

Universidad de León

Departamento de Biología Molecular

Área de Microbiología



INBIOTEC

Instituto de Biotecnología de León

Tesis doctoral

**“Regulación del metabolismo en
Streptomyces: Control por ArgR”**

Alma M^a Botas Muñoz

León, 2013

Memoria presentada por Alma M^a Botas Muñoz
para optar al grado de Doctor en Biología

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mis agradecimientos van dirigidos a aquellas instituciones que han financiado esta tesis doctoral. A la Universidad de León, al Ministerio de Educación y Ciencia y al Ministerio de Ciencia e Innovación. Este trabajo se llevó a cabo conjuntamente en el Área de Microbiología de la Universidad de León y en el Instituto de Biotecnología de León, INBIOTEC.

Quisiera agradecer de un modo general a todos los compañeros que me han acompañado a lo largo de estos años, tanto de Microbiología como de INBIOTEC. A titulares, doctores, becarios... Pero, de un modo particular, me gustaría dar las gracias a aquellos que han tenido una aportación especial.

A la Dra. Paloma Liras, por apoyarme desde el principio para realizar esta tesis doctoral, por su dirección científica y por ayudarme incluso cuando peor pintaban las cosas.

A Rosma Pérez, por su codirección, su paciencia (a veces) y, sobre todo, por estar ahí siempre, con cada duda y para cada “Escucha...”. Porque a pesar de nuestro carácter, quizás demasiado parecido que tantas veces nos hizo chocar, hemos conseguido llevarnos bien. Gracias por todo lo que me has enseñado.

Al Área de Genética, por iniciarme en el mundo de la genómica, en particular a Paqui y a Vences.

A los técnicos de laboratorio, porque sin su ayuda habría sido imposible el día a día. En particular, a la rubia, Sofía, que siempre aparecía con una sonrisa.

A las secretarias, Bea, Alcira y Andrea, por ayudarme con la odisea que suponen los trámites burocráticos. Gracias por todo eso y más.

A todos aquellos que a lo largo de estos años me han echado un cable (o varios): Sonia, Maite, Irene, Rubén, Coral, Javi, Fernando y, en especial, Antonio Rodríguez. No hay palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí, por tus enseñanzas, tus ánimos, por tener siempre un momento para escuchar de forma completamente desinteresada, y estar siempre dispuesto a hacer un descanso... o tomar unas tapas.

No podría olvidar la mención especial al cuarto 203 (y más), por las horas y horas que hemos pasado juntos. Solo espero que nunca perdamos esta amistad.

Y a aquellos que han pasado por mi vida a lo largo de estos años y que, sin yo saber bien por qué, han decidido quedarse. A Bea, Alberto y el pequeño Javi, a Rober, a mis amigos de Candelario, a los de la quinta del 83 de La Robla. A las nuevas amistades, que han llegado recientemente, en cuya permanencia confío. Todos ellos han contribuido a convertirme en quien soy.

Por supuesto, a mi familia, en especial a mis padres y a mi hermano. Porque estos años han sido duros, y han tenido que armarse de mucha paciencia para soportar mis malos ratos. Por vuestro aliento y cariño incondicionales. Por enseñarme desde pequeña que trabajando puedo alcanzar cualquier meta. Nunca sabré cómo agradecerélos. No sería nadie sin vosotros.

Y, por último, a Alberto. Por llegar a mi vida cuando más falta hacía y servirme de apoyo día tras día. Por tu confianza y por tu ayuda constante.

A todos, gracias.

Listado de Abreviaturas y Acrónimos

6-FAM: 6-carboxifluoresceína

A: adenina

aa: aminoácidos

ADNt ADN total o genómico

ADNasa: desoxirribonucleasa

amp: ampicilina

aph: kanamicina

apra: apramicina

ARNasa: ribonucleasa

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo

ATP: adenosin-5'-trifosfato

BCIP: 5-bromo-1-cloro-3-indoxil fosfato

BrEt: bromuro de etidio

BSA: albúmina sérica bovina

C: citosina

CIA: cloroformo-alcohol isoamílico

Cm: cloranfenicol

CoA: Coenzima A

C_t: carboxilo terminal

Ct: ciclo umbral, del inglés *threshold cycle*

Da: Dalton

DIG: digoxigenina

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato.

DO: densidad óptica

DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

EMSA: ensayo de retraso en gel

F/N: fenol neutro

FPLC: cromatografía líquida rápida de proteínas

G: guanina

GES: genes estadísticamente significativos

GST: glutatión-S-transferasa

Hyg: higromicina

HTH: hélice-vuelta-hélice

IPTG: 1-isopropil-β-D-galactopiranosido

Kb: kilopares de bases

kDa: kilodalton

kn: kanamicina

M: molar

MALDI-TOF: del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight*

Mb: megapares de bases

MOPS: ácido morfolinopropanosulfónico

Nal: ácido nalidíxico

NBT: azul de nitrotetrazolio

Nt: nucleótido

N_t: amino terminal

ORF: marco de lectura abierto

p/v: relación peso/volumen

PAGE: electroforesis de proteínas en gel de acrilamida

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

(p)ppGpp: guanosina-3',5'-bispirofosfato o guanosina-5'trifosfato-3'-pirofosfato

RBS: sitio de unión a ribosomas

RIN: número de integridad del ARN

RLU: unidades de luz relativas

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: PCR acoplada a retrotranscripción

SCM: sitio de clonación múltiple

SDS: dodecilsulfato sódico

T: timina

TAE: tris-acetato-EDTA

TCS: sistema de dos componentes

TEMED: N, N, N', N'-tetrametilendiamina

Tm: temperatura de hibridación

Tris: (hidroximetil)aminometano

U: Uracilo

v/v: relación volumen/volumen

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

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

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Sistemática del género <i>Streptomyces</i>	11
1.2. Características del género <i>Streptomyces</i>	13
1.2.1. Breve introducción al mundo de las actinobacterias	13
1.2.2. Variabilidad en el género <i>Streptomyces</i>	13
1.2.2.1. Ciclo biológico de <i>Streptomyces</i>	14
1.2.2.2. Estructura del cromosoma de <i>Streptomyces</i>	16
1.2.2.3. Elementos genéticos extracromosomales de <i>Streptomyces</i>	18
1.2.2.4. Inestabilidad genética	19
1.2.3. Producción de metabolitos secundarios	20
1.3. Regulación de la producción de antibióticos	22
1.3.1. Agrupaciones génicas para la síntesis de antibióticos	22
1.3.2. Reguladores pleiotrópicos del metabolismo secundario	24
1.3.2.1. Sistemas de dos componentes	24
1.3.2.2. Sistemas de serina-treonina quinasa	25
1.3.2.3. Otros reguladores pleiotrópicos	25
1.3.3. Autorreguladores	26
1.3.4. Reguladores específicos de ruta	27
1.3.4.1. Los reguladores de tipo SARP	27
1.3.4.2. Otros tipos de reguladores específicos de ruta	27
1.3.5. Pequeños ARN no codificantes	28
1.4. <i>Streptomyces coelicolor</i>	28
1.5. Arginina	31
1.5.1. Vía de biosíntesis de la arginina	31
1.5.2. Vías de catabolismo de la arginina	32
1.5.2.1. Ruta de la arginasa	33
1.5.2.2. Ruta de la arginina deiminasa	33
1.5.2.3. Ruta de la arginina succiniltransferasa	34
1.5.2.4. Rutas de la arginina transaminasa y oxidasa	34
1.5.2.5. Ruta de la arginina descarboxilasa	34
1.5.2.6. Otras rutas de utilización de arginina, citrulina y ornitina	35
1.5.3. Sistemas de transporte de arginina	35
1.5.4. El regulón de la arginina. Organización de los genes de biosíntesis de arginina	35
1.5.5. Regulación de la biosíntesis de la arginina	36
1.5.6. Estructura del regulador ArgR	37
1.5.6.1. Clasificación de las proteínas ArgR	38
1.5.6.2. Unión de ArgR a regiones operadoras: las cajas ARG	39
1.5.7. El regulador ArgR en distintos microorganismos	41
1.5.7.1. El represor ArgR en <i>Streptomyces</i>	41
1.5.8. Otras funciones del represor ArgR	42
1.5.8.1. ArgR en la segregación del cromosoma	42
1.5.8.2. Interacción/Regulación con otras rutas metabólicas	43

2. OBJETIVOS	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1. Microorganismos utilizados	51
3.2. Medios y condiciones de cultivo	52
3.2.1. Medios de cultivo para <i>Streptomyces</i>	52
3.2.2. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	53
3.2.3. Condiciones de cultivo de los microorganismos	54
3.2.4. Aditivos empleados en los medios de cultivo	54
3.3. Conservación de las cepas y medida del crecimiento de los microorganismos	55
3.3.1. Conservación de las cepas	55
3.3.2. Cuantificación de las esporas de <i>Streptomyces</i>	56
3.3.3. Medida del crecimiento	56
3.4. Plásmidos	57
3.4.1. Plásmidos de <i>E. coli</i>	57
3.4.2. Plásmidos con origen de replicación de <i>Streptomyces</i>	58
3.5. Manipulación enzimática del ADN	58
3.5.1. Digestión con enzimas de restricción	58
3.5.2. Desfosforilación de los extremos de ADN 5'-fosfato	59
3.5.3. Modificación de los extremos del ADN	59
3.5.4. Ligación de fragmentos de ADN	59
3.6. Electroforesis de ácidos nucleicos	60
3.6.1. Electroforesis del ADN	60
3.6.2. Extracción del ADN desde geles de agarosa	60
3.6.3. Cuantificación y determinación de la pureza de los ácidos nucleicos	61
3.7. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	62
3.7.1. Mini-preparaciones de plásmido de <i>E. coli</i>	62
3.7.2. Lisis alcalina	63
3.8. Preparación de ácidos nucleicos	64
3.8.1. Procesos generales de purificación y concentración	64
3.8.2. Método de aislamiento de ADN total	65
3.9. Secuenciación del ADN	66
3.10. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	67
3.10.1. Análisis de transformantes de <i>E. coli</i> mediante PCR	68
3.11. Métodos relacionados con la manipulación y análisis de ARN.	
Aislamiento de ARN total	68
3.11.1. Recolección de muestras de cultivo y estabilización del RNA	69

3.11.2.	Lisis enzimática y mecánica del micelio de <i>Streptomyces</i>	69
3.11.3.	Purificación con minicolumnas del Sistema RNeasy de Qiagen	70
3.11.4.	Muestras para RT-PCR: digestión opcional con DNasa I	71
3.11.5.	Cuantificación, control de calidad y conservación	71
3.12.	Análisis de expresión génica mediante RT-PCR y Q-PCR	73
3.12.1.	Reacciones de RT-PCR a tiempo final	73
3.12.2.	PCR a tiempo real (Q-PCR)	75
3.13.	Análisis de expresión génica mediante micromatrices	77
3.13.1.	Marcaje y purificación de ácidos nucleicos para micromatrices	78
3.13.2.	Purificación de los marcajes de ácidos nucleicos con Cy3 y Cy5	79
3.13.3.	Cuantificación de los ácidos nucleicos marcados con Cy3 y Cy5	80
3.13.4.	Hibridación de micromatrices 4x44K	81
3.14.	Análisis mediante ChIP on chip	84
3.14.1.	Material de partida: cultivos	84
3.14.2.	Ruptura del micelio y sonicación del ADN	85
3.14.3.	Visualización en el gel	86
3.14.4.	Inmunoprecipitación	86
3.14.5.	Lavados y elución	87
3.14.6.	Marcaje de los fragmentos de ADN	87
3.14.7.	Preparación de las mezclas de hibridación	88
3.15.	Transformación de <i>E. coli</i>	89
3.15.1.	Inducción del estado de competencia en <i>E. coli</i>	89
3.15.2.	Transformación de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico	90
3.16.	Conjugación <i>Streptomyces-E. coli</i>	91
3.17.	Fermentaciones	91
3.17.1.	Desarrollo de las fermentaciones	91
3.17.2.	Ensayo enzimático ornitina carbamoiltransferasa (OTC)	92
3.17.3.	Medida de la producción de antibióticos en <i>S. coelicolor</i>	92
3.17.4.	Ensayos de luminiscencia	93
3.18.	Técnicas de purificación y caracterización de proteínas	94
3.18.1.	Purificación de proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad	94
3.18.2.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	96
3.18.3.	Cuantificación de proteínas	98
3.18.4.	Transferencia de proteínas e inmunodetección	98
3.18.5.	Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	99
3.18.6.	Ensayos de retraso en gel	99
3.18.7.	Ensayos de protección con DNasaI	103
3.19.	Programas y páginas informáticas	104
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	107

4.1. Estudio comparativo de la expresión génica de las cepas <i>S. coelicolor</i> M145 y <i>S. coelicolor</i> ΔargR	109
4.1.1. Estudio de <i>S. coelicolor</i> M145 y <i>S. coelicolor</i> Δ argR en una serie temporal	111
4.1.2. Genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos	114
4.1.3. Genes relacionados con el metabolismo de purinas y pirimidinas	117
4.1.4. Genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno	120
4.1.5. Estructura ribosomal, recombinación y reparación	124
4.1.6. Genes relacionados con la síntesis de coenzimas	125
4.1.7. Genes relacionados con estructura y morfología celular	127
4.1.8. Genes relacionados con metabolismo secundario	134
4.1.9. Genes que codifican proteínas de secreción	140
4.1.10. Genes que codifican proteínas de membrana	141
4.1.11. Genes que codifican reguladores y factores sigma	142
4.1.12. Genes no clasificados	144
4.1.13. Validación de los resultados de las micromatrices mediante Q-PCR	148
4.2. Complementación del mutante <i>S. coelicolor</i> ΔargR para la restauración de la función génica de argR	150
4.2.1. Construcción de los plásmidos de complementación pMS83-StrepargR y pMS83-argRStrep para la complementación del mutante <i>S. coelicolor</i> Δ argR	150
4.2.2. Efecto de la complementación de <i>S. coelicolor</i> Δ argR	153
4.3. Expresión heteróloga y purificación a homogeneidad de ArgR	154
4.3.1. Análisis informático de la secuencia de la proteína ArgR de <i>S. coelicolor</i>	154
4.3.2. Sobreexpresión heteróloga de la proteína GST-ArgR	156
4.3.3. Expresión y purificación de las proteínas StrepArgR y ArgRStrep	157
4.4. Identificación de las regiones promotoras que actúan como dianas de ArgR	159
4.4.1. Puesta a punto de las condiciones para EMSA con StrepArgR y ArgRStrep	161
4.4.2. Interacción de ArgR con genes del metabolismo de nitrógeno	164
4.4.3. Interacción de ArgR con genes de metabolismo de aminoácidos	166
4.4.4. Interacción de ArgR con genes de biosíntesis de purinas y pirimidinas	166
4.4.5. Interacción de ArgR con reguladores, factores sigma y anti-sigma	168
4.4.6. Interacción de ArgR con el metabolismo secundario	170
4.4.7. Interacción de ArgR con otras regiones reguladoras	170
4.4.8. Secuencias protegidas por StrepArgR frente a la digestión con DNAsa I	171
4.4.9. Definición de un nuevo modelo de caja ARG	175
4.5. Funcionalidad del extremo amino de ArgR	177
4.5.1. Caracterización de los mutantes argR de <i>S. coelicolor</i>	177
4.5.1.1. Comparación de la producción de antibióticos	177
4.5.1.2. Comparación de la actividad OTC	178
4.5.1.3. Comparación de la actividad luciferasa en distintos entornos génicos	179
4.5.1.4. Ensayos de retraso en gel con Strep-ArgR _N	180

4.6.	Análisis mediante ChIP on chip	182
4.6.1.	Puesta a punto de los pasos clave para la obtención de la cromatina	182
4.6.2.	Diseño experimental: comparación directa vs comparación indirecta	184
4.6.3.	Control del enriquecimiento en el ADN inmunoprecipitado, marcaje e hibridación en micromatriz	184
5.	CONCLUSIONES	189
6.	ANEXOS	193
6.1.	Listado cebadores	195
6.2.	Transcriptómica serie temporal	202
6.3.	Resumen de resultados de EMSAs con ArgR	216
6.4.	Alineamiento cajas ARG v1.3	218
6.5.	Matriz de puntuación v1.3	220
6.6.	Resumen resultados de regulación por ArgR	222
7.	BIBLIOGRAFÍA	225

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistemática del género *Streptomyces*

El género *Streptomyces* fue descrito en 1875 por Cohn (Cohn, 2005) y denominado *Streptothrix* (pelo enrollado) por su aspecto filamentososo. En 1943 adoptó su nombre actual, *Streptomyces* (hongo enrollado), y se creó un sistema de clasificación de los actinomicetos (Waksman y Henrici, 1943), en el que todos los miembros tenían la capacidad de formar células ramificadas. La base para la clasificación fue el grado de ramificación. De tres grupos principales, dos se dividían a su vez en otros dos, resultando finalmente cinco géneros (Fig. 1.1).

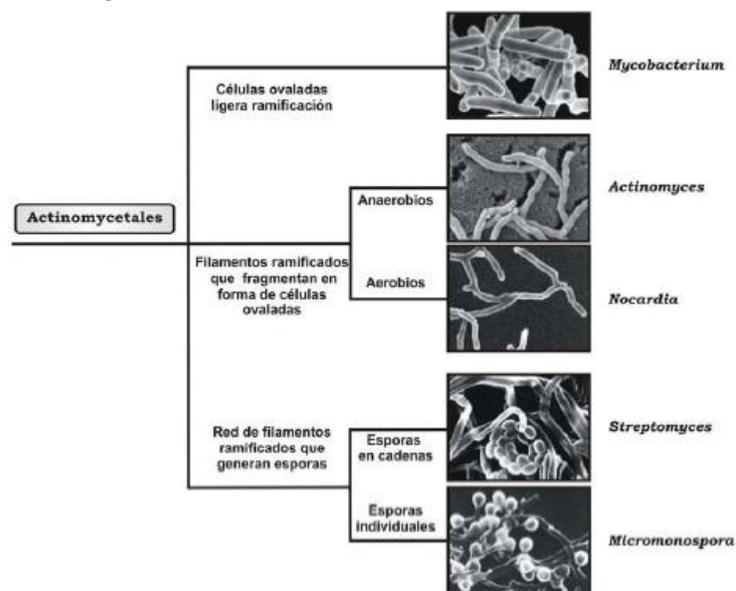


Fig. 1.1: Esquema de los géneros que componen el orden de los *Actinomycetales*. Clasificación de los actinomicetos según Waksman y Henrici basada en características morfológicas. Modificado de Hopwood (2007).

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, lo que desencadenó el descubrimiento de un gran número de especies y la aparición de diversos sistemas de clasificación (Anderson y Wellington, 2001). Algunas características utilizadas para describir las nuevas especies eran de carácter subjetivo, como el color del micelio sustrato y aéreo, la morfología de las cadenas de esporas, la producción de melanina, etc. (Gause *et al.*, 1957; Waksman, 1961). En estudios posteriores se introdujeron otras características clasificatorias como propiedades bioquímicas, nutricionales y fisiológicas.

En 1964 se creó el *International Streptomyces Project* (ISP) estableciendo métodos y criterios para definir especies tipo del género *Streptomyces* (Shirling y Gottlieb, 1966; 1972), como características morfológicas de las hifas y de las esporas, características fisiológicas como la producción de melanina, crecimiento en diferentes medios y asimilación de diferentes fuentes de carbono. Estas pruebas no fueron definitivas en la taxonomía de *Streptomyces*, pero sentaron las bases de futuros sistemas de clasificación.

El desarrollo de sistemas analíticos mucho más potentes como la secuenciación y comparación de la secuencia que codifica el ARN ribosomal 16S (Anderson y Wellington, 2001), la determinación de los niveles de hibridación ADN-ADN, el análisis de patrones de restricción y la amplificación al azar de ADN polimórfico, provocó un profundo cambio en la taxonomía y permitió un mayor conocimiento de las especies del género *Streptomyces*.

Las filogenias basadas en la secuencia de una sola molécula como es el ADN que codifica la subunidad ribosomal 16S no reflejan adecuadamente la relación filogenética, debido a posibles eventos de transferencia horizontal de genes y tasas variables de mutación y de recombinación. La aparición de genomas completos ha permitido generar filogenias con mejor resolución, obtener una visión más amplia de la evolución de los distintos grupos bacterianos (Ventura *et al.*, 2007) y realizar un nuevo estudio basado en la combinación de filogenias construidas con secuencias de genes individuales y genomas completos (Alam *et al.*, 2010). Así, el árbol consenso obtenido presenta una mejor resolución y robustez que las filogenias construidas con genes individuales (Fig. 1.2).

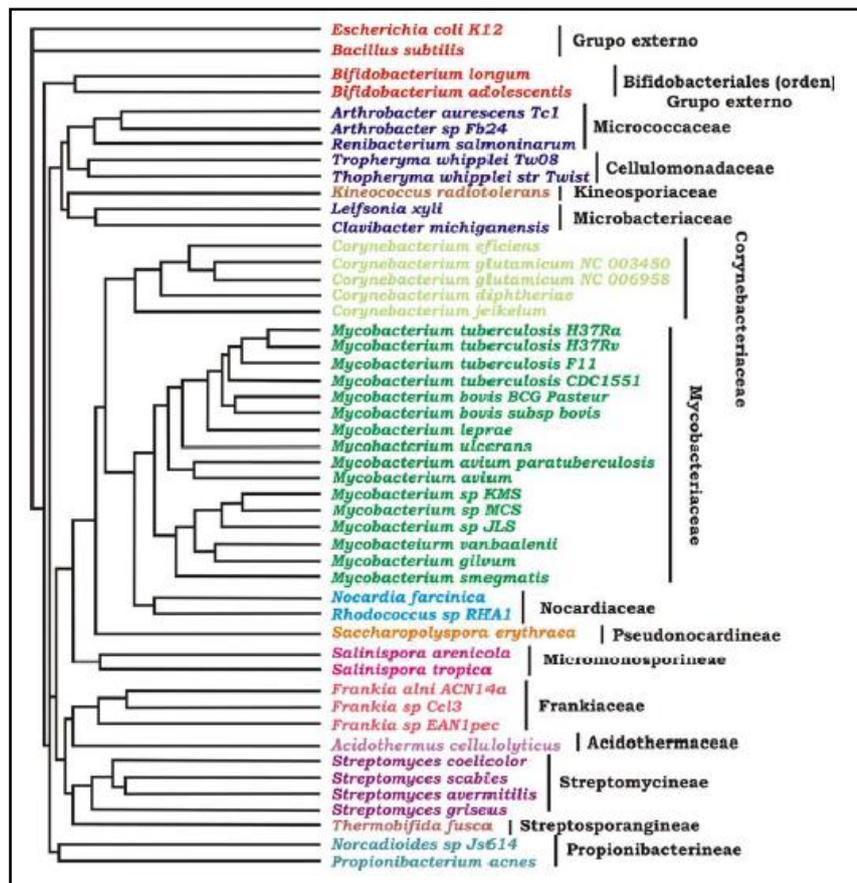


Fig. 1.2. Árbol filogenético del orden de los Actinomycetales, construido a partir de filogenias de genes individuales y de filogenias de genomas completos. A la derecha se marca la familia o el suborden que agrupa a las diferentes especies. (Alam *et al.*, 2010).

La actual taxonomía del género *Streptomyces* es la siguiente (Garrity *et al.*, 2004):

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

El género *Streptomyces* es uno de los más numerosos y más estudiados. Se han descrito más de 500 especies y subespecies que aparecen reflejadas y se van actualizando en la página web: <http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesb.html>. En la primera edición del manual de Bergey *Streptomyces* aparece en el volumen V, volumen formado por bacterias Gram positivas con alto contenido en G+C (Chater y Hopwood, 1993). La segunda edición lo incluye en el volumen V con el título *The Actinobacteria* (<http://www.bergeys.org/>; Goodfellow, 2012).

1.2. Características del género *Streptomyces*

1.2.1. Breve introducción al mundo de las actinobacterias

Actinobacteria constituye uno de los grupos bacterianos con mayor diversidad: existen morfologías desde cocoide (*Micrococcus*) o rodo-cocoide (*Arthrobacter*) hasta hifas fragmentadas (*Nocardia*) o micelio altamente diferenciado (*Streptomyces*); muestran variedad en las propiedades fisiológicas y metabólicas, como la producción de enzimas extracelulares y la formación de distintos metabolitos secundarios (Schrempf, 2001); están ampliamente distribuidas en ecosistemas acuáticos, aéreos y terrestres, especialmente en el suelo donde juegan un papel crucial en el reciclaje de biomateriales por descomposición y formación de humus (Goodfellow y Williams, 1983; Bentley *et al.*, 2002; Stach y Bull, 2005). También existen patógenos, comensales de plantas, simbioses de insectos y de otros organismos como esponjas marinas (Suzuki *et al.*, 1999; Quintana *et al.*, 2008; Lerat *et al.*, 2009; Kaltenpoth, 2009; Pimentel-Elardo *et al.*, 2010). Estas simbiosis resultan particularmente interesantes y están vinculadas a la producción de metabolitos secundarios por parte de las bacterias participantes. Por otra parte, muchas bifidobacterias se utilizan como ingredientes activos en los denominados “alimentos funcionales” debido a sus propiedades probióticas, como la protección contra patógenos mediante procesos de exclusión competitiva, modulación inmune y la capacidad de adherirse al mucus o al epitelio intestinal (Stanton *et al.*, 2005).

El orden de los actinomicetos está formado por bacterias Gram positivas, neutrófilas, aerobias facultativas, mesófilas con una temperatura de crecimiento entre 25 y 35 °C, cuyo ADN tiene un contenido en G+C superior al 50 % (Goodfellow, 1989; Chater y Hopwood, 1993; van Keulen *et al.*, 2007), característica que se interpreta como el resultado de una presión selectiva que ha favorecido un uso de codones poco propicio para determinados bacteriófagos (Chater y Chandra, 2006).

1.2.2. Variabilidad en el género *Streptomyces*

La capacidad de las especies del género *Streptomyces* para colonizar diferentes hábitats viene dada por la diversidad de su metabolismo, que les permite emplear fuentes de carbono y nitrógeno muy variadas. Aunque su pH de crecimiento óptimo se encuentra entre 6,5 y 8, han sido aislados miembros del género capaces de crecer tanto en medios ácidos (DeRisi *et al.*, 1997; Flowers y Williams, 1978) como en medios con pH 9 o superiores (Chaphalkar y Dey, 1998). Su presencia en el suelo se ve favorecida por su crecimiento micelial y su capacidad de formar esporas, las cuales constituyen un sistema de dispersión y una forma de resistencia que favorece la supervivencia durante largos periodos de escasez de agua y nutrientes (Ensign, 1978).

Los estreptomicetos desarrollan un papel muy importante en los ciclos biogeoquímicos de biodegradación, ya que durante su crecimiento secretan una gran variedad de enzimas hidrolíticas que permiten degradar polímeros insolubles de la materia orgánica presente en el suelo (McCarthy y Williams, 1992). Esta característica es una herramienta para procesos de biorremediación. Por ejemplo, *Streptomyces* sp. MC1 es capaz de reducir hasta un 94 % la concentración de cromo hexavalente de muestras de suelo (Polti *et al.*, 2009), carcinógeno que daña las estructuras celulares debido a su alto poder de oxidación.

Algunas especies liberan geosmina, sustancia química de naturaleza sesquiterpenoide (Gerber y Lechevalier, 1965), que permanece en la tierra hasta que caen las primeras gotas de lluvia, siendo arrastrada por la humedad haciendo que el aire adquiera el olor característico a tierra mojada. El ser humano percibe la geosmina en concentraciones de hasta 1 parte por cada 1000 millones, lo que la convierte en una de las moléculas más olorosas que existen. Los camellos, algunos insectos y las lombrices se ven atraídos por su aroma ya que es indicativo de la presencia de agua.

Los miembros del género *Streptomyces* cuentan con un gran número de genes y sistemas dedicados a la regulación del estrés oxidativo (Lee *et al.*, 2005). En general se ha considerado que los *Streptomyces* son aerobios estrictos, si bien la secuenciación del genoma del organismo modelo del género, *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002), ha revelado que posee un complejo enzimático relacionado con la respiración de nitrato (van Keulen *et al.*, 2005a; Fischer *et al.*, 2010). Probablemente esta anaerobiosis facultativa es otro producto de la adaptación de estas bacterias a su hábitat, el suelo, un medio sumamente complejo y cambiante, en el que la aparición puntual de condiciones de estrés anóxico (por ejemplo, a causa del encharcamiento estacional) puede exigir para la supervivencia el mantenimiento de un metabolismo basal independiente del oxígeno (van Keulen *et al.*, 2007). El hecho de que en el genoma de *S. coelicolor* haya 65 factores σ diferentes (Bentley *et al.*, 2002), frente a los 7 de *E. coli* (Sharma y Chatterji, 2010), es una muestra de la flexibilidad fisiológica que exige el nicho ecológico de estas actinobacterias.

1.2.2.1. Ciclo biológico de *Streptomyces*

Los microorganismos del género *Streptomyces* poseen un ciclo de vida complejo (Fig.1.3) durante el cual experimentan profundos cambios morfológicos y fisiológicos que culminan en la formación de esporas y la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios con numerosas aplicaciones biotecnológicas. Las esporas presentes en el suelo emiten un tubo germinativo cuando encuentran las condiciones óptimas de aporte de nutrientes y humedad (Hardisson *et al.*, 1978). La energía para esta fase inicial se obtiene a partir de la degradación del disacárido trehalosa, componente mayoritario de la espora que puede llegar a constituir el 12 % del peso seco de la misma (Ensign, 1978). Con la germinación de la espora se inicia la síntesis de ARN y proteínas y, tras la aparición del tubo germinativo, la de ADN (Hardisson *et al.*, 1978). En el modelo clásico (fig. 1.3 y 1.4 a) el crecimiento del tubo germinativo origina hifas multigenómicas y escasamente septadas que penetran en el sustrato, del cual obtienen nutrientes a partir de la acción de enzimas hidrolíticas extracelulares (Williams *et al.*, 1983) que proporcionan una gran versatilidad en cuanto al uso de nutrientes. El crecimiento de las hifas ocurre por extensión longitudinal de la pared celular en el extremo apical de la hifa (Miguélez *et al.*, 1992), tanto en medio sólido como líquido (Braña *et al.*, 1982). Después de la septación de las células en crecimiento, las células subapicales pueden cambiar la polaridad, generando un nuevo punto de crecimiento que conducirá a la formación de una ramificación (Flärdh, 2003). A medida que avanza el crecimiento hay un incremento en el número de ramificaciones, principalmente en las secciones más viejas de la hifa, lo que da lugar a un crecimiento exponencial del micelio (Allan y Prosser, 1983), formándose una densa y compleja red de hifas que constituye el micelio sustrato o vegetativo.

Si las condiciones nutricionales dejan de ser favorables, hay una situación de estrés fisiológico o ante determinadas señales extracelulares, a partir de la zona apical del micelio sustrato emergen hifas que se proyectan hacia el aire, generando un micelio aéreo (Méndez *et al.*, 1985) que crece a expensas del micelio vegetativo, donde previamente se han ido desencadenando procesos de muerte celular controlada que generan los nutrientes necesarios para el desarrollo del micelio aéreo (Chater, 2001). Tras un periodo de elongación y crecimiento, tiene lugar en las hifas aéreas la formación sincrónica y regular de septos. Cada

compartimento resultante es unigenómico y dará lugar a una única espora (Hardisson y Manzanal, 1976), rodeada de una gruesa cubierta hidrofóbica que evita que el agua las arrastre hacia las profundidades del suelo donde la concentración de oxígeno es baja e impida la dispersión a través del aire, agua o incluso vía transmisión animal (McCarthy y Williams, 1992). Con la espora se cierra el ciclo de diferenciación morfológica de *Streptomyces*. Las esporas poseen compuestos para la iniciación del metabolismo activo, ya que el sumergirlas en agua destilada es suficiente para activar la proteosíntesis y la transición de la fase de dormancia al metabolismo activo (Strakova *et al.*, 2013). Estos autores sugieren que la primera fase del programa de desarrollo es independiente de las condiciones de cultivo y postulan que está predeterminado genéticamente o por las condiciones existentes durante la esporulación.

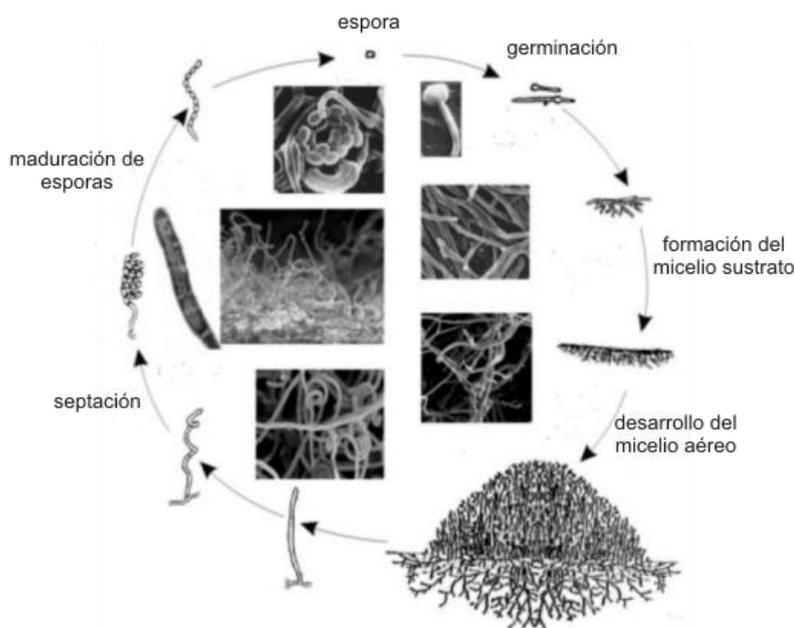


Fig. 1.3. Modelo clásico del ciclo de vida de *Streptomyces*

En el modelo clásico el ciclo de vida en medio sólido se diferencia en micelio sustrato (vegetativo) y micelio aéreo (reproductivo). Recientemente se ha descrito un nuevo modelo basado en estudios moleculares de transcriptómica y proteómica, en el que se describen nuevas fases de diferenciación para el crecimiento en superficie y para cultivos sumergidos (Fig. 1.4, Manteca *et al.*, 2008; Manteca y Sánchez, 2009). En una primera fase se produce la germinación de las esporas como micelio joven compartimentalizado (micelio I), que forma agregados desde tiempos tempranos en el crecimiento y comienza a morir desde el centro del agregado hacia afuera, intercalándose segmentos de micelio viables y muertos (fig. 1.5) y produciéndose finalmente una muerte celular programada (Manteca *et al.*, 2007). Este proceso de muerte supone una parada en el crecimiento que precede a la formación de micelio multinucleado (micelio II), que crece a partir de los segmentos viables que quedan del micelio I. Se han definido dos tipos de micelio II en base a la ausencia o presencia de las capas hidrofóbicas de las hifas aéreas, denominados temprano y tardío, respectivamente. El micelio sustrato del modelo clásico se corresponde con el micelio temprano del nuevo modelo y el micelio aéreo con la fase tardía del micelio II, el cual ya se ha recubierto de la superficie hidrofóbica. El micelio II tardío sufre una segunda ronda de muerte, dando lugar a la formación de esporas (Manteca *et al.*, 2008; Manteca y Sánchez, 2009).

En cultivos líquidos, el modelo clásico asume que el micelio sustrato, al alcanzar la fase estacionaria, produce los metabolitos secundarios, ya que en estas condiciones es infrecuente la

diferenciación morfológica; el nuevo modelo propone la muerte celular programada del micelio I y la generación del micelio II 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).

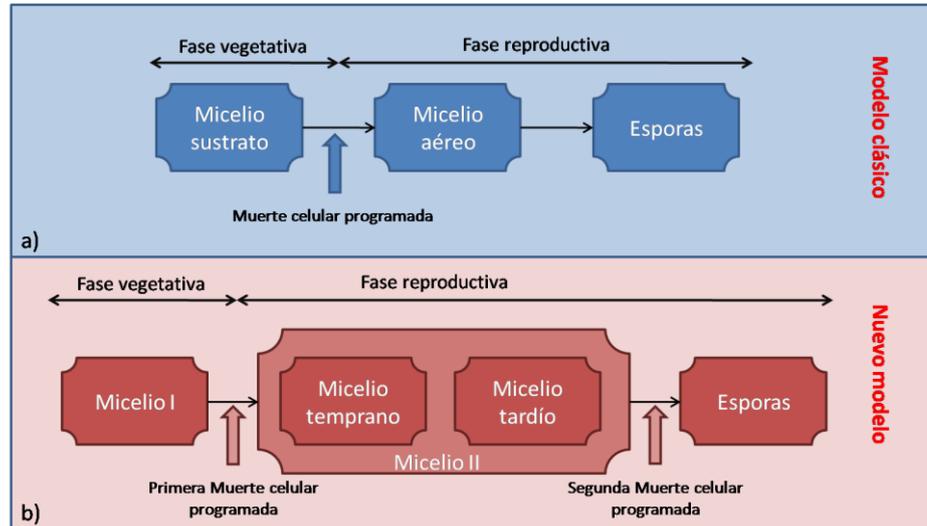


Fig. 1.4: Fases de la diferenciación morfológica en *Streptomyces*. Comparación entre el modelo clásico de diferenciación (a) y un nuevo modelo de ciclo celular (b). Modificado de Manteca y Sánchez (2009).

Por consiguiente, parece que un mecanismo programado de muerte celular, equivalente al mecanismo de apoptosis en organismos superiores, es el principal desencadenante de la producción de antibióticos en *Streptomyces* (Bibb, 2005; Manteca *et al.*, 2008). Concretamente, uno de los principales desencadenantes en *S. coelicolor* y otras especies de *Streptomyces* es la acumulación en el medio de N-acetilglucosamina (componente del peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas), resultado de la muerte del micelio sustrato (Rigali *et al.*, 2008).

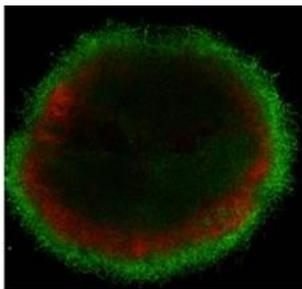


Fig. 1.5. Regiones vivas y muertas en el micelio de *Streptomyces*. Imagen de microscopía de fluorescencia confocal laser de micelio de *S. tsukubaensis*. Para analizar la viabilidad de las células se han usado el yoduro de propidio que se une a los ácidos nucleicos de las células muertas (región roja), y SYTO 9, que tiñe tanto células viables como aquellas con la permeabilidad de la membrana alterada (región verde). Tomado de Yagüe *et al.* (2010).

1.2.2.2. Estructura del cromosoma de *Streptomyces*

Los genomas de actinobacterias secuenciados hasta ahora pertenecen a organismos relevantes en medicina humana y animal, biotecnología o ecología, y se asume que la heterogeneidad genómica observada es un reflejo de su biodiversidad.

Las especies del género *Streptomyces* contienen un cromosoma lineal de gran tamaño, entre 6,7 y 11,9 Mb (Lin *et al.*, 1994; Dary *et al.*, 2000), y con un contenido medio de G+C que oscila entre el 68 y el 74 % (Ventura *et al.*, 2007). Precisamente por el alto porcentaje 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), que normalmente están ausentes en genes implicados en el crecimiento vegetativo y aparecen en genes implicados en la resistencia a antibióticos, regulación o diferenciación celular (ver apartado 1.3.1). Respecto al inicio de la traducción en *Streptomyces*, el codón utilizado mayoritariamente es AUG (metionina) aunque no es raro encontrar GUG (valina) y CUG (leucina) (Chater y Hopwood, 1993).

La aparición de la secuencia completa del genoma de *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002), a la que siguió la de especies de interés industrial, como *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003), *S. griseus* (Ohnishi *et al.*, 2008), *S. clavuligerus* (Medema *et al.*, 2010) o *S. tsukubaensis* (Barreiro *et al.*, 2012), ha revelado que el cromosoma se encuentra organizado genéticamente, con una región central de 6 Mb y dos brazos terminales de 2 Mb, aproximadamente (Fig. 1.6). En el núcleo central se localizan mayoritariamente genes esenciales conservados, implicados en la biosíntesis de macromoléculas, el metabolismo primario y la división celular, mientras que en los brazos se concentran genes en su mayoría no esenciales, relacionados con el metabolismo secundario y la síntesis de enzimas hidrolíticas, y albergan en su mayor parte genes característicos de cada especie (Bentley *et al.*, 2002; Ikeda *et al.*, 2003; Choulet *et al.*, 2006; Ohnishi *et al.*, 2008). Los extremos del cromosoma contienen secuencias repetidas e invertidas denominadas TIR (*Terminal Inverted Repeat*), cuyo tamaño varía, según la especie, entre 24 y 600 kb (Volff y Altenbuchner, 1998).

