades de repetición en las zonas promotoras de los diferentes genes se indica mediante cajas y también se marca con un recuadro el inicio de traducción de los diferentes genes. En el caso de los genes del metabolismo del nitrógeno *glnA*, *glnII* y *amtB*, se indican las secuencias reconocidas por GlnR mediante barras horizontales, de manera que permite visualizar la posible represión ejercida por PhoP por la interacción con GlnR.

PhoA


Especie y secuencia
Estructura operadora
Cadena
Distancia ATG (pb)
`S. tsukubaensis´
CGGCCCGCTGCCACGACCGGCCGGCCCGCTCCGGCCGGCTCCACCGCGAC
ACTCCGGCCGATACCCGAACCCGCGCCCGTCACCACCGCGATCCTCGACT
GCCGCGTGCTCATG
phoA
S. coelicolor
SCO 2287
CCTCGTCGGTGGTTCTCACGGTGTTCATGACTCGGCAGCGTACGGGTCGC
GGAACATCCGGAACTCATCCGTCCGACACGTGATCGCCATGTCCGTGCCA
C
C
AACCGGGGTCGTTCCCGGCGCTTCGAATGCCCCTTGCAACCACCGCAAGG
3,9
5,2
Sentido
127
GGAGGAACGGATG
phoA
S. avermitilis
SAV 5914
TACGCAGGCCGGGCGGTCCGGCATACGGAACTCATCTGTCCGACACCCGA
CTGTTGTGTACGCGACAGGAGATCGTTGACCCTGGCCACTCCAATGCCTT
GTACAACAACCGTCAGGGGAGGGCCAGATG
phoA
S. griseus
CTCAGTGTTCATGGCCCGGCAGCGTACGGGACGGATCGATGCGCGGGGCA
CGCGGTGCTCATCGACCCGCCATGCGGATGTTGTGCACGCGACAACGGTG
3,6
4,3
Sentido
110
CGTCGTCACGCCCGGCTGCCATGAAGCCCGACAGCATCCGGGCTGAGGAG
GGGCATATGACAGCCGCACAGACCATCATG
phoA
S. scabies
CTTCTCCTCGCGGCGGCCCGCCAGCGCCACCGACCAGCCGGCGCGCAGCA
GTTCCACCGCCACGGCACGGCCGATGCCGGAGCCCGCACCCGTGACGATC
SCAB 66113
GCAATCCTGGTCTCTTCAGCCTTCATGGGCCCGCAGCGTAGGGGAGGCCG
CGGATCCGGCCGCGCAGGTGGGGCCCGATATATGGAACTCATTCGTCCGC
6,1
2,6
Sentido
262
CATTTGGGTGTTGTGTACGTGCCACAAGATCGTCGAACCTGGCCACTCCA
CTATCGAACACAACTACCTTCAGAAGAGGGCCAGATG
phoA
S. clavuligerus
SCLAV 1511
CACGACGGCGACGTTCGGGGGAACGGAGGAAGCGGCGGCAGGGGCGGCAG
CAGTGAACGAGCTGGAAGGGGTGGAAGCGATGGAAGGAGCGGACGGGGTG
GAAACAGGGGGAGGGCTCGGGGAATCCATGGGGCCGCAGCGTAGACCTGA
GCCCACCGGGGCGAAGGTGCGCGTTTCCGTACAGGGACGTCATCCCACCG
6,0
4,9
Antisentido
268
CCATGTCAATGTCGTGTACTCGACAAGTCCTGGTCGTCCGCCACCTCTCC
CATGCAGAGGACACCTGTCTCACGGGAGAGGGGAAGAGGACCATG
phoA

PhoX

Especie y secuencia	Estructura operadora	Cadena	Distancia ATG (pb)
`S. tsukubaensis´			
GCTGTGGATTCATCCGCGGTTCATCCGATGTCCGCCACTTTGCACACGTT CCCCCCTAACGTCACGCCCGGAGACATTCCGACACGCTGTCGGCGCGGTG CGCGCCGGAGGAGGACGAAGTG phoX	C C 7,2 7,4	Sentido	79
S. coelicolor			
GATTCCGCGGGTTCACCCGGCGTTCACCGCGACGCCCGGTCCCGGCACGT ATGCGCGCCTACGGTCGCGCTGACACCAGGGCATACAGGGATTCTCAAGG GGAGAACACAGTG phoX	C C 14,3 10,4	Sentido	78
S. avermitilis			
TCCCGCGGGTTCACCCTCGGTTCAGCCGCACGCCCTCCTCCCGCACACGC GTCCCCATAGCGTCACGCCGAGATCAAGGGAACGTATGGGGAGAGTAAAGTG phoX	11,9 12,6	Sentido	69
S. griseus			
ACTTCACCCGCCGTTCACCGGGAGTCCCTCGGACCGCGTGGAGGCGCCCA TACCGTCACGCACGACACCAGACGGAGGGAATCCACGTG phoX	11,6 11,2	Sentido	63
S. scabies			
CGCCGCAGGTTCACCCCTTGTTCACCTCGCGTCCCCGCGCTCGCACGCAC GCCCCCCTAGCGTCGCGCTCACACCAAGAATGTACAAAGAGCACCGAGGA GCGCGCTGTG phoX	10,6 12,9	Sentido	76
S. clavuligerus			
TCATCCTGGGATTCATCCCGCGTTCACTCCGCGTCCGCCACTTCGCACCG ATTCACCCCTAACGTCTCGCCCGGAGGGTTTCCGACAGACTGTCGGCGCC GGTGTGCGCCGGAGGAGGATTCAAGTG phoX	6,1 9,9	Sentido	150

PstS

Especie y secuencia	Estructura operadora				Cadena	Distancia ATG (pb)
	Es	Eu	C	C		
`S. tsukubaensis´						
CTGCCACCCAGCCGCCCGGCACGGTTCACCTGCCGTTCACCCACCCCCTC GGGTCACTTCACCTGTTCTGCCTAATTTCGGCCTTACGTGGTGACCGGCA CCCGGCCGGCTCCCCCCACCCCCGACCCACGCCGCCCAGCGTCCCGGCAT CCGCCGGCGGGCCCGGCGGCTTCTGGAAGGAACACCCGAAAGTG *pstS*	1,4	-7,0	14,0	12,9	Sentido	146
S. coelicolor						
CCGTGACCTCACCGCACCGTCCACAGGGGTTCACCCGGCGTTCATTTACG CCCTTCGGCGCCTTCATCTCATCTGCCTAATTTCGGCCTTACCACTCCTC GCACGCCGCCGAATTCAGGACGGCGGCTCCTGGAAGGAACTCCCTCAAGT GAAGCTTCAGCGCATG *pstS*	1,8	-3,4	14,3	5,1	Sentido	113
S. avermitilis						
GTTCACCTTCCGTTCACTCTCGGCCATCGGCGGCTTCACCTCTTCTGCCT AATTTCGGCCTTACGCGGTGCGGGACGGCGACCTGAATGTCGCCTCCGCA TTACACAGACTTCGCACGCCGCCACCAGTCGGCGGCTCCTGGAAGGAACT CCCGAAAGTGAAGCTTCAGCGCATG *pstS*	12,2	8,2	-8,2	7,0	Sentido	128
S. griseus						
GCCCGCACCCGCCTGCCCGACACGGTTCACCTGCCGTTCACTCTCCCCCG TCGGCGGCTTCACCTGTTCTGCCTAATTTCGGACGTACACGGTGCGCGGC GACAAGCCACAGCACCGCTCCTCATCGCACGCCGTCGTAGAACGAACTGA CCACGGCGGCTCCTGGAAGGAACACCCGAAAGTG *pstS*	1,6	-12,1	14,0	9,2	Sentido	135
S. scabies						
CGTGACCTCACCGCACTTTCGGCAGGGGTTCACTCGCCGTTCACTTCCGT CCATCGGCGGCTTCACCTGATCTGCCTAATTTCGGCCTTACCCGGTGCGG GATGCGGGCCGAAACCAGGCCGTGCACCCCGTGACGACAGCAGTTCGAGG GACTGACGGCACCGACCGGGCAGGCCCCGAGGCTGATACGACGACTTCGC ACGCCGCCATGTGGACGGCGGCTCCTGGAAGGAACTCCCGAAAGTG *pstS*	1,8	-0,5	10,9	8,5	Sentido	194
S. clavuligerus						
GACACGGTTCACCTGCGGTTCACTCTCCCCCATGAGCCCTGTCACCTGAT CTGCTTAATTTCGGCCCCATGTGGTGACCGGCACCGGGCCGGACGTCCCA CTCCCGATCACACGCCGTCGCAGCGCGCCCCGGTACGGACAGGCGTCCGG CGGCTTCTGGAAGGAACACTGGAAAGTG *pstS*	14,0	9,2	-16,1	2,1	Sentido	125