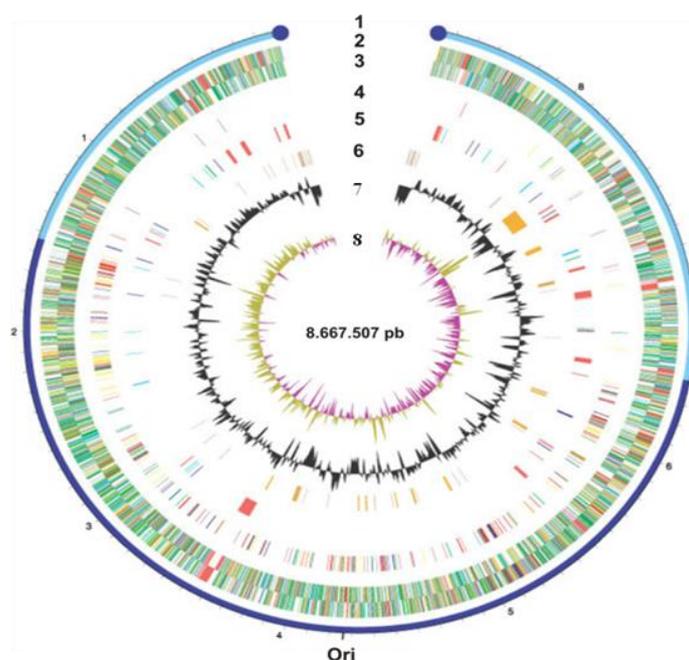


Fig. 1.6. Representación circular del genoma de *S. coelicolor*. En el círculo externo (1) se representa esquemáticamente la región central o núcleo (línea en azul oscuro) y los brazos terminales (líneas en azul claro) del cromosoma, en cuyo extremo se encuentran las proteínas terminales. En los círculos 2 y 3 se muestran todos los genes, coloreados según su función (negro: metabolismo energético, rojo: metabolismo secundario y transferencia de información, amarillo: metabolismo primario, verde claro: desconocida, azul claro: reguladores). En el círculo 4 se indican genes implicados en procesos esenciales para la célula: replicación del DNA, transcripción, traducción, división celular. En el círculo 5, se indican en rojo los genes del metabolismo secundario, en azul palo, exoenzimas; en azul oscuro, conservones; en verde, proteínas de vesículas de gas. Los transposones (marrón) y los genes adquiridos por transferencia lateral (naranja) se muestran en el círculo 6. Por último, el círculo 7 muestra el contenido en G+C, y el círculo 8 muestra el sesgo GC, apareciendo en morado los valores menores a 1, y en caqui los valores mayores que 1. Modificado de Bentley *et al.* (2002).

El cromosoma circular de los patógenos *Mycobacterium tuberculosis*, de 4,4 Mb, y el de *Corynebacterium diphtheriae*, de 2,5 Mb, también mantienen una moderada sintonía con el núcleo central del cromosoma de *S. coelicolor* y de otros *Streptomyces* (Bentley *et al.*, 2002), lo que sugiere que las bacterias del género *Streptomyces* han evolucionado a partir de un ancestro común a otros actinomicetos; este antecesor común poseería un genoma circular de alrededor de 4 Mb que pudo linearizarse mediante un proceso de recombinación simple con un plásmido lineal (Chen, 1996; Ventura *et al.*, 2007; Kirby, 2011), adquiriendo los brazos laterales a través de una transferencia horizontal de nuevos grupos de genes (Hopwood, 2006), lo cual también se explica por la abundancia de transposones en los extremos del cromosoma (Chen *et al.*, 2002).

La replicación del cromosoma se inicia a partir de un *oriC* de localización central, y continúa bidireccionalmente hacia los extremos, donde se encuentran covalentemente unidas las proteínas terminales que actúan como cebadores para la síntesis del último fragmento de Okazaki (Jakimowicz *et al.*, 1998).

Según la base de datos GOLD (*Genomes Online Database*) en 2013 existen 125 especies del género *Streptomyces* secuenciadas o en proceso de secuenciación, gracias a la aparición de nuevas y rápidas tecnologías como la pirosecuenciación.

1.2.2.3. Elementos genéticos extracromosomales de *Streptomyces*

De los elementos extracromosomales, los plásmidos son los más usuales. Estos son lineales o circulares (Hopwood *et al.*, 1987; Kinashi y Shimaji-Murayama, 1991), de alto o bajo número de copias e incluso los hay que pueden integrarse en el cromosoma, cuyo tamaño varía entre 10 kb y 1,8 Mb y presentan un contenido en G+C similar al del cromosoma (Kieser *et al.*, 2000; Medema *et al.*, 2010). El número de copias suele ser inversamente proporcional a su tamaño. En general se trata de plásmidos que acomodan genes del metabolismo secundario o genes no esenciales para el crecimiento (Ventura *et al.*, 2007) como el plásmido gigante SCP1 de *S. coelicolor*, el cual posee los genes implicados en la biosíntesis y resistencia al antibiótico metilenomicina (Bentley *et al.*, 2004) o el plásmido pSCL4 de *S. clavuligerus*, con un gran número de agrupaciones para producción de metabolitos secundarios incluyendo posibles antibióticos (Medema *et al.*, 2010).

Los plásmidos lineales presentan proteínas terminales unidas a sus extremos y, al igual que el cromosoma, se replican a partir de una región *oriC* central. Recientemente se ha descrito que en los plásmidos lineales de *S. coelicolor* las proteínas de un extremo interactúan con las del otro, dotándolos de una estructura circular superenrollada, fenómeno que se produce también en los cromosomas (Tsai *et al.*, 2011).

Algunos plásmidos circulares, como SLP1 de *S. coelicolor*, se pueden integrar en sitios específicos del cromosoma de la cepa hospedadora (*attB*) por recombinación con el sitio de integración del plásmido *attP*. Así, cromosoma y plásmido se replican juntos, aunque sin perder la capacidad de transferirse independientemente mediante conjugación a otras especies, donde se circularizan y permanecen en bajo número de copias replicándose autónomamente. En los plásmidos circulares no integrativos, la replicación tiene lugar mediante el sistema del círculo rodante, lo que les permite estar presentes con un alto número de copias (Kieser *et al.*, 2000).

La cepa *S. coelicolor* A3(2) porta tres plásmidos de diferentes características. Un plásmido lineal de 356 kb denominado SCP1 (Wright y Hopwood, 1976b; Kinashi y Shimaji-Murayama, 1991) que contiene los genes de biosíntesis del antibiótico metilenomicina (Kirby y Hopwood, 1977), un plásmido

circular transmisible de 30 kb y de pocas copias denominado SCP2 (Bibb *et al.*, 1981), y un plásmido de 17 kb normalmente integrado en el cromosoma denominado SLP1 (Chater y Hopwood, 1993) pero que es capaz de escindirse, conjugarse y replicarse autónomamente en otros estreptomicetos (Hopwood *et al.*, 1987; Hopwood y Kieser, 1993).

Por otra parte, en los *Streptomyces* y otras actinobacterias se encuentran ampliamente difundidos elementos genéticos con características intermedias entre los bacteriófagos y los plásmidos: los denominados AICEs (*Actinomycete integrative and conjugative elements*), elementos integrativos específicos de sitio y que suelen persistir a lo largo de las generaciones en el cromosoma hasta que se transfieren mediante conjugación a otro hospedador diferente, pudiéndose comportar en él como plásmidos replicativos (Hopwood *et al.*, 1984; te Poele *et al.*, 2008). Actúan como moduladores de la diversidad del genoma hospedador y están implicados en la adquisición de agrupaciones de metabolitos secundarios y otro ADN vía transferencia génica horizontal (te Poele *et al.*, 2008; Medema *et al.*, 2010).

Se han descubierto numerosos transposones en *Streptomyces*, existiendo ejemplos tanto de elementos integrativos específicos de sitio como de elementos capaces de integrarse al azar en el genoma: *IS110* (Chater *et al.*, 1985), *Tn4556* (Chung, 1987), *IS117* (Henderson *et al.*, 1990), y *Tn4811* (Chen *et al.*, 1992). Existe un gran número de fagos capaces de infectar a estas bacterias, llamados actinofagos, presentando todos ellos su material genético en forma de ADN de doble cadena (Kieser *et al.*, 2000).

Estos plásmidos, elementos transponibles y actinofagos se han convertido en herramientas para la manipulación genética de los *Streptomyces* (Baltz *et al.*, 1997; Kieser *et al.*, 2000) y a partir de ellos se han creado, por ejemplo, plásmidos integrativos con sistemas de recombinación fágicos como Φ C31 y Φ BT1 utilizados en este trabajo.

1.2.2.4. Inestabilidad genética

Una característica común a los cromosomas del género *Streptomyces* es su inestabilidad, ya que sufren con frecuencia (0,1-1 %) ampliaciones o deleciones espontáneas en los extremos, pudiendo originar estas últimas la circularización del cromosoma (Kieser *et al.*, 2000). Las mutaciones suelen ser pleiotrópicas y afectan sobre todo al metabolismo secundario y a la diferenciación celular (Chen, 1996). La variabilidad en la producción de antibióticos por distintos clones dentro de una cepa de *Streptomyces* es un hecho bien conocido en la industria y es una muestra más de la inestabilidad genética. En algunas ocasiones afecta también al metabolismo primario, particularmente a uno o más pasos de la ruta de biosíntesis de 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 visto que mutantes con cromosomas circulares son más inestables (Fischer *et al.*, 1997a). La inestabilidad se debe frecuentemente a la deleción de fragmentos de ADN y a un proceso asociado con la amplificación de secuencias vecinas (Cullum *et al.*, 1986; Birch *et al.*, 1990). Tanto las deleciones como las ampliaciones son debidas a procesos de recombinación en las regiones terminales poco conservadas (Volff y Altenbuchner, 2000).

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).

1.2.3. Producción de metabolitos secundarios

El metabolismo primario coincide con la fase de crecimiento exponencial y se puede definir como una serie de reacciones enzimáticas interrelacionadas que facilitan la energía, los intermediarios biosintéticos y las macromoléculas clave necesarias para las células vivas (Turner, 1973). Como resultado de un sistema metabólico finamente regulado, los metabolitos primarios raramente se acumulan.

El metabolismo secundario se ha definido como el conjunto de rutas que determinan la producción de una serie de compuestos que, sin resultar esenciales para la vida ni para el crecimiento de los organismos que los producen, confieren a estos ventajas ecológicas (Challis y Hopwood, 2003). Pese al interés que suscitan los metabolitos secundarios, su papel en la naturaleza es una cuestión abierta (Aminov, 2009). Los metabolitos secundarios son compuestos que se caracterizan porque: 1) no son esenciales para el crecimiento o la supervivencia del organismo productor y son, generalmente, específicos de cada cepa; 2) poseen una gran variedad de estructuras químicas y de actividades biológicas; 3) se sintetizan generalmente tras la entrada en la fase estacionaria de crecimiento o de diferenciación morfológica a partir de metabolitos primarios o de intermediarios de los mismos por medio de vías únicas; 4) su síntesis se encuentra regida por agrupaciones de genes con mecanismos reguladores que coordinan el nivel de expresión con la fase fisiológica del organismo productor (Martín y Demain, 1980; Vining, 1992; Challis y Hopwood, 2003).

El suelo, principal hábitat natural de los estreptomicetos, es un medio muy cambiante. La capacidad de las especies de *Streptomyces* para producir antibióticos y otros metabolitos secundarios ha podido suponer una ventaja evolutiva, facilitando su adaptación a las diferentes y variables situaciones de estrés (físico, químico o biológico) que tienen lugar en este hábitat. Estas ventajas selectivas permiten explicar: los mecanismos de acción que presentan; la amplia variedad de sus estructuras químicas; el importante gasto energético que supone para el organismo que los produce y el elevado porcentaje del genoma que se dedica a su producción, en torno al 20 % (Challis y Hopwood, 2003).

El género *Streptomyces* es la principal fuente natural de metabolitos secundarios bioactivos de gran importancia: antibióticos, agentes antitumorales, inmunosupresores, antivíricos, antifúngicos, insecticidas, sideróforos, antiparasitarios, inhibidores de enzimas, pigmentos, inmunomoduladores, estimuladores del crecimiento de plantas, herbicidas y muchos otros (Kieser *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2003; Hopwood, 2007. Ver tabla 1.1). En total, un 61 % de los metabolitos secundarios con actividad conocida producidos por microorganismos los producen las actinobacterias, y de ellos un 80 % los producen miembros de *Streptomyces* (es decir, un 49 % del total de los microorganismos, Bérdy, 2005). En el caso concreto de los antibióticos, esos porcentajes pasan a ser del 66, 80 y 53 %, respectivamente (Kieser *et al.*, 2000; Challis y Hopwood, 2003). Hasta el momento sólo se ha descubierto una 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).

La activación del metabolismo secundario y la diferenciación morfológica están relacionadas (Demain y Fang, 1995). Recientemente se han descubierto pequeñas moléculas sintéticas que alteran los rendimientos de producción de metabolitos secundarios mediante la inhibición de la biosíntesis de ácidos grasos, ya que así se dispone de más precursores para la síntesis de metabolitos secundarios (Craney *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2013). El modelo del ciclo de vida de *Streptomyces* propuesto recientemente por Manteca *et al.* (2008) (ver apartado 1.2.2.1), correlaciona la parada del crecimiento que se produce en las bacterias de este género con la fase de transición entre el micelio I compartimentalizado y el micelio II diferenciado multinucleado, el cual posee el potencial para la producción de metabolitos secundarios.

Metabolito	Especie productora	Diana biológica	Aplicación
Acarbosa	<i>S. glaucescens</i>	Alfaglucosidasa	Tratamiento de la diabetes
Ácido clavulánico	<i>S. clavuligerus</i>	Inhibidor de penicilinasas	Antibacteriano combinado con penicilinas
Actinomicina	<i>S. antibioticus</i>	Transcripción	Anticancerígeno
Adriamicina	<i>S. peucetius</i>	Replicación del DNA	Anticancerígeno
Anfotericina	<i>S. nodosus</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Ascomicina	<i>S. hygrosopicus</i>	Linfocitos	Inmunosupresor
Avermectina	<i>S. avermitilis</i>	Neurotransmisores de invertebrados	Antiparasitario
Avoparcina	<i>S. candidus</i>	Pared celular bacteriana	Promotor del crecimiento
Bialafos	<i>S. hygrosopicus</i>	Metabolismo del nitrógeno	Herbicida
Bleomicina	<i>S. verticillus</i>	Replicación del DNA	Anticancerígeno
Candidicina	<i>S. griseus</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Cloranfenicol	<i>S. venezuelae</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Clortetraciclina	<i>S. aureofaciens</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Daunomicina	<i>S. peucetius</i>	Replicación del DNA	Anticancerígeno
Doxorubicina	<i>S. peucetius</i>	Replicación del DNA	Anticancerígeno
Estaurosporina	<i>S. longisporoflavus</i>	Replicación del DNA	Anticancerígeno
Estreptotricina	<i>S. lavendulae</i>	Ribosomas bacterianos	Promotor del crecimiento
Estreptomina	<i>S. griseus</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Filipina	<i>S. avermitilis</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Fosfinotricina	<i>S. viridochromogenes</i>	Glutamina sintetasa	Herbicida
Fosfomicina	<i>S. wedmorensis</i>	Pared celular bacteriana	Antibacteriano
Kanamicina	<i>S. kanamyceticus</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Kasugamicina	<i>S. kasugaensis</i>	Síntesis proteica	Antifúngico
Lincomicina	<i>S. lincolnensis</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Mitomicina	<i>S. caespitosus</i>	Replicación del DNA	Anticancerígeno
Monensina	<i>S. cinnamomensis</i>	Membrana celular	Promotor del crecimiento
Neomicina	<i>S. fradiae</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Nikomina	<i>S. tendae</i>	Síntesis de quitina	Antifúngico e insecticida
Nistatina	<i>S. noursei</i>	Membrana celular	Antifúngico
Novobiocina	<i>S. niveus</i>	Replicación del DNA bacteriano	Antibacteriano
Nistatina	<i>S. noursei</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Oleandomicina	<i>S. antibioticus</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Oxitetraciclina	<i>S. rimosus</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Pimaricina	<i>S. natalensis</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Polioxina	<i>S. cacaoi</i>	Síntesis de quitina	Antifúngico
Pristinamicina	<i>S. pristinaespiralis</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Rapamicina	<i>S. hygrosopicus</i>	Linfocitos	Inmunosupresor
Tacrolimus	<i>S. tsukubaensis</i>	Linfocitos	Inmunosupresor
Tetraciclina	<i>S. aureofaciens</i>	Ribosomas bacterianos	Antibacteriano
Tienamicina	<i>S. catleya</i>	Pared celular bacteriana	Antibacteriano
Tilosina	<i>S. fradiae</i>	Ribosomas bacterianos	Promotor del crecimiento
Virginiamicina	<i>S. virginiae</i>	Ribosomas bacterianos	Promotor del crecimiento

Tabla 1.1. Metabolitos producidos por especies del género *Streptomyces*. Modificada de Hopwood (2007).

1.3. Regulación de la producción de antibióticos

Generalmente, la biosíntesis de antibióticos en medio líquido se inicia durante la fase estacionaria, una vez que ha finalizado el crecimiento vegetativo, mientras que en medio sólido coincide con la formación del micelio aéreo (Bibb, 2005). Ocasionalmente algunos antibióticos se producen en paralelo al crecimiento, como sucede en *S. clavuligerus* en relación a la producción de ácido clavulánico, lo que puede deberse a un proceso de diferenciación del micelio poco sincronizado (Bascarán *et al.*, 1991).

Las fuentes fácilmente asimilables como glucosa, iones amonio y fosfato estimulan el crecimiento y reducen la producción de metabolitos secundarios (Martín y Demain, 1980; Demain y Fang, 1995). Las fuentes de nitrógeno precursoras de moléculas de metabolitos secundarios ejercen un esperado efecto positivo sobre la producción de los mismos (Cheng *et al.*, 1995). La limitación de alguno de los factores nutricionales supone un estrés para la célula bacteriana que disminuye su tasa de crecimiento. La producción de diversos tipos de metabolitos secundarios y antibióticos solo se da en condiciones nutricionales limitantes de fosfato (Martín, 2004; Martín *et al.*, 2012), probablemente porque la mayor parte de los componentes celulares esenciales están fosforilados, y porque el fosfato está involucrado en un gran número de funciones celulares y en la regulación de la expresión de muchos genes (Torriani, 1990). La integración de las diferentes señales nutricionales permite a la célula bacteriana redirigir los recursos energéticos hacia la obtención de unos u otros nutrientes y de esta manera adaptarse a los cambios que se producen en la naturaleza.

Ante una situación de escasez de aminoácidos, las bacterias han desarrollado un sistema de regulación nutricional conocido como respuesta estricta que consiste en un rápido descenso de la síntesis de ARN. Los ARNt descargados se unen al sitio A del ribosoma induciendo que la proteína asociada a los ribosomas RelA catalice la síntesis de ppGpp (guanosina 5'-difosfato-3'-difosfato, Cashel y Kabalcher, 1970). El mecanismo exacto mediante el cual actúa la molécula de ppGpp aun no ha sido elucidado, pero se piensa que puede estar directamente implicada en la selección de los promotores por parte de la ARN polimerasa (Hesketh *et al.*, 2007b). En *S. clavuligerus* se ha observado una superproducción de antibióticos en mutantes $\Delta relA$, los cuales no producen ppGpp (Gómez-Escribano *et al.*, 2008).

El ppGpp no es la única señal intracelular que desencadena el metabolismo secundario: la S-adenosil-L-metionina, SAM (Kim *et al.*, 2003) y el AMPc (Horinouchi *et al.*, 2001, ver apartado 1.3.2.3) parecen jugar también papeles relevantes en la modulación de estos procesos.

1.3.1. Agrupaciones génicas para la síntesis de antibióticos

El análisis molecular de los genes de biosíntesis de antibióticos ha mostrado que genes estructurales y genes importantes para el control de la producción del antibiótico y la supervivencia de la cepa productora están asociados en agrupaciones génicas (*clusters*) (Martín y Liras, 1989). Estos genes no estructurales se clasifican en dos grupos:

1) Genes de resistencia. Evitan el suicidio de los organismos productores, pero no la muerte de los organismos que carecen de diana para el antibiótico (Cundliffe, 1989). Los mecanismos de resistencia son múltiples, siendo muy frecuente la modificación intracelular del antibiótico llevada a cabo por enzimas hidrolíticas, como β -lactamasas (Liras y Martín, 2006), acetiltransferasas (Vara *et al.*, 1985), fosfotransferasas (Distler y Piepersberg, 1985) o glucosiltransferasas (Vilches *et al.*, 1992). Otro sistema de

resistencia adicional es el bombeo o expulsión del antibiótico del citoplasma, mecanismo mediado por proteínas transmembrana que acoplan el transporte del antibiótico a un gradiente de protones o a la hidrólisis de ATP (Cattoir, 2004). Por ejemplo, en *S. coelicolor* el operón *actAB* codifica dos sistemas de transporte de actinorrodina (Xu *et al.*, 2012).

2) Genes reguladores. Codifican proteínas de bajo peso molecular, generalmente básicas, con regiones características hélice-vuelta-hélice (HTH, por *Helix-Turn-Helix*) de unión al ADN. El conocimiento de la regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios resulta sumamente interesante desde un punto de vista práctico, puesto que los puntos de regulación constituyen una de las principales y más intuitivas dianas de la ingeniería metabólica cuando lo que se busca es el aumento de la producción de un determinado compuesto (Olano *et al.*, 2008). Se pueden distinguir varios niveles en la regulación de la producción de metabolitos secundarios en el género *Streptomyces* (fig. 1.7). En el nivel superior se encuentran los reguladores pleiotrópicos que intervienen en la regulación conjunta de la diferenciación morfológica y la biosíntesis de antibióticos y que tienden a encontrarse en regiones del cromosoma alejadas de las agrupaciones biosintéticas. En el nivel más bajo de regulación intervienen los reguladores específicos de ruta que controlan la producción de un único antibiótico y que suelen ubicarse dentro de las agrupaciones biosintéticas. Su expresión es dependiente de uno o varios factores pleiotrópicos, los cuales, a su vez, se activan o reprimen en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos o ambientales como el choque térmico, las radiaciones, concentraciones de oxígeno demasiado altas o bajas y la acidificación del medio (Bibb, 2005; Martín *et al.*, 2011). Este modelo simplificado no refleja la complejidad real de los mecanismos que controlan la producción de antibióticos, ya que se ha demostrado la existencia de reguladores específicos que pueden actuar sobre la síntesis de varios antibióticos, y modular la acción de reguladores pleiotrópicos (Huang *et al.*, 2005), teniendo por tanto efectos pleiotrópicos. A medida que aumentan los datos respecto a la regulación en *Streptomyces* se va apreciando cada vez más su complejidad y la idea de una regulación de tipo jerárquico va dando lugar a la de una red mucho más compleja, en la que existe regulación cruzada, retroalimentación y una gran versatilidad, lo que permite a la bacteria adaptarse a los cambios que se producen en su medio ambiente (Sawai *et al.*, 2004).

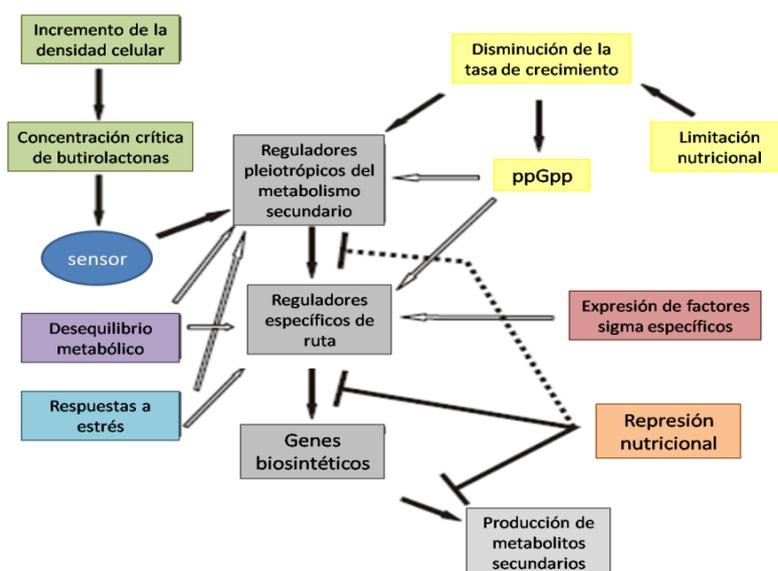


Fig. 1.7. Esquema de las interacciones entre los diferentes niveles de regulación del metabolismo secundario, según el modelo clásico. Las flechas negras representan regulaciones positivas, mientras que las claras representan interacciones plausibles sin comprobación experimental directa. Las flechas romas simbolizan represión. Modificado de Bibb (1996).

1.3.2. Reguladores pleiotrópicos del metabolismo secundario

La complejidad de la regulación pleiotrópica del metabolismo secundario de *Streptomyces* queda patente en el hecho de que solo en *S. coelicolor* se conocen multitud de reguladores pleiotrópicos encargados de modular la síntesis de los cuatro antibióticos producidos por esta bacteria (Bibb, 1996). Hasta ocho reguladores diferentes podrían estar uniéndose a los promotores de los reguladores específicos de ruta *actII-ORF4* y *redD* en *S. coelicolor* (Park *et al.*, 2009). Algunos reguladores pleiotrópicos, como AdpA, afectan a niveles muy elevados de la cascada de señales, ejerciendo efecto en múltiples funciones celulares, mientras que otros parecen restringir sus efectos al control del metabolismo secundario (Anderson *et al.*, 2001). Los reguladores pleiotrópicos son capaces de integrar una gran variedad de estímulos nutricionales y ambientales, señales intercelulares, tasa de crecimiento, deficiencias nutricionales o estreses fisiológicos (Martín, 2004; Rigali *et al.*, 2008). Existen múltiples subniveles en su modo de acción, con unos actuando sobre otros, formando una red (Huang *et al.*, 2005).

1.3.2.1. Sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes (TCS por *Two Component System*), están presentes en los organismos de todos los dominios: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya*. Controlan la expresión de determinados genes en respuesta a factores del medio, participando en quimiotaxis, captación de nutrientes, fijación del nitrógeno, esporulación, *quorum sensing* y virulencia (Hoch, 2000; Stock *et al.*, 2000).

El modelo básico de TCS está formado por una quinasa sensora (SK, *Sensor Kinase*) y un regulador de la respuesta (RR, *Response Regulator*) (Fig. 1.8, Hutchings *et al.*, 2004). Los reguladores de respuesta principalmente actúan como factores transcripcionales, aunque en algún caso también pueden tener alguna actividad enzimática o regular la actividad de una proteína (Galperin, 2006).

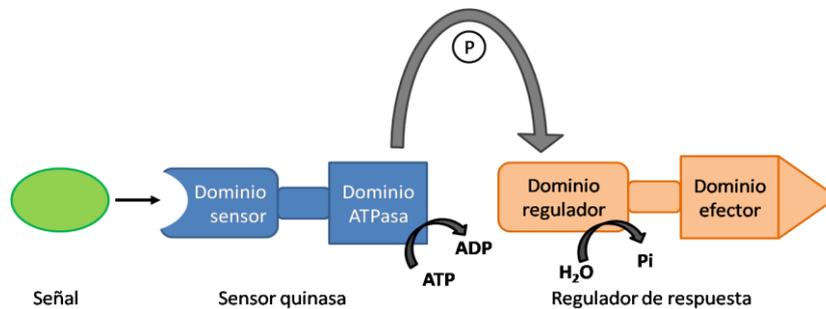


Fig. 1.8: Representación esquemática del modelo básico de transducción de señal de un sistema de dos componentes. Modificada de Hutchings *et al.* (2004).

Se considera que el rango de señales medioambientales al que las bacterias pueden responder está directamente relacionado con el número de SKs que contiene su genoma, lo que a su vez es proporcional al tamaño de este (Kim y Forst, 2001). En *S. coelicolor* se conocen 53 parejas sensor-regulador, 85 quinasas sensoras y 79 reguladores de respuesta (Hutchings *et al.*, 2004).

Un modelo de sistema de dos componentes es el control de la respuesta a la escasez de fosfato inorgánico. Está mediado por PhoR/PhoP (Sola-Landa *et al.*, 2003, 2005; Mendes *et al.*, 2007), de forma que cuando existen condiciones de fosfato limitantes, la SK (PhoR) fosforila el RR (PhoP). En *S. coelicolor* se ha demostrado la unión de PhoP a unas secuencias específicas denominadas cajas PHO situadas en las regiones promotoras de gran variedad de genes (Sola-Landa *et al.*, 2005), tanto del metabolismo primario como del secundario, así como la existencia de una regulación cruzada entre la escasez de fosfato y el metabolismo del nitrógeno, lo cual demuestra una vez más la importancia de este tipo de sistemas para la

supervivencia del microorganismo (Sola-Landa *et al.*, 2013). Se han descubierto recientemente varios ejemplos de regulación cruzada entre reguladores globales, como entre PhoP y GlnR, o entre PhoP y AfsR, lo que resulta en la modulación de los genes *actII-orf4* y *redD* en *S. coelicolor* (Santos-Beneit *et al.*, 2012).

1.3.2.2. Sistemas de serina-treonina quinasas

La transducción de señales en bacterias está mediada también por proteínas típicas de eucariotas como las serina-treonina quinasas (Zhang, 1996). Un ejemplo es el sistema AfsK-AfsR-AfsS, que controla de forma global la producción de antibióticos y la diferenciación morfológica (Umeyama *et al.*, 2002; Horinouchi, 2003). Se ha demostrado la fosforilación de AfsR por otras serina/treonina quinasas como *pkaG* y *afsL* (Sawai *et al.*, 2004). Si cada una de ellas responde a estímulos ambientales diferentes, AfsR puede ser un punto de regulación central donde confluyan varias cascadas de señalización inducidas por diversas señales e integradas por distintas serina/treonina quinasas. El estudio de Lian *et al.* (2008) sugiere la implicación de *afsS* en la modulación de la síntesis de antibióticos, en el control de los genes de respuesta a la escasez de fosfato y en los genes del metabolismo de nitrógeno y azufre, lo cual apunta una vez más la existencia de una conexión entre el estrés nutricional y la activación de las rutas de producción de antibióticos en *S. coelicolor*.

1.3.2.3. Otros reguladores pleiotrópicos

Otro ejemplo de regulación pleiotrópica es la ejercida por los genes *bld*, cuya inactivación anula la formación de micelio aéreo dando lugar a un fenotipo calvo (*bald*) e incapacita la producción de antibióticos sin que el crecimiento del micelio vegetativo se vea afectado (Merrick, 1976; Chater y Chandra, 2006), lo que de nuevo sugiere que la formación de micelio aéreo y la síntesis de antibióticos comparten puntos de regulación (Nodwell *et al.*, 1999). El estudio de estos mutantes ha permitido determinar que los genes *bld* están implicados en la regulación y síntesis de una cascada jerarquizada de señales extracelulares, que conduce a la formación y secreción del péptido hidrofóbico SapB (Willey *et al.*, 1993), molécula surfactante que junto a otras proteínas denominadas chaplinas y rodlinas, recubren la superficie de las hifas mediante una capa hidrofóbica, disminuyendo la tensión superficial del entorno acuoso, lo que facilita su crecimiento hacia fuera del sustrato y permite el desarrollo del micelio aéreo (Claessen *et al.*, 2006).

La mayoría de los genes *bld* codifican factores σ o reguladores transcripcionales (Chater y Chandra, 2006), siendo excepciones *bldK* y *bldA*. Este último codifica el único ARNt capaz de leer los poco frecuentes codones TTA para la incorporación del aminoácido leucina (Piret y Chater, 1985): únicamente el 2-3 % de los genes de las especies de *Streptomyces* contienen este codón, y son genes implicados en la esporulación y la regulación de la producción de antibióticos cuya expresión tiene lugar en la última fase del crecimiento exponencial y durante la fase estacionaria (Leskiw *et al.*, 1991; Ventura *et al.*, 2007; Chater y Chandra, 2008). Es interesante destacar que el gen *redA* posee un codón TTA que le hace estar bajo el control del gen regulador pleiotrópico *bldA*.

Otros genes implicados en la diferenciación morfológica se denominan *whi* por el fenotipo blanco (*white*) que presentan los mutantes a partir de los cuales se han caracterizado, y que carecen de la pigmentación característica de las esporas maduras (Chater, 2001). Dichos genes actúan, al igual que los genes *bld*, de manera secuencial. El gen temprano *whiG* induce la esporulación (Chater *et al.*, 1989), proceso que cesa debido a la acción de WhiA y WhiB, que también inducen el fin de la replicación del ADN (Aínsa *et al.*, 2000). El cese de crecimiento dispara la activación de otros genes tempranos como los reguladores *whiH*, crítico para la septación de las hifas aéreas (Chater, 2001), y *whiI*, implicado en la

condensación del cromosoma que tiene lugar durante la esporulación. En las etapas tardías de la esporulación es esencial la presencia del factor σ codificado por *sigF* que, junto con *whiD*, interviene en el engrosamiento de la pared de las esporas y en la acumulación del policétido que otorga la pigmentación característica de las esporas, sintetizado por *whiE* ORFI-VIII.

A semejanza de lo que ocurre en *E. coli*, uno de los efectores propuestos en el control de la diferenciación y la producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces* es el adenosín monofosfato cíclico (AMPC, Chen *et al.*, 2006). Durante la germinación, la formación de micelio aéreo y producción de antibióticos se produce un aumento en la cantidad de AMPC (Süsstrunk *et al.*, 1998). Mutantes en la proteína receptora de AMPC, Crp, muestran defectos en la germinación, un crecimiento retrasado y una esporulación anticipada (Derouaux *et al.*, 2004). Gao *et al.* (2012) demuestran que Crp es también un regulador del metabolismo secundario y de la producción de antibióticos en *S. coelicolor*.

1.3.3. Autorreguladores

En numerosas especies del género *Streptomyces* se ha descrito la regulación de la diferenciación morfológica y/o del metabolismo secundario a través de moléculas difusibles de bajo peso molecular y con estructura γ -butirolactona, denominadas autorreguladores. Estas moléculas actúan como señales intercelulares, llevando a cabo su función fisiológica a muy baja concentración, del orden nanomolar, a través de la unión a receptores citoplasmáticos que actúan como reguladores transcripcionales (Takano, 2006). La unión de las butirolactonas a sus receptores induce un cambio conformacional de estos, impidiendo su unión a los promotores y permitiendo la expresión de sus genes diana (Natsume *et al.*, 2004). Esto da lugar a la diferenciación morfológica y/o bioquímica y provoca un adelanto en la producción de metabolitos secundarios (Takano *et al.*, 2001). Es posible que los receptores de butirolactonas puedan actuar como activadores transcripcionales, ya que se han descrito casos en los que su delección retrasa o inhibe la producción de antibióticos (Takano, 2006). La interacción de las proteínas receptoras de butirolactonas con los promotores diana tiene lugar a través del reconocimiento de secuencias ARE (*AutoRegulatory Elements*) localizados antes o cerca del promotor de los genes que codifican SARP (Folcher *et al.*, 2001) (ver apartado 1.3.4.1).

La mayoría de los sistemas de butirolactonas descritos hasta el momento actúan de forma específica regulando la producción de un antibiótico (Ohnishi *et al.*, 1999; Folcher *et al.*, 2001; Wang y Vining, 2003; Lee *et al.*, 2008). Un amplio número de los receptores de butirolactonas descritos se localizan en la agrupación génica del antibiótico cuya biosíntesis regulan, por lo que se les ha llegado a considerar reguladores específicos de ruta (Bibb, 2005).

La primera molécula de tipo butirolactona descubierta fue el factor A de *S. griseus* (Hara y Beppu, 1982), así denominado por ser un factor de autorregulación. Esta molécula, al alcanzar una concentración crítica, se une a su proteína receptora ArpA, provocándole un cambio conformacional que incapacita su unión al ADN (Onaka y Horinouchi, 1997) y permite la transcripción del gen *adpA*. AdpA activa la transcripción del activador específico de la biosíntesis y resistencia a estreptomicina, *strR*, y de varios genes esenciales para la formación de micelio aéreo y de esporas, además de regular genes que codifican metaloendopeptidasas y serina-proteasas, genes para biosíntesis y resistencia de grisazona (Ohnishi *et al.*, 2005).

En *S. coelicolor* se han descrito tres butirolactonas: SCB1, SCB2 y SCB3. La primera de ellas regula positivamente la producción de actinorrodina, undecilprodigiosina y del sideróforo desferroxiamina (D'Alia *et al.*, 2011). La proteína derivada del gen receptor de γ -butirolactonas, ScbR, se une a su propio promotor y al del gen adyacente, *scbA*, regulando la producción de SCBs (*S. coelicolor butanolides*) en la fase de transición (Takano, 2006).

1.3.4. Reguladores específicos de ruta

Los reguladores específicos son proteínas de unión al ADN con un bajo peso molecular, la mayoría de los cuales actúan como activadores, y por ello su sobreexpresión aumenta la producción del antibiótico (Chater y Bibb, 1997), lo cual es muy interesante desde el punto de vista industrial. En algunos casos también pueden funcionar como represores transcripcionales.

1.3.4.1. Los reguladores de tipo SARP

El grupo de reguladores específicos mejor representado en *Streptomyces* es el de los llamados SARPs (*Streptomyces Antibiotic Regulatory Proteins*), activadores transcripcionales que presentan junto a sus dominios de unión a ADN de tipo wHTH (*winged Helix-Turn-Helix*), un dominio BTAD (*Bacterial transcriptional activator domain*) (Bibb, 2005; Tanaka *et al.*, 2007). Siguiendo los criterios de clasificación de los reguladores transcripcionales, podrían conformar una subfamilia dentro de la familia OmpR (Wietzorrek y Bibb, 1997). Los SARP tienen su motivo de unión al ADN en las proximidades de su extremo N-terminal, rasgo mucho más corriente entre los represores (Pérez-Rueda *et al.*, 1998).

Los ejemplos de este tipo de reguladores entre los miembros del género *Streptomyces* son muy numerosos: los que codifican el regulador de la actinorrodina ActII-ORF4 (Fernández-Moreno *et al.*, 1991), de la undecilprodigiosina RedD y RedZ (Narva y Feitelson, 1990), o de la biosíntesis del antibiótico dependiente de calcio CDA CdaR (Ryding *et al.*, 2002) en *S. coelicolor*, o el de la cefamicina C y el ácido clavulánico en *S. clavuligerus*, CcaR (Pérez-Llarena *et al.*, 1997), entre otros muchos. Esta familia se ha identificado también en diferentes agrupaciones génicas de biosíntesis de policétidos aromáticos, péptidos ribosomales y no ribosomales, policétidos Tipo I, β -lactamas y compuestos azoxi (Bibb, 2005).

1.3.4.2. Otros tipos de reguladores específicos de ruta

Además de la subfamilia SARP, entre los reguladores específicos existen otras familias de proteínas reguladoras, como la familia LysR, representada por el regulador del ácido clavulánico en *S. clavuligerus* ClaR (Pérez-Redondo *et al.*, 1998); la familia TetR, con Gel19, implicado en la síntesis de geldamicina en *S. hygroscopicus* (Kim *et al.*, 2010); la familia AraC, con el regulador RapG como activador directo de la síntesis de rapamicina en *S. hygroscopicus* (Kuscer *et al.*, 2007); la familia LuxR, representada a través de la subfamilia LAL (*Large ATP-binding regulators of the LuxR family*), cuyas proteínas 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 HTH característico de esta familia (De Schrijver y De Mot, 1999), y algunos ejemplos serían PimM, regulador de la producción de pimaricina en *S. natalensis* (Antón *et al.*, 2007), Cvm7P, regulador de la biosíntesis de clavamas en *S. clavuligerus* (Tahlan *et al.*, 2007) o los reguladores GlmRI y GlmRII en el caso de la geldanamicina (He *et al.*, 2008). Dado que gran parte de los esfuerzos dedicados al estudio de la regulación del metabolismo secundario en *Streptomyces* se han centrado en los reguladores tipo SARP, muy poco se sabe aún del funcionamiento de los reguladores pertenecientes a estas otras familias.

1.3.5. Pequeños ARN no codificantes

La regulación transcripcional de los procesos metabólicos y el control del metabolismo secundario se han estudiado extensivamente, pero poco se sabe acerca de la regulación postranscripcional en este género (Reuther y Wohlleben, 2007). En los últimos años se ha visto que pequeños ARNs no codificantes (sRNAs, por *small RNAs*) participan en el control postranscripcional en gran variedad de procesos celulares de adaptación y desarrollo en varias especies bacterianas (Sharma y Vogel, 2009; Waters y Storz, 2009). Son por tanto parte integral de la red de regulación, haciéndola un poco más complicada. Recientemente se ha identificado en *S. coelicolor* 63 posibles sRNAs de 82-494 nucleótidos de longitud, y se ha verificado la expresión, en la mayoría de los casos dependiente de la fase de crecimiento, de 11 de ellos (Vockenhuber *et al.*, 2011). Estos autores no han encontrado similitudes fuera del grupo de *Streptomyces*, debido a su capacidad de formar especies de ARN altamente estructuradas y estables. Las dianas de los sRNAs son regiones conservadas presentes en estructuras en *loop* o regiones de cadena sencilla de la región de inicio de la translación o en la secuencia codificante, pero no en regiones intergénicas (Vockenhuber *et al.*, 2011).

1.4. *Streptomyces coelicolor*

S. coelicolor recibe este nombre debido al color azulado de uno de los pigmentos que produce, la actinorrodina (Hopwood, 2007). *S. coelicolor* A3(2) es el organismo modelo de los actinomicetos y más concretamente del género *Streptomyces* (Hopwood, 1999). Su genética ha sido desarrollada durante las últimas cinco décadas bajo la dirección del Prof. David Hopwood en el instituto John Innes en Norwich (Reino Unido). Las técnicas utilizadas en su manipulación han sido recopiladas en el libro *Practical Streptomyces Genetics* (Kieser *et al.*, 2000). La secuencia completa del genoma realizada en el Instituto Sanger (Bentley *et al.*, 2002) está disponible con libre acceso desde hace varios años, con 7825 secuencias codificantes estimadas (Tabla 1.2).