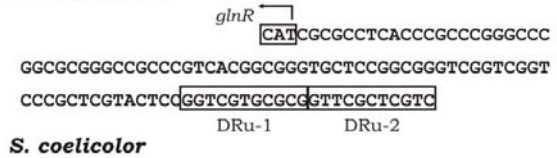
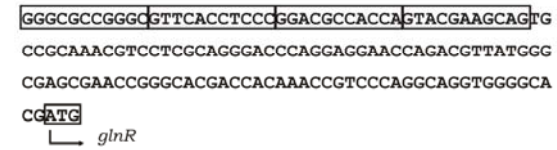
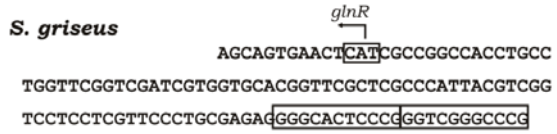
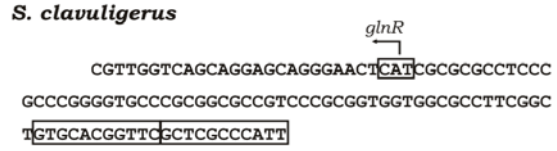
PitH2

Especie y secuencia	Estructura operadora	Cadena	Distancia ATG (pb)
`*S. tsukubaensis´*			
GCTTGGGGTCACCCCCAGTCCGGCCCCAGTTCACCTTCCGTTCACCCAGG TTACTTACCTTCGGCGAGCCACTGACCTCCAAAGATTGCCTGGGTAAATG *pitH2*	E E C C Es 10,0 2,2 12,2 11,6 [2] -3,6	Sentido	34
S. coelicolor			
GCGACCCCGCTTCCGGTCACCGTGGCGCCCTGCCCAGTTCATCTTCC GTTCACCCTGGTTACTTACGTTCGTCGCGCCAACGACCTCGAACGAT TGCCTGGGTAAATG *pitH2*	Es Es Eu C C Es -4,4 [1] 8,3 -6,1 9,8 11,6 [2] -5,3	Sentido	34
S. avermitilis			
TAGAGACACCCCACAGCCCGCCTCAGTTCATCTTCCGTTCACCCAGGTT GCTTACGGTCCACCTGCCACTGACGTCCAACAGAAGCCTGGGTAAATG *pitH2*	9,8 11,6 [2] 0,1	Sentido	34
S. griseus			
ACCCACTCCGTTTGGGGTCACCGCAACGCCCTGCCCAGTTCATCTTCC GTTCATCCAGGTTGCCTACGGTCCACGTGCCACTGACGTCGAACGATT GCCTGGGTAAATG *pitH2*	-8,5 [2] 5,7 -6,1 9,8 9,1 [1] -4,1	Sentido	34
S. scabies			
TCACTACACCCGCGCGCCCGCCCCAGTTCATCTTCCGTTCACCCAGCT TGCTTACGGTCCTCATGCCAATGACGTCCGAAAGAAGCCCGGGTAAATG *pitH2*	5,4 -5,1 9,8 12,6 [2] 0,1	Sentido	34
S. clavuligerus			
GCCCGCCTGAGTTCACCTTCCGTTCACTCAGGTTACCTACGTTCGCCG AGCCACTGACGTCCAAAGATTGCCTGGGTAAATG *pitH2*	12,2 11,6 [2] -9,4	Sentido	34