En el genoma de *S. coelicolor* A3(2) un elevado porcentaje de las proteínas codificadas poseen función reguladora, existiendo 65 factores sigma (Tabla 1.2), algunos de los cuales responden a estímulos externos y activan genes implicados en el estrés por azufre, homeostasis de la pared celular y en el desarrollo del micelio aéreo (Paget *et al.*, 2001; Bentley *et al.*, 2002). También presenta una gran variedad de reguladores pertenecientes a diferentes familias como LysR, LacI, ROK, GntR, TetR, IclR, AraC, AsnC y MerR. Además, hay un grupo de 25 posibles proteínas de unión a ADN que no tiene miembros fuera de *S. coelicolor*, y podría constituir una nueva familia de reguladores específica de *Streptomyces* (Bentley *et al.*, 2002). Un reflejo de la interacción del microorganismo con el medio en el que habita es la existencia de aproximadamente un 8 % de proteínas relacionadas con el transporte y un 10,5 % de secuencias para proteínas de secreción: nucleasas, lipasas, xilanasas, celulasas y quitinasas, entre otras.

El metabolismo secundario, a pesar de no ser considerado una función esencial, otorga muchas ventajas; por ejemplo, la síntesis de hopanoides podría proteger al organismo frente a la pérdida de agua a través de la membrana plasmática del micelio aéreo, y el ácido eicosapentanoico podría ayudar a mantener la fluidez de la membrana a bajas temperaturas. También llama la atención la presencia de al menos tres

agrupaciones que probablemente codifiquen la formación de sideróforos para captar hierro en condiciones de baja disponibilidad (Bentley *et al.*, 2002).

Tamaño	8,667507 Mb
Contenido G+C	72,12 %
Secuencias codificantes	7825
DNA no codificante	11,1 %
Tamaño medio de los genes	991 pb
Proteínas con función reguladora	965 (12,3 %)
Factores sigma	65
Proteínas transportadoras	614 (7,8 %)
Proteínas secretadas	819 (10,5 %)
Sistemas de dos componentes completos	53
Agrupaciones de metabolitos secundarios	22
Agrupaciones de antibióticos	4

Tabla 1.2: Características generales del genoma de *S. coelicolor* A3(2). Modificado de Bentley *et al.* (2002).

Los estreptomicetos poseen un alto grado de heterogeneidad en las secuencias promotoras (Bibb *et al.*, 1985; Janssen y Bibb, 1990; Strohl, 1992). Algunos genes de estreptomicetos se transcriben desde más de un promotor (Bibb *et al.*, 1985), a veces por diferentes formas de la ARN polimerasa (Buttner *et al.*, 1988). Este hecho podría reflejar cambios en la disponibilidad de los factores sigma y otras proteínas reguladoras durante el desarrollo (Bibb, 1996).

La disponibilidad de la secuencia del genoma de *S. coelicolor* y el desarrollo de métodos eficientes para su análisis ha permitido la investigación global de la expresión génica mediante el uso de micromatrices (chips) de ADN (DeRisi *et al.*, 1997). Gracias a esta técnica se han observado alteraciones en el patrón de expresión de genes durante el crecimiento de *S. coelicolor* y concretamente durante la fase de transición del metabolismo primario al secundario, desvelándose una parte muy importante de las rutas de biosíntesis de antibióticos (Huang *et al.*, 2001). Trabajos adicionales han contribuido a desvelar ciertos aspectos desconocidos o incompletos de *S. coelicolor* tales como cascadas de regulación y mecanismos de respuesta a estrés (Lee *et al.*, 2005; Bucca *et al.*, 2009; Castro-Melchor *et al.*, 2010; Santos-Beneit *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2012; Allenby *et al.*, 2012).

De los cuatro antibióticos descritos en *S. coelicolor* A3(2), actinorrodina, undecilprodigiosina, antibiótico dependiente de calcio o CDA (*Calcium Dependent Antibiotic*), y metilénomicina (Fig. 1.9), dos son pigmentos de baja actividad antibiótica, pero de fácil percepción, extracción y estabilidad, lo que permite su cuantificación mediante espectrofotometría. Esto hace de *S. coelicolor* un buen organismo modelo para el estudio de la producción de antibióticos.

El antibiótico pigmentado actinorrodina es un policétido (Fig. 1.9) que se sintetiza por los genes de la agrupación *act* (SCO5071-SCO5092). Este compuesto, descrito como indicador de ácido-base (Brockmann y Hieronymus, 1955), otorga a la colonia y sus alrededores un característico tono azulado a pH básico, y rojo a pH ácido y neutro. Ha sido propuesto como un buen colorante para la industria alimentaria gracias a su solubilidad, estabilidad y nula toxicidad (Zhang *et al.*, 2006). Se han descrito seis análogos de la molécula (α -, β -, γ -, ϵ -actinorrodina y ácido actinorrodínico), aunque el número podría ascender al menos hasta diez (Bystrykh *et al.*, 1996). La actividad antibiótica de este compuesto es muy limitada en bacterias Gram positivas y nula en bacterias Gram negativas (Wright y Hopwood, 1976a).

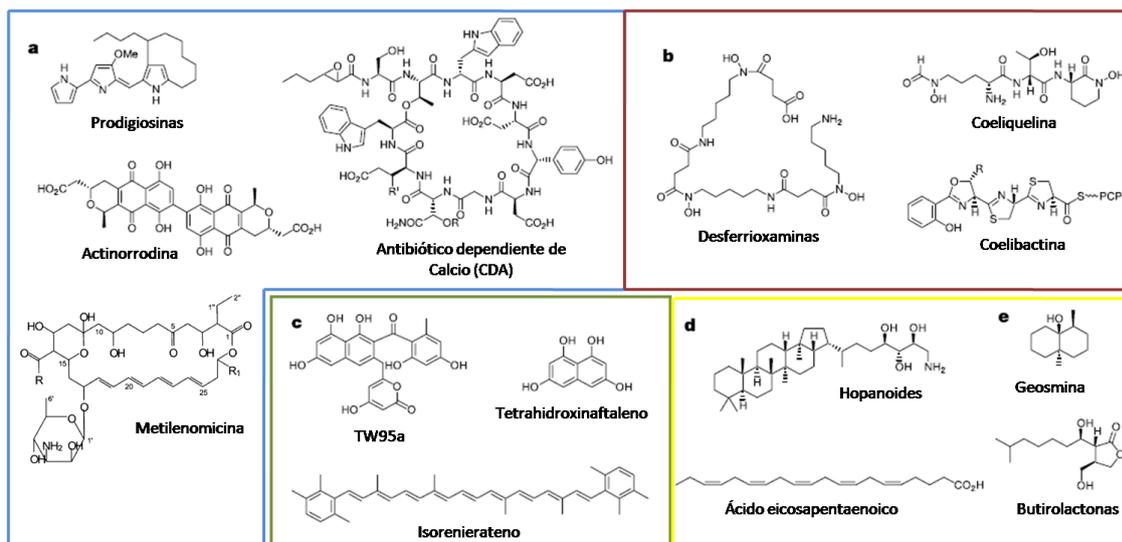


Fig. 1.9: Estructura química de algunos antibióticos y metabolitos secundarios producidos por *S. coelicolor*, agrupados por su posible función: a) antibióticos; b) sideróforos; c) pigmentos; d) lípidos; e) otras moléculas (Bentley *et al.*, 2002).

El pigmento rojo undecilprodigiosina (Fig. 1.9) es un antibiótico tripirrólico codificado por la agrupación génica *red* (SCO5877-SCO5898) (Tsao *et al.*, 1985). Las prodigiosinas se forman por la condensación de tres anillos pirrólicos y se diferencian por el hidrocarburo presente en el tercero de ellos. Su localización es intracelular ya que es muy insoluble en agua, lo cual impide su difusión en el medio. Fueron descubiertas en especies del género *Serratia* (y más tarde también en especies del género *Streptomyces*) por su actividad antibacteriana, antifúngica y antiprotozoica (Williams *et al.*, 1971; Rudd y Hopwood, 1980). Recientemente se les ha asignado un efecto inmunosupresor y anticancerígeno (Williamson *et al.*, 2007) demostrándose una toxicidad selectiva frente a todas las líneas celulares responsables del cáncer de mama (Ho *et al.*, 2007).

El antibiótico CDA es un lipopéptido cíclico de 11 aminoácidos con un hidrocarburo de 6 carbonos en su extremo amino terminal (Fig. 1.9), codificado por la agrupación de genes *cda* (SCO3210-SCO3249) (Kempter *et al.*, 1997). Fue descrito en *S. coelicolor* por Lakey *et al.* (1983) y caracterizado químicamente por Kempter *et al.* (1997). Su actividad antibacteriana depende de la presencia de calcio en el medio. Su cuantificación se puede realizar mediante bioensayo utilizando organismos como *Bacillus mycoides* o *Staphylococcus aureus* en presencia de nitrato cálcico (Kieser *et al.*, 2000).

La metilenomicina es un compuesto con un núcleo ciclopentanona, incoloro y lipofílico, que fue descubierto en *S. violaceoruber* (Haneishi *et al.*, 1974a, 1974b, 1974c). Los genes *mmr* que codifican la agrupación de síntesis están en el plásmido SCP1. La metilenomicina presenta actividad antibacteriana en bacterias Gram negativas y Gram positivas, siendo especialmente efectiva en especies del género *Proteus* y ambientes ácidos (Terahara *et al.*, 1979). Su cuantificación se determina por HPLC, o por bioensayo, generalmente frente a cepas de *S. coelicolor* SCP1⁻ (carentes de plásmido). La cepa *S. coelicolor* M145 es una cepa libre de los plásmidos SCP1 y SCP2, por lo que no produce metilenomicina (Kieser *et al.*, 2000).

Desde la publicación del genoma de *S. coelicolor* se ha desvelado la existencia de otros 18 metabolitos secundarios (policétidos, péptidos, sideróforos, hopanoides, terpenos, butirolactonas, geosmina, etc) codificados por su genoma (Thompson *et al.*, 2002). La existencia de tantos y tan variados metabolitos secundarios probablemente indica una adaptación específica a los diferentes hábitats en los que se encuentra presente este microorganismo.

1.5. Arginina

El interés en la biosíntesis de arginina estriba en el conocimiento a nivel molecular de esta vía en *E. coli* (Glansdorff y Xu, 2007) y al hecho de que la arginina y los productos relacionados con su vía de biosíntesis son precursores de muchos antibióticos (estreptomocina, estreptotricina, mitomicina, undecilprodigiosina, ácido clavulánico...).

La arginina juega un papel importante en la unión de sustratos, cofactores y efectores cargados negativamente a sitios activos de proteínas (Riordan *et al.*, 1977) y está implicada en la formación de simples y dobles enlaces, a menudo con las cadenas de aspartato o glutamato, lo cual estabiliza la estructura terciaria y cuaternaria de numerosas proteínas y es una importante forma de interacción entre estas (de Vos *et al.*, 1992).

1.5.1. Vía de biosíntesis de la arginina

La arginina se sintetiza a partir del glutamato en 8 etapas (fig. 1.10). El primer paso es la acetilación del grupo amino del glutamato (Cunin *et al.*, 1986). La biosíntesis de arginina *de novo* vía N-acetilglutamato es característica de muchos procariotas, hongos y plantas, incluyendo algas unicelulares, pero no de animales (Alonso y Rubio, 1989; Slocum, 2005). El grupo acetilo se conserva en los primeros 4 intermediarios e impide la ciclación espontánea del glutamato semialdehído a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (el último intermediario de la biosíntesis de prolina). Así se asegura la separación de la vía biosintética de la arginina de la de prolina (Xu *et al.*, 2007). Sin embargo, en algunas condiciones se ha observado un intercambio de metabolitos entre ambas vías (Itikawa *et al.*, 1968; Billheimer *et al.*, 1976).

Existen dos formas de eliminar el grupo acetilo. En la ruta lineal, característica de las enterobacterias y descrita en la arqueobacteria *Sulfolobus solfataricus*, la acetilornitinasas (codificada por *argE*) hidroliza la N-acetilornitina a ornitina y acetato (Cunin *et al.*, 1986). El resto de los procariotas estudiados como *Micrococcus glutamicus*, arqueobacterias metanogénicas, *Neisseria gonorrhoeae*, *Geobacillus stearothermophilus* y *B. subtilis*, *S. coelicolor* y *Corynebacterium glutamicum*, entre otros, y los eucariotas *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa* utilizan la ruta cíclica (Udaka y Kinoshita, 1958; Shinnery y Catlin, 1978; Meile y Leisinger, 1984; Davis, 1986; Sakanyan *et al.*, 1993; Hindle *et al.*, 1994; Sakanyan *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2007). En la ruta cíclica el grupo acetilo es reciclado desde la N-acetilornitina hasta el glutamato por medio de la ornitina acetiltransferasa (OAT codificada por *argJ*). Por tanto, en la acetilación del glutamato intervienen dos enzimas: la ornitina acetiltransferasa y la N-acetilglutamato sintasa (ArgA). En *S. clavuligerus* la actividad OAT es capaz de complementar la actividad N-acetilornitinasas codificada por el gen *argE* de la ruta lineal de arginina en *E. coli* (Rodríguez-García *et al.*, 2000; de la Fuente *et al.*, 2004).

Datos enzimáticos y genéticos demuestran que en *N. gonorrhoeae*, *G. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *Thermotoga neapolitana* y *Thermotoga maritima* y *S. cerevisiae* la OAT es bifuncional: es capaz de transferir al glutamato tanto el grupo acetilo de la N-acetilornitina como el de la acetilcoenzima A (Martín y Mulks, 1992; Sakanyan *et al.*, 1993; O'Reilly y Devine, 1994; Crabeel *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2007). La información existente relativa a *Pseudomonas aeruginosa*, *S. coelicolor*, *S. clavuligerus* y *C. glutamicum* indica que poseen una OAT monofuncional (Haas *et al.*, 1972; Hindle *et al.*, 1994; Sakanyan *et al.*, 1996; de la Fuente *et al.*, 2004).

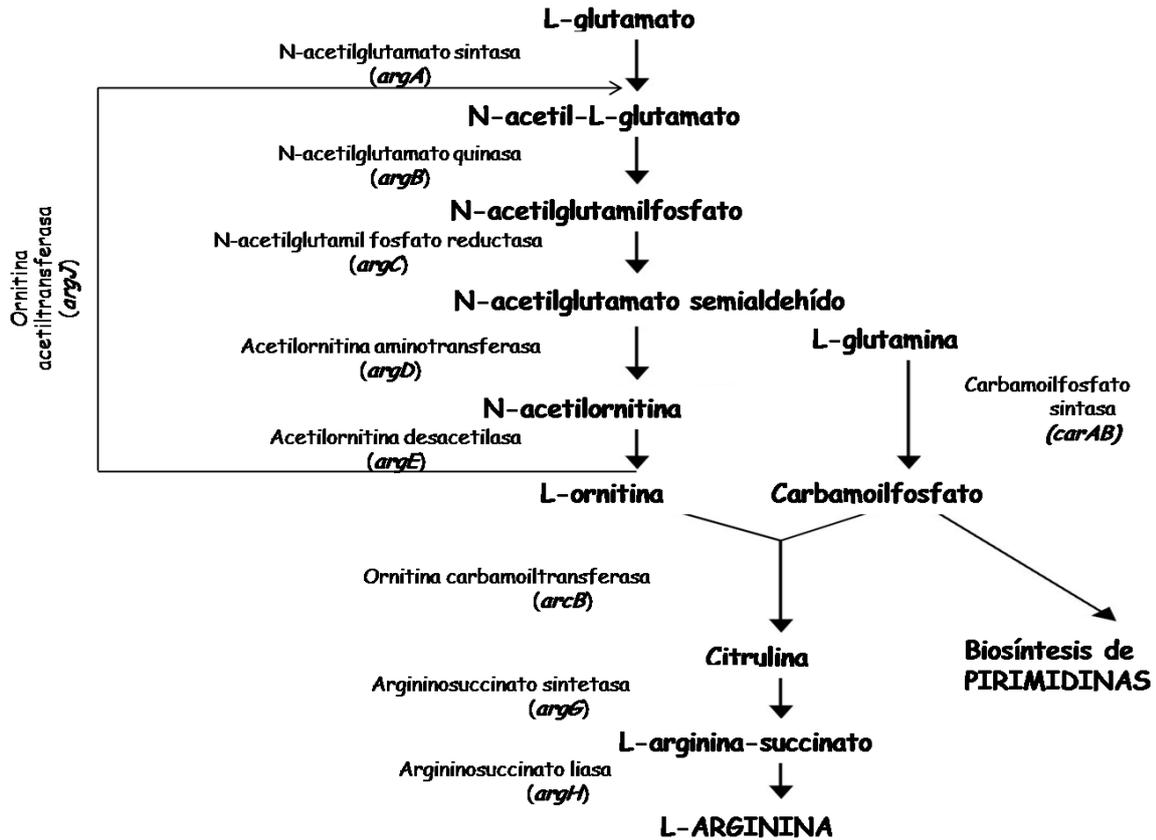


Fig. 1.10. Vía de biosíntesis de arginina. Entre paréntesis se indica el nombre del gen que codifica cada actividad enzimática.

La ornitina carbamoiltransferasa (OTC), enzima con actividad arginasa en *Streptomyces*, incorpora el carbamoilfosfato a la ornitina para formar citrulina (de la Fuente *et al.*, 1996). La síntesis del carbamoilfosfato, metabolito común en la síntesis de arginina y pirimidinas, se regula conjuntamente por arginina y pirimidinas mediante represión transcripcional de los promotores y control alostérico de la actividad carbamoilfosfato sintasa (Pierard *et al.*, 1965; Devroede *et al.*, 2004). Algunos organismos elaboran dos diferentes OTCs: una anabólica y otra catabólica, empleada en la vía de la arginina deiminasa (Cunin *et al.*, 1986). *B. subtilis* produce dos enzimas reguladas independientemente, una reprimida por arginina y otra reprimida por uracilo (Paulus y Switzer, 1979).

1.5.2. Vías de catabolismo de la arginina

Las bacterias tienen varias estrategias para degradar arginina (Fig. 1.11) ya que, dependiendo del organismo y de las condiciones de crecimiento, se puede utilizar la arginina como fuente de nitrógeno, carbono o energía (Charlier y Glansdorff, 2004; Larsen *et al.*, 2005).

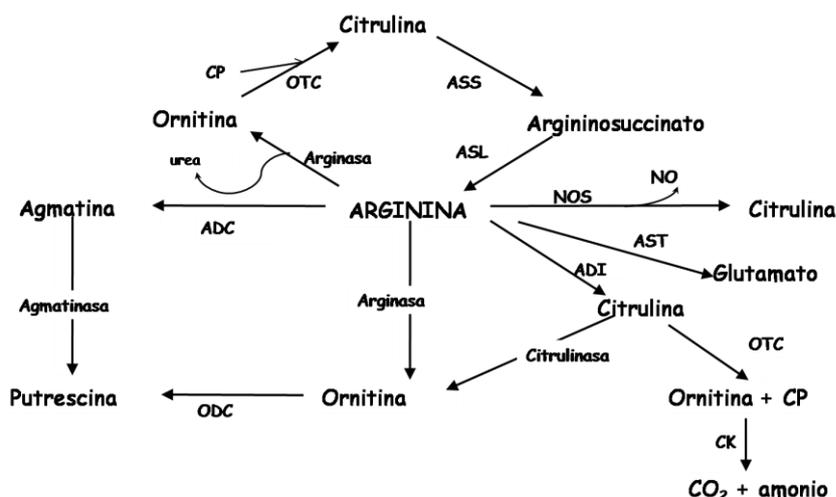


Fig. 1.11. Principales rutas catabólicas de arginina.

1.5.2.1. Ruta de la arginasa

La ruptura hidrolítica de arginina a ornitina y urea por la arginasa es el mecanismo enzimático de degradación de arginina más estudiado. Se ha caracterizado para varias especies, entre ellas bacilos, el grupo de *Agrobacterium-Rhizobium*, cianobacterias, micobacterias, *Streptomyces*, *Thermus aquaticus*, *Proteus* (Zeller *et al.*, 1954a y b; De Hauwer *et al.*, 1964; Prozesky *et al.*, 1973; Degryse *et al.*, 1976; Weathers *et al.*, 1978; Gupta y Carr, 1981; Dessaux *et al.*, 1986; Klingel *et al.*, 1995; de la Fuente *et al.*, 1996). La ruta de la arginasa puede estar inducida por arginina, citrulina, ornitina o incluso por prolina (Cunin *et al.*, 1986), y reprimida por glucosa (Broman *et al.*, 1978) y catabolitos nitrogenados (Dubois *et al.*, 1974). El destino de la ornitina y la urea difiere de un organismo a otro. En *Bacillus* no se utiliza la urea, pero la ornitina es fuente de carbono y nitrógeno mediante transaminación con 2-cetoglutarato, para dar glutamato (Broman *et al.*, 1978). En el género *Agrobacterium*, la arginina puede utilizarse como fuente de nitrógeno por una arginasa inducible y una ureasa constitutiva (Dessaux *et al.*, 1986). Algunas cepas son capaces de utilizar arginina u ornitina también como fuente de carbono.

En *S. coelicolor*, la actividad arginasa posiblemente esté asociada con la actividad carbamoilfosfato transferasa de *arcB*, como en *S. clavuligerus* (de la Fuente *et al.*, 1996). En cuanto a los genes de utilización de urea, según la anotación funcional del genoma se han encontrado los siguientes: *ureDGFCA* (SCO1231-SCO1236) y *ureABC* (SCO5525-SCO5526). Bascarán *et al.* (1989) describieron que la urea es degradada por la ureasa y utilizada como fuente de nitrógeno.

1.5.2.2. Ruta de la arginina deiminasa

La arginina deiminasa (ADI), junto con la OTC y la carbamato kinasa (CK) constituyen la ruta deiminasa, que cataliza la conversión de arginina en ornitina, amonio y dióxido de carbono con liberación de ATP (Zúñiga *et al.*, 2002a, 2002b).

Esta ruta está ampliamente distribuida en halobacterias, cianobacterias, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Staphylococcus*, bacterias lácticas, bacilos, clostridios, *Mycoplasma*, *Spiroplasma*, *Spirochaeta*, *Streptococcus* y *Streptomyces* (Deibel, 1964; Barile *et al.*, 1966; Dundas y Halvorson, 1966; Mitruka y Costilow, 1967; Weathers *et al.*, 1978; Broman *et al.*, 1978; Igwebe y Thomas, 1978; Stalon *et al.*, 1982; Stalon y Mercenier, 1984; Cunin *et al.*, 1986; Larsen *et al.*, 2004; Fulde *et al.*, 2011). La utilización de

arginina por la ruta ADI en muchos de estos microorganismos se caracteriza por una abundante excreción de ornitina, lo que indica que solo se usa el grupo guanidino de la arginina. La degradación de arginina por la ruta ADI también proporciona energía. Esta ruta se reprime por amonio en presencia de una buena fuente de energía como glucosa (Broman *et al.*, 1978).

En *S. coelicolor* los genes con actividad arginina deiminasa pertenecientes a esta ruta son *arcA* y *arcA2* (SCO0613 y SCO5975) y tienen similitud con los genes *arcA* de *Pseudomonas* y *E. coli*.

1.5.2.3. Ruta de la arginina succiniltransferasa

La ruta AST, con glutamato como producto final, se ha demostrado en *Aeromonas formicans*, en la mayoría de las cepas de *Pseudomonas*, en distintas especies de *Klebsiella* y en *E. coli* (Palleroni *et al.*, 1974; Friedrich y Magasanik, 1978; Schneider *et al.*, 1998). La síntesis de las enzimas de esta ruta en *Pseudomonas* está inducida por arginina, y reprimida por succinato y glutamina, con poco efecto regulador del amonio (Wauven y Stalon, 1985).

Dos genes con actividad aminotransferasa de *S. coelicolor* pueden pertenecer a esta ruta: *gabT* (SCO5676) y SCO1865.

1.5.2.4. Rutas de la arginina transaminasa y oxidasa

La bacteria *Arthrobacter simplex* cataliza la transaminación entre arginina y 2-cetoglutarato para producir 2-cetoarginina y glutamato (Tochikura *et al.*, 1980). La cianobacteria *Synechococcus* produce 2-cetoarginina por una arginina oxidasa, enzima responsable de la oxidación de arginina en oscuridad (Pistorius y Voss, 1982), que también cataliza la oxidación de lisina, ornitina e histidina. Se inhibe por cationes divalentes cuyo efecto inhibitorio puede revertirse por ATP y ADP (Pistorius y Voss, 1980). En cualquier caso, la 2-cetoarginina puede utilizarse como fuente de carbono y nitrógeno (Miller y Rodwell, 1971a, 1971b y 1971c).

Actinomicetos y algunas corinebacterias pueden producir guanidinobutirato a partir de arginina. La ruta de utilización del guanidinobutirato es similar en varios organismos (Tricot *et al.*, 1990). La guanidinobutirasa degrada guanidinobutirato en urea y 4-aminobutirato, que, en presencia de 2-cetoglutarato, produce glutamato y succinato semialdehído por la acción de una transaminasa. El succinato semialdehído se oxida a succinato por una deshidrogenasa.

1.5.2.5. Ruta de la arginina descarboxilasa

Tanto eucariotas como procariotas requieren putrescina o sus derivados para un óptimo crecimiento. Este compuesto puede formarse por la descarboxilación directa de ornitina, o por descarboxilación de arginina en agmatina, que se convierte en putrescina directa o indirectamente vía carbamoilputrescina (Tabor y Tabor, 1985). La actividad arginina descarboxilasa (ADC) está presente en enterobacterias, micobacterias, *Pseudomonas* y *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y metanobacterias (Loutit, 1952; Zeller *et al.*, 1954a, 1954b; Speranza y Bagni, 1977; Guirard y Snell, 1980; Scherer y Kneiffel, 1983; Stalon y Mercenier, 1984).

Todos los genes de la ruta ADC de *Pseudomonas* tienen homólogos en el genoma de *S. coelicolor*: SCO7311, SCO5527, SCO6414, SCO5655, SCO4913 y SCO5676, con actividades descarboxilasa, aminotransferasa y deshidrogenasa.

1.5.2.6. Otras rutas de utilización de arginina, citrulina y ornitina

Algunas especies del género *Clostridium* son capaces de utilizar ciertos pares de aminoácidos como fuente de energía acoplando la oxidación de uno de ellos con la reducción del otro (Mead, 1971). En algunos clostridios encontramos que la ornitina se produce a partir de arginina por la ruta ADI (Mead, 1971) y en otros por medio de la ornitina ciclasa, que también se encuentra en especies aeróbicas como *A. tumefaciens* y algunas especies de *Pseudomonas* (Dessaux *et al.*, 1986).

1.5.3. Sistemas de transporte de arginina

Existen tres sistemas de toma de arginina con distinta especificidad de sustrato y diferente afinidad por L-arginina: el específico de arginina (Wissenbach *et al.*, 1995), el sistema de transporte de aminoácidos LAO (lisina, arginina, ornitina, Rosen, 1971) y el menos conocido sistema AO, que transporta arginina y ornitina (Celis, 1977). En *E. coli* ArgR regula el sistema de transporte LAO de forma más leve que el sistema de absorción específico de arginina, quizás porque el sistema LAO es el único modo de transporte de histidinas. Es posible que el sistema AO esté regulado por arginina mediante la represión del sistema LAO (Caldara *et al.*, 2007).

La mayoría de los sistemas de transporte de L-arginina están regulados por ArgR, salvo excepciones como en *M. tuberculosis* (Makarova *et al.*, 2001), lo que proporciona un mecanismo para el control homeostático de los niveles de arginina (Schaumburg y Tan, 2006). Existen pruebas de la implicación de ArgR en la regulación de los genes de transporte de arginina en *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Chlamydia* y *Streptococcus pneumoniae* (Nishijyo *et al.*, 1998; Makarova *et al.*, 2001; Schaumburg y Tan, 2006; Kloosterman y Kuipers, 2011). Los promotores de los genes que codifican transportadores de L-arginina en *E. coli*, contienen dos cajas ARG de 18 pb separadas por 3 pb, y su regulación en algunos casos no es mediante exclusión estérica de la ARN polimerasa, sino por cambios topológicos en la región promotora (Caldara *et al.*, 2007).

1.5.4. El regulón de la arginina. Organización de los genes de biosíntesis de arginina

El término regulón fue acuñado para definir genes metabólicamente relacionados bajo el control de una única proteína reguladora (Maas y Clark, 1964). El tipo de organización del regulón permite la represión diferencial de genes o grupos de genes de una ruta metabólica y una regulación múltiple de genes individuales o regulación cruzada de rutas.

La organización de los genes de biosíntesis de arginina muestra una gran variación entre los diferentes organismos estudiados (Fig 1.12). En algunos organismos los genes de biosíntesis de arginina están dispersos por el genoma, mientras que en otros están agrupados (Haas *et al.*, 1977; Yim *et al.*, 2008). En *E. coli* hay dos agrupaciones: *argECBH* y *carAB* (Crabeel *et al.*, 1979). También en *Salmonella typhimurium* existe una agrupación *argECBH*, mientras que en *Proteus mirabilis* y *Serratia marcescens* la agrupación es *argECBGH*, y el resto de genes de arginina están dispersos por el cromosoma (Sanderson, 1970; Prozesky *et al.*, 1973; Matsumoto *et al.*, 1975). Casos extremos son *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae* y *Cyanobacterium* spp. donde todos los genes biosintéticos se encuentran dispersos por el cromosoma, excepto el operón *carAB* (Haas *et al.*, 1977; Picard y Dillon, 1989; Floriano *et al.*, 1994). En las bacterias

Gram positivas existe la tendencia a agrupar los genes de biosíntesis para la obtención de ornitina o citrulina. Todas las enzimas requeridas para la síntesis de citrulina están codificadas por el operón *argCJBD-carAB-argF* en *B. subtilis*, mientras que *argGH* y el gen *argE* están separadas (Mountain *et al.*, 1986; Kunst *et al.*, 1997). En *G. stearothermophilus* existe el operón *argCJBD* (Sakanyan *et al.*, 1993; Savchenko *et al.*, 1996). En *C. glutamicum*, los genes de biosíntesis están organizados en la agrupación *argCJBDFRGH*, y se transcriben de forma independiente desde los promotores de *argC* y *argG*, dando lugar a dos transcritos: *argCJBDFR* y *argGH* (Sakanyan *et al.*, 1996; Larsen *et al.*, 2005). Una agrupación *argCJBDFRGH* aparece en *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* (Errey y Blanchard, 2005). En *Lactobacillus plantarum* se ha descrito la agrupación *carA-argCJBDF* (Bringel *et al.*, 1997) y la agrupación *argCJ* en *Thermus thermophilus* (Baetens *et al.*, 1998). La agrupación biosintética de *T. maritima* es *argGHCJBD* y *purBA-argF* (Szwajkajzer *et al.*, 2001). Los genes de biosíntesis de arginina de *Lactococcus lactis* están codificados por tres operones: *argCJDBF*, *gltS-argR* y *argGH* (Bolotin *et al.*, 2001).

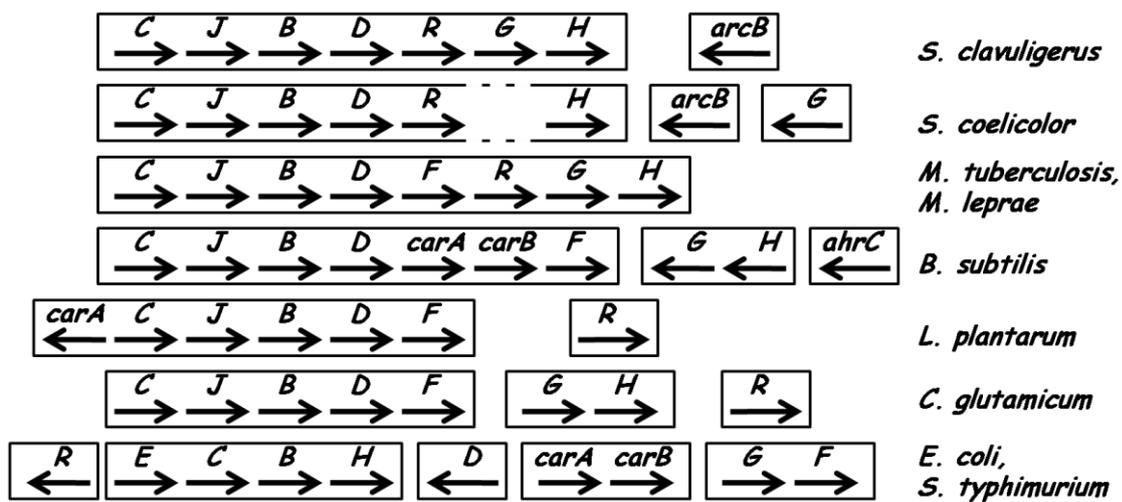


Fig. 1.12. Organización de las agrupaciones biosintéticas de distintos microorganismos (Modificada de Rodríguez-García *et al.*, 2000). Para dar claridad al esquema los genes *arg* se denominan sólo con la letra específica.

En *S. coelicolor* la agrupación comprende *argCJBDR*, con *argH* a unas 10 kb, mientras que *argG* y *arcB* (*argF* en *E. coli*) están aislados (Ishihara *et al.*, 1985). Concretamente, *argG* se localiza en una región inestable al final del cromosoma (Redenbach *et al.*, 1996). Se ha descrito en nuestro laboratorio que la agrupación *argCJBDRGH* de *S. clavuligerus* da lugar a dos transcritos *argGH* y *argCJBDR* (Ludovice *et al.*, 1992; Rodríguez-García *et al.*, 1995, 1997, 2000). En *S. avermitilis*, *S. cattleya*, *S. griseus* y *S. bingchenggensis* la agrupación es la siguiente: *argCJBDR* y los otros genes están aislados en los cromosomas (<http://biocyc.org/>).

1.5.5. Regulación de la biosíntesis de la arginina

A pesar de la diferencia en la organización de los genes implicados en el metabolismo de arginina, su regulación transcripcional es sorprendentemente similar en bacterias muy divergentes, incluyendo organismos Gram negativos como *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* y *Moritella profunda* (Lim *et al.*, 1987; Lu *et al.*, 1992; Maas, 1994; Xu *et al.*, 2003); Gram positivos como *C. glutamicum*, *B. subtilis*, *G. stearothermophilus* y *S. clavuligerus* y *S. coelicolor* (Czaplewski *et al.*, 1992; Dion *et al.*, 1997; Rodríguez-García *et al.*, 1997; Yim *et al.*, 2011; Pérez-Redondo *et al.*, 2012); y bacterias extremófilas como

T. neapolitana y *T. marítima* (Morin *et al.*, 2003; Charlier, 2004). Todos ellos tienen las mismas características en cuanto a la regulación de la ruta de biosíntesis de arginina: no hay atenuación de la transcripción, la ruta se controla por producto final y está mediada por la proteína ArgR que actúa como regulador transcripcional (Cunin *et al.*, 1986; Lim *et al.*, 1987; Rodríguez-García *et al.*, 1997; Caldara *et al.*, 2006).

La biosíntesis de arginina se controla sobre todo en una de las dos primeras enzimas de la vía. En *E. coli* y en los organismos con flujo lineal del grupo acetilo la enzima inhibida es la N-acetilglutamato sintasa codificada por *argA* (Vyas y Maas, 1963), mientras que en los organismos que reciclan el grupo acetilo es la N-acetilglutamato quinasa, codificada por *argB*, enzima que cataliza el segundo paso (Udaka, 1966; Haas y Leisinger, 1975; Meile y Leisinger, 1984). Sin embargo, en *G. stearothermophilus* no se detecta inhibición de la N-acetilglutamato quinasa ni por arginina ni por ornitina. En este caso la diana es la doble actividad codificada por *argJ* y el efector no es la arginina sino la ornitina (Sakanyan *et al.*, 1993). Esta misma inhibición se ha observado también en *C. glutamicum* (Sakanyan *et al.*, 1996) y *S. cerevisiae* (Crabeel *et al.*, 1997).

La carbamoilfosfato sintetasa también está sometida a un control estricto. En *E. coli*, organismo con una sola enzima carbamoilfosfato sintetasa, es inhibida por UMP y activada por ornitina, al tiempo que la arginina y el uracilo reprimen su síntesis (Cunin *et al.*, 1986). Una de las dos carbamoilfosfato sintetasas de *B. subtilis* está reprimida por arginina y la segunda está reprimida e inhibida por pirimidinas (Paulus y Switzer, 1979).

1.5.6. Estructura del regulador ArgR

Entre los procariotas se han estudiado los genes *argR* de *E. coli* K12, *E. coli* B, *Salmonella typhimurium*, *B. subtilis* (en este microorganismo se denomina *ahrC*, de *arginine hidroxamate resistant C*), *G. stearothermophilus*, *P. aeruginosa*, *M. tuberculosis*, *C. glutamicum* y *S. clavuligerus* (Lim *et al.*, 1987; North *et al.*, 1989; Lu *et al.*, 1992; Tian y Maas, 1994; Dion *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1997a; Rodríguez-García *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 2007; Cherney *et al.*, 2008a; Lee *et al.*, 2009). Los estudios se extendieron a los extremófilos *T. thermophilus*, al psicrófilo *M. profunda*, y a los hipertermófilos *T. neapolitana* y *T. marítima* que crecen a más de 90 °C (Dimova *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2003; Morin *et al.*, 2003; Fujiwara *et al.*, 2006).

A pesar de la baja identidad de secuencia entre los diferentes represores de arginina en distintas bacterias, todas las estructuras tridimensionales resueltas son hexámeros de unos 100 kDa, aproximadamente, formada por seis subunidades idénticas de unos 150 aminoácidos cada una (Lim *et al.*, 1987; North *et al.*, 1989; Lu *et al.*, 1992; Czaplowski *et al.*, 1992; Massant *et al.*, 2006). Otros represores son dímeros como el de triptófano o metionina, o tetrámeros, como el de la lactosa. Este mayor grado de oligomerización puede deberse a su capacidad de unirse a más de un operador palindrómico (Maas, 1994).

La secuencia de aminoácidos revela que la mitad N_t del péptido es básica y que la mitad C_t es ácida. Mediante la caracterización de mutaciones se ha determinado que la mitad N_t es la responsable de la unión al ADN y que la mitad C_t está implicada en la unión de arginina y en la oligomerización (Burke *et al.*, 1994; Tian y Maas, 1994; Cherney *et al.*, 2008b).

La cristalización de la mitad C_t de la proteína de *E. coli* prueba que este dominio es capaz de formar un hexámero por sí mismo. La estructura deducida de la cristalización muestra que el hexámero está compuesto de dos trímeros y que se estabiliza por la unión de 6 moléculas de arginina en el plano trímero-trímero (Van Duyne *et al.*, 1996). Dicha unión provoca un cambio conformacional que hace que un trímero rote 15° respecto al otro, excepto en *M. tuberculosis*, en el que la rotación es de 11° , lo que mejora la afinidad del represor hacia el operador (Van Duyne *et al.*, 1996; Ni *et al.*, 1999; Garnett *et al.*, 2008; Cherney *et al.*, 2010; Strawn *et al.*, 2010). Cada molécula de arginina interactúa con dos subunidades de un trímero y otra subunidad del otro trímero, actuando como un pegamento molecular (Ni *et al.*, 1999). El motivo aminoacídico GTIAGDDTL/I localizado en la región C_t está bien conservado en todos los represores de arginina conocidos y sirve para la unión a arginina; en particular, los residuos “DD” (Asp-Asp) son suficientes para la oligomerización de las proteínas ArgR (Yim *et al.*, 2011).

Se ha cristalizado y determinado la estructura tridimensional de la mitad N_t de ArgR de *E. coli*, y así se ha podido dilucidar la homología estructural con la familia de proteínas con motivo wHTH (Sunnerhagen *et al.*, 1997), familia que comprende proteínas reguladoras de procariontes y eucariontes. El motivo wHTH se caracteriza por tener tres hélices, en las que las hélices 2 y 3 forman una variante hélice-vuelta-hélice, flanqueadas por alas formadas por láminas β y lazos (Brennan, 1993). Todas las proteínas ArgR pertenecen a la familia wHTH, excepto la de *P. aeruginosa*, que pertenece a la familia AraC/XylS (Park *et al.*, 1997b). El motivo wHTH de las proteínas ArgR posee una significativa variabilidad de secuencia. Esta variabilidad podría reflejar una distinta flexibilidad y/o afinidad del motivo wHTH en distintas bacterias (Karaivanova *et al.*, 1999). Los residuos esenciales de ArgR para la interacción con ADN conservados en distintas bacterias son SR (Ser-Arg) y están localizados en la hélice α_3 (Grandori *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 2011). Si se reemplazan por otros aminoácidos disminuye el efecto regulador de ArgR (Karaivanova *et al.*, 1999). En *E. coli* la sobreexpresión del extremo amino reprime los niveles de OTC. Se ha demostrado que este extremo amino se une al operador *in vitro*, independientemente de la presencia de L-arginina (Grandori *et al.*, 1995).

Proteínas ArgR de distintas bacterias de la familia *Corynebacteriaceae*, como *M. tuberculosis* y *C. glutamicum*, tienen secuencias de aminoácidos más largas que otros organismos como *E. coli* o *B. subtilis*, debido a inserciones al principio de los dominios C_t y N_t y a que la región entre ambos dominios es el doble de larga, lo que le otorga mayor flexibilidad (Van Duyne *et al.*, 1996; Garnett *et al.*, 2007; Cherney *et al.*, 2008a).

1.5.6.1. Clasificación de las proteínas ArgR

La existencia de diferentes clases funcionales de moléculas de ArgR en bacterias evolutivamente distantes refleja la evolución de mecanismos reguladores desde un regulador general con baja especificidad de secuencia y baja eficiencia de unión a su diana, hasta un regulador con elevada especialización y eficiencia, lo que proporcionaría una ventaja selectiva (Morin *et al.*, 2003; Charlier, 2004).

- Los represores de clase I tienen un alto grado de conservación de la secuencia de aminoácidos y existen como hexámeros, incluso a bajas concentraciones de proteína y en ausencia de arginina (Lim *et al.*, 1987; Lu *et al.*, 1992; Szwajkajzer *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2003). Son muy específicos de secuencia y muy dependientes de arginina y se encuentran típicamente en γ -proteobacterias (*S. typhimurium*, *M. profunda* y *E. coli*). Sus dianas consisten en un par de cajas ARG repetidas en tándem (apartado 1.5.6.2), idealmente separadas por 3 pb compuestas exclusivamente por A-T y T-A. (Tian *et al.*, 1992). Los reguladores de clase I interactúan eficientemente con operadores de su misma clase, pero no con los de otras, ya que tienen

requerimientos muy rígidos, como el espaciado exacto entre el par de cajas ARG, que impiden el reconocimiento de otros operadores (Charlier *et al.*, 1992).

- Los represores de clase II se caracterizan por una dependencia de arginina más moderada y una menor especificidad, como la que muestran los represores de *Bacillus* y *Streptomyces*, que se unen a operadores de las clases I y III eficientemente. Se aislaron como proteínas triméricas, pero existen en un equilibrio dependiente de concentración con la forma hexamérica, que se establece en presencia de arginina y/o altas concentraciones de proteína (Dion *et al.*, 1997). Sus dianas consisten en un par de cajas ARG en tándem idealmente separadas por 2 pb que contienen al menos un par G-C o C-G (Song *et al.*, 2002). AhrC de *B. subtilis* es más flexible que ArgR de *E. coli* en el reconocimiento de las secuencias de unión (Czaplewski *et al.*, 1992). Funcionalmente, AhrC puede sustituir en *E. coli* a ArgR en cuanto a la represión de la biosíntesis de arginina (Smith *et al.*, 1989) y en la resolución de plásmidos (Stirling *et al.*, 1988), y produce retraso mediante EMSA de secuencias con cajas ARG de *Streptomyces* (Rodríguez-García *et al.*, 1997).

- Los represores de las hipertermófilas *T. neapolitana* y *T. marítima* constituyen la clase III. Son reguladores termoestables de tipo global más eficientes a temperaturas de 80-90 °C que exhiben baja eficiencia de represión, baja especificidad de diana y baja dependencia de arginina en su capacidad de oligomerización y de unión al ADN. La unión del represor aumenta la Tm del ADN unos 15 °C. Son proteínas triméricas con capacidad de formar hexámeros, e interactúan con una única secuencia de las cajas ARG del operador, lo que podría significar que tienen un papel regulador más global (Charlier, 2004). Otra diferencia con respecto a los reguladores de clase I y II es que tienen un residuo serina en la posición en que el resto de reguladores tiene una glutamina, lo que les hace mostrar una activación poco dependiente de arginina en cuanto a la capacidad de unión a DNA (Fujiwara *et al.*, 2006; Massant *et al.*, 2006) (Fig. 1.13). De hecho, dicha unión es el doble de eficiente en ausencia de arginina que en su presencia (Dimova *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2002). Las proteínas de esta clase se comportan como superrepresores en *E. coli*.

				Clase
<i>Escherichia coli</i>	94	AVVVIHTSPGAAQLIARLLDSL	115	I
<i>Moritella profunda</i>	92	CLIVIQTSPGSAQLIARLLDSL	113	
<i>Bacillus subtilis</i>	92	HMIVLKTMPGNAQAIGALMDNL	113	II
<i>Streptomyces coelicolor</i>	118	NLVVLRTPPGAAQFLASAIQDA	139	
<i>Thermotoga marítima</i>	95	NLIVIKTIPGTASGIARVIDRL	116	III
<i>Thermus thermophilus</i>	94	NLLVVKTAEGHASGIAYLLDRL	115	

Fig. 1.13. Alineamiento parcial de proteínas ArgR pertenecientes a las tres clases en que se clasifican. Los residuos de glutamina (Q) conservados en las clases I y II y los residuos de serina (S) de la misma posición de la clase III aparecen encuadrados. Tomado de Fujiwara *et al.* (2006).

1.5.6.2. Unión de ArgR a regiones operadoras: las cajas ARG

En las proximidades de los promotores regulados por ArgR hay al menos una región control, que consiste en unas secuencias parcialmente palindrómicas de 18 pb. Las denominadas cajas ARG tienen como secuencia consenso la mostrada en la Fig. 1.14. Se trata de una secuencia rica en A-T que contiene dos segmentos de 5 pb fuertemente conservados como repeticiones invertidas (Maas, 1994; Makarova *et al.*, 2001):

Secuencia consenso

^aNTGAAT ^{aatt} ^{taa}ATTCAN ^a_t

Fig. 1.14. Secuencia consenso de cajas ARG de *E. coli* (Maas, 1994).

En los genes regulados negativamente por ArgR, las cajas ARG frecuentemente solapan con el promotor, de modo que la unión de ArgR bloquea la unión de la RNA polimerasa (Charlier *et al.*, 1992). La amplitud de la respuesta reguladora y la afinidad de unión de los operadores varían en función de la composición de nucleótidos de las cajas ARG, la distancia que les separa, el grado de solapamiento con el promotor y la fuerza del mismo (Charlier *et al.*, 1992; Glansdorff, 1996; Chen *et al.*, 1997). En *E. coli* se han caracterizado los sitios de unión del represor en las zonas promotoras de los genes estructurales de biosíntesis de arginina y en el gen *argR*. Estos operadores están formados por dos cajas ARG separadas por 3 pb en los genes estructurales o 2 pb en *argR* (Charlier *et al.*, 1992; Lim *et al.*, 1987). Lo mismo ocurre en *S. typhimurium* (Lu *et al.*, 1992). En *B. subtilis*, la separación es de 11 pb (Garnett *et al.*, 2008). Las cajas ARG a menudo aparecen en parejas (Charlier *et al.*, 1992; Maghnouj *et al.*, 1998), aunque también se han encontrado cajas individuales, por ejemplo en los operones catabólicos de *B. subtilis* (Miller *et al.*, 1997), en la ruta de la arginina deaminasa en *B. licheniformis* (Maghnouj *et al.*, 1998), en la región de recombinación *cer* en el plásmido ColE1 de *E. coli* (Stirling *et al.*, 1988) y en *M. tuberculosis* (Cherney *et al.*, 2008a). En cualquier caso, las cajas funcionales se alinean en un mismo lado de la hélice del ADN (Larsen *et al.*, 2005).

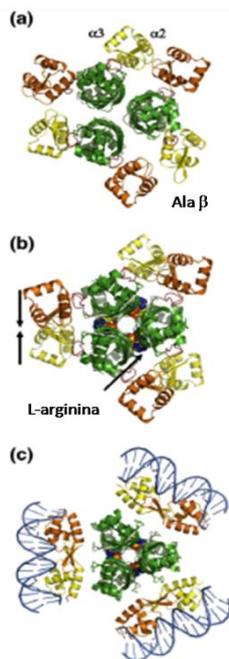


Fig. 1.15. Modelo de unión a cajas ARG. Los dominios C_t aparecen representados en verde, y los dominios N_t en amarillo y naranja, y el conector flexible, en rojo. Las moléculas de L-arginina se representan como esferas. (a) Estructura cristalina del hexámero sin L-arginina. (b) Hexámero, en el que la unión de L-arginina provoca una rotación de 15° en un trímero respecto al otro, haciendo que los dominios N_t se mantengan más cerca unos de otros (indicado por las flechas). (c) Hexámero en complejo con tres cajas ARG individuales. Cuando la proteína se une a un operador, hay un reordenamiento de los dominios N_t , orientando las alas y las hélices de reconocimiento hacia la posición correcta para la unión al ADN. Tomado de Garnett *et al.* (2008).

La unión proteína-ADN es cooperativa, es decir, la unión de una molécula represora a una caja ARG facilita la unión a la segunda caja ARG, ya que induce una torsión de $70-90^\circ$ en el ADN, cuyo centro se localiza entre las dos cajas (fig. 1.15) (Tian *et al.*, 1992; Burke *et al.*, 1994; Sz wajkajzer *et al.*, 2001). Por ensayos de protección y de interferencia se ha determinado que, en *E. coli*, ArgR contacta con una sola cara del ADN, abarcando cuatro surcos mayores consecutivos y dos surcos menores que corresponden a dos cajas de arginina (Charlier *et al.*, 1992; Tian *et al.*, 1992). Los represores de organismos termofílicos, al unirse a una sola caja, establecen contacto únicamente con dos surcos mayores y uno menor (Song *et al.*, 2002).

La evolución del regulón de arginina y las cajas ARG parece reflejar un término medio entre mantener la flexibilidad del regulón por una parte y preservar los mecanismos universales de regulación, por otra (Makarova *et al.*, 2001).

1.5.7. El regulador ArgR en distintos microorganismos

Las dos secuencias codificantes de *argR* en *E. coli* K12 y *E. coli* B tienen una diferencia de 5 pb que implican únicamente un cambio de prolina en ArgRK por leucina en ArgRB. Esto causa una alteración en la estructura de los represores y hace que tengan distintas propiedades de unión, teniendo *argRB* una expresión constitutiva, y *argRK* una inducible por arginina (Lim *et al.*, 1987; Tian *et al.*, 1994). La diferencia en el diseño de la regulación de la biosíntesis de arginina entre *E. coli* B y *E. coli* K12 puede reflejar una diferencia para asegurar la supervivencia en los hábitats naturales de las dos cepas (Tian *et al.*, 1994).

Algunas especies de *Chlamydia* también producen un homólogo de ArgR, lo que resulta interesante, ya que han simplificado tanto su genoma que dependen del hospedador para crecer y replicarse, y son incapaces de sintetizar su propia arginina. La función de ArgR es regular la expresión génica y la absorción de arginina en respuesta a los niveles intracelulares del aminoácido y así mantener el control homeostático de los niveles de arginina (Schaumburg y Tan, 2006).

La presencia de múltiples homólogos de reguladores transcripcionales de la familia de ArgR es común en algunas bacterias Gram positivas de bajo contenido en G+C. En *Enterococcus faecalis*, precediendo al operón catabólico de arginina hay dos genes denominados *argR1* y *argR2*, que se expresan diferencialmente en respuesta a arginina y glucosa (Barcelona-Andrés *et al.*, 2002). En *L. lactis*, la expresión del metabolismo de arginina está controlada por los dos reguladores transcripcionales homólogos ArgR y AhrC, al igual que en *Lactobacillus plantarum* (Nicoloff *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2004, 2008). La proteína ArgR de *L. lactis*, en su extremo C₁ ha perdido un residuo de aspártico, directamente implicado en la unión a arginina, mientras que AhrC lleva un residuo adicional de aspártico en la misma posición (Ni *et al.*, 1999). Esto, junto con el hecho de que ambos reguladores sean esenciales para la regulación, hace pensar que ambas proteínas interactúan para formar complejos heterohexaméricos (Larsen *et al.*, 2004, 2005, 2008). Lo mismo ocurre en *L. plantarum* (Nicoloff *et al.*, 2004). Larsen *et al.* (2005) explican que AhrC de *L. lactis* no tiene capacidad de unión a ADN, mientras que ArgR se une a los promotores de los operones de biosíntesis y de catabolismo de arginina independientemente de la presencia de arginina. Cuando AhrC y ArgR están juntos interactúan entre sí y la molécula de arginina incrementa la unión a las cajas ARG del operón de biosíntesis y disminuye la unión a las de catabolismo. Por tanto, ArgR actúa como represor transcripcional y AhrC tiene una doble función como co-represor de los genes biosintéticos y anti-represor de los catabólicos.

En *S. cerevisiae*, la represión de los genes anabólicos y la inducción de los catabólicos mediada por arginina se lleva a cabo por un complejo proteico de tres componentes: ARGRI, Mcm1 y ARGRII (Amar *et al.*, 2000), que interactúa también con ARGRIII, un regulador pleiotrópico requerido para la estabilidad de las proteínas del complejo (El Bakkoury *et al.*, 2000). La unión del complejo al ADN requiere la presencia de arginina, mientras que la interacción entre ARGRII, ARGRI y Mcm1 ocurre en ausencia del efector. La región operadora consiste en dos repeticiones imperfectas de 29 pb.

1.5.7.1. El represor ArgR en *Streptomyces*

En 1996 Soutar y Baumberg observaron la existencia de un regulador homólogo a ArgR y AhrC, implicado en el control de los genes de biosíntesis de arginina en *S. coelicolor*, y se detectaron cajas ARG corriente arriba de *argC* en *S. coelicolor* (Hindle *et al.*, 1994) y *argG* (Rodríguez-García *et al.*, 1995) y *argH* (Rodríguez-García *et al.*, 2000) en *S. clavuligerus*.

La amplificación de una caja ARG en un plásmido multicopia en *S. lividans* resulta en una desrepresión de las actividades biosintéticas de arginina de 2 a 2,5 veces, lo que sugiere que el represor está “secuestrado” por dichas cajas (Rodríguez-García *et al.*, 1997). Soutar y Baumberg (1996) observaron el mismo efecto en *S. coelicolor*.

Hasta este trabajo, la proteína ArgR de *Streptomyces* más estudiada ha sido la de *S. clavuligerus* (Rodríguez-García *et al.*, 1997). El gen *argR* en *S. clavuligerus* codifica una proteína de 160 aminoácidos con un peso molecular de 17117 Da para el monómero. Existen dos cajas ARG por delante de los genes *argG* y *argC*, de modo que permiten regular toda la agrupación génica de biosíntesis de arginina ya que las unidades de transcripción para estos genes son *argCJBD* y *argGH*. En *S. clavuligerus*, *argR* no está precedido por dos cajas ARG como en *E. coli*, sino que tiene una única caja con un 50 % de similitud a la secuencia consenso. Por tanto la formación del transcrito monocistrónico de *argR* parece ser débil y constitutiva (Rodríguez-García *et al.*, 2000).

La sobreexpresión de *argR* en *S. clavuligerus* resulta en una fuerte disminución de la actividad biosintética OTC y una estimulación de la actividad catabólica OAT (Rodríguez-García *et al.*, 1997). Esto sugiere que en las especies de *Streptomyces*, como en otros organismos, ArgR reprime los genes de biosíntesis de arginina y activa al menos algunos genes catabólicos de arginina (Klingel *et al.*, 1995).

1.5.8. Otras funciones del represor ArgR

1.5.8.1. ArgR en la segregación del cromosoma

Las interacciones entre proteínas unidas a sitios distantes en los ácidos nucleicos son importantes para muchos procesos biológicos, incluyendo regulación de la expresión génica, replicación del ADN, procesamiento del ARN, y recombinación. Uno de los procesos más conocidos es la recombinación específica de sitio (Sadowski, 1986), que sirve para asegurar que tanto los plásmidos circulares como los cromosomas estén en estado monomérico antes de la segregación en la división celular (Sherratt *et al.*, 1995).

El sistema de recombinación específica Xer de *E. coli* actúa en ciertas secuencias encontradas en plásmidos como *cer* en ColE1 y *psi* en pSC101, y en el locus *dif* del cromosoma de *E. coli* (Summers y Sherratt, 1984; Cornet *et al.*, 1994). La recombinación en *dif* está implicada en la segregación del cromosoma a las células hijas durante la división celular (Sherratt *et al.*, 1995). En el proceso de recombinación en *cer* intervienen necesariamente cinco proteínas: dos recombinasas, XerC y XerD, dos hexámeros de unión a ADN, PepA y ArgR y el sistema de dos componentes ArcA/ArcB (Stirling *et al.*, 1988; Colloms *et al.*, 1998; Gourlay y Colloms, 2004). La función de PepA y ArgR es asegurar que la recombinación sea intramolecular (McCulloch *et al.*, 1994). La secuencia *cer* contiene una caja ARG para la unión de ArgR a unos 100 pb del sitio de recombinación (Stirling *et al.*, 1988). Sénéchal *et al.* (2010), mediante mutaciones en ArgR, demuestran la importancia del extremo C₁ en la recombinación específica de sitio *cer*/Xer. PepA y ArgR también son necesarias para el mantenimiento o establecimiento de la lisogenia de *E. coli* (Paul y Summers, 2004; MacDonald *et al.*, 2008).

1.5.8.2. Interacción/Regulación con otras rutas metabólicas

A través de estudios de transcriptómica se han descubierto nuevos genes del regulón de arginina (Caldara *et al.*, 2006) que revelan una conexión entre el metabolismo de arginina y el de otros aminoácidos y compuestos, así como con sistemas de transporte de aminoácidos. Sin embargo, la participación de ArgR en procesos distintos a los que implican directamente a la molécula de arginina se conoce desde hace tiempo:

- Distintos estudios indican que el metabolismo y regulación de arginina tienen importancia en la virulencia de varias bacterias patogénicas como *M. tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila* y *M. bovis* (Sasseti *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2009; Hovel-Miner *et al.*, 2010). En *Streptococcus suis*, la única función conocida de ArgR es regular la ruta ADS. Dicha ruta es un posible factor de virulencia, ya que permite a este organismo sobrevivir en ambientes ácidos (Fulde *et al.*, 2011).
- ArgR también tiene efecto represor en el promotor del operón de la glutamato sintasa, una de las dos mayores rutas de asimilación de amonio en *E. coli*, por interacción directa con una caja ARG en respuesta a arginina (Paul *et al.*, 2007). Una regulación similar se ha observado en *P. aeruginosa*, microorganismo en el que ArgR participa en la inducción del catabolismo y en la represión de la biosíntesis del glutamato (Park *et al.*, 1997a; Lu *et al.*, 2004).
- En cuanto a la síntesis de otros aminoácidos, Lee *et al.* (2010) identificaron en *C. glutamicum* enzimas implicadas en la producción de glutamato y prolina a partir de fenol, reguladas por ArgR. La biosíntesis de lisina de *T. thermophilus* se regula por arginina, lisina y ArgR (Fujiwara *et al.*, 2006). Chou *et al.* (2010) han visto que el catabolismo y la absorción de lisina está controlado por arginina y ArgR en *P. aeruginosa*.
- Hovel-Miner *et al.* (2010) hipotetizan que la disponibilidad de L-arginina es una señal reguladora que afecta a la expresión génica en las vacuolas que contienen *Legionella* (LCV) de proteínas requeridas para la infección. ArgR regula el sistema requerido para el bloqueo de la fusión del fagolisosoma y establecimiento del LCV y activa genes requeridos para la tolerancia a ácidos (Ryan *et al.*, 2009).
- En *S. clavuligerus* se ha detectado una caja ARG en el gen *oat2*, localizado en la agrupación del ácido clavulánico que codifica una acetiltransferasa y que parece actuar como modulador en la síntesis de este compuesto (Rodríguez-García *et al.*, 2000; de la Fuente *et al.*, 2004).
- En *E. coli*, ArgR regula la producción de timidinas mediante la regulación de la carbamoil-fosfato sintetasa junto con otros dos reguladores, PurR y PepA (Koo *et al.*, 2011).
- ArgR en *P. aeruginosa* también controla la expresión del operón *oprD*, que codifica una porina de membrana (Ochs *et al.*, 1999).

2. OBJETIVOS

Este trabajo se inició para aclarar la responsabilidad de la proteína ArgR en el distinto patrón transcripcional entre la cepa *S. coelicolor* M145 y la derivada de esta, *S. coelicolor* $\Delta argR$, carente del gen *argR*. Para ello se establecieron los siguientes puntos de estudio:

1. Validar los resultados de transcriptómica obtenidos previamente mediante RT-PCR y expresión de un gen testigo.
2. Llevar a cabo experimentos de transcriptómica a lo largo del tiempo.
3. Expresar y purificar el regulador ArgR.
4. Identificar dianas moleculares de ArgR y estudiar la interacción de ArgR con distintos promotores.
5. Analizar las interacciones de ArgR en el genoma de *S. coelicolor* mediante CHIP-chip.
6. Observar el efecto de la ausencia del extremo carboxilo de ArgR.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos utilizados

Los microorganismos que han sido utilizados en este trabajo se enumeran a continuación con sus características y referencias bibliográficas. Todos ellos fueron resembrados periódicamente y conservados a -80 °C como suspensiones celulares o de esporas en glicerol al 20 %.

***E. coli* DH5 α** (Hanahan, 1983). F⁻, *recA1*, *relA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, ($r_k^- m_k^+$), *supE44*, *relA1*, λ^- , ($\phi 80d lacZ\Delta M15$), $\Delta(lacZYA^-argF)$, U169. Cepa utilizada en experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico por la alta eficiencia de transformación de sus células competentes y su baja tasa de recombinación. Posee una delección en el extremo 5' del gen *lacZ* del operón *lac*, susceptible de ser complementada por determinados vectores de clonación, como pBluescript® (Stratagene). Esta α -complementación produce una coloración azul en la colonia, originada por la acción de la β -galactosidasa (codificada por *lacZ*) sobre el compuesto X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido), previamente añadido al medio de cultivo. La mutación *endA1* inactiva endonucleasas intracelulares que degradan el ADN plasmídico. La mutación *hsdR17* elimina la endonucleasa de restricción del sistema *EcoKI*, de modo que el ADN que carece de la metilación en *EcoKI* no será degradado. La mutación *recA1* elimina la recombinación homóloga, por lo que reduce la delección y multimerización de plásmidos.

***E. coli* ET12567 [pUZ8002]** (Bierman *et al.*, 1992). *dam-13::Tn9*, *dcm-6*, *hsdM*, *oriT-RP4* con el plásmido pUZ8002. Cepa deficiente en metilación utilizada como donadora en el proceso de conjugación intergenérica y resistente a cloranfenicol. El plásmido pUZ8002 porta el gen de resistencia a kanamicina y los genes *tra*, necesarios para llevar a cabo la conjugación. No es en sí mismo un plásmido movilizable porque carece de origen de transferencia. Su tasa de crecimiento es más lenta que DH5 α .

***E. coli* BL21 (DE3)** (Studier y Moffatt, 1986). F⁻, *dcm*, *ompT*, *hsdS_B*, ($r_B^- m_B^-$), *gal* λ (DE3). Cepa deficiente en las proteasas *Ion* y *ompT*, empleada para la expresión de proteínas recombinantes. Es lisogénica para λ -DE3, que contiene el gen que codifica la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*.

***E. coli* BL21 (DE3) [pLysS]** (Grodberg y Dunn, 1988). F⁻, *dcm*, *ompT*, *hsdS_B*, ($r_B^- m_B^-$), *gal* λ (DE3) [pLysS Cm^r]. Además de las características de la cepa anterior, es resistente a cloranfenicol, y permite una alta eficiencia de la expresión proteica de cualquier gen que esté bajo el control del promotor T7 y tenga un RBS, como por ejemplo, los vectores pET (en nuestro caso, pET24a(+)). Contiene el plásmido pLysS, en cuya secuencia está el gen que codifica la lisozima T7, encargada de disminuir el nivel de expresión de fondo de genes diana bajo el control del promotor T7 pero no interfiere con el nivel de expresión tras la inducción con IPTG. Por ello, proporciona un control más estricto de la expresión de proteínas tóxicas.

***Streptomyces coelicolor* M145** (Kieser *et al.*, 2000). Cepa carente de los plásmidos SCP1 y SCP2.

***Streptomyces coelicolor* $\Delta argR$** (Pérez-Redondo *et al.*, 2012). Cepa mutante derivada de *S. coelicolor* M145 donde el gen *argR* se ha sustituido por el casete de resistencia a apramicina.

Streptomyces coelicolor argR::apra (R. Pérez-Redondo, Universidad de León). Mutante derivado de *S. coelicolor* M145 donde el gen *argR* se ha interrumpido en el nucleótido 357 del gen *argR* por inserción del casete de resistencia a apramicina.

3.2. Medios y condiciones de cultivo

La composición de los medios de cultivo que se describen a continuación está referida a 1 litro y todos ellos se repartieron en botellas en alícuotas de 100 ml, a no ser que se indiquen otros volúmenes. Para la preparación de medios sólidos se añadió el agar directamente a las botellas. Los medios se esterizaron en autoclave u olla a presión a 121 °C durante 20 minutos. Cuando se trata de estudios de fermentaciones, para reducir variaciones entre los replicados, las botellas de medio recién preparado, principalmente SA o MG, fueron pesadas antes y después de la esterilización. Las pérdidas de peso por evaporación se completaron con agua MilliQ.

3.2.1. Medios de cultivo para *Streptomyces*

2xYT (Sambrook y Russell, 2001). Medio de cultivo empleado para la germinación de esporas de *Streptomyces* en la conjugación intergenérica. Se ajusta a pH 7,2 con KOH.

Bactotripton	20 g
Extracto de levadura	10 g

MG (Doull y Vining, 1981, 1989). Medio para las fermentaciones de *S. coelicolor*.

MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂ 9 mM	1 ml
NaCl 17 mM	1 ml
MOPS ácido	21 g
Elementos traza 1X	4,5 ml
Almidón	50 g
Glutámico (147,1 g/mol)	8,83 g
Agua MilliQ	Ajustar el volumen <u>por peso</u> hasta 1 kg

La composición de los elementos traza, a una concentración inicial 100X es la siguiente:

Para 10 ml de 100X	
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,0390 g
H ₃ BO ₃	0,0057 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,0037 g
MnSO ₄ 1H ₂ O	0,0061 g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,8800 g

Disolver el almidón (marca Scharlau) por separado en medio volumen final de agua hirviendo. Añadir el resto de los componentes y enfriar a temperatura ambiente antes de ajustar a pH 6,5 con NaOH. Alicuotear por peso, no por volumen, considerando que la densidad es aproximadamente 1. Se complementa después de la esterilización con el hierro y el fosfato: En los casos en los que fue oportuno, se suplementó el medio con L-arginina a una concentración final 25 mM.

FeSO ₄ ·7H ₂ O, 3,2 mM, 1X	1 ml para 100 ml
KH ₂ PO ₄ + K ₂ HPO ₄ 1M	0,25 ml para 100 ml

SFM o **SM** (Hobbs *et al.*, 1989). Medio para la conjugación intergenérica entre *E. coli* y *Streptomyces*. Se disuelven 20 g de manitol y se ajusta el volumen hasta un litro, se distribuye en 100 ml por botella y se añaden agar (2 %) y harina de soja (2 %) a cada botella. Se esteriliza dos veces en autoclave y se añade $MgCl_2$ a concentración final 10 mM cuando se vierten las placas.

TBO (Higgins *et al.*, 1974). Se usa para conseguir esporulación abundante en *S. coelicolor*. Su pH se ajusta a 6,5 y se añade agar al 2,5 % p/v.

Concentrado de tomate	20 g
Copos de avena	20 g

TSB (Sambrook y Russell, 2001). Se utiliza para el cultivo de *Streptomyces* y *E. coli*. Se ajusta el pH a 7,2. El medio TSA tiene la misma composición, pero añadiendo agar al 1 %, y se utiliza, entre otras cosas, para la realización de bioensayos y para la cuantificación de las esporas de *Streptomyces*.

Caldo de tripticaseína-soja	30 g
-----------------------------	------

YEME 34 % (Chater *et al.*, 1992). Por su alto contenido en sacarosa se utiliza para obtener un cultivo de *Streptomyces* de micelio disgregado y suelto. Contiene:

extracto de levadura	3 g
extracto de malta	3 g
peptona	5 g
glucosa	10 g
sacarosa	340 g

Una vez esterilizado se añade, por cada 100 ml de medio, 2,5 ml de glicina al 20 % y 200 μ l de $MgCl_2$ 2,5M.

3.2.2. Medios de cultivo para *E. coli*

Medio de Luria Bertani (LB) (Miller, 1972). Medio de cultivo general. Se ajusta a pH 7,3 con NaOH. Este medio se usó también con agar al 2 % bajo la denominación de **LA**.

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

SOB (Hanahan, 1983).

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,584 g
KCl	0,186 g

El pH se ajusta a 7,5 y el volumen final a 980 ml. Se reparte en alícuotas de 98 ml y si se desea en forma sólida se añade agar al 2 %. Una vez esterilizado se completa con 1 ml, por cada 100 ml, de la solución $MgCl_2$ 1 M, $MgSO_4$ 1 M. Para obtener el medio **SOC** (Sambrook y col., 1989) se añade 1 ml de glucosa 1 M (esterilizada por filtración) por cada 100 ml. Ambos medios se utilizaron para preparar células competentes de *E. coli* y durante su transformación.

TB (Tartof y Hobbs, 1987). Medio utilizado para la extracción de plásmidos de *E. coli*.

Triptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	4 ml

Se ajusta el volumen a 900 ml y se esteriliza en alícuotas de 90 ml. Una vez enfriado el medio se añaden 10 ml de tampón KH_2PO_4 0,17 M y K_2HPO_4 0,72 M por 90 ml de medio, cuya función es tamponar el pH.

3.2.3. Condiciones de cultivo de los microorganismos

El crecimiento de las cepas de *E. coli* se realizó a 37 °C. En medio líquido se mantuvieron en matraces sin indentación en un incubador orbital con una agitación de 220 rpm (Sambrook y Russell, 2001).

El crecimiento de las cepas de *S. coelicolor* se realizó a 30 °C, tanto en medio sólido como en medio líquido. Cuando los cultivos fueron líquidos, se mantuvieron en incubador con agitación de 300 rpm. Las cepas de *Streptomyces* se cultivaron en matraces con indentación para facilitar la dispersión del micelio y con tapón metálico para asegurar una mejor aireación del cultivo. Estos matraces, con sus respectivos tapones metálicos, se esterilizaron conjuntamente en estufa a 150 °C durante 5 horas tras un lavado previo con agua MilliQ.

3.2.4. Aditivos empleados en los medios de cultivo

Cuando fue necesario, los medios de cultivo descritos se suplementaron con diversos componentes (ver a continuación). A causa de su termolabilidad, todos estos componentes se esterilizaron a través de filtros con poros de 0,22 μm de diámetro (Millipore), con la excepción de los que van disueltos en solventes orgánicos, que no fueron esterilizados.

3.2.4.1. Antibióticos

La adición de uno o varios antibióticos a un medio de cultivo tiene como objetivo la selección de clones resistentes a los mismos dentro de una población heterogénea, o bien el mantenimiento de la homogeneidad de una población microbiana ya resistente (especialmente en el caso de marcadores de resistencia vinculados a plásmidos replicativos, que de otro modo podrían perderse en ausencia de presión selectiva).

Ampicilina (Amp). Fue adquirida como preparado farmacéutico Britapen (Beecham S.A.). Se preparó a una concentración de 200 mg/ml en solución acuosa, y para la selección de transformantes de *E. coli* se empleó a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Apramicina (Apra). Empleada en forma de sulfato de apramicina, de Sigma Chemical. Se preparó a una concentración de 100 mg/ml en solución acuosa. En la selección de transformantes (*E. coli*) o exconjugantes (*Streptomyces*) se usó una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$. En el caso de los *Streptomyces* cultivados en medio líquido, la concentración empleada fue de 40 $\mu\text{g/ml}$.

Cloranfenicol (Cm), de Sigma Chemical. Se preparó a una concentración de 100 mg/ml en etanol 100 %. A la hora de seleccionar transformantes de *E. coli* se utilizó una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$.

Kanamicina (Kn), de Sigma Chemical. Se preparó a una concentración de 100 mg/ml en solución acuosa y se utilizó a una concentración de 50 µg/ml. Se utiliza para seleccionar transformantes de *E. coli* y exconjugantes de *Streptomyces*.

Higromicina (Hyg), de Sigma Chemical. Se preparó en agua a una concentración de 200 mg/ml, y se utilizó a 100 µg/ml. Se utiliza para seleccionar transformantes de *E. coli* y exconjugantes de *Streptomyces*.

Ácido nalidíxico (Nal), de Sigma Chemical. Se emplea en las conjugaciones intergenéricas para evitar la proliferación de *E. coli*, ya que no afecta al crecimiento de *Streptomyces*. Se preparó a una concentración de 25 mg/ml en NaOH 1N y la concentración final en el medio de cultivo fue de 25 µg/ml.

3.2.4.2. Otros aditivos

Para la selección de transformantes de *E. coli* mediante la detección de la actividad β-galactosidasa fue necesario añadir al medio LA:

IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido). Obtenido de Takara. Se preparó a una concentración de 0,84 M en agua. Para la selección de transformantes se empleó una concentración final de 0,4 mM. Para la inducción de la expresión de proteínas recombinantes a una concentración final de 0,1-1 mM.

X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido). Se obtuvo de Sigma Chemical. Se preparó en solución concentrada a 25 mg/ml en N,N'-dimetilformamida al 100 %. En los experimentos de transformación de *E. coli* se utilizó a una concentración final de 35 µg/ml. Se conservó a -20 °C y protegido de la luz.

3.3. Conservación de las cepas y medida del crecimiento de los microorganismos

3.3.1. Conservación de las cepas

Las cepas de *E. coli* se conservaron durante un máximo de 3 semanas a 4 °C en placas de TSA o LA. Para mayor tiempo se mezcló un volumen de cultivo en medio líquido con un volumen de glicerol al 40 % y se guardaron a -80 °C.

Las diferentes cepas de *Streptomyces* se conservaron como esporas y en forma de micelio. Para mantenimiento a corto plazo se guardaron en placas de TSA a 4 °C durante un máximo de dos meses. Para obtener esporas se sembraron placas de TBO y se incubaron a 30 °C durante, al menos, una semana. Una vez conseguida una buena esporulación (apreciable por el oscurecimiento de la superficie de las colonias) se raspó toda la superficie de la placa con un bastoncillo humedecido con glicerol al 20 %, y este se pasó a un tubo de polipropileno, donde se resuspendieron las esporas en glicerol al 20 %. Se sumergieron en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos, tras lo cual se mantuvieron en hielo para evitar la germinación, y se filtraron por algodón hidrófilo, para eliminar restos de agar y fragmentos de micelio. Se centrifugaron (4500 rpm/10 minutos/4 °C), resuspendieron en glicerol 20 % y guardaron a -80 °C.

Cuando se conservaron como micelio congelado, las cepas se cultivaron durante 24-36 horas en medio TSB a 28-30 °C y 250-300 rpm en un agitador orbital, hasta obtener una densidad óptica (DO) de entre 6 y 9. Después se mezcló 1 volumen de cultivo con 1 volumen de glicerol al 40 % y se guardó a -80 °C.

3.3.2. Cuantificación de las esporas de *Streptomyces*

Las esporas de *Streptomyces* se cuantifican a partir de la suspensión obtenida tras su recolección. El procedimiento consiste en sembrar diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} , por lo general, de dicha suspensión en medio TSA suplementado, si es necesario, con los antibióticos adecuados. A partir del número de colonias que aparezcan tras 2-3 días a 30 °C se calcula el número de esporas viables (formadoras de colonias) presentes en el tubo concentrado original, que se conserva congelado. Es importante conservar a -80°C los viales de esporas cuantificadas, ya que a -20 °C la viabilidad de las esporas declina de manera progresiva con el paso del tiempo.

3.3.3. Medida del crecimiento

La evolución del crecimiento de los cultivos líquidos de *E. coli* fue estimada por densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nm realizando diluciones de la muestra original para que la medida no sobrepasase en ningún caso un valor de 1,2. Este procedimiento no es adecuado para *Streptomyces* la mayor parte de las veces, por lo que se emplea el peso seco o la cantidad de ADN para medir el crecimiento de este microorganismo.

3.3.3.1. Determinación del peso seco en cultivos líquidos de *Streptomyces*

Para cuantificar el crecimiento de los cultivos de *Streptomyces* se valoró su peso seco por unidad de volumen. Para ello, se recogieron 2 ml de cultivo en un tubo eppendorf previamente pesado en balanza de precisión, se centrifugaron cinco minutos a 13200 rpm, para eliminar el sobrenadante, y el micelio precipitado se resuspendió con agua MilliQ, tras lo cual volvió a ser precipitado mediante centrifugación y lavado de nuevo. Tras una última centrifugación, el micelio, ya libre de sales y restos de cultivo, fue deshidratado a 60 °C durante 80 horas. Se pesó el eppendorf con el micelio seco en una balanza de precisión y se calculó la biomasa existente en los dos mililitros de cultivo originales como el incremento de masa entre el tubo vacío y el tubo con micelio desecado.

Hasta el límite de 1 mg/ml de peso seco el crecimiento es equivalente a la DO a 600 nm. Es decir, una $DO_{600} = 0,5$ es lo mismo que 0,5 mg/ml de peso seco (A. Rodríguez-García, comunicación personal).

3.4. Plásmidos

Durante el desarrollo de este trabajo se han usado vectores con origen de replicación de *Streptomyces* y vectores con origen de replicación de *E. coli*.

3.4.1. Plásmidos de *E. coli*

pBluescript II SK⁺ y pBluescript I KS⁺ (Stratagene). Vectores multicopia derivados de pUC19, empleados para la clonación de fragmentos de ADN. Incluyen un gen de resistencia a ampicilina y una parte del gen *lacZ* que codifica el fragmento N₁ de la β-galactosidasa, lo que complementa la delección *lacZΔM15* presente en cepas de *E. coli* como *E. coli* DH5α. Entre este gen y su promotor (inducible por IPTG) se localiza un sitio de clonación múltiple (SCM), de manera que los transformantes, en presencia de IPTG, serán capaces de metabolizar X-Gal (un análogo de la lactosa, sustrato natural de la β-galactosidasa), dando lugar a un compuesto azul que teñirá las colonias. La clonación de un fragmento de ADN en el SCM interrumpe el gen *lacZ* imposibilitando la complementación de la cepa de *E. coli* y provoca que los clones sean de color blanco, además de resistentes a ampicilina. Las versiones KS y SK se diferencian en la orientación del SCM respecto de la transcripción de *lacZ*.

pET24a(+) (Novagen, Merck). Plásmido de expresión que contiene el promotor T7 inducible por IPTG y el gen *lacI* (que codifica el represor del operón *lac*), el origen de replicación de f1 (Kn^R). Este vector tiene una secuencia que codifica la etiqueta T7 en el extremo amino del gen insertado en el SCM, y otra en el extremo carboxilo que codifica una cola de histidinas. En este trabajo se utilizó para clonar el gen *argR* con la etiqueta Strep (ver apartado 3.18.1.1).

pGem-T-Easy Vector (Promega). Vector utilizado para la suclonación de fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR con Taq Polimerasa debido a la presencia de una timidina terminal en ambos extremos 3' del vector (Amp^R). Situado entre la secuencia del gen *lacZ* y su promotor se encuentra el sitio de clonación con puntos de corte para enzimas de restricción, de modo que la conservación de la actividad β-galactosidasa es indicadora de la ausencia de insertos.

pGEX-2TK (GE Healthcare). Plásmido diseñado para la expresión de proteínas de fusión en *E. coli* (Amp^R). Posee un gen que codifica la glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum* acoplado al promotor *tac* inducible por IPTG. Incluye también el gen *lacI* que codifica la proteína encargada de reprimir la expresión de los genes situados bajo el control del promotor *tac* hasta la adición del IPTG. Inmediatamente por detrás del gen que codifica la GST existe un SCM, con sitios de corte únicos EcoRI, SmaI y BamHI, seguido de codones de paro en los tres marcos de lectura posibles. De este modo, un fragmento de ADN clonado en estos sitios de restricción se traducirá junto a la GST en posición N₁ dando lugar a una proteína de fusión que puede ser separada del resto de proteínas citoplasmáticas de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad. Adicionalmente, tras la purificación es posible cortar la proteína de fusión gracias a la presencia de una secuencia de reconocimiento para la proteasa trombina, situada entre el final de la GST y el inicio del SCM.

pTC123-aphII (Pérez-Redondo *et al.*, 2012). Plásmido derivado del pTC182 que contiene el gen *neo* y un fragmento SphI de 5,7 kb que incorpora la zona 3' de *argJ* y los genes *argBDR* y SCO1575 de *S. coelicolor*.

pUZ8002 (Kieser *et al.*, 2000). Plásmido no movilizable pero que permite la movilización de un plásmido que posea *oriT* (Cm^R y Kn^R). Se usa en la conjugación intergenérica *E. coli*-*Streptomyces*.

3.4.2. Plásmidos con origen de replicación de *Streptomyces*

pLUXARneo (Santos-Beneit *et al.*, 2008). Vector de clonación bifuncional *E. coli-Streptomyces* integrativo en *Streptomyces* (Apr^R , Kn^R) transferible mediante conjugación. Es un vector sonda de promotores con el sistema de la luciferasa como testigo.

pMS83 (M. Smith, University of York, UK): Vector de clonación bifuncional *E.coli-Streptomyces* integrativo (Hyg^R) y transferible mediante conjugación. Se integra en el genoma de *Streptomyces* mediante el sitio de integración del fago Φ BT1 (Gregory *et al.*, 2003).

3.5. Manipulación enzimática del ADN

Las enzimas de restricción y modificación, así como la RNasa A de páncreas bovino, la ADN polimerasa del fago T7, la proteinasa K, la lisozima, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, la fosfatasa alcalina de intestino de ternero y la ADN ligasa del fago T4, fueron adquiridas a las siguientes casas comerciales: Amersham Biosciences, GE Healthcare, Roche, Boehringer Mannheim, New England Biolabs, Sigma, Promega, Takara y MBI Fermentas. Las KAPA-Taq DNA Polimerasa, Go-Taq Polimerasa, Platinum *Pfx* DNA Polimerasa y Phusion DNA Polimerasa se adquirieron a Roche, Promega, Fisher Bioblock y New England Biolabs, respectivamente. La Dnasa I procede de Quiagen y de Ambion.