PpK

Especie y secuencia	Estructura operadora	Cadena	Distancia ATG (pb)
`*S. tsukubaensis*´	C C		
CCCGGCGGCCCGGCCCTCACCCGAACGGGGGAACACCCGGCGGGTG CCGGGTCCGGGCCCCGCCGTACCGTCCGGCCTGCGATTCCGGGACG TCATGTCCTCGTTACCGGGCATTCAGACGGCGCTGGGACCCTCACC CAATG ppK	2,3 2,0	Sentido	115
S. coelicolor			
CCGCGCCGTTCCGAGGACGGACACCCCCCGGCGCGACCCCGACCCA CCCACCGGACAAACCGCGCTACGCGCACCCCCACCGCACCCGCACA GGCCGCCGCAGGCATCGCGCACCCCCAGCCACCCCGCGCAGGCCGC CGCAGGCACCCCCAGCCACCACCCTCCAGAGGCTCCCCGCTATCCC ACACGTCATGTCCCCGTAACCATCGATTCAGACAGCCTTGCGAGGC TCACCGAATG ppK			
S. avermitilis			
GGTGCCACGGACGCCCGGGAGCCGCCCCCCGCTATCCCGCACGTCA TGTCTCCGTAACCAACGATTCAGACGACCTTGCGACCCTCGGCCAA TGAACCCCGCCGTG ppK	3,6 0,2	Sentido	73
S. griseus			
CATGTCGCCGTTACCGGCCATTCAGACGCCCTTGCGACCCTCACGG GATGCAGCCAGCTGTGCCCGCCCCCCGCCGCAACGGGAGAGCCCGG GGAGACTCCGCTCAGGGCTCCTCCGGGCGTGACCCGGGGTTTCCCG GGCCTTCCGCGATCTTTCCGGGCTCCGACGCGCCTGAGAAGCGCTC AGCGCGGAACAATAGGTCCATG ppK	3,4 1,8	Sentido	172
S. scabies			
TGACGGCCCGGCCCATCGACCCGGCACGCCCCTC CTACGGGGGGAGGGGCGTGCCGACGGCGTACAGAAGGTGAACGGCG TGCGACGGCGGAACAGCGTGCGCCGGGGCCCGGCGCAGGTCCGCGC GGAACCGGCGGGCCTCCCCGCGCTATCCCGCACGTAAGGTCTCCGT AACCGGCGATTAAGACGGCCTTGCGACGCTTCGGCAATGAACCCCG TCGTGCCCGAGCCCTCGCCTCCCCCACGCAACGGCCCAAGCAACGG GAAGAGCGCGGGGAACGGCCCCCGTGCGACCGTG ppK			
S. clavuligerus			
GTTCGGCGGGCGGGGGACCGGCCGCCGGGAGCACCCCGTTCCGCTCC CGTTCCGCCCCGGTGGGAGCCCCGCGGGACCCCGTTCCCCCGGAGC CGACCCCCGTCGGCGGAAGGCCGCCGAAGCTGACCGAAACCATCAG GGTCCAGGACGAGAATCGGACACTCGTGCATGTACCCACAAGATCA CCCCGGCCCCAGCCGCCCCACCCCCCTCATCGGCACCGCAGCTCAG CCGACGTCCCCCGCCCGGCCCCGCTCCGCTTCCTTCCGGTCACCCT GTTGTTACCAGCCATTCAGACGGCGCTGGGACCCTCACTCAATG ppk	7,3 2,7	Sentido	295

GlnR

Especie y secuencia	Estructura operadora	Cadena	Distancia ATG (pb)
`S. tsukubaensis´ 	DRu-1: 5,0 / DRu-2: 7,0	Antisentido	82
S. coelicolor 	3,3 / 13,2 / -0,8 / -7,6	Sentido	96
S. avermitilis	3,2 / 8,4	Antisentido	203
S. griseus 	2,0 / 3,5	Antisentido	83
S. scabies	9,3 / 1,3	Antisentido	117
S. clavuligerus 	3,3 / 2,3	Antisentido	59