3.5.1. Digestión con enzimas de restricción

Las endonucleasas de restricción fueron usadas en los tampones de digestión adecuados y siguiendo las recomendaciones de los fabricantes en cuanto a la temperatura a la que se realizó la digestión, la concentración de sales y la presencia de aditivos, ya que las condiciones óptimas de reacción son diferentes para cada endonucleasa.

El volumen de reacción y la cantidad de ADN digerido variaron en función de las necesidades de cada ensayo, cuidando siempre que el volumen de enzima no superara 1/10 del volumen de digestión total, para que el glicerol que contiene la solución de almacenamiento (50 %) no impidiera la actividad enzimática o indujera actividades inespecíficas de tipo *STAR*, fenómenos que pueden manifestarse para concentraciones de glicerol superiores al 5 % (v/v) en la reacción de digestión. Cuando el ADN se encontraba suspendido en tampón TE, se llevó a cabo la reacción en un volumen que superase al menos 10 veces el volumen de ADN a digerir. De esta manera se impide que el TE interfiera con el tampón de reacción.

El análisis de plásmidos recombinantes obtenidos por el método de minipreparación se realizó con cantidades menores de 1 μ g de ADN en un volumen de 20 μ l. La preparación de vectores para subclonación requirió digestiones de 1–2 μ g de plásmido en un volumen de 20 μ l. Cuando se necesitó recuperar fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se digirieron de 5 a 50 μ g de ADN en 50 o 100 μ l totales de volumen de digestión. En todo caso, la cantidad de enzima añadida, como norma general, fue de 0,5-1 unidades por μ g de ADN y los tiempos de incubación variaron entre 3 y 12 horas.

3.5.2. Desfosforilación de los extremos de ADN 5'-fosfato

En algunos casos los extremos resultantes de la digestión de los vectores de clonación con enzimas de restricción fueron desfosforilados con fosfatasa alcalina, enzima que hidroliza los enlaces 5'-fosfato de los extremos de una molécula de ADN e impide la religación por formación de un enlace fosfodiéster entre los dos extremos del vector. Para ello, mezclar en un microtubo tampón 10X (1/10 del volumen final), vector de clonación (no más de 1 µg), fosfatasa alcalina (1 unidad) y agua MilliQ hasta alcanzar el volumen final. Incubar 30 minutos a 37 °C, detener la reacción durante 15 minutos a 65 °C y, por último, fenolizar y precipitar.

Soluciones

- ♦ Tampón 10X de fosfatasa alcalina: Tris-HCl 0,1 M pH 8,3; ZnCl₂ 10 mM; MgCl₂ 10 mM.

3.5.3. Modificación de los extremos del ADN

Los extremos producidos por las enzimas de restricción fueron modificados para generar extremos romos o semirrellenados y poder ligar entre sí fragmentos no compatibles. Para ello se utilizó el fragmento Klenow de la DNA Polimerasa I de *E. coli*, que presenta actividad polimerasa 5'→3'. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20-50 µl, incluyendo el tampón comercial aportado por el fabricante. La concentración de desoxinucleótidos trifosfato fue de 100 µM. La concentración de Klenow fue de 1 unidad por µg de ADN. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

En el caso de hacer romos los extremos 3' se añadió primero la Klenow y se incubó a 37 °C 5 minutos, entonces se añadieron los desoxinucleótidos trifosfato y se incubó durante 30-45 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo se inactivó la enzima por calentamiento a 65 °C durante 10 minutos.

En el caso de semirrellenar los extremos solo se añadió la combinación de nucleótidos necesaria.

Soluciones

- ♦ Tampón 10X del fragmento Klenow: MgCl₂ 0,2 M; NaCl 0,5 M; Tris-HCl 0,4 M; pH 7,5.

3.5.4. Ligación de fragmentos de ADN

La ADN ligasa del fago T4 fue usada para llevar a cabo las reacciones de ligación de los vectores de clonación con distintos fragmentos de ADN, es decir, cataliza las uniones fosfodiéster entre los extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato del ADN de doble cadena, requiriendo como cofactores Mg²⁺ y ATP. Se empleó en todos los casos siguiendo las instrucciones del fabricante en volúmenes de 10 µl. La concentración final de vector e inserto se ajustó siguiendo las indicaciones de Sambrook y Russell (2001), y la de enzima fue de 0,05 U/µl. La relación estequiométrica entre vector e inserto varió entre 1:3 y 1:30, dependiendo de si los extremos a ligar fueran romos o cohesivos. En general, las ligaciones basadas en moléculas de ADN con los extremos romos resultan más improbables y complicadas, por lo que se procura que exista un mayor número de moléculas de inserto en relación al vector, que en los casos de extremos cohesivos, con el fin de facilitar su incorporación. La ligasa del fago T4 es flexible en cuanto a las temperaturas de incubación que admite su actividad. Para extremos cohesivos se incubó a 14 °C durante 6-16 h. En el caso de extremos romos la reacción se mantuvo a temperatura ambiente y se redujeron los tiempos de reacción.

Soluciones

- ♦ Tampón 10X de ligasa de fago T4: Tris-HCl 50 mM; MgCl₂ 50 mM; DTT 50 mM; ATP 10 mM; pH 7,5.

3.6. Electroforesis de ácidos nucleicos

3.6.1. Electroforesis del ADN

La técnica de electroforesis horizontal en geles de agarosa sumergidos se emplea para separar fragmentos de ADN según su tamaño, bien para su análisis o como sistema de aislamiento de un fragmento concreto. Las electroforesis se realizaron según las indicaciones de (Sambrook y Russell, 2001).

Se utilizó agarosa (Low EEO, Pronadisa) disuelta por calentamiento en tampón TAE con concentraciones de entre el 0,7-2 %, según el rango de tamaños de los fragmentos que se deseara separar. El gel, una vez polimerizado, fue sumergido en tampón TAE 1X. El espesor de los geles fue de 4-6 mm y la altura de la capa de tampón situada entre la cara superior del gel y la superficie se mantuvo en 0,5 cm, aproximadamente. Antes de su aplicación en el gel, las muestras de ácido nucleico se mezclaron con 1/10 de volumen de tampón de carga (10X) que actúa como indicador del frente de migración del gel, además de proporcionar densidad a la muestra de ácidos nucleicos, y se mantuvieron a 65 °C durante unos minutos para provocar la ruptura de posibles enlaces no covalentes entre distintos fragmentos presentes en la muestra. Como indicador de tamaño molecular se empleó ADN del fago λ digerido con las enzimas HindIII, PstI o EcoRI/HindIII. Generalmente se utilizaron unos 300 ng de marcador por carril.

La electroforesis se llevó a cabo en cubetas de metacrilato (Life Technologies Horizon 11·14) y a un voltaje de entre 70 y 90 V. La duración de la electroforesis vino dada por la longitud del gel empleado, así como del tamaño de los fragmentos de ADN a estudiar. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron por inmersión en solución del agente intercalante bromuro de etidio durante 10-20 minutos y las bandas fueron visualizadas mediante iluminación con luz ultravioleta en un transiluminador.

Soluciones

- ♦ Tampón TAE: Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA 2 mM.
- ♦ Tampón de carga 10X: Azul de bromofenol 0,25 %, xilencianol 0,25 %, sacarosa 40 %.
- ♦ Solución de bromuro de etidio: Se prepara en agua una solución madre 10 mg/ml y se conserva a 4 °C. Se añaden 200 μ l de esta solución a un litro de tampón TAE.

3.6.2. Extracción del ADN desde 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 ello primero se recortó el gel alrededor de la banda deseada.

3.6.2.1. Método de congelación rápida (“Freeze-Squeeze”)

Es un método rápido y sencillo que permite una recuperación del 70-80 % del ADN retenido en la agarosa. En el procedimiento de Polman y Larkin (1989) ha sido sustituido el uso de lana de vidrio (nociva por inhalación) por algodón hidrófobo.

Protocolo

1. Colocar la banda de agarosa que contiene el fragmento de ADN de interés en un microtubo al que previamente se ha practicado un orificio en el fondo y obturado con algodón hidrófobo estéril. Dicho tubo se coloca sobre otro tubo de 2,2 ml sin tapa.
2. Congelar el conjunto a -80 °C durante al menos 20 minutos.
3. Centrifugar a temperatura ambiente durante 10 minutos a 13200 rpm. La agarosa quedará retenida en el filtro de algodón y el ADN pasará junto con el tampón al tubo inferior.

4. Tratar la fase acuosa recogida en el tubo inferior una vez con FN/CIA y seguidamente con CIA para eliminar los restos de fenol.
5. Precipitar la fase acuosa recogida con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol.
6. Precipitar a -20 °C y centrifugar durante un mínimo de 10 minutos a 13200 rpm y 4 °C.
7. Lavar con etanol 70 %. Centrifugar y dejar evaporar los restos de etanol.
8. Resuspender en el volumen apropiado de agua o TE.

3.6.2.2. Sistemas comerciales de extracción de ADN

Están basados en el empleo de matrices de sílice. En este trabajo fue utilizado el sistema *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amershan Biosciences), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Emplea un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión del ADN de doble cadena (0,1-48 Kb) a la matriz de la columna. Una vez el ADN es retenido, las proteínas y sales contaminantes son eliminadas mediante un lavado. El ADN es posteriormente eluído en un tampón de baja fuerza iónica. Este mismo sistema se utilizó para purificar una solución de ADN, hacer un cambio de tampón o eliminar enzimas, obviando el paso de fusión de la agarosa. Se obtiene un porcentaje de recuperación superior al 60 %. En la purificación de ácidos nucleicos marcados para hibridación en micromatrices se usó el sistema *MinEluteTM PCR purification kit* (BioPrime) (ver apartado 3.13.2).

Protocolo

1. Pesar el eppendorf con el fragmento de agarosa recortado del gel.
2. Añadir 10 µl de tampón de captura por cada 10 mg de agarosa.
3. Incubar a 60 °C hasta disolver la agarosa (unos 10 minutos). Durante ese tiempo invertir alguna vez para facilitar el proceso. Dar un pulso en la centrífuga.
4. Pasar un máximo de 600 µl del volumen total a la columna colocada sobre un eppendorf.
5. Mantener 30 segundos a temperatura ambiente y centrifugar 30 segundos a velocidad máxima. Descartar el eluído (Repetir los pasos 4 y 5 si aún queda volumen de muestra).
6. Añadir 500 µl de tampón de lavado y centrifugar a velocidad máxima durante 30 segundos.
7. Descartar el tubo y su contenido y colocar la columna en otro eppendorf.
8. Añadir 30 µl de tampón de elución o agua MilliQ al centro de la columna, incubar 1 o 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar un minuto a velocidad máxima. Para aumentar el porcentaje de recuperación, volver a pasar el eluído por la columna.
9. Guardar el eluído a -20 °C.

3.6.3. Cuantificación y determinación de la pureza de los ácidos nucleicos

Desde las fotografías con muestras de ADN se cuantificaron fragmentos concretos por comparación de intensidad de su señal con un patrón de ADN de concentración conocida. El patrón empleado fue el proporcionado por la digestión con HindIII o PstI de ADN del fago λ.

Adicionalmente, la cuantificación y pureza de ADN y de ARN se llevó a cabo espectrofotométricamente en un equipo *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific). El aparato estima la concentración de la muestra basándose en su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A260), teniendo en cuenta que la absorptividad específica (concentración de una sustancia que determina una unidad de absorbancia a una longitud de onda establecida) para el ADN de doble cadena es de 50 µg/ml, mientras que en el caso del ADN de cadena sencilla tiene un valor de 33 µg/ml, y para el ARN es de 40 µg/ml. Además, el cociente A260/A280 indica la pureza de la muestra, con valores de 1,8 o 2,1 de muestras puras de ADN o ARN, respectivamente. La presencia de proteínas contaminantes en las muestras reduce este

coeficiente, ya que algunos de los residuos de aminoácidos presentan picos de absorción a 280 nm (Sambrook y Russell, 2001).

El cociente A260/A230 para ácidos nucleicos puros se encuentra entre 1,8 y 2,2. Valores inferiores indican la presencia de contaminantes no proteicos en las muestras. En el caso del ARN la medida se considera óptima cuando el cociente A260/230 se encuentra entre 2 y 2,3 (Sambrook y Russell, 2001).

En el apartado 3.11.5 se indica la utilización de electroforesis capilar para determinar la limpieza e integridad del ARN.

3.7. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

El protocolo utilizado para la obtención de ADN plasmídico dependió de la cantidad de ADN necesaria. Así, para conseguir preparaciones de ADN de plásmidos en gran escala se siguió el método de lisis alcalina, mientras que para obtener menores cantidades se utilizó el de minipreparaciones de ADN

3.7.1. Minipreparaciones de plásmido de *E. coli*

Este método permite obtener de manera rápida pequeñas cantidades de ADN plasmídico. Se utilizó para comprobar los plásmidos presentes en transformantes de *E. coli*, lo que requiere sólo unos pocos microgramos de ADN.

Protocolo (Holmes y Quigley, 1981)

1. Inocular colonias aisladas en 800 µl de medio TB suplementado con el antibiótico de selección. Hacer réplicas en una placa (con el palillo con el que se coge la colonia). Incubar durante 10-20 horas a 37 °C y 220 rpm (normalmente durante toda la noche).
2. Centrifugar a 13200 rpm durante 30 segundos para precipitar las células. Retirar el sobrenadante por decantación sobre papel secante.
3. Añadir 200 µl de STET y 6 µl de lisozima. Esta última se añade en la tapa del tubo de 1,5 ml. Agitar durante 20 segundos en el *mixer* de la casa Eppendorf.
4. Sumergir en agua hirviendo durante exactamente 40 segundos. Rebasar este tiempo nos expone a la fragmentación del ADN genómico y su aparición en la preparación final de material plasmídico.
5. Centrifugar inmediatamente durante 10 minutos a 13200 rpm. Retirar el precipitado viscoso (restos celulares, proteínas y ADN genómico) con un palillo estéril.
6. Añadir 20 µl de acetato sódico 3 M y 120 µl de isopropanol. Mezclar por inversión. Dejar en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos.
7. Centrifugar 10 minutos a 13200 rpm y descartar el sobrenadante. Dejar secar durante 10 minutos.
8. Resuspender en 15-20 µl de TE o agua. Dos microlitros de esta preparación son suficientes para los ensayos de digestión con la restrictasa elegida.

Soluciones

- ♦ STET. Sacarosa 8 %, TrisHCl 10 mM, EDTA 50 mM pH 8 y Tritón X-100 0,5 %.
- ♦ Tampón TE. Tris·HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8.
- ♦ Solución de lisozima. 10 mg/ml en agua.

3.7.2. Lisis alcalina

Este método se empleó para aislar altas cantidades de ADN plasmídico.

Protocolo modificado de Sambrook y Russell (2001)

1. Inocular una colonia aislada en 90 ml de medio TB suplementado con 10 ml de sales de fosfato y 50 µg/ml del antibiótico correspondiente. Cultivar durante 14-20 horas a 37 °C y 220 rpm.
2. Centrifugar las células durante 5 minutos a 4400 rpm. Eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender el precipitado en 4 ml de TEG. Añadir 50 µl de lisozima 10 mg/ml y 2 volúmenes (8 ml) de solución NaOH-SDS fresca. Mezclar por inversión suavemente. Dejar reposar 5-10 minutos a temperatura ambiente.
4. Añadir 1 volumen (4 ml) de acetato potásico 5 M frío. Agitar rápida y vigorosamente hasta que la solución adquiera un color blanco. Mantener en frío 10 minutos.
5. Centrifugar durante 15 minutos a 4400 rpm y 4 °C. Filtrar el sobrenadante a través de un algodón hidrófilo y transferir a un tubo de vidrio Corex®. Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol. Mezclar por inversión y dejar precipitar 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar, utilizando adaptadores para evitar la ruptura de los tubos Corex®, 15 minutos a 4500 rpm. Descartar el sobrenadante.
7. Lavar el precipitado con etanol al 70 % y resuspender en 400 µl de TE. Pasar a eppendorf y añadir 1 volumen de cloruro de litio 5 M, que hace que precipite el RNA, y mezclar por inversión.
8. Centrifugar 10 minutos a 13200 rpm. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y precipitar añadiendo un volumen de isopropanol. Dejar reposar 5-10 minutos.
9. Centrifugar 10 minutos a 13200 rpm. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol al 70 %, secar y resuspender en 400 µl de TE.
10. Añadir un volumen de FN/CIA. Mezclar por inversión durante un par de minutos y centrifugar 5 minutos a 13200 rpm. Repetir este paso.
11. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo y añadir un volumen de CIA. Mezclar por inversión durante 1 minuto y centrifugar 5 minutos a 13200 rpm.
12. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo. Precipitar el ADN añadiendo 2 volúmenes de etanol 100 % frío. Mantener a -20 °C durante un mínimo de 30 minutos. Centrifugar 10 min a 13200 rpm y 4 °C y descartar el sobrenadante.
13. Lavar el precipitado con etanol al 70 %. Centrifugar 12500 rpm 5 minutos y a temperatura ambiente, eliminar el sobrenadante con una pipeta y dejar evaporar.
14. Disolver en 50-100 µl de tampón TE.

Soluciones

- ♦ Solución TEG. Tris-HCl 25 mM pH8, glucosa 50 mM y EDTA 10 mM pH 8. La glucosa puede ser sustituida por sacarosa, denominándose a la solución TES.
- ♦ Solución NaOH-SDS. NaOH 0,2 N y SDS 1 %. Para preparar 10 ml de solución fresca, añadir en este orden: 7,44 ml H₂O; 160µl NaOH 10 N; 400 µl SDS 20 %.
- ♦ Tampón TE. Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8.
- ♦ FN (fenol neutro). Mediante agitación, disolver en agua 500 g de fenol y 0,5 g de hidroxiquinoleína. Añadir un volumen de Tris-HCl 1 M pH 8,5 y agitar durante 15 minutos. Dejar reposar hasta que se separen dos fases. Retirar la fase acuosa y repetir el proceso anterior con Tris-HCl 1 M pH 8 hasta que el pH de la fase fenólica alcance un valor de 7,8-8,0. Conservar la fase fenólica bajo una capa de 3 cm de Tris-HCl 100 mM pH 8, a 4 °C y protegido de la luz.
- ♦ CIA (cloroformo-alcohol isoamílico). Mezclar cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 24:1.
- ♦ Solución de ácido acético: 60 ml acetato de potasio 5 M; 11,5 ml ácido acético glacial; 28,5 ml agua. La solución resultante es 3 M respecto al potasio y 5 M respecto al acetato.

3.8. Preparación de ácidos nucleicos

3.8.1. Procesos generales de purificación y concentración

3.8.1.1. Fenolización

La fenolización se usa para eliminar proteínas y otras impurezas de las preparaciones de ácidos nucleicos. Se ha utilizado en los protocolos de aislamiento de ADN y para eliminar las enzimas añadidas en los procesos de tratamiento del ADN.

Protocolo

1. A una solución de ADN, preferiblemente en tampón TE y en microtubo, añadirle un volumen de FN, agitar en *vortex* o manualmente durante 5 minutos y centrifugar (14000 rpm, 5 minutos). En el caso de que la muestra contenga pocos contaminantes (por ejemplo, digestiones con enzimas de restricción), este paso se puede omitir.
2. Recoger el sobrenadante procurando no arrastrar la interfase blancuzca, formada por los coágulos de proteínas, y agregar un volumen de FN/CIA. Agitar y centrifugar de la misma forma descrita en el paso anterior. Este proceso se repite cuantas veces sean necesarias hasta que la interfase aparezca transparente, libre de impurezas.
3. Tratar la fase acuosa para eliminar restos de fenol con un volumen de CIA, mezclar y centrifugar (13200 rpm, 5 minutos).
4. Recuperar la fase superior y precipitar el ADN (ver siguiente apartado).

Existen tubos con una resina inmisible (tubos PLG) con los solventes para extracción con FN/CIA de la casa 5PRIME. Su uso aumenta el rendimiento de purificación, permite una purificación más sencilla, reduce el contacto con solventes orgánicos peligrosos y elimina la contaminación de la interfase con respecto al método tradicional.

3.8.1.2. Precipitación

Para concentrar los ácidos nucleicos y eliminar restos de sales o trazas de CIA después de fenolizar se precipitó con una sal y un alcohol, que provocan que el ADN pierda su solubilidad en agua. Primero se añadió una sal que neutraliza las cargas negativas de los ácidos nucleicos. Las sales y las cantidades empleadas fueron:

- 1) acetato sódico 3 M pH 5,2 en proporción 1/10;
- 2) cuando la solución inicial contenía EDTA en concentraciones superiores a 1 mM, dado que este compuesto precipitaría a pH ácido, se utilizó acetato sódico 3 M no tamponado en proporción 1/10;
- 3) cuando la solución inicial contenía nucleótidos (por ejemplo, después de una digestión con RNasa) para minimizar su precipitación se añadió acetato amónico 10 M en proporción 1/4;
- 4) cuando la solución inicial contenía SDS se utilizó NaCl 5M a una concentración final 0,2 M, ya que permite que el SDS se mantenga soluble en etanol al 70 %.

Después de mezclar la sal se añadieron, o bien 0,6 volúmenes de isopropanol y se mantuvo a temperatura ambiente, o bien 2 volúmenes de etanol y se conservó a -20 °C. El isopropanol es una alternativa eficiente al etanol, ya que se necesita menor cantidad para precipitar el ADN. El tiempo de incubación dependió de la concentración del ácido nucleico, variando desde unos pocos minutos (concentraciones de ADN >0,2 mg/ml) hasta 24 horas (concentraciones de ADN del orden de 0,1 µg/ml).

Cuando la muestra se precipita con isopropanol la centrifugación posterior se realiza a temperatura ambiente durante 10 minutos a 13200 rpm, mientras que si se usa etanol se centrifuga a 4 °C y a 13200 rpm, durante 5-40 minutos, según la concentración inicial de ADN.

El precipitado se lava con etanol 70 % para eliminar los restos de sales, se centrifuga (13200 rpm/4 °C/5 minutos), se retira el líquido con ayuda de una pipeta y se dejan evaporar los restos de etanol durante 5 minutos. Un exceso de secado dificulta la resuspensión del ADN y provoca desnaturalización del ADN. Los ácidos nucleicos se disuelven en TE o en agua MilliQ estériles y se conservan a -20 °C.

3.8.1.3. Eliminación enzimática del ARN

Los procesos de purificación de ADN conllevan habitualmente la obtención de muestras que presentan contaminación con ARN. Para eliminarlo selectivamente se empleó la ribonucleasa A (RNasa A) de páncreas bovino, libre de DNasas. Se utilizó a una concentración final de 100 µg/ml, incubando la reacción a 37 °C durante una hora.

Soluciones

- ♦ RNasa A. Solución madre preparada a 10 mg/ml en Tris-HCl 10mM pH 7,5; NaCl 15mM. Ebullición la solución durante 15 minutos, enfriar lentamente y guardar a -20 °C.

3.8.2. Método de aislamiento de ADN total

3.8.2.1. Método de “salting-out”

Se siguió este protocolo para la extracción de ADN total de *Streptomyces*.

Protocolo modificado de Pospiech y Neumann (1995)

1. Partir de 30 ml de cultivo de *Streptomyces* crecido en medio TSB suplementado con glicina al 0,5 % a DO₆₀₀ entre 5-7, por lo general durante 36-48 horas.
2. Recoger el micelio centrifugado durante 10 minutos a 4500 rpm y 4 °C. Resuspender en 5 ml de solución SET y añadir lisozima a concentración final 20 mg/ml, incubando a 37 °C de 30 a 60 minutos.
3. Añadir proteinasa K y SDS a concentración final de 0,5 mg/ml y 1 %, respectivamente. Mezclar por inversión e incubar 2 horas a 55 °C, mezclando ocasionalmente.
4. Añadir 2 ml de NaCl 5 M a concentración final 1,25 M, mezclar vigorosamente por inversión y dejar enfriar hasta 37 °C.
5. Añadir 5 ml de cloroformo y mezclar por inversión durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar 15 minutos a 4500 rpm.
7. Transferir el sobrenadante (6 ml) a un tubo de vidrio Corex® y precipitar con 0,6 volúmenes de isopropanol mezclando por inversión.
8. Recoger el ovillo formado con una pipeta pasteur con el extremo sellado y lavar con etanol al 70 %, dejar secar y disolver en 2 ml de TE a 55 °C. Es importante no forzar la disolución mediante pipeteo para no romper los cromosomas, especialmente si el ADN genómico es para experimentos de hibridación.

Soluciones

- ♦ Solución SET: NaCl 75 mM, EDTA pH 8 25 mM, Tris-HCl pH 7,5 20 mM. Preparar en el momento de su uso.
- ♦ Solución de lisozima: 50 mg/ml en agua. Congelar en alícuotas.
- ♦ Proteinasa K: 20 mg/ml en agua. Congelar en alícuotas.
- ♦ SDS: 10 g de dodecilsulfato sódico en 100 ml de agua.

3.8.2.1. Método de Kirby

En algunas ocasiones el método utilizado para el aislamiento de ADN total fue el de Kirby.

Protocolo modificado de Kieser *et al.*, (2000)

1. Crecer la cepa en 50 ml de medio YEME a 30 °C con agitación orbital durante 36-48 horas (cultivo en fase estacionaria) a 300 rpm.
2. Recoger el micelio por centrifugación. Resuspender el micelio en 3 ml de solución de lisis. Incubar 15 minutos a 37 °C.
3. Añadir 4 ml de solución de Kirby 2X, y agitar suavemente.
4. Añadir 8 ml de FN/CIA (1:1) y agitar suavemente por inversión.
5. Centrifugar 10 minutos a velocidad máxima.
6. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo y añadir 1 volumen de FN/CIA. Centrifugar como en el paso anterior y recuperar la fase acuosa. Repetir el proceso hasta que no se observe interfase.
7. Precipitar el ADN (apartado 3.8.1.2).

Soluciones

- ◆ TES. Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; EDTA 25 mM pH 8,0; Sacarosa 0,3 M
- ◆ Solución de lisis. TES; lisozima 2 mg/ml; RNasa 10 µg/ml.
- ◆ Solución de Kirby 2X. Aminosalicilato de sodio 12 g; 5 ml de Tris-HCl 2 M pH 8,0; 6 ml de fenol neutro pH 8,0. Completar con agua hasta 100 ml.

3.9. Secuenciación del ADN

Los fragmentos de ADN clonados en plásmidos, los amplificados por PCR, etc., se secuenciaron según el método de secuenciación cíclica basado en la terminación de la polimerización por 2',3'-dideoxynucleótidos trifosfato (Sanger *et al.*, 1977). Para ello se utilizó el sistema *ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). La secuenciación de los productos amplificados se llevó a cabo por electroforesis capilar en el secuenciador *ABI PRISM 3130* (Applied Biosystems), en el Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC).

En este proceso se emplean dideoxynucleótidos (ddNTPs) análogos de los desoxynucleótidos (dNTPs) que carecen del grupo 3' hidroxilo necesario para la formación del siguiente enlace fosfodiéster. Cada ddNTP está conjugado con un fluoróforo específico.

En la fase de elongación, la ADN polimerasa del fago T7 incorpora los ddNTPs al azar en distintos tiempos, dando lugar a una población de moléculas fluorescentes de distintos tamaños. Los fragmentos de ADN marcados con los diferentes fluoróforos se separan según su tamaño por electroforesis a través del polímero. A medida que la muestra pasa por el capilar, los fragmentos atraviesan una ventana en la que son iluminados por un láser, lo que provoca la excitación de los fluoróforos ligados a los fragmentos. Estos emiten luz a una longitud de onda específica para cada uno de ellos, que es captada y almacenada por el sistema, permitiendo que los cuatro tipos de emisiones fluorescentes puedan detectarse simultáneamente.

3.10. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos específicos de ADN se llevó a cabo mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986). Esta técnica requiere conocer la secuencia que se desea amplificar, de manera que se pueda diseñar dos cebadores complementarios a cada uno de los extremos del fragmento que se quiere amplificar. Dichos cebadores aportan los extremos 3'OH libre para iniciar la síntesis de ADN de doble cadena a partir de un molde de ADN de cadena sencilla.

La reacción de PCR consiste en la repetición cíclica de las siguientes etapas:

1. **Desnaturalización.** Consiste en la separación de las dos cadenas del ADN molde mediante la incubación a elevada temperatura (92-96 °C). Las hebras disociadas permanecerán de esta forma en la solución hasta que la temperatura baje lo suficiente como para permitir la unión de los cebadores.
2. **Hibridación** de los cebadores con la secuencia. Se basa en un enfriamiento rápido, por debajo de la temperatura de desnaturalización de los cebadores (temperatura de *melting*, T_m), para que puedan hibridar con sus secuencias complementarias en las cadenas del ADN molde. La temperatura de esta etapa es un factor crítico, ya que si es demasiado alta el rendimiento de la reacción es bajo porque la tasa de hibridación es baja, y si es demasiado baja puede afectar a la especificidad de la reacción, amplificando productos no deseados. Por esta razón la temperatura de hibridación se determina empíricamente, partiendo normalmente de una temperatura 5 °C inferior a la menor de las temperaturas de desnaturalización de los cebadores.
3. **Elongación.** La polimerasa sintetiza ADN complementario al ADN molde de cadena sencilla a partir del extremo 3' de los cebadores. La temperatura varía entre 68 y 72 °C, dependiendo de la enzima utilizada y el tiempo varía en función del tamaño del fragmento que se desea amplificar.

Al finalizar la reacción de PCR, se analiza su resultado en un gel de agarosa, comprobando el tamaño y la cantidad del fragmento amplificado, así como la no deseable presencia de fragmentos de amplificación inespecíficos.

Durante este trabajo se han llevado a cabo varias reacciones de PCR, cada una de las cuales ha requerido unas condiciones diferentes en cuanto al tipo de polimerasa utilizada, número de ciclos, temperatura de hibridación, tiempo y temperatura de elongación. Los cebadores fueron obtenidos mediante síntesis comercial. Las cantidades de ADN usados para amplificar desde un molde de ADN genómico fueron de 1-5 ng/ μ l y desde ADN plasmídico de 0,00002-0,2 ng/ μ l. Se empleó DMSO (dimetil sulfóxido) porque dificulta la formación de estructuras secundarias y aumenta la eficiencia y especificidad de la reacción, disminuyendo la aparición de productos inespecíficos. Debido a que puede inhibir la reacción se añadió a una concentración final del 4 %. Dependiendo de la finalidad de los fragmentos que se querían amplificar, se usó:

- *KAPA-Taq DNA polymerase* y *GO-Taq*: para el análisis rápido de transformantes de *E. coli* mediante PCR de colonias, es decir, cuando la introducción de un pequeño número de errores por parte de la enzima no resultaba crucial para el experimento.

Mezcla de reacción: Tampón comercial 1X; dNTPs 200 μ M; pareja de oligonucleótidos 0,4 μ M; ADN molde 25 ng; KAPA-Taq DNA Polimerasa 0,4 U. En cada caso se ensayaron concentraciones de 1; 1,5 y 2 mM de $MgCl_2$ de y DMSO 2 %. Volumen final de reacción 20 μ l.

Condiciones de reacción: Desnaturalización inicial 95 °C/2 minutos; 29 ciclos con el esquema: 95°C/30 segundos; T_m de la pareja de oligonucleótidos menos 5 °C (particular para cada pareja)/ 30 segundos; 72 °C/1 minuto por kb; extensión final 72 °C 2 minutos.

- *Phusion High-Fidelity DNA polymerase*: se utilizó cuando la fidelidad en la copia se hizo imprescindible, es decir, siempre que los fragmentos amplificados fuesen a ser objeto de una clonación posterior. Esta polimerasa genera extremos romos en los fragmentos amplificados.

Mezcla de reacción: Tampón comercial 1X; dNTPs 200 μ M; oligonucleótidos 0,5 μ M de cada; ADN molde 25 ng; DMSO 3 %; Phusion DNA Polimerasa 0,4 U. Volumen final de reacción 20 μ l.

Condiciones de reacción: Desnaturalización inicial 98 °C/60 segundos; 30 ciclos con el esquema: 98 °C/15 segundos; T_m de la pareja de oligonucleótidos-5 °C/15 segundos; 72 °C/30 segundos por kb; extensión final 72 °C/ 10 minutos.

3.10.1. Análisis de transformantes de *E. coli* mediante PCR

Este método se utilizó para el análisis de transformantes de *E. coli* como alternativa a la realización de minipreparaciones y digestión.

El ADN molde utilizado procede de la propia colonia crecida en medio sólido, romada con palillo estéril, o líquido de una alícuota de cultivo líquido (1 μ l) en una mezcla de reacción con *Go-Taq* o *Kapa-Taq* polimerasas. Para permitir que el ADN sea accesible a los componentes de la reacción la desnaturalización inicial se extiende durante 5 minutos.

3.11. Métodos relacionados con la manipulación y análisis de ARN. Aislamiento de ARN total

En general, y dada la facilidad con la que el ARN es objeto de degradación, así como la ubicuidad en el ambiente de RNAsas, el manejo de muestras de ARN o su obtención ha de hacerse con extremo cuidado. No se debe tocar ningún equipo ni superficie de trabajo (como el papel de filtro) con las manos desnudas y los guantes deben cambiarse frecuentemente. Para limpiar pipetas, gradillas, rotor, tapa de centrífuga y superficies de trabajo se aplica la solución *RNaseZap* de Ambion con un papel y guantes, por ser corrosiva, y después se debe enjuagar el material con agua abundante libre de RNAsas. Las pinzas se esterilizan por calor. Las soluciones como el agua MilliQ o el TE y todo el material de plástico desechable (como tubos eppendorf y puntas para las micropipetas) se esterilizan dos veces consecutivas en el autoclave.

Es crucial la estabilización del patrón de transcripción de las células en el momento de la toma de muestras, por lo que estas se tratan en el momento de su recogida con dos volúmenes de la solución *RNAProtect Bacteria Reagent* (Qiagen), solución que actúa inhibiendo tanto la degradación del ARN como la síntesis de nuevos transcritos.

La extracción de ARN de *Streptomyces* se realizó a partir de cultivos líquidos mediante las columnas *RNeasy mini* (Qiagen). Este sistema permite el procesamiento rápido y cómodo de un gran número de muestras.

3.11.1. Recolección de muestras de cultivo y estabilización del RNA

Protocolo

1. Preparar tubos de 4 volúmenes de capacidad, considerando que un volumen corresponde a la muestra y dos al reactivo *RNA Protect Bacteria*.
2. Recoger la muestra del matraz inmediatamente después de detener la agitación del incubador en el tubo con el reactivo *RNA Protect Bacteria*. Se recogen 2 ml a tiempos tempranos, y 1 ml posteriormente.
3. Agitar inmediatamente en *vortex* durante 5 segundos.
4. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 5000 rpm durante 10-15 minutos a temperatura ambiente.
6. Decantar y retirar bien el sobrenadante (apoyando la boca del tubo sobre papel secante, por ejemplo).
7. Congelar el precipitado de micelio a -20 °C (durante un máximo de dos meses) o a -80 °C (máximo un año) hasta el momento de la extracción.

Soluciones

- ♦ *RNA protect Bacteria*. Qiagen. Incluye las soluciones de lisis y lavado.

3.11.2. Lisis enzimática y mecánica del micelio de *Streptomyces*

Protocolo

1. Descongelar a temperatura ambiente los micelios estabilizados. No dejar transcurrir más de 10 minutos antes de seguir con el siguiente paso.
2. Añadir 170 µl de lisozima y resuspender pipeteando hasta disgregar el micelio. Evitar en lo posible formar espuma.
3. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
4. Añadir 600 µl de RLT-β-ME en campana extractora y agitar con *vortex* inmediatamente.
5. Transferir a tubos *Lysing Matrix B* (Mp Biomedical) y pasar a hielo.
6. Agitar en *FastPrep* (MP Biomedical): velocidad 6,5 m/s durante 30 segundos.
7. Introducir 1 minuto en hielo para enfriar.
8. Repetir la agitación en *FastPrep*: velocidad 6,5 m/s durante 30 segundos.
9. Refrigerar en hielo.
10. Centrifugar a temperatura ambiente durante 1 minuto para que las bolitas de la matriz de lisis se compacten junto con el micelio roto.
11. Preempaquetar dos tubos de PLG de 2 ml de volumen por muestra (centrifugación 30 segundos a velocidad máxima).
12. Transferir 750 µl del lisado a un tubo PLG.
13. Añadir 400 µl de fenol ácido y 400 µl de CIA.
14. Agitar vigorosamente durante ½-1 minuto los tubos en sentido longitudinal hasta formar una suspensión.
15. Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 minutos a velocidad máxima.
16. Transferir la fase superior acuosa a un nuevo tubo PLG.
17. Repetir la extracción con fenol ácido-CIA.
18. Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 minutos a máxima velocidad.

Soluciones

- ♦ Lisozima. 15 mg/ml disuelta en TE. La lisozima se toma con una espátula flameada de un vial (*Fluka*) reservado al uso con ARN y se disuelve en un tubo de 10 ml en TE. Se guardan alícuotas a -20 °C. No se usan con más de 2 ciclos de congelación. Para cada muestra se precisan 170 µl.
- ♦ RLT-B-ME. Añadir 6 µl de β-Mercaptoenanol por cada 600 µl de tampón RLT.
- ♦ Tampones RLT, RW1 y RPE. Incluidos en *RNeasy mini kit*. El tampón RPE se completa con etanol al iniciar el kit.
- ♦ Fenol ácido de calidad, como *Aquaphenol* (Qbiogene).
- ♦ CIA. cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1

3.11.3. Purificación con minicolumnas del Sistema RNeasy de Qiagen

Protocolo

19. Preparar las minicolumnas rotuladas en una gradilla.
20. Pipetear 740 µl de la fase acuosa a un microtubo de 2 ml. Generalmente queda algo de líquido; de esta forma se iguala el volumen recuperado entre muestras.
21. Añadir 412 µl de etanol absoluto. En caso de recuperar menos de 740 µl en el paso anterior, el volumen de etanol se obtiene multiplicando por 0,5555 el volumen acuoso recuperado.
22. Descongelar la DNasa I, atemperar el tampón RDD del kit *RNase-Free DNase Set* (Qiagen).
23. Mezclar pipeteando el etanol con el resto de la solución. Si se forma un ovillo se pasa por la columna igualmente. No centrifugar.
24. Añadir 650 µl de la preparación a la minicolumna.
25. Centrifugar 15 segundos a temperatura ambiente a máxima velocidad.
26. Descartar el eluido volcando el tubo de colección, limpiar el borde en papel secamanos limpio; evitar el contacto del interior de la minicolumna con cualquier superficie.
27. Cargar el resto de la preparación
28. Centrifugar 15 segundos a velocidad máxima.
29. Descartar el eluido de la forma anteriormente descrita.
30. Añadir 350 µl de RW1 a cada minicolumna.
31. Centrifugar 15 segundos a velocidad máxima.
32. Descartar el eluido de la forma anteriormente descrita.
33. Preparar la solución en RDD de DNasa I. Se necesitan $(10 \times n)$ µl de DNasa disuelta en agua, siendo n el número de muestras. Añadir 70 µl de solución RDD. Mezclar pipeteando suavemente. Se puede dar un pulso suave para recoger el líquido en el fondo del tubo.
34. Pipetear 79 µl de la solución de DNasa I sobre la membrana de la columna e incubar a 30 °C en estufa durante 30 minutos.
35. Centrifugar brevemente.
36. OPCIÓN: Dar un pulso a las minicolumnas y hacer una segunda digestión. Este paso opcional sirve para conseguir eliminar el DNA contaminante en RT-PCR. No es necesario para experimentos de hibridación de micromatrices.
37. Añadir 350 µl de RW1.
38. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente para inactivar la DNasa.
39. Para cada minicolumna preparar un tubo de recolección de 2 ml sin tapa, y un tubo de 1,5 ml rotulado.
40. Centrifugar 15 segundos a velocidad máxima. Cambiar la columna a un tubo de recolección de 2 ml.
41. Añadir 500 µl de solución RPE.
42. Centrifugar 15 segundos a velocidad máxima. Descartar el eluido y añadir otros 500 µl de solución RPE.
43. Centrifugar 2 minutos a velocidad máxima. Opcional: descartar el eluido y centrifugar 15 segundos para asegurar la eliminación del RPE de la punta de la minicolumna.
44. Con cuidado, transferir la columna a un microtubo de 1,5 ml
45. Añadir 50 µl de agua sobre la membrana, incubar 1 minuto y centrifugar 1 minuto a velocidad máxima para eluir el RNA.
46. Descartar la columna y cerrar el tubo de colección.

Soluciones

- ♦ RNase-Free DNase Set (Qiagen) que contiene DNasa I y tampón RDD.

3.11.4. Muestras para RT-PCR: digestión opcional con DNasa I

La digestión en minicolumna con DNasa I no es suficiente para la eliminación de todo el ADN que eluye junto con el ARN. Esto presenta un problema cuando el ARN va a ser empleado en RT-PCR, por lo que se hace un tratamiento adicional con DNasa I de la casa Ambion.

Protocolo

1. Añadir 0,1 volumen de tampón 10X de DNase I y 1 μ l de DNasa I (1-2 μ l).
2. Mezclar suavemente pipeteando e incubar a 37 °C durante 30 minutos.
3. Añadir 1 ml de DNasa I, mezclar e incubar a 37 °C 30 minutos.
4. Resuspender la resina de inactivación de la DNasa y añadir 0,2 volúmenes a la muestra.
5. Incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente, mezclar 2-3 veces durante la incubación por pipeteo.
6. Centrifugar 1,5 minutos a máxima velocidad. Recuperar el sobrenadante a un nuevo tubo sin remover o arrastrar también la resina.

Soluciones

- ♦ DNasa *DNAfree* de Ambion. Contiene Turbo-DNasa, su tampón 10X y la resina de inactivación.

3.11.5. Cuantificación, control de calidad y conservación

Unos 2 μ l de la preparación de ARN se miden en *NanoDrop ND-1000* para determinar la concentración y los indicadores de pureza A260/280 y A260/A230 (ver apartado 3.6.3). Conocida la concentración, se guarda una parte de la preparación de ARN total a -20 °C para uso próximo, otra parte a -80 °C para conservación a largo plazo y unos 2-3 μ l se destinan al control por electroforesis capilar.

El ensayo de electroforesis en chip se basa en los principios de electroforesis en gel con la ventaja de que reduce el tiempo y el consumo de muestra y reactivo. Cada chip de este sistema comercial contiene un conjunto de microcanales interconectados que una vez cargados se convierten en un circuito eléctrico. Los 16 electrodos del equipo *2100 Bioanalyzer* (Agilent) encajan en los 16 pocillos del chip y cada electrodo se conecta a una fuente de alimentación independiente. Las biomoléculas con carga como ADN, ARN o proteínas son electroforéticamente impulsadas y separadas según su tamaño. Los datos se traducen en imágenes similares a las de un gel clásico y a electroferogramas donde se representa la intensidad de fluorescencia frente al tiempo de migración. Gracias a un marcador con fragmentos de tamaño conocido el tamaño de cada fragmento de la muestra se calcula a partir de su tiempo de migración.

Existen distintos chips comercializados por Agilent según el tipo de muestra. Para el análisis de ARN se usó *RNA 6000 Nano*.

Para evaluar la calidad de las preparaciones de ARN, que pueden incluir restos de ADN o fragmentos que se originan por la degradación del ARN, el sistema calcula mediante un algoritmo el número de la integridad del ARN (RIN), que va desde 1, muestra completamente degradada, a 10, muestra sin ninguna degradación. En este trabajo las muestras de ARN extraídas dieron valores de entre 8,5 y 10, lo que significa que son de alta calidad.

Protocolo

1. Pipetear 550 μ l de matriz de gel en un tubo con filtro.
2. Centrifugar a 3600 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Preparar alícuotas de 65 μ l de matriz de gel filtrada en tubos de 1,5 ml libres de ARNasa (suficiente para 2 chips). Guardar a 4 °C las alícuotas que no se necesitan.

4. Atemperar durante 30 minutos el fluoróforo concentrado, mezclar con *vortex* durante 10 segundos y dar un pulso de centrifuga.
5. Añadir 1 μ l de este fluoróforo a la alícuota de 65 μ l preparada en el paso 4 y mezclar bien con *vortex*.
6. Centrifugar a velocidad máxima durante 10 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla es suficiente para preparar 2 chips, pero debe ser usada en el mismo día.
7. Preparar 1 μ l de ARN (50 y 500 ng/ μ l) en un tubo.
8. Desnaturalizar a 70 °C durante 3 minutos junto con la alícuota del marcador de tamaños.
9. Pasar a un baño de hielo y dar un pulso de 20 segundos. Mantener en hielo.
10. Insertar y apretar la jeringa en la plataforma de carga (Fig. 3.1). Colocar un chip *RNA 6000 Nano* en la base de la plataforma de carga de chips. Subir el émbolo de la jeringa hasta la posición 1 ml (presionar la pinza para permitirlo).
11. Pipetear 9 μ l de la mezcla gel-fluoróforo en el centro del pocillo, no en la pared, señalado como G rodeada por un círculo. Cerrar la plataforma y presionar el émbolo de la jeringa hasta que se encaje en la pinza hacia la mitad de su recorrido.



Fig. 3.1. Chip para electroforesis de ARN, izquierda, y plataforma de cebado de chips, derecha.

12. Esperar exactamente 30 segundos y soltar la pinza de retención. El émbolo va retrocediendo por sí mismo. Esperar 5 segundos y subir manual y lentamente el émbolo de la jeringa hasta la posición de 1 ml. Esperar otros 5 segundos.
13. Abrir la plataforma de cebado de chips y pipetear 9 μ l de la mezcla gel-fluoróforo en los dos pocillos marcados como G.
14. Pipetear 5 μ l del estándar interno *ARN Nano 6000* en los 12 pocillos de la muestra y en el pocillo señalado con la escalera.
15. Pipetear 1 μ l de escalera de tamaños en el centro del pocillo señalado con la escalera.
16. Pipetear 1 μ l de muestra en el centro de cada uno de los otros 12 pocillos.
17. Colocar en el Bioanalizador el chip de limpieza, cargado con *RNasa Zap*, cerrar la tapa para lavar los electrodos y esperar 1 minuto. Abrir la tapa y sustituir por el chip de enjuagado, cargado con agua libre de RNasas, cerrar la tapa y esperar 1 minuto. Abrir y retirar el chip de enjuagado.
18. Colocar el chip de electroforesis en el adaptador del *vortex IKA* y agitar durante 1 minuto a 2400 rpm. No sobrepasar la velocidad para evitar salpicaduras entre los pocillos.
19. Es importante ejecutar el chip de electroforesis en el Bioanalizador en 5 minutos, siguiendo las siguientes especificaciones:
 - Kit: *RNA 6000 Nano kit*
 - *Prokaryote Total RNA Nano assay*
20. Presionar el botón de inicio. La electroforesis tarda unos minutos en comenzar.
21. Tras la electroforesis, descontaminar los electrodos del Bioanalizador como se explicó anteriormente.

Soluciones

- ♦ *RNA 6000 Nano kit*, que contiene:
 - Fluoróforo concentrado (Tubo con tapa azul).
 - Estándar interno (Tubo con tapa verde).

- Matriz de gel (Tubo con tapa roja).
- Escalera de fragmentos de RNA *RNA 6000 Nano kit* (Tubo con tapa amarilla). Se preparan alícuotas en tubos limpios de RNAsa con 2 μ l, y se guardan a -20 °C.
- ◆ *RNaseZAP* de Ambion para la descontaminación de electrodos.

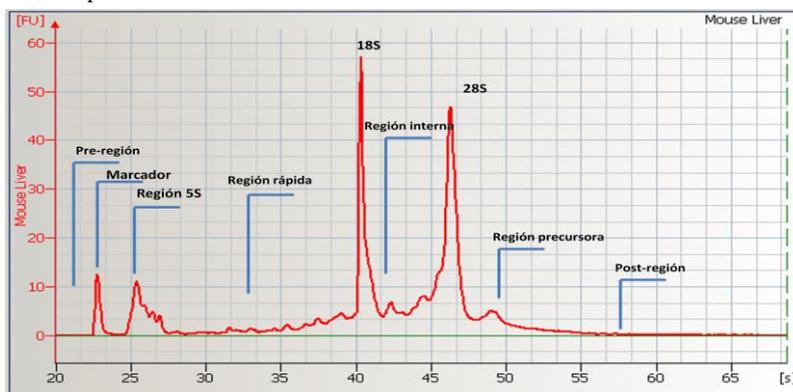


Fig. 3.2. Electroferograma de una muestra de ARN eucariota.

Para el cálculo de la integridad del ARN el estándar interno y los ribosomales mayores (16S y 23S en bacterias o 18S y 28S en células eucariotas) dividen el electroferograma en regiones. Alteraciones o anomalías en el perfil de la línea del electroferograma pueden ser indicadoras de degradación y son críticas si implican fluctuaciones en la línea base, o señales inesperadas en las regiones 5S, rápida o interna, o si producen una mala relación entre las áreas de los fragmentos ribosomales mayores (18S y 28S en la fig. 3.2).

3.12. Análisis de expresión génica mediante RT-PCR y Q-PCR

El análisis de la RT-PCR (*Reverse Transcription PCR*) a tiempo final permite comparar la expresión de un gen en distintas cepas o condiciones, pudiendo establecer, en algunos casos, diferencias de expresión. También sirve para analizar la existencia de transcripción acoplada entre dos genes contiguos.

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

3.12.1. Reacciones de RT-PCR a tiempo final

Esta técnica tiene como objetivo detectar la expresión de un gen por la presencia de su ARNm. Consiste en la amplificación específica mediante PCR de un fragmento monocatenario de ADN, llamado ADN complementario (ADNc), que es generado previamente mediante la acción de la transcriptasa reversa sobre una molécula de ARNm que emplea como molde. La detección y análisis del producto se lleva a cabo una vez finalizado el proceso de amplificación. Por ello, este tipo de RT-PCR se denomina “a tiempo final”.

Los experimentos de RT-PCR se llevaron a cabo mediante el sistema en un sólo paso comercializado por Invitrogen, *Superscript One-Step RT-PCR with Platinum Taq*, donde la síntesis de ADNc y su amplificación por PCR tienen lugar de forma consecutiva en un mismo tubo.

La elección de cebadores en un experimento de RT-PCR es un factor crítico a la hora de obtener amplificación. Los oligonucleótidos se diseñaron con el programa *Vector NTI*, de Invitrogen, para generar productos específicos de entre 300 y 600 pb, aunque en los casos de genes pequeños (menores de 400 pb) el fragmento a amplificar tuvo que ser menor. Se intentó que la zona a amplificar se localizase cerca del extremo 5' del transcrito, para minimizar la posible degradación del molde ya que los extremos 3' de los ARNm son más inestables. La temperatura de hibridación de ambos oligonucleótidos debe ser similar, con un máximo de 5 °C de diferencia entre la pareja.

La temperatura de hibridación y el número de ciclos necesarios para detectar transcritos o diferencias de expresión, se determinaron experimentalmente para cada pareja de cebadores. El número de ciclos dependió, además, de la cantidad de transcrito específico del gen con el que se esté trabajando. Las condiciones generales de las reacciones de RT-PCR fueron las siguientes:

	Temperatura	Tiempo
Síntesis de ADNc		
<i>Retrotranscripción</i>	55 °C	30 minutos
<i>Pre-desnaturalización</i>	94 °C	2 minutos
Amplificación por PCR (20-40 ciclos)		
<i>Desnaturalización</i>	94 °C	30 segundos
<i>Hibridación</i>	T _m de cada pareja de oligonucleótidos menos 5 °C	30 segundos
<i>Extensión</i>	72 °C	15-30 segundos
<i>Extensión final</i>	72 °C	10 minutos

Síntesis de ADNc: consiste en la transcripción reversa del ARN molde. La síntesis de ADNc se consigue en unos 15-30 minutos a una temperatura de 50-55 °C. Inmediatamente después, la transcriptasa reversa es inactivada y la ADN polimerasa es reactivada. El híbrido ARN/ADNc se desnaturaliza durante dos minutos de incubación a 94 °C, como paso previo a la reacción de PCR.

Amplificación por PCR: Se utiliza para amplificar el ADNc obtenido en función del nivel de expresión. Se llevó a cabo en forma de dos bloques: el primero siempre constó de 3 ciclos, en los cuales la temperatura de hibridación era unos 2 °C menos que la temperatura de fusión (T_m) de la pareja de oligonucleótidos; el segundo bloque variaba en número de ciclos, entre 20 y 40, siendo la temperatura de hibridación unos 5-7 °C inferior a la T_m más baja de los dos cebadores, aunque como en cualquier PCR, esta temperatura ha de ser optimizada de manera empírica.

Extensión final: 10 minutos a 72 °C.

En todos los casos las reacciones se llevaron a cabo en 20 µl de volumen final, empleándose como molde 150 ng de ARN total. Dicho ARN fue el mismo que el empleado en el experimento de micromatrices de Pérez-Redondo *et al.* (2012), correspondiente a las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* Δ*argR* en medio MG sin y con suplemento de L-arginina (condiciones A a D, fig. 4.2, apartado 4.1). Se eligió al azar un ARN correspondiente a una de las 4 réplicas biológicas de cada una de las 4 condiciones y posteriormente se repitió el experimento con otras 4 réplicas biológicas, obteniendo en todos los casos los mismos resultados. El resto de componentes se añadieron según las especificaciones del fabricante. Como tampón de la reacción se utilizó el aportado por el kit, que también incluye los desoxinucleótidos trifosfato. La composición de las reacciones fue la que se detalla a continuación:

Componentes	Volumen
Mezcla de Reacción 2X	10 µl
RNA molde (150 ng/µl)	1 µl
Oligonucleótido 1 (10 µg/µl)	1 µl
Oligonucleótido 2 (10 µg/µl)	1 µl
DMSO	0,8 µl
Mezcla SuperScript II TM /Platinum® Taq	0,4 µl
Agua libre de RNasa	5,8 µl

Para descartar que la amplificación se debiese a la presencia de restos de ADN en la muestra se dispusieron las reacciones de control negativo oportunas, consistentes en la preparación de una mezcla idéntica a cada uno de los experimentos de RT-PCR, con la salvedad de que a esta se le añadían 0,16 μl de *Platinum Taq* en lugar de transcriptasa reversa. Dado que la ADN polimerasa no puede emplear ARN como molde, estas reacciones no pueden en ningún caso dar lugar a bandas de amplificación a no ser que se encuentren contaminadas con ADN. Se usó como control endógeno el gen codificante del principal factor sigma de *S. coelicolor* (SCO5820, *hrdB*) de expresión constitutiva. Sirvió para comprobar que la cantidad de ARN molde es la misma entre todas las muestras (datos no mostrados). El tamaño de los productos amplificados se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

En este tipo de técnica la cantidad de producto final obtenido y, por tanto, la intensidad de la banda que se observa en un gel, no es proporcional a la cantidad de molde inicial. El incremento de producto en PCR es sigmoideo y únicamente en la fase exponencial las diferencias de amplificación reflejan diferencias en la cantidad de molde. Por ello se repitió el experimento disminuyendo el número de ciclos hasta el momento en que se encontraban diferencias entre las muestras pertenecientes a distintas condiciones. Posteriormente se estableció un volumen de reacción de 60 μl que se repartía en 3 tubos, los cuales podíamos sacar del termociclador transcurridos los ciclos de interés, por ejemplo 25, 28 y 31 ciclos. Los tubos se sacaron del termociclador en el paso de desnaturalización, y se trasladaron a un termobloque, en el cual se mantuvieron durante 10 minutos a 72 °C, durante el paso de extensión final. De esta forma se consigue una RT-PCR semicuantitativa al comparar el resultado de 3 reacciones de amplificación que proceden de una misma mezcla original en un proceso más repetitivo y fiable que con mezclas individuales.

3.12.2. PCR a tiempo real (Q-PCR)

Esta variante de la PCR se basa en la detección y cuantificación simultáneas de la fluorescencia emitida por los productos de PCR a lo largo de todo el proceso de amplificación (Higuchi *et al.*, 1993).

El diseño de los cebadores se llevó a cabo de manera que amplificasen fragmentos de entre 80 y 200 pb. Se intentó que la complementariedad de los cebadores fuera lo menor posible para evitar la formación de dímeros de oligonucleótidos, los cuales disminuyen la eficiencia de la amplificación y alteran los resultados al producir un aumento inespecífico de la fluorescencia.

3.12.2.1. Retrotranscripción

La síntesis de ADNc se llevó a cabo empleando la retrotranscriptasa *SuperScript™ III*.

Protocolo

1. Mezclar los hexanucleótidos al azar (*Random Primers*, Invitrogen, a una concentración final de 12,5 ng/ μl), el RNA molde (entre 0,5 μg y 3 μg) y los dNTPs (concentración final de 0,7 mM) y añadir agua hasta completar un volumen final de 14 μl .
2. Incubar a 70°C durante 5 minutos y enfriar a 4°C durante un tiempo mínimo de 1 minuto.
3. Añadir 4 μl de Tampón 5X, 1 μl de DTT 0,1 M y 1 μl de retrotranscriptasa (200 unidades). Mezclar con la pipeta e incubar durante 1 hora a 55 °C.
4. Inactivar la retrotranscriptasa incubando a 70 °C durante 15 minutos.
5. Guardar el ADNc a 4 °C si va a usarse en las siguientes 48 horas. Si no es así, almacenar a -20 °C hasta el momento de su uso.

Soluciones

- ♦ SuperScript III (Invitrogen). Enzima suministrada junto con el resto de reactivos: tampón 5X, DTT 0,1 M y hexanucleótidos al azar 50 ng/ μl .

3.12.2.2. PCR a tiempo real

La amplificación y cuantificación del ADN mediante Q-PCR se realizó en el termociclador *StepOnePlus* usando *SYBR Green PCR Master Mix* (ambos de Applied Biosystems), el fluoróforo Sybr sólo emite fluorescencia al unirse a ADN de doble cadena, siendo la cantidad de fluorescencia emitida durante una reacción de PCR proporcional a la cantidad de producto amplificado. Debido a que el Sybr Green se une a cualquier molécula de ADN de doble cadena, es muy importante que en la reacción de PCR no se amplifiquen productos inespecíficos ni se formen dímeros de oligonucleótidos.

Las reacciones se prepararon de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, en un volumen final de 20 μ l. En los experimentos de validación de transcriptómica como molde se utilizaron 2 μ l de cDNA sintetizado en el apartado anterior y que, según el gen analizado, se utilizó sin diluir o diluido de 2 a 10 veces, de manera que el inicio de amplificación del producto (ciclo umbral, Ct) se detectara entre los ciclos 15 y 25. La concentración final de oligonucleótidos fue de 300 μ M, obteniéndose con ella la mayor amplificación de producto específico en el menor Ct, y sin formación de dímeros de oligonucleótidos.

Para comprobar que en las muestras de ARN no existía contaminación con ADN, se llevaron a cabo controles negativos donde se sustituyó el ADNc molde por ARN.

La técnica de Q-PCR se utilizó también para comprobar el enriquecimiento en fragmentos diana de ArgR en las muestras de cromatina inmunoprecipitada listas para ser usadas en una hibridación CHIP on chip (apartado 3.14). En este caso, el ácido nucleico de partida ya es ADN, y por tanto no hay paso de retrotranscripción. Como molde para Q-PCR se utilizaron 10 ng de ADN obtenido de la inmunoprecipitación de la cromatina.

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

	Temperatura	Tiempo
Activación de la polimerasa	50 °C	2 minutos
Desnaturalización inicial	95 °C	10 minutos
PCR (40 ciclos)		
Desnaturalización	95 °C	15 segundos
Hibridación/Extensión	60 °C	1 minuto

En todos los casos, finalizado el programa se llevó a cabo una curva de disociación para detectar la amplificación de posibles productos inespecíficos o la formación de dímeros de oligonucleótidos. Además se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2 % para separar y visualizar los productos amplificados.

3.12.2.3. Cuantificación de la expresión génica

La cuantificación del producto durante una PCR a tiempo real debe producirse en la fase exponencial de amplificación antes de que los componentes de la reacción comiencen a ser limitantes, ya que solo entonces la cantidad de producto amplificado es proporcional a la cantidad de molde inicial (Bustin, 2000). Debido a esto, la mayoría de los métodos de cuantificación se basan en la determinación del ciclo umbral o Ct (*Threshold Cycle*), definido como el ciclo en el cual la fluorescencia emitida por el producto sobrepasa el umbral de la fluorescencia basal.

La determinación de la línea base y del ciclo umbral se llevó a cabo gracias a la aplicación informática suministrada con el termociclador (*Sequence Detection Software*, Applied Biosystems).

La cuantificación relativa de las diferencias de expresión de un gen diana entre las cepas mutante y control se realizó a través del método del $\Delta\Delta$ Ct (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001), que requiere la

co-amplificación de un gen de referencia cuya expresión no muestre diferencias entre las cepas analizadas, permitiendo compensar pequeñas variaciones en la cantidad de RNA molde presente en las reacciones, originadas por errores en la cuantificación y pipeteo de las muestras. Como gen de referencia se empleó *hrdB*, que codifica un factor sigma de expresión constitutiva en *Streptomyces* (Buttner *et al.*, 1990).

La aplicación del método del $\Delta\Delta Ct$ requiere que la eficiencia de amplificación de los cebadores empleados se encuentre próxima al 100 %. La eficiencia de cada pareja de oligonucleótidos se determinó amplificando diluciones seriadas de ADN genómico (6 diluciones diferentes, cada una de ellas amplificadas por triplicado), y midiendo la pendiente de la recta resultante de la representación los Ct obtenidos frente al logaritmo de la concentración de ADN. Se consideraron valores de pendiente comprendidos -3,6 y -3,1 como válidos, lo que indica una eficiencia del 90-100 %.

Según el método del $\Delta\Delta Ct$, el valor relativo de expresión de un gen en la cepa mutante viene dado por $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct$ indica la diferencia entre los ΔCt de ambas cepas analizadas, obtenidos cada uno de ellos a partir de la diferencia del Ct del gen diana y del gen de referencia en cada cepa. Valores relativos de expresión superiores a 1 indican que la expresión del gen analizado se encuentra sobreexpresado en la cepa mutante, mientras que valores inferiores a 1 indican su represión.

$$\text{Valor relativo de expresión} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{mutante}} - \Delta Ct_{\text{control}}$$

$$\Delta Ct_{\text{mutante}} = Ct_{\text{diana}} - Ct_{\text{hrdB}}$$

$$\Delta Ct_{\text{control}} = Ct_{\text{diana}} - Ct_{\text{hrdB}}$$

3.13. Análisis de expresión génica mediante micromatrices

La palabra *microarray* (micromatriz) deriva del griego *mikro* (pequeño) y del inglés *array* (distribución ordenada). Por tanto las micromatrices permiten el depósito de miles de puntos conteniendo sondas de ADN sobre una superficie sólida de vidrio, plástico o incluso de silicio, para tener una visión instantánea de actividad de genomas completos o de un grupo selecto de genes o región de ADN. En nuestro caso se utilizaron para detectar genes afectados por la ausencia del regulador ArgR mediante la comparación de los niveles de expresión entre las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$.

Tras cohibridar las muestras marcadas fluorescentemente, un lector excita a diferentes longitudes de onda la micromatriz y compara los resultados obtenidos para la emisión de cada fluorocromo. De modo que si una sonda devuelve una mayor cantidad de fluorescencia verde, se interpretará como mayor proporción del ácido nucleico marcado con Cy3. Si por el contrario, la mayor emisión corresponde al color rojo, se identificará con una mayor proporción del ácido nucleico marcado con Cy5. Finalmente, la emisión de fluorescencia en color amarillo indica una misma proporción de ácido nucleico marcado con Cy5 y marcado con Cy3.

Las micromatrices de *S. coelicolor* se adquirieron a Oxford Gene Technology (OGT). Son micromatrices impresas sobre soporte de vidrio del tamaño de un portaobjetos. Elegimos el formato 4x44k, lo que significa que en cada portaobjetos hay 4 micromatrices independientes e idénticas, cada una con 43798 sondas de 60 nucleótidos de longitud. Dichas sondas comprenden ORFs y regiones intergénicas del genoma de *S. coelicolor*.

Se realizaron tres réplicas biológicas para cada una de las cepas, *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$ cultivadas en medio MG, y se tomaron cinco tiempos de cada una de ellas: 32, 42, 49, 56 y 66 horas para aislar el ARNm. Mediante retrotranscripción se obtuvo ADNc marcado fluorescentemente con Cy3. El ADN genómico (ADNg) de la cepa M145 marcado con Cy5 se usó como ácido nucleico de referencia para todas las hibridaciones. Este se extrajo de un cultivo en fase estacionaria, para evitar que esté más representada la región central donde se origina la replicación, se purificó por el método adecuado y se disolvió en Tris-HCl 10 mM pH 8.

El éxito de un ensayo de micromatrices depende en gran parte de la calidad de la muestra obtenida. El RNA total debe estar intacto y puro, no debe contener proteínas ni DNA contaminante. Para ello se exige que sea evaluada su cantidad, calidad e integridad.

Los procedimientos de marcaje, hibridación y detección se indican en los siguientes apartados. Se ha procurado especial cuidado en cada paso para introducir la menor variabilidad técnica posible.

3.13.1. Marcaje y purificación de ácidos nucleicos para micromatrices

A continuación se detallan los protocolos de marcaje de ADNc con Cy3-dCTP a partir de ARN y el de ADNg con Cy5-dCTP. Durante todo el procedimiento es necesario usar puntas, microtubos y agua MilliQ libre de RNasas mientras se sintetiza el ADNc. También es conveniente evitar la exposición de los fluoróforos a la luz directa o intensa, por lo tanto, mantener en oscuridad el reactivo y las mezclas. El Cy5 es especialmente sensible al ozono y a la humedad.

3.13.1.1. Marcaje del ARN total. Síntesis y marcaje de ADNc con Cy3-dCTP

Protocolo (A. Rodríguez-García, Instituto de Biotecnología de León)

1. Para cada hibridación del cristal de 4x44K preparar en microtubo de 0,2 ml la siguiente mezcla: 4,2 μg de ARN total, 0,6 μl de cebadores, y agua MilliQ hasta un volumen de 5,9 μl .
2. Desnaturalizar en termociclador a 70 °C durante 10 minutos.
3. Enfriar en hielo al menos durante 1 minuto y centrifugar a máxima velocidad durante 10 segundos. Mantener en hielo.
4. Por lo general se hibridaron dos cristales en cada ocasión, de manera que se prepararon 8 ADNc a partir de sus ARN. La tabla indica los volúmenes necesarios para 1 o 8 reacciones de marcaje considerando un exceso de mezcla (margen de seguridad) del 12 %: La reacción simple (1 reacción) está indicada como 0,35X e implica la reducción del volumen de todos los reactivos respecto a lo indicado por el manual de Invitrogen.

	0,35X	Para 8 reac. 0,35X + 12 %
<i>Solución First Strand 5X</i>	2,10 μl	18,8 μl
<i>DTT 100 mM</i>	1,05 μl	9,4 μl
<i>dNTP-R</i>	0,21 μl	1,88 μl
<i>Cy3-dCTP 1 mM</i>	0,53 μl	4,7 μl
<i>Superscript III (o II)</i>	0,70 μl	6,27 μl
<i>Volumen final</i>	4,59 μl	41,1 μl

5. Añadir 4,59 µl de la mezcla madre a las muestras de ARN-cebadores. Mezclar bien pipeteando, evitar la formación de burbujas.
6. Incubar en termociclador: 25 °C / 10 minutos y 46 °C / 5-6 horas. Si se deja por la noche, se incluye un paso final a 4 °C.
7. Añadir 3,5 µl de NaOH 1 N y mezclar bien.
8. Incubar en termociclador a 70 °C durante 10 minutos.
9. Añadir 3,5 µl de HCl 1 N y mezclar bien. Es muy importante que los volúmenes de base y ácido se añadan con precisión (con una misma pipeta) para neutralizar la solución.

Soluciones

- ♦ Muestras de ARN total a una concentración mínima de 0,66 µg/µL. Si no se alcanza, el ARN se puede concentrar en centrifuga de vacío a temperatura ambiente, pero sin llegar a desecarlo puesto que su resuspensión sería trabajosa.
- ♦ Cebadores aleatorios (hexámeros, 3 µg/µl, Invitrogen).
- ♦ Transcriptasa reversa SuperScript III (200 u/µl), DTT y solución First Strand 5X (kit de Invitrogen).
- ♦ Agua sin ARNasas.
- ♦ Mezcla de dNTPs para marcaje de ARN, "dNTP-R" (dA/G/TTP: 25 mM; dCTP: 10 mM). Se preparan a partir de soluciones 100 mM independientes de dATP, dCTP, dGTP, dTTP (New England Biolabs).
- ♦ Cy3-dCTP 1 mM (GE Healthcare).
- ♦ Soluciones comerciales de NaOH 1 N y HCl 1 N (Sigma).

3.13.1.2. Marcaje de ADN genómico con Cy5-dCTP

Protocolo (A. Rodríguez-García, Instituto de Biotecnología de León)

1. Preparar en microtubo de 1,5 ml 3 µg de ADNg, 20 µl de cebadores aleatorios, y agua MilliQ hasta completar 40 µl. Mezclar bien pipeteando.
2. Desnaturalizar en termobloque: 95 °C / 5 minutos.
3. Enfriar en hielo durante al menos 5 minutos, agitar en *vortex* y centrifugar a máxima velocidad durante 10 segundos.
4. Manteniendo el microtubo en hielo, añadir a la mezcla anterior, en el siguiente orden: 5 µl de nucleótidos y 3,75 µl de Cy5-dCTP. Agitar en *vortex* y centrifugar a máxima velocidad durante 10 segundos. Añadir 1,5 µl de Exo-Klenow.
5. Tras añadir la polimerasa, pipetear suavemente para homogeneizar y transferir a un microtubo de 0,2 ml.
6. Incubar en el termociclador a 37 °C durante toda la noche.

Soluciones

- ♦ Muestra de ADN total a una concentración mínima de 150 ng/µl.
- ♦ Sistema de marcaje BioPrime Array CGH Genomic Labeling Module (Invitrogen), que incluye:
 - *2.5X Random Primers Solution* (octámeros, 750 µg/ml).
 - *10X dCTP Nucleotide Mix* dCTP
 - Fragmento *Exo-Klenow* de la polimerasa de ADN (40 U/µl; 31 µl)
 - Solución de paro (EDTA 0,5 M pH 8,0).
- ♦ Cy5-dCTP 1 mM (GE Healthcare).

3.13.2. Purificación de los marcajes de ácidos nucleicos con Cy3 y Cy5

Para la eliminación de los cebadores, nucleótidos, enzimas y sales de los marcajes se usó *MinElute PCR purification kit* (Qiagen), evitando en todo momento la luz directa. Una vez purificados, los marcajes se mantienen a -20 °C en oscuridad hasta su uso. Se deben evitar los ciclos de congelación-descongelación.

Protocolo

1. Añadir 5 volúmenes de la solución PB a cada solución de marcaje.

2. Mezclar bien, cargar las minicolumnas y centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto.
3. Comprobar la coloración de la membrana de la minicolumna y del eluido, rojo/rosa para el marcaje con Cy3, azul para el marcaje con Cy5. Si la membrana no tiene color, el marcaje habrá sido poco eficiente. Descartar el eluido.
4. Añadir 500 µl de solución PE a las minicolumnas para el primer lavado de las membranas.
5. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto.
6. Añadir 250 µl de solución PE a las minicolumnas para el segundo lavado de las membranas y centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto.
7. Descartar el eluido del tubo de colección.
8. Centrifugar 1 minuto a velocidad máxima para eliminar los restos de etanol procedentes de la solución PE.
9. Transferir las minicolumnas a microtubos de 1,5 ml sin tapa.
10. Añadir 10 µl de solución EB (Tris-HCl 10 mM pH 8,5) sobre el centro de la membrana.
11. Mantener 1 minuto a temperatura ambiente.
12. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto.
13. Añadir otros 10 µl de solución EB calentada a 60 °C, distribuyéndolos en la zona de la membrana que retenga color.
14. Mantener 1 minuto a temperatura ambiente.
15. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto.
16. Repetir la elución con los 20 µl recogidos del microtubo y vueltos a aplicar sobre la membrana.
17. Mantener 1 minuto a temperatura ambiente.
18. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto.
19. Comprobar los restos de coloración de la membrana (debe quedar blanquecina) y decidir si se repite la elución.
20. Pasar el eluido a un microtubo con tapa para su conservación. Medir el volumen recuperado.
21. Reservar 1,5 µl para medidas espectrofotométricas y almacenar el resto del eluido (ver apartado siguiente).

Soluciones

- ♦ Kit MinElute PCR purification (Qiagen), que incluye las soluciones PB, PE y EB y las columnas de purificación.

3.13.3. Cuantificación de los ácidos nucleicos marcados con Cy3 y Cy5

Los marcajes se valoran por un barrido espectrofotométrico con el *NanoDrop ND-1000*. Esto permite calcular la cantidad de ácido nucleico sintetizado y la eficiencia en la incorporación de marcaje, valores necesarios para determinar qué cantidad de muestra marcada se dispone en la hibridación.

Protocolo

1. En el programa de control del *NanoDrop ND-1000*, elegir la opción “Microarray”.
2. Hacer doble blanco con el tampón EB.
3. Para el marcaje del ADNg se utiliza la opción “DNA-50” mientras que para el marcaje del ADNc sintetizado a partir de ARN total se utiliza la opción “ssDNA-33”.
4. Aplicar 1,5 µl de cada marcaje.
5. Tomar nota de los valores de concentración de ADN y de marcaje, que sirven para los cálculos posteriores.

Para la hibridación de las matrices 4x44K es necesario un rendimiento mínimo de la síntesis de 825 ng (concentración obtenida x volumen eluido), una actividad específica (Cy3 pmol / ADN µg) de 40 pmol/µg y 20 pmoles de ADNg marcado con Cy5. La frecuencia de incorporación de nucleótidos marcados (FIC) se indica en porcentaje y se calcula así $FIC = (Cy3 \text{ pmol} \times 330 \text{ pg/pmol} \times 10^{-3} \text{ ng/pg}) / \text{ADNc ng}$. Los valores deben oscilar entre 2 y 5 % según Corning Life Sciences.

3.13.4. Hibridación de micromatrices 4x44K

Una vez decididos los volúmenes de ADN_g de *S. coelicolor* M145 marcado con Cy5 (común a todas las hibridaciones) y de cada uno de los ADN_c marcados con Cy3 proveniente de los distintos tiempos de cultivo en MG de *S. coelicolor* Δ argR o *S. coelicolor* M145, los dos tipos de ácidos nucleicos se aplicaron en cada una de las matrices de los cristales de OGT. Se procuró incluir en cada cristal la máxima aleatoriedad posible en cuanto a la procedencia de los ADN_c, teniendo en cuenta que se trataba de tres réplicas biológicas de dos cepas y cinco tiempos de fermentación, es decir, 30 muestras de ADN_c combinados en 8 cristales de formato 4x. Es necesario el uso de guantes sin polvo para evitar el depósito de partículas en las micromatrices que pudiera interferir en la hibridación y en la lectura, así como trabajar en condiciones de luz tenue cuando se maneje el ADN marcado con los fluoróforos.

3.13.4.1. Preparación de la solución de hibridación y las mezclas de los marcajes

Protocolo

1. Preparar la mezcla madre para las 4 hibridaciones de un cristal siguiendo el orden de la tabla. Mezclar bien pipeteando.

Para 4 hibridaciones	
<i>MES 12X</i>	44,0 μ l
<i>NaCl 5 M</i>	105,6 μ l
<i>Formamida 100 %</i>	105,6 μ l
<i>EDTA 0,5 M</i>	21,12 μ l
<i>Tritón 10 %</i>	52,8 μ l

2. Preparar en microtubos de 1,5 ml las 4 mezclas de marcajes por cristal. Según las indicaciones del protocolo de Invitrogen, se añaden 20 pmoles del marcaje con ADN_g, y 825 ng de ADN_c marcado con Cy3. Completar con agua MilliQ hasta un volumen de 41,4 μ l. En el caso de que las muestras de Cy3-ADN_c o Cy5-ADN_g se encontraran muy diluidas, se puede recurrir al desecado de los marcajes, en centrífuga de vacío (sin calor) en un microtubo de 1,5 ml.
3. Desnaturalizar en termobloque a 94 °C durante 3 minutos.
4. Inmediatamente dar un pulso en microcentrífuga.
5. Añadir 68,57 μ l de solución madre del punto 1 del protocolo a los 41,4 μ l de las mezclas de marcajes (volumen final, 110 μ l). Mezclar bien pipeteando y evitar las burbujas.
6. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto para eliminar las posibles burbujas. Mantener en oscuridad y a temperatura ambiente mientras se prepara el montaje.

Soluciones

- ♦ Muestras de ADN_c marcado con Cy3.
- ♦ Muestra de ADN_g marcado con Cy5. Por lo general el ADN_g-Cy5 es referencia común y se utiliza el mismo marcaje para todas las hibridaciones de un experimento, o para sucesivos experimentos y poder comparar entre ellos.
- ♦ NaCl 5 M, Sigma.
- ♦ MES 12X, mezclar 17,6 g de MES ácido monohidratado libre y 48,3 g MES en sal sódica (ambos de Sigma). Añadir agua hasta 200 ml. Ajustar pH a 6,5 con HCl 1 M. Completar con agua hasta 250 ml. Filtrar con un filtro estéril con un diámetro de poro de 0,45 μ m.
- ♦ Tritón 10 %, Sigma.
- ♦ Formamida 100 %, Sigma. Manejar en campana extractora.
- ♦ EDTA 0,5 M, Sigma.

3.13.4.2. Montaje e incubación de las hibridaciones

Las hibridaciones no se aplican directamente sobre la matriz, sino sobre el cristal que las cubre, y que está compartimentalizado en 4 áreas, correspondientes a las 4 matrices del porta de formato 4x44K, gracias a unas gomas adheridas a su superficie. Una vez aplicadas las muestras, se enfrenta el cristal al porta con las matrices, y el conjunto se encierra en una cámara que evita que el conjunto se mueva (fig. 3.3). Una vez ensamblado el conjunto, las hibridaciones se incuban en un sistema rotatorio para asegurar el movimiento de la solución de hibridación por toda el área de la matriz. Tanto los cubres compartimentalizados como las cámaras de hibridación fueron adquiridas a Agilent.

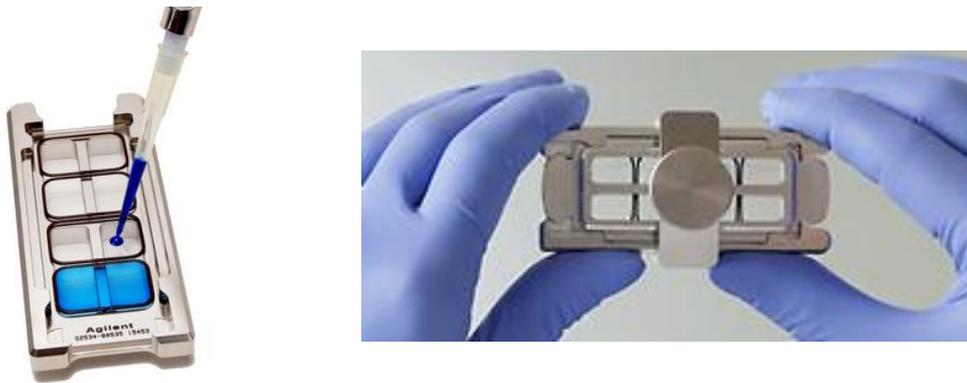


Fig. 3.3. Izquierda, cristal cubre matriz de formato 4x encajado en la parte inferior de la cámara de hibridación. La coloración azul no corresponde a la de una muestra real. Derecha, cámara de hibridación cerrada con un montaje de cristales 4x lista para la incubación.

Protocolo

1. Revisar el portaobjetos con las micromatrices y el cristal cubreobjetos: que no tengan polvo ni defectos visibles. Eliminar el polvo con aire comprimido (cuidando con pulsar suavemente para que no expulse líquido en vez de gas). Tener especial cuidado con la cara impresa.
2. Anotar el número de serie del porta y la procedencia del ADNc que será aplicado en cada matriz de izquierda a derecha, comenzando, por ejemplo, por el lado del código de barras del cubreobjetos (es importante seguir un orden sistemático para saber a quién corresponde cada hibridación en el análisis posterior).
3. Encajar el cubreobjetos en la base de la cámara.
4. Poner 100 μ l de mezcla de hibridación tomados mediante carga forzada de la pipeta sin tocar las gomitas. Esto hace que quede en la punta una pequeña cantidad de líquido, de modo que evita formar burbujas al expulsar el líquido sobre el centro de cada compartimento del cubreobjetos. Las burbujas más pequeñas suelen desaparecer tras unos minutos de incubación.
5. Una vez depositadas las 4 mezclas de hibridación en sus 4 compartimentos posicionar el porta con la cara impresa hacia abajo, sujetándolo por la parte de la etiqueta y acercarlo al cubre haciendo tope con un dedo para evitar que se deslice. Bajar suavemente hasta que ambos cristales contacten.
6. Situar la parte superior de la cámara de hibridación sobre el conjunto previo. Mantener en horizontal el montaje.
7. Deslizar el tornillo de sujeción en el centro de la cámara y atornillar con firmeza.
8. En orientación vertical, rotar el conjunto 2-3 veces en sentido horario para humedecer las superficies.
9. Inspeccionar la formación de una burbuja única en cada compartimento y su movimiento libre.
10. Soltar las burbujas fijas mediante golpecitos con el extremo redondeado de un lápiz sobre el cubre.
11. Incubar a 55 $^{\circ}$ C durante 67 horas en un horno de hibridación con rotación a una velocidad de 4 rpm, por ejemplo en el horno Grant Boekel.
12. Es necesario revisar las burbujas y destruir las inmóviles durante los días intermedios. Evitar la luz intensa.

3.13.4.3. Lavados de la hibridación

Para los lavados utilizamos las soluciones y el protocolo de Agilent. Antes de comenzar el protocolo, encender el ordenador y el escáner Agilent. Iniciar el programa ScanControl para que se enciendan los láseres del lector y estén a máximo rendimiento en el momento de la lectura.