GlnA

Especie y secuencia	Estructura operadora	Cadena	Distancia ATG (pb)
`S. tsukubaensis´			
CGGTTAACGCGGCCGAAACAATCGGGTCATCCTTGAGAAATCCCCTCTG CCTATCGTCGGGCCTGCGTGTGGCCACCGCACTGGCCGTACGGACGAGC TACCAACCCGCCCCCGCCCGGGACGGGAGTAGGAGGAGTTGGATG *glnA*	C C C 7,6 -11,1 6,0	Sentido	105
S. coelicolor			
AGGGAGCCGGTTAACTTCTGCGAAACAAATGGGTCACGCCCGAGAAAT TCCCTCGGCCAATTGAAGACGCTTTGTTTACCCAGTGCGGGCTCTTTA CACCCGTCCCTAGGGTCGAGGAAGCGTGTGCCACCCGCACTGGCCGCA GTGGGCAGGGATCCCAGATCCTTCGCACACGGTGGGCGTGACCGGCGT CTGGCCGCACGAACGATCTACCAACCCGGCGGGACGGTCGGGAGTAGGA GACCGGCGTGCTTGCTAGATGGTTGGGCCGCCCTGCCAGCCCTCATCCT *glnA* GGAGCTGGATG CCTCGACCTAC	C C C 2,1 -12,5 9,2 C C Es 6,5 -6,3 [1] 1,2	Sentido Antisentido	102 106
S. avermitilis			
CGAGCCGGTTAACTTCGGCGAAACAAATGGGTCATGCTTGAGAAATCCC CCGTCCCTATGGTCGGGTCCAGCGTGTGCCACCGCACTGGCCGCACGAA CGAACTACCACCCCGGTCGGACATGGTCGGGAGTAGGAGGAGCTGGATG *glnA*	3,2 -12,5 4,3	Sentido	45
S. griseus			
GCCCCGGTTAACTTGGGCGAAACAAATGGGTCACGCTTGAGAAATCACG CCTGCCTATGGTCGGGTCCAGCGTGCGCCACCGCACTGGCCGCACCACG AGCTACACAACCCCGTCCCTCCCGGGCCGGGAGTAGGAGGAGTTGGATG *glnA*	4,0 -12,5 6,8	Sentido	105
S. scabies			
GGGATGTCCGGTTAACTTGTGCGAAACAAATGGGTCACGTACGAGAAAC CCCTACAGGCCAATTGAACACGCTTTGTTTACCCAGTGCATGCTCTTTG CACCCGTCCCTAGGGTCGACGACAGCGTGTGCCACCGCACTGGCAGCAC GTGGGCAGGGATCCCAGCTGCTGTCGCACACGGTGGCGTGACCGTCGTG *glnA* GAACGAACTACCACCCCGGCAGGACGTCGGGAGTAGGAGGAGCTGGATG CTTGCTTGCTGGTGGGGCCGTCCTGCAGCCCTCATCCTCCTCGACCTAC	2,9 -12,5 7,5 5,4 -7,1 [1] 1,2	Sentido Antisentido	101 105
S. clavuligerus			
TCCCGGTTAACGTGTGCGAAACAAACGGGTCATGCTGGAGAAATCCCAT AGGGCCAATTGCACACGATTTGTTTGCCCAGTACGACCTCTTTAGGGTA CTGCCTAAGGTCGGTCACGCGTGTGCCACCGCACTGGCCGCGACAGCCG GACGGATTCCAGCCAGTGAGCACACGGTGGCGTGACCGGCGCTGTCGGC *glnA* CAAGCCCGCCCCACCGACCCGGGGACGGGAGTAGGAGGAGTTGGATG GTTCGGGCGGGGTGGCTGGGCCCCTGCCCTCATCCTCCTCAACCTAC	4,9 -11,1 5,4 6,2 -5,2 [1] 0,1	Sentido Antisentido	104 108

GlnII

Especie y secuencia	Estructura operadora	Cadena	Distancia ATG (pb)
`S. tsukubaensis´			
GTAACACGGGGTTCACAACCGGGCAACGGGTGGGAAATCGCCCGTTGA CAAGCTGCTGAGCGACCCTGCTGCACCCGCAAAGGATGAGGCCCGTG *glnII*			
S. coelicolor			
GCCGGGTAACACGGGGTTCACCTACGGGCAACGGTCGGGAAATCGCCC GTTGGCACGCTGCACGGCAGTAGACGCGGCACCCCTGCCGCCCCCGCG CCGCCGCACCCGCACGTGCGCCGAGACCCACCCCGAAGGATGTGGCCC CGTG *glnII*	C C E Eu Es 1,6 11,2 -2,2 -2,1 2,1	Sentido	86
S. avermitilis			
CCCAGGTAACACGGGGTTCACATTCGGGCAATGGTCGGGAAATCGCCT GTTGACAGGCTTCCGGCATCTCCCGCGGCGCCCCAGCCGCAGCGCCGC AGCACCCGCAGTGCGCCTACAGACACACCCCGAAGGATGTGGCCCGTG *glnII*	1,6 6,5 -4,7 -3,9 3,4	Sentido	82
S. griseus			
CCTCGGTAACACCGGGTTCACATCCGGGCAACGGACGGGAAATCGCGT CTTGCCAAGCTGCGACGCATAGACCGCTGCACCCGCAAAGGATGGCGT CCGTG *glnII*	0,9 7,5	Sentido	39
S. scabies			
ACCAGGTAACACGGGGTTCACATTCGAGCAACGGCCGGGAAATCGCGC GTTGACAGGCTGCGCGGCATCAGCGGCGTTTCAGTGCCGCAGCGCCGC AGCACCCGCACATGCGCCTAGTGACCCACCCCGAAGGATGTGTCCC GTG *glnII*	1,6 6,5 -6,2 -2,4 3,4	Sentido	83
S. clavuligerus			
ACCTCGTAACACAGGGTTCACATTAGGGCAACGGTCGGGAAATGGGGC ATTGCGACGCTGCGGGGGTACCGCACGAGCCGCAAAGGATGAGTCCCGTG *glnII*			

AmtB

Especie y secuencia	Estructura operadora			Cadena	Distancia ATG (pb)
	C	C	C		
`S. tsukubaensis´					
CGGCGGCGGCCGTTCATGACCGCGTAACACGGCCGCCCCCTTCGTCAC CGGCGCGAAACAAGCGGCCCCATCACCCGAAACCGCACCACGCCACTC TCGTCGTCCATGCCCCCCACGTCCCCCGGGCGGGCCCGTCCCCGGCCC CGCCCTCAGGTCCCACCGCACGCGGCCGCACCGACGACGAGGAGACGC CGATG *amtB*	-2,6	5,6	-0,4	Sentido	161
S. coelicolor					
CGGCCCCGGCCGTTCACCCACGCGTAACACGCACCGTGCCTTCGTCAC GGCGGCGAAACAACGAGGGGCTTCCACCGAAACCGCGCTGCGTCAATG TCGTGGCGCATAACCGGCCCACCCCTCACCGCCCGCCCGCCAGGCTTC GCCCCCACGGGGCCGCACCAACGACGAGGAGACGCCGATG *amtB*	-1,7	11,9	-1,9	Sentido	148
S. avermitilis					
CTTAGCAGGCAGTTCATGGACGCGTAACACGCACAGCGCCTTCGTCAC TGCGGCGAAACATCGAGGGGCGCCGACCGAAACCGCGCTGCGCCAATC TCATGGCGCATAACCGGCCCACCCCTCTTGACCGCTCAGGTTTCGCCC GCACGGGGCCGTACCAACGACGAGGAGACGCCGATG *amtB*	-3,7	6,5	-1,9	Sentido	144
S. griseus					
TGCCACCGCGCATTCATGTCGCCGTAACACGCCGTCCCGCTTCGTCAC GCTCGCGAAACATCGTGCGGCATCCCCGGAAACGGCGCTCGGTCAGTC TCATGGCTCATAACCGGCCGCACCGACCCACCCGGCCGTCCCGCACCT TCCCCGTGGTTCCGCAGCATTCCCCCGCACGCCGCGGCCGCACCGACG ACGAGGAGACGCCGATG *amtB*	1,1	3,8	-0,1	Sentido	173
S. scabies					
CGGGATTCACGTTTCACCTGTCTGTAACGTGATGGGTGCCTTCGTCAC CTCCGGGAAACATTTCCAAACTCCCGGCGAAACGGTGCTGCGTCAGTC TCCTCAGCACAGTCGGCCCTCCCCGATAGCTCCCCAGCTTCCGCATCC GCACGGGCCGTTCCGACCACGAGGAGATACCGGCATTG *amtB*	-7,9	7,5	-4,6	Sentido	146
S. clavuligerus					
CCGGCGGCCCGGTTCATGGCGGCGTAACACGGCGGATCCCTTCGTCAC CCCCGTGAAACATCGCACGGCATCGGCTGAAACCGCGCTCCGCCACCC TCATGGCGCATAACCGGCCCGCCGCCCGATCCGCTCAGGCTCCCGCCC GATCCGCTCAGGCTCCACCCGTACGTGGCCGCACCGACGACGAGGAGT CGCCCATG *amtB*	-13,3	7,2	-0,4	Sentido	164