Protocolo

1. Rotular y llenar con 50 ml dos tubos con la solución de lavado I (el tubo para desprender el cubreobjetos del porta con las matrices y el tubo para el primer lavado) y un tubo con la solución de lavado II.
2. Suplementar con 25 μ l de *Triton X-102* las soluciones de lavado I y II.
3. Mantener la solución II durante un mínimo de 30 minutos a 37 °C.
4. Disponer un tubo de 50 ml con solución de estabilización y secado, que se reutiliza para al menos 10 cristales.
5. Desmontar la cámara de hibridación y sumergir en el primer tubo con solución de lavado I el conjunto cristal-cubreobjeto con las etiquetas hacia la superficie del líquido y desacoplar ambos cristales haciendo palanca entre ambos con las pinzas.
6. Separar ambos cristales evitando que el cubre raye la matriz y transferir el cristal con esta sujetando exclusivamente el área del código de barras o los bordes, al tubo de 50 ml con la solución de lavado I a temperatura ambiente. Evitar cualquier contacto con el área impresa de la micromatriz.
7. Cerrar el tubo y ponerlo en horizontal y con la cara impresa del cristal hacia arriba en una caja opaca. Evitar el deslizamiento del tubo dentro de la caja.
8. Agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 85 rpm. El largo del tubo se colocará paralelo al movimiento del agitador.
9. Sacar el cristal con las pinzas lentamente para evitar burbujas y transferirlo sin demora al tubo con la solución II precalentada a 37 °C.
10. Mantener en agitación horizontal a temperatura ambiente y en oscuridad a 85 rpm exactamente durante 1 minuto.
11. Retirar lentamente el cristal e introducirlo en el tubo con 50 ml de la solución de estabilización y secado durante unos segundos y sacarlo lentamente. Se puede volver a introducir si hubiese una burbuja o manchas.
12. Guardar el cristal en un envase adecuado en oscuridad hasta la lectura de la fluorescencia que debe ser inmediata.

Soluciones

- ♦ Soluciones de lavado I, lavado II y Triton X-102, de *Agilent Gene Expression Wash Tampon Kit*.
- ♦ Solución de estabilización y secado (Agilent)

3.13.4.4. Lectura de la fluorescencia

Las señales de fluorescencia se leyeron en un equipo G2565BA de Agilent. Este escáner posee dos láseres, que excitan, entre otros, los fluoróforos Cy3 y Cy5. Cuando las señales fluorescentes hibridadas con las sondas del cristal emiten fluorescencia de emisión, la señal es amplificada y convertida en una señal digital que permite su cuantificación. El programa ScanControl genera dos archivos Tiff, uno por cada potencia de los láseres de excitación, que pueden visualizarse mediante cualquier programa de imagen, y donde se muestra en falso color el resultado de la cohibridación de los ácidos nucleicos marcados con las sondas de la micromatriz. Para el análisis de los datos de intensidades se usa el programa FeatureExtraction.

3.13.4.5. Procesado de los datos de las micromatrices

Una vez obtenidos los datos numéricos resultantes de las intensidades de las señales de hibridación, el Dr. Antonio Rodríguez García realizó un análisis en R con el paquete *limma* incluido en el proyecto Bioconductor (Linear Models for Microarray data). Los resultados estadísticos los agrupó con el programa *maSigPro* (microarray Significant Profiles), además de analizarlos con *Betr* (Bayesian Estimation of Temporal Regulation) y hacer un agrupamiento alternativo con *BHC* (Bayesian Hierarchical Clustering). Finalmente, se exportaron los resultados a un archivo Excel incluido en el CD anexo a esta memoria.

3.14. Análisis mediante *ChIP on chip*

La técnica ChIP on chip combina la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) con la tecnología de las micromatrices (chip) y sirve para estudiar las interacciones entre proteínas y ADN *in vivo*. Se utilizó por primera vez para identificar sitios de unión de factores de transcripción en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Lieb *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2000; Iyer *et al.*, 2001). En 2002, el grupo de Richard Young (Lee *et al.*, 2002) determinó la posición en el genoma de 106 factores de transcripción en levaduras. Otras aplicaciones para ChIP on chip incluyen replicación de ADN, recombinación, y estructura de la cromatina. Desde entonces, esta técnica se ha convertido en una valiosa herramienta para determinar mapas genómicos de las modificaciones de histonas y otros factores de transcripción. El análisis del genoma completo permite determinar la localización de los sitios de unión de casi cualquier proteína.

Esta técnica, simplificada en la fig. 3.4, consiste en el uso de un anticuerpo que reconozca la proteína de interés y consta básicamente de dos pasos: fijación de las proteínas al ADN mediante la adición de formaldehído e inmunoprecipitación específica de un tipo de complejo proteína-ADN al usar anticuerpos específicos. Después se revierte el entrecruzamiento para liberar el ADN implicado en la unión con la proteína de estudio y este se marca con fluorescencia. Finalmente, estos fragmentos se aplican sobre la superficie de la matriz y, tras un tiempo suficiente de hibridación, se lee la fluorescencia. Los datos de fluorescencia son traducidos a valores numéricos para poder realizar un análisis.

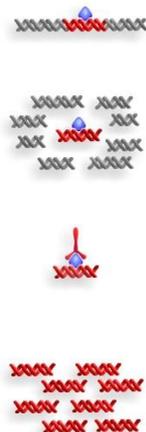


Fig. 3.4. Esquema del proceso de fijación de la proteína a su diana, fragmentación del ADN, captura selectiva mediante anticuerpo de los complejos proteína-ADN y recuperación de los fragmentos diana carentes de proteína.

En nuestro caso, la proteína de estudio es ArgR y se utilizaron dos tipos de anticuerpos: monoclonales contra la etiqueta Strep, cuando utilizamos las cepas complementadas *S. coelicolor* Δ argR pMS83-argRStrep y *S. coelicolor* Δ argR pMS83-StrepargR (ver apartado 4.2), y policlonales contra ArgR.

El protocolo descrito se basa en las indicaciones de Lee *et al.* (2006) y del grupo del Dr. Smith en la Universidad de Surrey, pero ha sido desarrollado por nosotros en Inbiatec.

3.14.1. Material de partida: cultivos

El entrecruzamiento o unión de las proteínas que interaccionan con ADN a sus dianas se produce *in vivo* por incubación con formaldehído.

Protocolo

1. Crecer 100 ml de cultivo de *Streptomyces* a 30 °C y 300 rpm durante 32 horas en medio MG (sin y con L-arg), hasta una $DO_{600} = 1$ (1 mg/ml de peso seco).

2. Añadir formaldehído hasta una concentración final del 1 % e incubar a 30 °C en agitador durante 20 minutos.
3. Añadir glicina a concentración final 0,5 M e incubar 5 minutos más. La glicina inutiliza el exceso de formaldehído que no se haya unido al ADN.
4. Centrifugar las células a 4400 rpm durante 10 minutos y lavar el pellet con 20 ml de PBS 1X dos veces. Congelar el pellet a -20 °C o continuar el protocolo.

Soluciones

- ♦ Formaldehído 37 % de Prolabo.
- ♦ Glicina 2,66 M.
- ♦ Tampón PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM. El pH se ajusta a 7,4.

3.14.2. Ruptura del micelio y sonicación del ADN

Este punto es el más crítico del procedimiento y se realiza por agitación mecánica de la muestra en una cápsula que contiene una bola de acero y bolas de vidrio, cuidando que el material biológico permanezca siempre congelado. El polvillo obtenido se disuelve para someter a sonicación. Así, el micelio que no se haya roto lo hará ahora, de modo que el rendimiento de cromatina fragmentada será mayor que con otros protocolos, como el de ruptura del micelio mediante el uso de FastPrep.

Protocolo

5. Preparar un baño criogénico con sal y etanol para la sonicación y así evitar que la energía generada durante la producción de ultrasonidos recaliente la muestra en exceso.
6. El micelio, sin descongelar, se introduce en una cápsula de teflón de 7 ml (Shaking container teflon, Sartorius) y se rompe mecánicamente con *Mikrodismembrator U* por golpeado y cizallado con una bola de acero cromado de 10 mm de diámetro y bolas de vidrio (*lysing matrix B*). Es muy importante mantener las mitades abiertas de la cápsula de teflón, la junta circular y la bola de acero cromado fríos por inmersión en nitrógeno líquido. El tubo de *lysing matrix B* se introduce también brevemente en nitrógeno líquido. El resto de tubos y soluciones se mantienen en hielo. Romper el micelio durante 2 pulsos de 1 minuto a 2000 rpm. Sumergir la cápsula en nitrógeno líquido entre los dos pulsos de ruptura.
7. Transferir con una espátula fría el micelio pulverizado y congelado a un tubo de polipropileno de 10 ml metido en baño criogénico.
8. Añadir 7,5 ml de tampón IP con una pastilla del inhibidor de proteasas y resuspender el micelio. Invertir el tubo para que el micelio se embeba del tampón y posteriormente homogeneizar por pipeteo. Dividir el volumen en cinco alícuotas de 1,5–2 ml en tubos de 2,2 ml. No importa que en este proceso se arrastre parte de las bolas, ya que es probable que ayuden en el proceso de ruptura de la cromatina. Se retiran 35 µl como tiempo de referencia inicial (t=0) para la visualización en gel.
9. Sonicar. Debe ponerse a punto para cada punta y/o aparato de sonicación utilizado. En nuestro caso con *Ultrasonic Processor XL 2020*, Misonix Inc., se utilizó una punta de 2,4 mm de diámetro durante 10 segundos (15 segundos apagado), y se mantuvo la muestra siempre en frío. Evitar que la punta toque las paredes del tubo y que se forme espuma. Dar entre 10 y 14 pulsos de sonicación, sacando alícuotas a los 10, 12 y 14 pulsos. El grado de ruptura que se necesita se determina experimentalmente (ver apartado 4.6.1).
10. Lavar los lisados por centrifugación a 4 °C y 12000 rpm durante 10 minutos. Descartar el pellet. Almacenar la cromatina a -20 °C.

Soluciones

- ♦ Tampón IP: Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; Triton X-100 0,5 %.
- ♦ Pastillas de inhibidor de proteasas (*Protease Inhibitor Cocktail Tablets*). Roche.
- ♦ Bola de acero cromado (*Grinding balls of chromium steel*). Sartorius.
- ♦ Bolas de vidrio (*Lysing Matrix B*). QBIogene.

3.14.3. Visualización en el gel

El grado de ruptura de la muestra se determina de forma empírica, para lo cual es necesario aislar únicamente el ADN de las alícuotas recogidas en el paso anterior para poder ver el tamaño de sus fragmentos en el gel de agarosa. Para ello es suficiente tratar dichas alícuotas con proteinasa K en una solución con el detergente SDS, que facilita su acción de degradación de las proteínas. El rango óptimo de fragmentos de ADN debe oscilar entre 0,5 y 1 kb.

Protocolo

11. Añadir 10 µl del tampón de elución 5X y 5 µl de proteinasa K a cada alícuota tomada en el paso anterior. Incubar en un termobloque o termociclador a 42 °C durante 2 horas y luego a 65 °C durante un mínimo de 6 horas. Inactivar la proteinasa K mediante un choque térmico a 80 °C durante 10 minutos.
12. Centrifugar las alícuotas a 13200 rpm durante 10 minutos. Tomar el sobrenadante sin aproximarse con la punta al precipitado, porque se resuspende con relativa facilidad.
13. Correr 20 µl de muestra con 10 µg/ml de RNAsa en un gel de agarosa al 1 % y determinar qué fracciones deberían seguir el protocolo de inmunoprecipitación. Para evitar elegir una muestra demasiado rota, es conveniente hacer la comparación con muestras de más y menos ciclos.

Soluciones

- ♦ Tampón de elución 5X. SDS 5 %; TE 5 M pH 7,6
- ♦ Proteinasa K. 10 mg/ml, Roche.

3.14.4. Inmunoprecipitación

Una vez elegida la alícuota de sonicación, sobre la muestra de ADN fragmentada y con proteínas reversiblemente unidas, se produce una reacción antígeno-anticuerpo específica y dirigida. A su vez, el anticuerpo se liga a una resina (*Ultralink immobilized Protein A/G beads*), lo que permite una recuperación selectiva de los fragmentos de ADN que unen la proteína de interés, en nuestro caso ArgR.

Hay que reservar 200 µl de la muestra de sonicación elegida para el control de cromatina sin inmunoprecipitar. Esta muestra se incorpora en el protocolo en el paso 28 de “lavados y elución”.

Protocolo

14. Para cada fracción de cromatina lavar 100 µl de resina de la siguiente manera: añadir a la resina 0,5 ml de PBS con inhibidor de proteasas. Mezclar en un sistema de noria giratoria como *Intelli-Mixer RM-2* durante 5-10 minutos. Centrifugar de 2 a 3 minutos a 3000 rpm y 4 °C. Retirar el sobrenadante con cuidado, porque se resuspende fácilmente. Repetir el lavado 3 veces.
15. Resuspender la resina en ½ volumen de PBS con 5 % BSA e inhibidor de proteasas.
16. Tomar 100 µl de resina tratada y añadir 1 ml de cromatina. Incubar a 4 °C y 20 rpm durante 3-4 horas.
17. Centrifugar a 3500 rpm durante 1 minuto a 4 °C. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
18. Montar las reacciones de inmunoprecipitación con 1 ml de cromatina y 20 µg de anticuerpo.
19. Incubar a 4 °C a 20 rpm durante toda la noche.
20. Lavar 100 µl de resina 3 veces como en el paso 14.
21. Añadir a la reacción de inmunoprecipitación e incubar a 4 °C 4 horas y a 20 rpm.
22. Centrifugar a 3500 rpm durante 3 minutos, eliminar el sobrenadante y resuspender en 750 µl de tampón IP2 con inhibidor de proteasas.
23. Transferir la resina a un microtubo antiadherente libre de RNAsas (Ambion), incubar 5 minutos a 4 °C y 20 rpm.
24. Centrifugar a 3500 rpm 3 minutos y proceder con los lavados.

Soluciones

- ♦ BSA 5 %. Albúmina bovina (Sigma), preparada al 5 % p/v en agua.

- ♦ Tampón IP2. HEPES-KOH pH 7,5 50 mM; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 1 %; Na deoxycolato 0,1 %; SDS 0,1 %.
- ♦ Resina UltraLink Immobilized Protein A/G, 2 ml (Thermo Fisher Scientific).
- ♦ Tabletas con cocktail inhibidor de proteasas (Roche).
- ♦ Anticuerpo policlonal anti-ArgR (Abyntek Biopharma).

3.14.5. Lavados y elución

Protocolo

25. Lavar la resina con 1 ml de tampón IP2 + sal, incubar 5-10 minutos a 4 °C en *Intelli-Mixer* a 20 rpm y centrifugar la muestra durante 3 minutos a 4 °C y 3500 rpm.
26. Descartar el sobrenadante y lavar la resina con tampón IP de lavado. Incubar y centrifugar como en el paso anterior.
27. Descartar el sobrenadante y realizar el último lavado con TE pH 8 resuspendiendo, re-incubando y centrifugando la muestra durante 3 minutos a 4 °C y 3500 rpm.
28. Eluir el ADN añadiendo a la resina 240 µl de tampón de elución con 10 µl de proteinasa K.
29. Incubar las muestras a 55 °C toda la noche.
30. Romper la unión ADN-proteína incubando a 65 °C 30 minutos.
31. Centrifugar a 3500 rpm durante 3 minutos y recoger el sobrenadante.
32. Lavar la resina en 50 µl de TE pH 7,6, centrifugar a 3500 rpm 3 minutos y juntar los sobrenadantes.
33. Fenolizar dos veces con FN/CIA y una con CIA.
34. Purificar el ADN con columnas Bioprime (ver apartado 3.13.2) y resuspender en 20 µl de agua.
35. Determinar la concentración de ADN con el *NanoDrop ND-1000*.
Conseguimos valores de entre 30 y 50 ng/µl partiendo de 50 ml de cultivo a concentración 1 mg/ml (peso seco).
 - i. Se necesitan unos 20 ng para determinar por Q-PCR el enriquecimiento de fragmentos de ADN diana de la proteína de estudio.
 - ii. Unos 800 ng se emplean para la reacción de marcaje (ver apartado siguiente).

Soluciones

- ♦ Tampón IP2 + sal: Tampón IP + NaCl 500mM
- ♦ Tampón IP de lavado: Tris pH 8 10 mM; LiCl 250 mM; EDTA 1 mM; Nonidet P-40 0.5 %; Na deoxycolato 0,5 %.
- ♦ Proteinasa K: 10 mg/ml, Roche
- ♦ Tampón de elución 1X: SDS 1 %; TE 1 M pH 7,6.

3.14.6. Marcaje de los fragmentos de ADN

Una vez conseguido ADN inmunoprecipitado y habiendo comprobado su enriquecimiento por Q-PCR, el siguiente paso consistió en marcar con fluoróforos los fragmentos de ADN para su hibridación. Utilizamos dos enfoques diferentes. Por una parte, enfrentar el ADN inmunoprecipitado (ADN_{IP}) con el no inmunoprecipitado (ADN_{NoIP}) de la cepa *S. coelicolor* M145, y por otra, enfrentar el ADN_{IP} de la cepa *S. coelicolor* M145 con el ADN_{IP} de la cepa *S. coelicolor* $\Delta argR$. En cualquier caso, la cantidad de ADN mínima para iniciar el proceso de marcaje fue de 600-800 ng. El rendimiento en la recuperación de ADN no inmunoprecipitado no es limitante puesto que tiene menos pasos de tratamiento y resultó en 60 µg. En ambos enfoques se hace intercambio de fluoróforos, lo que quiere decir que en una hibridación tendríamos, por ejemplo, el ADN_{IP} marcado con Cy3 y el ADN_{NoIP} marcado con Cy5, mientras que en otra tendríamos el ADN_{IP} marcado con Cy5 y el ADN_{NoIP} marcado con Cy3.

En el protocolo siguiente únicamente se detalla un marcaje, ya sea con Cy3 o Cy5, del ADN_{IP} o del ADN_{NoIP} , entendiendo que se realizaron todos los ensayos necesarios.

Protocolo

1. Calcular el volumen necesario de la suspensión de ADN para unos 600-800 ng de marcaje. Mezclar los volúmenes siguientes en un microtubo de 1,5 ml.

ADN	600-800 ng
MilliQ	Hasta 40 μ l
2,5X cebadores aleatorios BioPrime	20 μ l

2. Desnaturalizar a 95 °C 5 minutos, agitar brevemente en *vortex* y enfriar inmediatamente en hielo 5 minutos.
3. Manteniendo el microtubo en hielo, añadir a la mezcla anterior, en el siguiente orden:

Mezcla 1-Cebadores	40 μ l
Mezcla de dNTP	5 μ l (1X)
Cy -dCTP	3,75 μ l
<i>Vortex</i> y pulso	
Exo-Klenow	1,5 μ l
volumen final	50,25 μ l

4. Pipetear suavemente para homogeneizar y transferir al microtubo de 0,2 ml. Con los sucesivos marcajes, observamos que el proceso mejoraba al añadir la Exo-Klenow en tres veces, 0,5 μ l de cada una, dejándola actuar durante como mínimo una hora antes de añadir más.
5. Incubar en el termociclador a 37 °C durante toda la noche.
6. Purificar con columnas y cuantificar el marcaje como en el apartado 3.13.3.

Los rendimientos de ADN_{IP} obtenidos fueron, en el mejor de los casos, de 100 pmoles y 1000-1500 ng. Basándonos en los experimentos realizados por otros grupos con cristales de 4x44K, que utilizan unos 40 pmoles de marcaje, o con cristales de 8x22K, que requieren 10-20 pmoles (Ponzielli *et al.*, 2008; Bucca *et al.*, 2009; den Hengst *et al.*, 2010; Allenby *et al.*, 2012), en nuestro caso para una matriz en cristal 1x25K necesitaríamos más de 100 pmoles de marcaje y/o más de 1500 ng de ADN. Esto está en consonancia con Lee y col. (2006), que para ChIP-chip utilizan un mínimo de 3 μ g de ADN y 200-500 pmoles de marcaje, y aseguran que en los casos en los que utilizaron 3 μ g y 200 pmoles en lugar de 5 μ g y 500 pmoles, el ruido de fondo les impedía tener unos resultados claros. Además, habría que destacar el hecho de que muchos autores amplifican el ADN inmunoprecipitado, ya sea con kit como *GenomePlex Whole Genome Amplification Kit* de Sigma, añadiendo colas de poliA y amplificando con oligos de poliT, o clonando en plásmidos (Kim *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2006; Ponzielli *et al.*, 2008).

Soluciones

- ♦ En el kit de marcaje *BioPrime Array CGH labelling module* (Invitrogen) se suministra: dNTP, Exo-Klenow (40 U/ μ l), mezcla de cebadores aleatorios 2,5X.
- ♦ Cy5-dCTP y Cy3-dCTP, ambos 25 nmol. GE.

3.14.7. Preparación de las mezclas de hibridación

Pese a tener baja eficiencia de marcaje, se realizaron hibridaciones. Los cristales utilizados fueron adquiridos a OGT (*Oxford Gene Technology*) y consisten en una única matriz con 22576 sondas de 60 nucleótidos de longitud diseñadas para hibridar con 5350 regiones intergénicas del genoma de *S. coelicolor*.

Protocolo

1. Resuspender el cebador RAND105 liofilizado (control de hibridación positivo marcado con Cy3) con 1 ml de agua. Mezclar con *vortex* y hacer una dilución 1/100. Mezclar con *vortex*.
2. Preparar la solución de hibridación en el siguiente orden:

Agua	78 μ l
MES 12X	42 μ l
NaCl 5 M	100 μ l
Formamida 100 %	100 μ l
EDTA 0,5 M	20 μ l
Tritón 10 %	50 μ l

3. Preparar en microtubo de 1,5 ml:

Marcaje Cy3	X μ l (mínimo 100 pmoles)
Marcaje Cy5	Y μ l (mínimo 100 pmoles)
Agua	100-(X + Y) μ l
RAND105 diluido	10 μ l
Volumen	110 μ l

4. Desnaturalizar la mezcla de los marcajes en termobloque a 94 °C / 3 minutos. Inmediatamente dar un pulso en microcentrífuga y añadir la solución de hibridación a las mezclas de marcajes. Mezclar pipeteando al menos 5 veces, evitando las burbujas.

Mezcla de marcajes	110 μ l
Solución de hibridación	390 μ l
Volumen final	500 μ l

5. Dar un pulso de centrifuga (1 minuto) para eliminar las posibles burbujas. Mantener en oscuridad y a temperatura ambiente mientras se prepara el montaje (apartado 3.13.4.2).
6. De la mezcla final se aplican 490 μ l sobre el cristal cubreobjetos.

Los protocolos de hibridación, lavados y lectura de la fluorescencia son los detallados en los apartados 3.13.4.2 a 3.13.4.4.

Soluciones

- ♦ MES 12X. Sigma
- ♦ NaCl 5M. Sigma
- ♦ Formamida 100 %. Sigma
- ♦ EDTA 0,5 M. Sigma
- ♦ Tritón 10 %. Sigma
- ♦ RAND105. Agilent.

3.15. Transformación de *E. coli*

La transformación mediante choque térmico fue el método empleado para la introducción en *E. coli* de las diferentes construcciones plasmídicas. Para ello, primero fue necesario obtener células competentes de la cepa que se usaría como receptora del plásmido.

3.15.1. Inducción del estado de competencia en *E. coli*

En función de la eficiencia de transformación necesaria se utilizaron dos protocolos distintos para inducir el estado de competencia en *E. coli*. Cuando se requerían eficiencias de transformación mayores de 10^7 transformantes/ μ g de ADN se prepararon células competentes por el método de Inoue. Se utilizó el método de la solución de TSS cuando era suficiente una eficiencia del orden de 10^6 transformantes/ μ g de ADN. En cualquier caso, resulta sumamente importante mantener soluciones y células a 4 °C (en un baño de hielo) durante todo el proceso de lavados e inducción de la competencia.

Protocolo (Inoue *et al.*, 1990)

1. Inocular 2 o 3 colonias de la cepa a la que se quiere inducir el estado de competencia en 25 ml de LB o SOC, e incubar durante 6-8 horas a 37 °C y 220 rpm.
2. Utilizar el cultivo anterior para inocular tres matraces de 1 litro con 250 ml de SOC, el primero con 10, el segundo con 4 y el tercero con 2 ml de preinóculo. Incubar durante 14-20 horas a 20 °C y 200-220 rpm. Medir la DO₆₀₀ hasta que algún cultivo alcance un valor de 0,55. Cuando esto ocurra, mantener el matraz en hielo durante 10 minutos y descartar el resto de cultivos.
3. Centrifugar el cultivo a 3900 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Desechar el sobrenadante, mantener las células en hielo y resuspenderlas suavemente en 80 ml de tampón de Inoue frío, agitando manualmente.
4. Centrifugar a 3900 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Desechar el sobrenadante, mantener las células en hielo y resuspenderlas suavemente en 20 ml de solución tampón de Inoue frío, agitando manualmente.
5. Añadir DMSO a una concentración final del 7 % (1,5 ml), mezclar suavemente y dejar reposar 10 minutos en hielo.
6. Repartir las células en alícuotas de 100 µl y congelar inmediatamente en nitrógeno líquido. Almacenar a -80 °C hasta el momento de su uso.

Soluciones

- ♦ Tampón de Inoue. PIPES 10 mM, CaCl₂ 2H₂O 15 mM, KCl 250 mM, MnCl₂ 4H₂O 55 mM. Esterilizar por filtración y guardar a -20 °C.

Protocolo del TSS (Chung *et al.*, 1989)

1. Escoger una colonia de la cepa a la que se quiere inducir el estado de competencia y cultivar en 5 ml de medio LB durante 10-12 horas con agitación de 220 rpm a 37 °C.
2. Emplear la suspensión así obtenida como preinóculo para iniciar un cultivo en las mismas condiciones.
3. Cuando dicho cultivo alcanza una DO₆₀₀ entre 0,3 y 0,5 unidades, recoger las células por centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
4. Resuspender el precipitado celular en 3 ml de solución TSS, con agitación suave.
5. Alicuotear y congelar las células inmediatamente en nitrógeno líquido para almacenarlas a -80 °C hasta su uso.

Soluciones

- ♦ Solución TSS. PEG 8000, 10 % (p/v); DMSO 5 % (v/v); MgSO₄ 50 mM, disueltos en medio de cultivo LB.

3.15.2. Transformación de *E. coli* con ADN plasmídico

En este método la entrada de ADN plasmídico se favorece por la modificación de la pared celular mediante un choque térmico a 42 °C.

Protocolo (Hanahan, 1983)

1. Una vez que se han descongelado las células competentes en hielo, añadir el ADN que se desea transformar (hasta un volumen máximo de 1/10 del volumen de células) y mantener 30 minutos en hielo.
2. Dar un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos para permitir la entrada del ADN dentro de las células.
3. Colocar en hielo de 3-5 minutos.
4. Añadir 4 volúmenes de medio SOC, e incubar durante 45 minutos a 37 °C y 220 rpm.
5. Sembrar distintas cantidades en placas con medio SOC suplementado con el antibiótico de selección a la concentración adecuada e incubar a 37 °C. Cuando se quiera llevar a cabo la selección en base a la interrupción del gen de la β-galactosidasa se utiliza medio LB que no inhibe la acción del IPTG y del X-gal añadidos como sí ocurre en SOC.

Soluciones

- ♦ IPTG (Isopropil-β-D-tio-galactósido) 0,84 M: Se utilizan 40 µl por 100 ml de medio LB.
- ♦ X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida) 25 mg/ml: Se utilizan 140 µl por 100 ml de medio LB.

3.16. Conjugación *Streptomyces-E. coli*

La introducción de material genético en las diferentes cepas de *Streptomyces* se llevó a cabo mediante conjugación intergenérica, debido a la mayor eficiencia del proceso frente a la transformación. Para ello se utilizó la cepa donadora *E. coli* ET12567 [pUZ8002]. Esta cepa es deficiente en los sistemas de metilación *dam*, *dcm* y *hsd*, con lo que se evita que *Streptomyces* degrade el plásmido durante el proceso de conjugación, y porta el plásmido pUZ8002, no transferible pero que contiene los genes necesarios para la movilización de vectores que contengan en su secuencia un *oriT* (Paget *et al.*, 1999). Si además de transferir un plásmido se desean forzar procesos de recombinación que permitan la interrupción o delección de un gen, el vector no debe ser replicativo en *Streptomyces*.

Protocolo (Kieser *et al.*, 2000)

1. Transformar el plásmido a conjugar con el antibiótico que lo selecciona en la cepa *E. coli* ET12567 [pUZ8002], siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.15.2. Tener en cuenta que la cepa ET12567 presenta resistencia a cloranfenicol y el plásmido pUZ8002 a kanamicina.
2. Cultivar una colonia transformante durante toda la noche en LB suplementado con el antibiótico de selección del plásmido conjugativo, cloranfenicol y kanamicina.
3. Transferir 1 ml de cultivo a 50 ml de medio LB con todos los antibióticos de selección y dejar crecer a 37° C hasta alcanzar una DO₆₀₀ comprendida entre 0,4 y 0,6 (3-4 horas).
4. Una vez alcanzada esta densidad óptica, centrifugar 10 ml a 4 °C y 4400 rpm y lavar dos veces con 1 volumen de medio LB. Resuspender finalmente en un 10 % del volumen inicial de LB.
5. Paralelamente inocular 10⁶-10⁷ esporas de *Streptomyces* en 500 µl de medio 2xYT y someterlas a un choque térmico de 50° C durante 10 minutos, para inducir la germinación de las esporas. En caso de no tener esporas, utilizar micelio crecido en placa durante unos dos días. El micelio se raspa y se homogeneiza con 2-3 ml de glicerol al 20 %. Para una conjugación se usan 0,5 ml de esta suspensión. También se puede partir de cultivo líquido a una DO~ 5. Se lavan 10 ml en sacarosa al 10,3 %, y se resuspende en 1 ml de glicerol 40 %.
6. Mezclar 500 µl de células lavadas (punto 4) con 500 µl de esporas o micelio (punto 5). Dar un pulso en la centrifuga, eliminar parte del sobrenadante y resuspender el precipitado.
7. Sembrar en placas de medio MS suplementado con 10 mM de MgCl₂. Dejar secar las placas e incubar a 30 °C.
8. Al cabo de 16 a 20 horas añadir una cobertera de 1 ml de agua con 1 mg/ml del antibiótico de selección del plásmido en *Streptomyces* y 0,5 mg/ml de ácido nalidíxico, que inhibe la síntesis de ADN y por tanto el crecimiento de *E. coli*. Incubar a 30 °C durante 2-3 días hasta observar colonias exconjugantes.
9. Transferir los transconjugantes a TSA con ácido nalidíxico (40 µl/ml) y el antibiótico de selección (50 µl/ml).

3.17. Fermentaciones

Para el estudio del metabolismo de *Streptomyces* se realizaron fermentaciones en matraces indentados. Cada cepa y/o condición de cultivo se analizó con 2 ó 3 réplicas.

3.17.1. Desarrollo de las fermentaciones

Los cultivos de *S. coelicolor* se iniciaron a partir de 10⁸ esporas conservadas a -80 °C en glicerol al 20 % inoculadas en 100 ml de medio definido MG (con sales de fosfato y hierro, ver apartado 3.2.1) suplementado o no con L-arginina (25 mM) manteniéndose a 30 °C y 300 rpm el tiempo necesario.

Según el ensayo que se realizase, se extrajeron muestras de volumen variable a los tiempos de cultivo elegidos. En todos los casos se reservaron 2 ml por muestra para valorar el crecimiento por peso seco o 1 ml para la medida del ADN (ver apartado 3.3.3).

3.17.2. Ensayo enzimático ornitina carbamoiltransferasa (OTC)

La ornitina carbamoiltransferasa (EC 2.1.3.3) cataliza la transferencia del grupo carbamoilo del carbamoilfosfato al radical δ -amino de la L-ornitina y da lugar a la formación de citrulina. La citrulina formada se determina según el método espectrofotométrico de Flint y Kemp (1981).

El micelio, proveniente de 5 ml de cultivo crecido en SA o MG durante 32 horas, se resuspendió en 1 ml de tampón TGD. Las actividades enzimáticas se ensayaron en extractos proteicos libres de células obtenidos por sonicación del micelio (apartado 3.14.2), durante 5 pulsos de 20 segundos.

Protocolo (Flint y Kemp, 1981)

1. En microtubos disponer de 20 μ l de L-ornitina 100 mM, 20 μ l de Tris-HCl 1 M pH 8,0 y 20 μ l de carbamoilfosfato de litio 50 mM. Para cada ensayo se dispone un blanco con solución Bun-Ácido añadida desde el principio. Además, se prepara un blanco general sin muestra enzimática.
2. Añadir el volumen necesario del extracto acelular, normalmente 5 μ l, completado hasta un volumen de 20 μ l con tampón TGD. El volumen final de reacción es de 80 μ l.
3. Incubar a 30 °C durante 10 minutos.
4. Parar la reacción con 500 μ l de solución Bun-Ácido. Añadir 350 μ l de solución Bun-Color, mezclar muy bien.
5. Calentar a ebullición durante 10 minutos.
6. Enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos y medir el incremento de absorbancia a 515 nm (dentro de la primera media hora).
7. Para el cálculo se emplea un coeficiente de extinción molar de $6,92 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Se define la unidad de actividad OTCasa anabólica como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de citrulina en un minuto. La actividad específica se expresa como unidades por mg de proteína.

Soluciones

- ♦ Tampón TGD. Tris-HCl pH 8,0 50 mM, glicerol 5 %, DTT 1 mM.
- ♦ Carbamilfosfato de litio 50 mM. Se prepara en el acto con agua en hielo, debido a su inestabilidad.
- ♦ Solución Bun-Ácido. a 200 ml de ácido sulfúrico se añade agua hasta un litro y 1 ml de una solución preparada disolviendo 1 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 20 ml de H_3PO_4 (98 %) y 10 ml de agua.
- ♦ Solución Bun-Color. Mezclar 3,5 ml de una disolución de diacetilmonoxima (2,3-butanodionamonoxima) al 2,5 % (p/v) en agua, con 3,5 ml de una disolución de tiosemicarbazida al 0,5 % (p/v) en agua y se añade agua hasta 50 ml.

3.17.3. Medida de la producción de antibióticos en *S. coelicolor*

De los cultivos desarrollados en MG se tomaron 700 μ l de muestra para la medida de producción de antibióticos, que se congelaron inmediatamente después de la recogida, para procesarlas todas a la vez.

3.17.3.1. Medida de actinorrodina

La actinorrodina fue determinada espectrofotométricamente a una longitud de onda de 640 nm. La cantidad de antibiótico viene expresada en nmol/mg de cultivo y se calculó teniendo en cuenta su coeficiente de extinción molar $\epsilon_{640} = 25320$ y aplicando la fórmula:

$$[\text{actinorrodina}] = \text{absorbancia} / \epsilon$$

Protocolo modificado de Kieser et al. (2000)

1. Añadir 700 µl de KOH 2N a 700 µl de muestra y agitar brevemente con *vortex*.
2. Mantener toda la noche a 4 °C.
3. Centrifugar a 4 °C durante 5 minutos. Tomar el sobrenadante y medir a 640 nm. Como blanco se utiliza el medio de cultivo en el que creció *S. coelicolor* al que se le añade 1 volumen de KOH 2N. Existe un rango de absorbancias lineal hasta 1,4; en el caso de obtener valores mayores, diluir con el medio usado al que se le ha añadido 1 volumen de KOH 2N.

Soluciones

- ♦ KOH 2N.

3.17.3.2. Medida de undecilprodigiosina

Para medir la producción de undecilprodigiosina necesitamos el precipitado obtenido en el paso anterior. Por ese motivo ambos antibióticos se cuantifican de forma paralela.

La undecilprodigiosina se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 530 nm. La cantidad de antibiótico viene expresada en nmol/mg de cultivo y se calculó teniendo en cuenta su coeficiente de extinción molar $\epsilon_{530} = 100500$. Su concentración viene dada por la fórmula:

$$[\text{undecilprodigiosina}] = \text{absorbancia} / \epsilon$$

Protocolo modificado de Kieser et al. (2000)

1. Lavar el precipitado con KOH 1N, resuspenderlo y centrifugarlo a 4 °C durante 10 minutos.
2. Retirar el sobrenadante con pipeta y lavar con HCl 0,5N del mismo modo que en el paso anterior.
3. Secar en centrífuga de vacío durante unos 20 minutos aproximadamente, hasta que visualmente no quede ningún resto líquido.
4. Resuspender en metanol ácido. Es bastante laborioso, porque hay láminas que no se deshacen. Incubar durante un mínimo de dos horas a temperatura ambiente.
5. Centrifugar durante 20 minutos a velocidad máxima y temperatura ambiente.
6. Medir el sobrenadante a 530 nm, utilizando como blanco el metanol ácido. Existe un rango lineal hasta una absorbancia de 1,4. En el caso de superar ese valor, las diluciones se hacen con metanol ácido.

Soluciones

- ♦ KOH 1N y HCl 0,5N.
- ♦ Metanol ácido. Añadir lentamente HCl diluido 1 N, ya que el pH disminuye muy rápido.

3.17.4. Ensayos de luminiscencia

Ni *Streptomyces* ni la mayoría de las bacterias producen bioluminiscencia. La actividad de las posibles regiones promotoras de *Streptomyces* puede detectarse con los genes testigo de la luciferasa de *Vibrio harveyi* (genes *luxAB*) de forma rápida, sensible y con un amplio rango de linealidad. El sistema de la luciferasa permite detectar pequeñas diferencias de expresión, lo cual lo convierte en una buena herramienta para análisis cuantitativos. Craney et al. (2007) han encontrado el operón *luxCDABE* de la bacteria *Photorhabdus luminescens*, que codifica la enzima luciferasa y el sustrato aldehído necesario para la reacción. Este operón se ha adaptado para su uso en bacterias de gran contenido en G+C como *Streptomyces*, pero en este trabajo el sistema utilizado ha sido el del vector sonda de promotores pLUXARneo (Santos-Beneit et al., 2008) basado en la luciferasa de *Vibrio harveyi*.

El proceso consistió en amplificar las regiones promotoras objeto de estudio con oligos que contienen los sitios de restricción NdeI y BamHI. Estos sitios sirven para posteriormente clonar los

fragmentos de forma dirigida en el codón ATG del gen *luxA* del vector pLUXARneo. La construcción se introdujo en *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* Δ *argR* mediante conjugación para comparar el efecto regulador de ArgR en ambas cepas. Las muestras destinadas a medida de luminiscencia (1 ml) se tomaron a las 32, 47,5, 55 y 72 horas de incubación y se mantuvieron en un baño criogénico hasta su procesamiento según el protocolo de Santos-Beneit *et al.* (2011) en un luminómetro Sirius V4.2 (Berthold Technologies). A continuación se mezclaron 500 μ l de muestra con 250 μ l de n-decanal al 0,1 % por inyección, y se midieron en el programa “Raw data” con un tiempo de integración de 20 segundos tras 5 segundos de demora. Las unidades de medida vienen dadas en unidades de luz relativa (RLU) por segundo.

Soluciones

- ♦ N-decanal al 0,1 %. Mezclar 100 μ l de n-decanal con 100 ml de agua MilliQ.

3.18. Técnicas de purificación y caracterización de proteínas

Para la manipulación de las proteínas y extractos proteicos se siguieron las recomendaciones de Sambrook y Russell (2001), poniéndose especial énfasis en evitar la exposición de las proteínas a temperaturas elevadas, mediante su mantenimiento en baños de hielo mientras son manipulados.

Se han desarrollado vectores de expresión para proteínas heterólogas que permiten una rápida purificación de la proteína de interés mediante cromatografía de afinidad. El fundamento de estos sistemas es colocar el gen de interés bajo el control de un promotor potente e inducible, fusionado a secuencias que codifican proteínas o péptidos con alguna característica que les permita ser purificados por cromatografía de afinidad.

3.18.1. Purificación de proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad

Para la purificación a homogeneidad de la proteína reguladora ArgR de *S. coelicolor* se optó por expresarla de manera heteróloga en *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] en forma de proteína de fusión. La etiqueta Strep II es un péptido de ocho aminoácidos (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) y 1 KDa de peso molecular que permite la purificación de la proteína a la que está fusionada en un único paso mediante cromatografía de afinidad con una columna de Strep-tactina.

El sistema de purificación se basa en la interacción altamente selectiva y fácilmente controlable entre el péptido Strep II y una variante de la estreptavidina, la Strep-tactina, que posee una afinidad de unión al péptido unas 100 veces mayor que la estreptavidina. Esta tecnología permite la purificación en un paso de casi todas las proteínas recombinantes en condiciones fisiológicas, preservando así su actividad biológica. La elución de la proteína recombinante purificada se lleva a cabo por adición de destiobiotina en PBS. La destiobiotina es un competidor específico análogo de la biotina, (ligando natural de la estreptavidina), estable, barato y de unión reversible, que desplaza a la proteína de fusión. La etiqueta Strep II puede eliminarse, pero esto solo se recomienda si no se tolera absolutamente ninguna modificación en la

proteína. Debido a su pequeño tamaño y a su naturaleza químicamente inerte, Strep II generalmente no interfiere con la actividad de la proteína recombinante.

Se utiliza la cepa *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] porque proporciona un mayor control de la expresión proteica para expresión de proteínas tóxicas. Son células fácilmente inducibles, pero presentan una menor expresión en comparación con la cepa *E. coli* BL21 (DE3).

El proceso completo consta de cuatro fases:

3.18.1.1. Construcción de los vectores de expresión en pET-24a(+)

Para purificar la proteína ArgR se diseñaron dos plásmidos de expresión, pET24a(+)-StrepargR y pET24a(+)-argRStrep con la etiqueta Strep II situada en el extremo 5' o en el extremo 3' del gen *argR*, respectivamente. El gen *argR* se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos ArgR17 y ArgR18, en el caso de colocar la etiqueta Strep II en el extremo 5' de *argR*, o los oligonucleótidos ArgR19 y ArgR20, en el caso de colocarla en el extremo 3', y se introdujo un codón de fin tras la secuencia de *argR* o de Strep II, respectivamente, para no traducir la cola de histidinas. El producto amplificado se subclonó de forma dirigida en el plásmido pET-24a(+) digerido con NdeI y HindIII, de modo que se eliminó la etiqueta T7.