AfsS

Especie y secuencia	Estructura operadora	Cadena	Distancia ATG (pb)
`*S. tsukubaensis*´			
ACCTCGTAACACAGGGTTCACATTAGGGCAACGGTCGGGAAATGGGGC ATTGCGACGCTGCGGGGGTACCGCACGAGCCGCAAAGGATGAGTCCC GTG *afsS*	C C 4,3 3,4	Sentido	**165**
S. coelicolor			
GTTCAGCGTTCGTTTATCTCCCCCTGGCACTGTCATCTCCGTCAGA CCGTCGCATCGGGGGGGCAGACGGATGACGACCGAGCCCACCAGTTA GTGTGCGGCTCCGCGCGCCCGTCCGGCAGCCTACGGGGGAGCTACC GGACGGGCGTTGCTACCTCGTCACGACCCATGAGGAGCGAAGTCCATG *afsS*	C C 7,0 5,8	Sentido	**161**
S. avermitilis			
GTTCAGCGTTCGTTTATCTCCCCCTGGCACTGTCATCTCCGTCAGA CCGTCGCATCGGGGGGGCAGACGGATGACGACCGAGCCCACCAGTTA GTGTGCGGCTCCGCGCGCCCGTCCGGCAGCCTACGGGGGAGCTACC GGACGGGCGTTGCTACCTCGTCACGACCCATGAGGAGCGAAGTCCATG *afsS*	7,7 7,9	Sentido	**176**
S. griseus			
GTTCATCAATCGTTTATCGGCGCACTGCACCCTTCAGTCATCGATC CGTCGCGTCGGGGGGCAGACGGGTCGGCTCAGCGGCCCACCACTAA GGTGTACGGCCCTGGAGGGCCTGCCCGGCAGTCCACGGGGGAACAG CCGGGCGGGCCCCGCCCGATCATCACGTCATCACGATCAGGAGTTG AGCCAGATG *afsS*	5,9 4,9	Sentido	**168**
S. scabies			
GTTCATCGAACGTTTATGAGCAGCTGCCACTCTTCGATTCATCGAT CCGTCGCGTCGGGGGGCAGGCGGGTCTCGTGGGCCTCACCCATAGG GTGAGCGCCCCGGGAACGCCCGTTCGGCGACCCTCGGGGGAGTTAC CGAACGGGCGTTCCGCCCAATGCTTGACAATCTCATGGGGGTACCA GCAATG *afsS*	6,2 0,6	Sentido	**165**
S. clavuligerus			
GTTCATCGAATGTTTATGACGGTGCGGAATGCTCATCGCAGTCGAT CCGTCGCGTCGGGGGGCAGACGGATCGCACAGGGACTTCGCCACAC CGGGGGGCGGGTGGAGTTCCCAGGGCCTTCCGTCCGGCGACCCTCG GGGGAGTCTCCGGGCGGGAGGCCACGTCTGTTTCATCAACACCACA GCACCATCGCACTAACCATG *afsS*	4,3 0,3	Sentido	**179**

7.2. Publicaciones científicas

En esta sección se recogen las publicaciones científicas, resultantes de parte del trabajo de esta tesis doctoral:

Martínez-Castro M, Solera E, Martín JF, Barreiro C. (2009) Efficient pyramidal arrangement of an ordered cosmid library: Rapid screening of genes of the tacrolimus-producer *Streptomyces* sp. ATCC 55098. *J Microbiol Methods.* 78(2):150-154.

Martínez-Castro M, Barreiro C, Romero F, Fernández-Chimeno RI, Martín JF. (2010) *Streptomyces tacrolimicus* sp. nov. a low producer of the immunosuppressant FK506. *Int J Syst Evol Microbiol.* In press.