3.18.1.2. Inducción de la expresión de la proteína de fusión

Dado que la producción de grandes cantidades de una proteína heteróloga puede tener múltiples consecuencias en el crecimiento de la cepa de expresión, se induce la actividad promotora que la controla únicamente cuando la población bacteriana ha alcanzado una densidad óptica adecuada. En la expresión heteróloga de proteínas prácticamente todos los parámetros (temperaturas, tiempo de cultivo, oxigenación o potencia de la inducción, etc.) son susceptibles de ser optimizados para obtener la mayor cantidad posible de la proteína heteróloga en forma soluble y biológicamente activa.

Protocolo

1. Cultivar un preinóculo de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] [pET24a(+)-StrepargR] y de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] [pET24a(+)-argRStrep] en medio LB suplementado con el antibiótico de selección, en este caso kanamicina, a 37 °C durante toda la noche.
2. A la mañana siguiente, inocular medio LB (de nuevo, con kanamicina) con un 1 % (v/v) de cultivo de preinóculo. Este cultivo crece a 37 °C y 220 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,6 y 0,8.
3. Inducir la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,1 mM-1 mM.
4. Mantener el cultivo durante 16-20 horas a 18 °C y 220 rpm.
5. Centrifugar el cultivo a 4400 rpm durante 10 minutos. Decantar el sobrenadante y conservar la fracción celular congelada a -80 °C hasta el momento en que se lleve a cabo la purificación de la proteína de fusión.

3.18.1.3. Preparación del homogeneizado celular

El extracto celular homogeneizado, a partir de cual se purificó la proteína, se obtuvo por ruptura mediante ultrasonidos con la ayuda de un equipo de sonicación (*Misonix Inc. XL 2020 Ultrasonic Processor*). Para ello, las células previamente inducidas y conservadas a -80 °C se resuspendieron en 5-10 ml de tampón PBS y fueron sometidas a 5 pulsos de sonicación de 20 segundos de duración cada uno a potencia 5, refrigerándose la muestra en un baño de hielo durante 40 segundos entre pulsos. El extracto homogeneizado así obtenido fue sometido a 30 minutos de centrifugación a 13200 rpm y a 4 °C en una microcentrífuga, con el fin de separar el precipitado insoluble del sobrenadante. Dicho sobrenadante, conteniendo la fracción proteica soluble, fue purificado mediante columna de afinidad.

Soluciones

- ♦ Tampón PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM. El pH se ajusta a 7,4.

3.18.1.4. Purificación mediante cromatografía de afinidad

La purificación de las proteínas de fusión con Strep II se llevó a cabo mediante un cromatógrafo FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ÄKTA (GE Healthcare), al que se acopló una columna de Strep-tactin inmovilizada en una matriz de sefarosa (GE Healthcare). Este sistema permite controlar la cantidad de proteína total que está saliendo de la columna en cada momento, gracias a la medida continua de la absorbancia a 280 nm. El volumen completo de la fracción soluble del extracto celular homogeneizado se inyectó en el FPLC, con el objetivo de permitir que la proteína de fusión interactúe con la Strep-tactina inmovilizada en la columna de sefarosa. A continuación, se lavó la columna con PBS hasta alcanzar de nuevo la línea base de A280, y por último se llevó a cabo la elución de la proteína unida a la columna con el tampón de elución, recogándose fracciones de 300 µl.

Se requiere un paso final de regeneración de las columnas con NaOH 0,5 M.

Soluciones

- ♦ Tampón de elución: Na₃PO₄ 20 mM; NaCl 280 mM; KCl 6 mM, pH 7,4; destiobiotina 2,5 mM.

3.18.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes o SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, Shapiro *et al.*, 1967) se llevó a cabo en geles de poliacrilamida, empleándose el sistema *MiniProtean III* (Bio-Rad) para geles de 7 x 8 cm, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El gel desnaturizante de poliacrilamida consta de dos fases de distinta porosidad, pH y fuerza iónica. En cada una de ellas el entramado de poliacrilamida presenta una densidad diferente: el gel de empaquetamiento o concentrador, en la zona superior, que permite concentrar las muestras, y el gel separador, en la zona inferior que separa las proteínas según su tamaño. La presencia de SDS, un detergente aniónico, produce un efecto desnaturizante al alterar la conformación nativa de las proteínas rompiendo los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. El SDS se une a las proteínas de manera proporcional a la masa molecular del polipéptido y las dota de una carga neta negativa, permitiendo la separación electroforética en función de la masa de las proteínas. Así, la carga eléctrica de la proteína o su estructura espacial no son factores que influyen en la movilidad electroforética de cada polipéptido.

Protocolo

1. Montar los cristales (previamente lavados y aclarados) que servirán de molde al gel. Llenar el espacio entre ellos con agua destilada, para descartar la ausencia de fugas y constatar el correcto encaje de los cristales. En general, se empleó un cristal externo con un separador de 0,75 mm.
2. Preparar en un tubo de polipropileno de 10 ml la mezcla acrilamida-bisacrilamida que dará lugar al gel separador. La concentración final de acrilamida determinará la resolución del gel (en general, 10-12 %). Para geles de 0,75 mm de espesor será suficiente preparar 5 ml de mezcla.
3. Decantar el agua destilada que habíamos puesto entre los cristales. Rellenar el hueco entre los cristales con unos 4 ml de mezcla.
4. Cubrir la mezcla a polimerizar con isopropanol, con el fin de lograr una superficie lo más plana, horizontal y regular posible. Dejar polimerizar a temperatura ambiente.
5. La mezcla remanente en el tubo de polipropileno sirve como indicadora de cuándo se produce la polimerización del gel. Decantar el isopropanol y eliminar los restos del mismo de la interfase con agua destilada.
6. Preparar en un nuevo tubo de polipropileno de 10 ml 2,5 ml de la mezcla que dará lugar al gel de empaquetamiento o concentrador a una concentración del 5 %.

Las soluciones formadoras del gel se prepararon añadiendo los componentes que se enumeran en la siguiente lista, en el orden indicado. Los agentes polimerizante y catalizador (TEMED y APS) se añaden justo antes de verter la mezcla entre los cristales:

Componentes	Gel Separador (5 ml)	Gel concentrador (2,5 ml)	
	10 %	12 %	
Agua MilliQ	2 ml	1,7 ml	1,525 ml
Mezcla acrilamida:bis-acrilamida 30 %	1,7 ml	2 ml	325 µl
Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	1,30 ml	1,30 ml	-----
Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	-----	-----	625 µl
SDS 10 % (p/v)	0,05 ml	0,05 ml	25 µl
APS 10 % (p/v)	0,05 ml	0,05 ml	25 µl
TEMED	0,002 ml	0,002 ml	3,5 µl

- Decantar el agua que cubre la superficie del gel y secar los restos con papel Whatman sin tocar el gel separador.
- Añadir la mezcla de acrilamida al 5 %. Introducir el peine (que dará lugar a los pocillos para las muestras) antes de que el gel polimerice. Dejar transcurrir al menos dos horas y luego retirar el peine.
- Introducir el gel en la cubeta de electroforesis y llenar la misma con el tampón de electroforesis desnaturalizante. Limpiar los pocillos con ayuda de una micropipeta.
- Añadir tampón de carga (1X) a las muestras de proteína que se vayan a someter a electroforesis y hervir durante 10 minutos antes de ser cargadas en el gel, para asegurar que las proteínas estén completamente desnaturalizadas. Cargar las muestras en el gel junto con un marcador de peso molecular para proteínas.
- Someter a electroforesis a unos 100 V durante aproximadamente 2-3 horas, lo suficiente como para que el marcador coloreado presente en las muestras comience a salir del gel.
- Tras la electroforesis, desmontar los cristales y extraer el gel de poliacrilamida para su tinción.

Soluciones

- ♦ Tampón de electroforesis desnaturalizante. Tris-base 3 g (0,025 M pH 8,8), glicina 14,4 g (0,2 M), SDS 1 g (0,1 % p/v), agua destilada 1000 ml.
- ♦ Tampón de carga desnaturalizante (5X). 0,5 ml de azul de bromofenol 0,1 %, 2 ml de SDS 10 %, 1 ml de glicerol; 1,2 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 70 µl de DTT 2,5 M; agua destilada 4,8 ml.
- ♦ Mezcla acrilamida:bis-acrilamida 30 %. Comercial, *Protogel* de National Diagnostics.
- ♦ Solución de persulfato de amonio (APS): 10 % (p/v).
- ♦ Marcador de peso molecular para proteínas Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad).

3.18.2.1. Tinción de los geles de proteínas con azul de Coomassie coloidal

Para la tinción de las proteínas en los geles se empleó el método del Coomassie coloidal (Candiano *et al.*, 2004), que presenta múltiples ventajas frente a los métodos de tinción por Coomassie tradicional ya que permite la obtención de geles limpios, sin apenas tinción de fondo, a la vez que ofrece una sensibilidad próxima a las tinciones con plata.

Protocolo

- Poner el gel recién sacado del tampón de electroforesis en un recipiente adecuado y cubrirlo durante 15 minutos y en agitación suave con una solución de fijación, que estabiliza las proteínas en la matriz del gel.
- Recuperar la solución de fijación para usos posteriores y lavar el gel con agua MilliQ durante 10 minutos en agitación suave. Repetir este paso de lavado dos veces más.
- Sumergir el gel en la solución de Coomassie coloidal y mantener en agitación suave, vigilando el proceso de teñido hasta que se alcance la intensidad de bandas deseada, normalmente toda la noche. Recuperar la solución de Coomassie coloidal.
- Lavar con agua MilliQ para eliminar la tinción de fondo.

Soluciones

- ♦ Solución de fijación. Ácido acético glacial 7 % (v/v) y metanol 7 % (v/v)
- ♦ Solución de teñido, Coomassie coloidal. Ácido fosfórico 10 % (v/v), metanol 20 % (v/v), sulfato amónico 10 % (p/v), azul de coomassie G-250 0,12 %.

3.18.3. Cuantificación de proteínas

La determinación de la concentración total de proteínas se efectuó por el método de Bradford (1976), basado en el cambio del máximo de absorción, de 465 a 595 nm, que experimenta el colorante Azul Brillante Coomassie G-250 tras unirse específicamente a proteínas. La lectura de la absorbancia a 595 nm y el cálculo de la recta patrón se efectuó en un espectrofotómetro *Hitachi U-2000* (Tokio, Japón).

Protocolo

1. Realizar diluciones seriadas en agua de la muestra proteica, entre 1/2 y 1/10 en un volumen final de 800 µl.
2. Preparar los patrones de concentración conocida de proteína mediante diluciones de una muestra de seroalbúmina bovina comercial de concentración conocida, por ejemplo la suministrada con ciertas enzimas de restricción de Takara. Es necesario establecer una nueva recta patrón cada vez que se cuantifiquen proteínas.
3. Añadir 200 µl de reactivo de Bradford a las muestras problemas y a las muestras patrón. Mezclar bien y dejar reposar durante 5-15 minutos.
4. Medir la absorbancia de las reacciones a 595 nm y estimar la concentración de proteína a partir de la recta patrón.

Soluciones

- ♦ Sistema comercial *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad).

3.18.4. Transferencia de proteínas e inmunodetección

La detección de la proteína ArgR en extractos de *E. coli* se llevó a cabo mediante técnicas de inmunotransferencia con: a) los anticuerpos policlonales obtenidos frente a ella, o b) anticuerpos monoclonales contra la etiqueta Strep II. Se utilizó el sistema *Mini Trans-Blot Transfer Cell* (Bio-Rad) para transferir las proteínas, previamente separadas mediante SDS-PAGE, a una membrana de PVDF (*Immobilon*, Millipore). En el protocolo de inmunodetección se empleó como anticuerpo secundario una solución de anti-IgG de ratón para anticuerpos monoclonales y de conejo para los policlonales (Sigma) conjugados en ambos casos a la fosfatasa alcalina. Esta enzima, en presencia de NBT y BCIP, da lugar a un precipitado coloreado, que se formará allí donde se haya producido la hibridación del anticuerpo primario-anticuerpo secundario, lo que permite la localización de ArgR en la membrana.

El protocolo de transferencia e inmunodetección aplicado es una variación del descrito por el fabricante de las membranas (*Immobilon*, Millipore).

Protocolo

1. Sumergir la membrana durante 15 segundos en metanol para permeabilizarla. aclarar en agua MilliQ durante 3-4 minutos y equilibrar en tampón de transferencia durante al menos 5 minutos.
2. Ensamblar el equipo de transferencia según las instrucciones: situar una de las almohadillas sobre la cara blanca del sándwich y sobre ella dos capas de papel *Whatman 3 MM* de idéntico tamaño humedecidas en tampón de transferencia. Eliminar las posibles burbujas que hayan quedado entre las capas empleando como rodillo una pipeta Pasteur. Situar el fragmento de membrana equilibrada en solución A, sobre el papel *Whatman 3 MM* húmedo.
3. Abrir los cristales entre los que se amolda el gel y retirar el gel adhiriéndolo a un papel *Whatman 3 mm* seco. Poner en contacto el gel con la membrana, empapando a continuación el papel al que está adherido con 3 ml de tampón de transferencia. Eliminar posibles burbujas.
4. Situar sobre el conjunto una nueva capa de papel *Whatman 3 MM* húmeda y una almohadilla más. Eliminar burbujas. La estructura final del sándwich ha de ser la siguiente: cara blanca, almohadilla, dos capas de papel, membrana, gel, dos capas de papel, almohadilla y cara negra.
5. Situar en la cubeta de electroforesis el sándwich, enfrentando su cara blanca al electrodo positivo. Llevar a cabo la electroforesis de transferencia a 220 mA de intensidad durante 30 minutos en tampón de transferencia.

6. Sacar la membrana y dejarla secar al aire durante 2 horas o a 37 °C durante 1 hora.
7. Sumergir la membrana en solución A durante 1 hora a temperatura ambiente o 14 horas a 4 °C. Esta solución bloquea la membrana a fin de evitar una masiva unión de proteínas inespecíficas que alteren la visualización del resultado.
8. Lavar brevemente con tampón PBS.
9. Sumergir la membrana en solución B y mantener 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave y constante. Esta solución contiene los anticuerpos primarios específicos frente a la proteína a detectar, en este caso ArgR, o frente a la etiqueta acoplada a la proteína, Strep II, empleando volúmenes de suero previamente establecidos según la concentración de anticuerpos y proteínas. Normalmente se utilizan unos 10 ml de solución B y 1-10 μ l de anticuerpo.
10. Lavar durante unos minutos con solución de lavado.
11. Sumergir la membrana en solución C, que incluye el anticuerpo secundario comercial, anti-IgG, habitualmente de conejo o de ratón. Dicho antisuero lleva conjugada a la inmunoglobulina la fosfatasa alcalina, enzima que permite revelar las reacciones antígeno-anticuerpo sobre la membrana. Incubar 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave y constante.
12. Lavar durante unos minutos con solución de lavado y proceder al revelado de la membrana.
13. Equilibrar la membrana en tampón para la fosfatasa alcalina.
14. Incubar la membrana, en reposo y oscuridad, con los sustratos de la reacción de detección en tampón para la fosfatasa alcalina, a razón de 45 μ l de solución de NBT y 35 μ l de solución de BCIP por cada 10 ml de tampón empleado. Mantener durante un tiempo variable de 10 minutos a 2-3 horas hasta la aparición de las bandas de proteína coloreadas.
15. Secar la membrana a temperatura ambiente.

Soluciones

- ♦ Tampón de transferencia. Tris-base 3 g, glicina 14,4 g, metanol 10 %, agua destilada 1000 ml.
- ♦ Solución A. Tampón PBS suplementado con leche desnatada en polvo a concentración final 5 % y Tween 20 0,1 %.
- ♦ Solución B. Tampón PBS suplementado con leche desnatada en polvo al 5 %, Tween 20 0,1 % y 1-10 μ l de la solución de anticuerpos específicos requerido para la detección.
- ♦ Solución de lavado. Tampón PBS.
- ♦ Solución C. Misma composición que la solución B, salvo en el tipo de anticuerpos, que en este caso son comerciales frente a Ig-G de conejo, en el volumen adecuado a las diluciones recomendadas por el fabricante.
- ♦ Tampón para la fosfatasa alcalina. NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, Tris HCl 100 mM pH 9,5, ajustado con HCl 1N.
- ♦ Solución de NBT. Disolver 75 mg de NBT en 1 ml de dimetilformamida al 70 % v/v.
- ♦ Solución de BCIP. Disolver 50 mg de BCIP en 1 ml de dimetilformamida al 100 %.

3.18.5. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

La identificación de la banda de la proteína cuyo tamaño coincidía en los geles SDS-PAGE con el esperado para la proteína de fusión se llevó a cabo mediante un espectrómetro de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) en el Servicio de Proteómica de INBIOTEC. Para ello, se cortaron directamente del gel las bandas a identificar y se extrajeron las proteínas presentes en las mismas, sometiéndose a continuación a una digestión con tripsina. El análisis mediante MALDI-TOF de los péptidos originados y su posterior comparación con las bases de datos disponibles permiten la identificación de las proteínas.

3.18.6. Ensayos de retraso en gel

Los ensayos de retraso en gel, o EMSAs (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) permiten analizar y caracterizar las interacciones entre proteínas y secuencias promotoras de ADN. Esta técnica, desarrollada a finales de los años ochenta del siglo pasado (Fried y Crothers, 1981; Garner y Revzin, 1981), se basa en el retraso de la movilidad electroforética de un fragmento de ADN provocado por la unión de una proteína.

La puesta a punto de esta técnica para cada caso particular conlleva ciertas dificultades, derivadas del hecho de que inicialmente no sólo se desconoce la secuencia de ADN a la que se une una proteína concreta, sino que se desconoce también si la actividad biológica de la misma persiste tras su purificación, y han de ponerse a punto las condiciones iónicas y de pH en las que se ha de producir la unión. Es importante comenzar probando la proteína recién purificada con el fin de evitar cualquier deterioro de su actividad biológica. Es muy recomendable probar esa proteína frente a un buen número de los fragmentos de ADN candidatos. Sólo cuando en alguna de las combinaciones seamos capaces de detectar una interacción, estaremos realmente en situación de comenzar a trabajar.

En los inicios de este trabajo, el marcaje de las sondas se realizó con digoxigenina, mientras que después se realizó con el fluoróforo 6-FAM, variando también el tipo de revelado o visualización del resultado.

3.18.6.1. Marcaje de la sonda de ADN con digoxigenina

El marcaje de las sondas se realizó empleando el sistema comercial *DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit, 2nd Generation* (Roche), que emplea una transferasa terminal para añadir una molécula de ddUTP marcada con digoxigenina a los extremos 3' de la molécula de ADN que se utilizará como sonda en el EMSA. La detección de la sonda así marcada se lleva a cabo mediante la inmunodetección de la digoxigenina.

Para el marcaje se utilizan 100 ng de ADN, 4 µl de tampón 5X, 4 µl de CoCl₂, 1 µl de DIG-ddUTP y 1 µl de transferasa terminal en un volumen final de 20 µl. Mezclar, dar un pulso y mantener durante 15 minutos a 37 °C.

Soluciones

- *DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit*, que incluye *Tampón 5X*, *CoCl₂*, 25 mM, *DIG-ddUTP*, 1 mM y *Transferasa terminal*, 400 U/µl.

3.18.6.2. Marcaje de la sonda de ADN con el fluoróforo 6-FAM

En este caso el marcaje de las sondas se llevó a cabo mediante PCR, empleándose en ella los cebadores universales directo y reverso, marcados con el fluoróforo 6-FAM (6-carboxifluoresceína) en su extremo 5', y como molde el fragmento de ADN a estudiar clonado en los plásmidos pBluescript II SK⁺ o pGem-T-Easy.

La PCR se llevó a cabo empleando la enzima Phusion, con 19 ciclos de amplificación a una temperatura de hibridación de 70 °C, bajando 1°C por ciclo, y 14 ciclos a 50 °C, alargando 1 segundo por ciclo el paso de elongación.

	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Nº de ciclos</i>
<i>Desnaturalización inicial</i>	98 °C	40 segundos	
<i>Desnaturalización</i>	98 °C	15 segundos	} 19 ciclos
<i>Hibridación</i>	70 °C (-1 °C/ciclo)	15 segundos	
<i>Elongación</i>	72 °C	30 segundos/kb	
<i>Desnaturalización</i>	98 °C	15 segundos	
<i>Hibridación</i>	50 °C	15 segundos	} 14 ciclos
<i>Elongación</i>	72 °C	30 segundos/kb (+1segundo/ciclo)	

En algunos casos el fragmento promotor no se clonó en ningún plásmido, de modo que la sonda se obtuvo directamente mediante PCR desde ADNt con cebadores específicos del promotor a amplificar

marcados con 6-FAM. El programa utilizado fue el mismo, variando únicamente la temperatura de hibridación, que fue específica de la pareja de oligos.

En ambos casos, los productos de PCR fueron secuenciados, tras purificarlos mediante Freeze-Squeeze (apartado 3.6.2.1) y cuantificarlos en Nanodrop, para corroborar su identidad, así como la ausencia de mutaciones puntuales.

3.18.6.3. Reacciones de unión entre proteína y ADN

En los ensayos de retraso, los componentes de una mezcla de reacción entre proteína-ADN deben ser determinados experimentalmente. En este caso, la composición de la mezcla de reacción utilizada para probar la existencia de regiones operadoras en el ADN capaces de interactuar específicamente con la proteína ArgR fue la descrita por Rodríguez-García *et al.* (1997):

Tampón de reacción 4X de ArgR	1 X
ADN sonda marcado	2 nM
Extracto purificado de ArgR	0,8 μ M
Glicerol	9 %
Poli d(I-C)	40 μ g/ml
Agua MilliQ	hasta 15 μ l

La reacción se incubó durante 30 minutos a 30 °C.

La presencia del polímero sintético poli d(I-C) en las reacciones de unión tiene como objetivo que la elevada concentración de este análogo del ADN con respecto a la sonda marcada dificulte que acontezcan uniones de tipo inespecífico entre la proteína y la sonda, ya que todas las proteínas que reconocen sitios de unión al ADN muestran algún grado de afinidad inespecífica por los ácidos nucleicos (Lane *et al.*, 1992). Una vez se vio que la unión entre ArgR y la sonda era específica, dejó de añadirse a la mezcla de reacción.

Controles: para todas las reacciones de unión estudiadas se realizó una réplica en la que la proteína era sustituida por el mismo volumen del tampón en el que está conservada, es decir, tampón de elución.

Soluciones

- ♦ Tampón de reacción 4X de ArgR. Tris-HCl 40 mM, MgCl₂ 20 mM, CaCl₂ 10 mM, KCl 1 M, DTT 2 mM, L-arg 40 mM.

3.18.6.4. Electroforesis en condiciones no desnaturizantes

La separación electroforética de los complejos proteína-ADN y de la sonda libre se llevó a cabo en geles de poli(acrilamida) en condiciones no desnaturizantes. Tanto para la preparación de los geles de acrilamida como para la electroforesis de las muestras cargadas en ellos se empleó el sistema *MiniProtean III* (Bio-Rad) para geles de 7 x 8 cm. Dichos geles se prepararon de manera análoga a la indicada en el apartado 3.18.2 pero variando su composición para que el gel respetase la conformación nativa y funcionalidad de las proteínas. Los geles empleados para los EMSA se prepararon al 5 % de poli(acrilamida), y en una sola fase. La relación acrilamida/ bis-acrilamida fue del 50:1 para aumentar la separación de los complejos sonda-proteína en caso de que se produjeran. Cabe destacar la importancia de que todos los reactivos estén filtrados, y que en todo momento se utilicen guantes sin polvo, ya que esta técnica, basada en la fluorescencia, es altamente sensible a cualquier impureza o mota de polvo. En estos geles, la movilidad del complejo proteína-ADN está determinada principalmente por su conformación, y por la carga y tamaño de la proteína, de manera que el tamaño de la sonda influye en menor medida en la velocidad de

migración. La movilidad del complejo proteína-ADN puede variar según el porcentaje de acrilamida y la proporción acrilamida/bis-acrilamida del gel.

Protocolo

1. Preparar la mezcla de reacción cuyos componentes son los indicados por la tabla siguiente, añadidos en el orden indicado e, inmediatamente después de añadir los agentes polimerizantes (persulfato amónico y TEMED), verter entre los cristales montados con un separador de 1 mm.

Componentes	Gel al 5 %
Agua MilliQ	9,42 ml
Tampón TBE 10X	0,625 ml
Mezcla acrilamida:bis acrilamida (2,09 ml
Glicerol	0,3175 ml
Persulfato amónico 10 %	87,5 µl
TEMED	8,5 µl

2. Polimerizar a temperatura ambiente durante 1 hora y mantener a 4 °C hasta el momento de su uso. Es recomendable dejar los geles consolidándose durante toda la noche a 4 °C antes de su utilización, con el fin de que la polimerización sea lo más homogénea posible.
3. Pre-correr el gel durante 30 minutos a 100V con tampón TBE 0,5X antes de cargar las muestras.
4. Retirar el peine y limpiar los pocillos con una micropipeta o con una jeringa y tampón TBE.
5. Cargar las reacciones y correr durante 30 minutos a 100 V y luego 4-5 horas a 50 V.

Soluciones

- ♦ Tampón TBE 10X. Ácido bórico 0,89 M; 20 ml de EDTA 0,5 M pH 8, Tris HCl 0,89 M, agua destilada hasta 1 litro. El pH final suele estar en torno a 8,3 y no es necesario ajustarlo. Diluir para TBE 0,5X.
- ♦ Mezcla acrilamida:bis-acrilamida 50:1. Acrilamida 50 g, bis-acrilamida 1 g, agua MilliQ hasta 100 ml. Filtrar con tamaño de poro 0,22 µm.

3.18.6.5. Revelado del EMSA

Para el marcaje con fluoróforos, el proceso es rápido y sencillo; únicamente hay que desmontar el gel de la cubeta de electroforesis y colocarlo en el escáner de fluorescencia *Ettan DIGE Imager* (EDI) (GE Healthcare). 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.

Sin embargo, para el marcaje con digoxigenina una vez desmontado el gel de la cubeta de electroforesis hay que transferir el ADN a una membrana de nylon *Hybond-N* (GE Healthcare). Para ello se monta el sándwich del mismo modo que en el apartado 3.18.4. Una vez transferido es necesario fijar el ADN a la membrana en un *UV Stratalinker 2400* (Stratagene) a 120 mJ, y posteriormente detectar la quimioluminiscencia.

Protocolo

1. Equilibrar la membrana 1-5 minutos en tampón de lavado.
2. Incubar 30 minutos en 100 ml de solución de bloqueo que bloquea la unión específica de los anticuerpos a la membrana.
3. Incubar 30 minutos en 20 ml de solución de anticuerpos.
4. Lavar dos veces durante 15 minutos en 100 ml de tampón de lavado para eliminar los anticuerpos que no se hayan unido.
5. Equilibrar 2-5 minutos en 20 ml de tampón de detección que equilibra la membrana.
6. Poner la membrana con ADN en una bolsa de hibridación y aplicar 1 ml de la solución de trabajo CSPD, cubrir la membrana evitando la aparición de burbujas e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Quitar el exceso de líquido y sellar los bordes de la bolsa. Mantener en oscuridad.
8. Incubar 10 minutos a 37 °C para estimular la reacción de quimioluminiscencia.

9. Exponer la membrana bajo una película de autorradiografía (*Hyperfilm*, GE Healthcare) en un estuche con pantallas intensificadoras de calcio-tungsteno-fósforo, durante 1 o 2 horas.
10. Revelar la película sumergiéndola sucesivamente en las siguientes soluciones: 1-5 minutos en líquido revelador de rayos X Kodak, 1 minuto en solución de paro y 5 minutos en líquido fijador Kodak.
11. Lavar con agua y dejar secar unos minutos a temperatura ambiente.

Soluciones

- ♦ **Tampón de lavado:** 0,1 M ácido maleico; 0,15 M NaCl pH 7,5; 0,3 % v/v Tween 20.
- ♦ **Tampón de ácido maleico:** 0,1 M ácido maleico; 0,15 M NaCl pH 7,5 ajustado con NaOH sólido.
- ♦ **Tampón de detección:** 0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl pH 9,5.
- ♦ **Solución de bloqueo 10X:** Disolver *Blocking reagent* (Roche) 10 % v/v en el tampón de ácido maleico bajo agitación constante y a alta temperatura, por ejemplo en microondas. La solución se vuelve opaca.
- ♦ **Solución de bloqueo 1X:** Diluir la solución 10X en tampón de ácido maleico. Preparar siempre fresca.
- ♦ **Solución de anticuerpos:** Diluir en una proporción 1:10000 (75 mU/ml) los anticuerpos Anti-Digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) en la solución de bloqueo.
- ♦ **Solución de trabajo CSPD:** Diluir 0,1 mg/ml 100 veces en el tampón de detección la solución del compuesto *CPD-Star* (Roche).
- ♦ **Líquido revelador de rayos X:** Diluir el preparado comercial de Kodak en proporción 1:31 en agua MilliQ.
- ♦ **Solución de paro:** Metanol 10 %; acético 10 %.
- ♦ **Líquido fijador:** Diluir el preparado comercial de Kodak en proporción 1:9 en agua MilliQ.

3.18.7. Ensayos de protección con DNasa I

Las reacciones de unión entre ADN y proteína se llevaron a cabo en condiciones similares a las utilizadas en los ensayos de retraso en gel (apartado 3.18.6.3), con la única diferencia de que el volumen final de reacción se escaló hasta los 56 μl , empleándose para cada reacción 9,3 nmol/l de la sonda de ADN marcada en una sola de las cadenas con 6-FAM. Las concentraciones de Strep-ArgR en las mezclas variaron entre 6 y 8 μM . La protección de la secuencia operadora por ArgR resultó ser lábil, por lo que se añadió formaldehído al 0,1 % para estabilizar la unión. El exceso de formaldehído se inutilizó (para no interferir con la actividad de la DNasa I) con la adición de glicina.

Protocolo

1. Preparar las soluciones de unión proteína-ADN que se quieran someter al ensayo de protección frente a DNasa I. Incluir una reacción control sin proteína (SDP), para establecer una comparación en el patrón de digestión de ambas y así detectar las zonas protegidas por Strep-ArgR.

<i>Mezcla de reacción</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Volúmenes</i>
Tampón de unión 4 X	1 X	7,5 μl
ADN	9,3 nmol/l	X μl
Formaldehído 4 %	0,1 %	0,81 μl
Glicina 2,66 M	0,05 M	0,56 μl
SDP/Strep-ArgR 14,1 $\mu\text{mol/l}$	8 $\mu\text{mol/l}$	16,9 μl
Agua MilliQ		Hasta 30 μl

2. Incubar las mezclas a 30 °C durante 25 minutos.
3. Anular el exceso de formaldehído mediante la adición de glicina a una concentración final de 0,05 M. Incubar 5 minutos más.
4. Añadir 0,003 unidades de DNasa I, en un volumen de 3 μl , con lo que obtendremos 30 μl de volumen final.
5. Dejar actuar la DNasa a 30 °C durante un minuto.
6. Parar la reacción añadiendo 180 μl de tampón de paro.
7. Purificar los fragmentos de ADN generados en la digestión mediante extracción con fenol-cloroformo (ver apartado 3.8.1.1). Tras la adición del etanol y la precipitación del ADN por centrifugación, dejar secar el ADN en oscuridad.

8. Resuspender las muestras en formamida y cargarlas en un secuenciador de ADN (*ABI3130*, Applied Biosystems).
9. Analizar los resultados mediante el programa *Peak Scanner 1.0* (Applied Biosystems).

Soluciones

- ♦ La DNasa empleada (*Lyophilized bovine pancreas DNase I*, Roche) debe ser reconstituida en un tampón de la siguiente composición: Tris-HCl 20 mM pH 7,0; NaCl 50 mM; BSA 100 µg/ml; DTT 1 mM y glicerol al 50 % (v/v) para su conservación, y diluida para su uso en el mismo tampón con un 10 % de glicerol hasta una concentración final de enzima de 0,0025 unidades/µl.
- ♦ SDP: Solución Dilución de la Proteína. Tampón de elución de la proteína + glicerol puro (v/v).
- ♦ Tampón de paro de la digestión: Tris-HCl 9 mM pH 8,0; EDTA 40 mM.

3.19. Programas y páginas informáticas

A lo largo de este trabajo se emplearon diversas herramientas informáticas específicamente diseñadas para el manejo de información biológica. Así, para el manejo general de secuencias de ADN, diseño de construcciones y de oligos, entre otras utilidades, se empleó *Vector NTI suite 9* (Invitrogen),

Las comparaciones de secuencias de ADN y proteínas con las bases de datos disponibles (EMBL y SWISS-PROT) se llevaron a cabo con la ayuda de *BLAST* en el servidor del NCBI (National Center for Biotechnology Information: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Se utilizó la página StrepDB (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>) por poseer centralizados los genomas de varios *Streptomyces*.

El análisis de los electroforetogramas resultantes de los ensayos de protección frente a DNasa I se realizó empleando el programa *Peak Scanner 1.0* (Applied Biosystems).

La predicción de las posibles cajas ARG en distintas secuencias de ADN se realizó con la página *RSAT* (Regulatory Sequence Analysis Tools: <http://rsat.ulb.ac.be/>), herramienta que facilita la búsqueda de secuencias reguladoras en zonas no codificantes.

La creación de logotipos de los sitios de unión para proteínas se realizó con el servidor bioinformático <http://weblogo.berkeley.edu/>.

Para procesar, normalizar y tratar estadísticamente los datos de las micromatrices, se utilizó el programa Limma. El análisis de los datos estadísticos y el agrupamiento de los mismos se realizó con maSigPro, Betr y BHC.

Para analizar los resultados de las Q-PCR, normalizar y tratar estadísticamente los datos, se utilizó el programa Rest de Qiagen.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio comparativo de la expresión génica de las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$

Este trabajo se inició en nuestro laboratorio para conocer la función reguladora de la proteína ArgR en la expresión génica de *S. coelicolor*. Para ello, en primer lugar, se construyó el mutante *S. coelicolor* $\Delta argR$, en el cual el gen *argR* ha sido eliminado y sustituido por el casete de resistencia a apramicina (Pérez-Redondo *et al.*, 2012).

La caracterización fenotípica de esta cepa reveló que en el mutante *S. coelicolor* $\Delta argR$ el proceso de diferenciación está afectado y forma esporas apenas pigmentadas (fig. 4.1.a). La pigmentación de los caldos de cultivo, debido a la biosíntesis de actinorrodina y undecilprodigiosina, es muy inferior a la de la cepa control (fig. 4.1.b). De hecho, la medida de estos antibióticos mostró que la producción específica de undecilprodigiosina disminuía mucho y que la de actinorrodina desaparecía en el mutante. Adicionalmente la adición de L-arginina (25 mM) al medio en la cepa control reducía la producción específica de ambos antibióticos hasta casi su desaparición (Pérez-Redondo *et al.*, 2012).

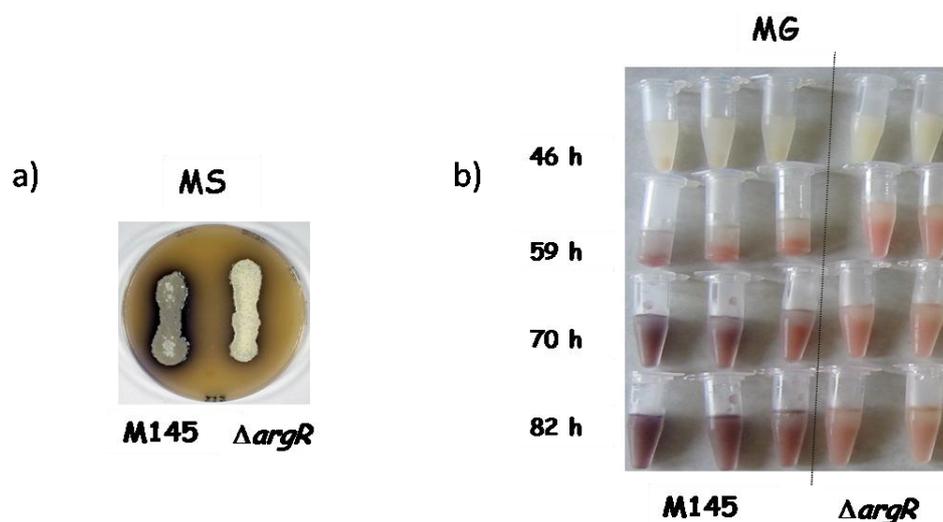


Fig. 4.1. a) Esporulación en MS de las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$ a la semana de cultivo. b) Muestras de fermentación de ambas cepas por triplicado o duplicado en medio MG, donde se aprecia la diferencia de pigmentación debida a la undecilprodigiosina.

Visto esto, se consideró que el gen *argR* tenía la suficiente importancia como para analizar sus efectos sobre la expresión de *S. coelicolor* y se iniciaron experimentos de transcriptómica (Pérez-Redondo *et al.*, 2012). Para ello se cultivaron *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$ en medio MG y MG con 25 mM de L-arginina y se tomaron muestras de fermentación a las 32 horas para extracción de ARN. En ese momento del cultivo las células están en fase de crecimiento exponencial, hay suficiente biomasa y solo está presente el metabolismo primario, es decir, aún no ha comenzado la producción de antibióticos. Se siguió un diseño de hibridación en micromatrices frente a ADN genómico de la cepa parental para analizar 4 réplicas biológicas de cada una de las 4 condiciones: 2 cepas (*S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$) y 2 condiciones de cultivo (medio líquido MG con y sin adición de L-arginina 25 mM). El uso de micromatrices permite evaluar diferencias de expresión de los genes en distintas condiciones, pudiendo ser estas: cepas, tiempos de cultivo, estados nutricionales, etc. Si para la comparación de los ARN se utiliza el ADN genómico del organismo de estudio, logramos tener una referencia común a todas ellas.

Las micromatrices se adquirieron al Functional Genomics Laboratory de la Universidad de Surrey (Reino Unido). Dichas micromatrices contienen sondas duplicadas para 7944 genes cromosomales, abarcando por tanto el 97,5 % del genoma de *S. coelicolor*.

El análisis estadístico de las cuatro réplicas biológicas de cada condición experimental en este primer conjunto de micromatrices permitió identificar 459 genes con diferencias transcripcionales significativas en al menos uno de los posibles contrastes entre las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$ y condiciones de cultivo, con o sin adición de arginina 25 mM (fig. 4.2).

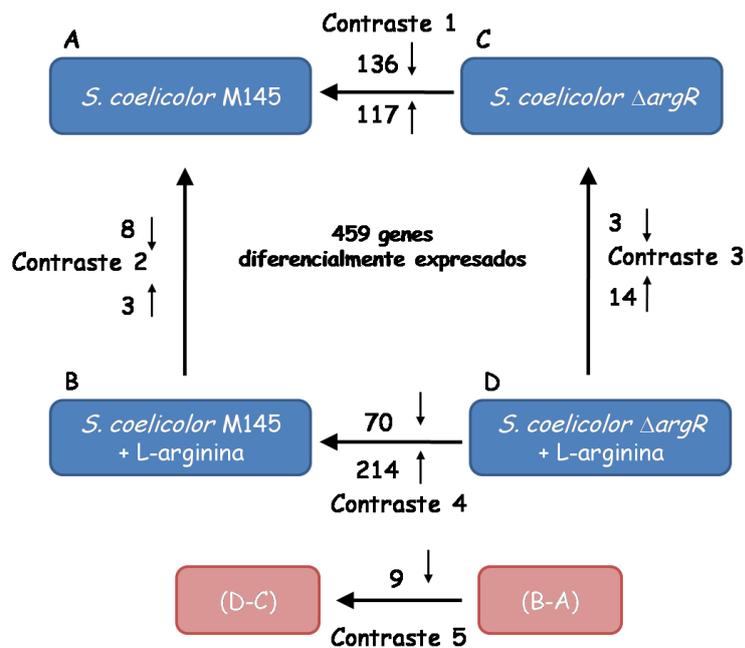


Fig. 4.2. Esquema del número de genes diferencialmente expresado en los cinco contrastes. Las cepas fueron cultivadas en ausencia (A y C) y presencia de arginina 25 mM (B y D). Las flechas grandes indican la comparación entre dos condiciones, mientras que las flechas pequeñas indican el número de genes sobreexpresados (punta de flecha hacia arriba) o subexpresados (punta de flecha hacia abajo) en cada uno de los contrastes. Tomado de Pérez-Redondo *et al.*, 2012.

Tras el análisis de resultados se vio que las diferencias en el patrón de expresión eran más dependientes de la presencia o ausencia de ArgR, que solo se forma en la cepa control (contrastos 1 y 4, cepa control vs cepa mutante) que de la presencia o ausencia de L-arginina en el medio de cultivo (contrastos 2 y 3) que solo afecta aproximadamente al 6 % de los genes diferencialmente expresados.

En relación al metabolismo primario, en *S. coelicolor* ArgR regula negativamente el metabolismo de arginina y el de otros aminoácidos, y el de purinas y pirimidinas. ArgR regula positivamente los genes de asimilación de nitrógeno y algunos aspectos relacionados con la esporulación. También se observó un efecto sobre el metabolismo secundario, ya que se afecta la biosíntesis de algunos metabolitos como los policétidos pertenecientes a la agrupación *cpk*. Además, modifica la expresión de distintos genes que codifican reguladores y otros factores transcripcionales.

Como complementación del estudio anterior durante esta tesis doctoral se realizó un segundo análisis transcriptómico a distintos tiempos de cultivo utilizando aquellas condiciones que en el experimento previo dieron mayores diferencias, es decir, el control *S. coelicolor* M145 y el mutante *S. coelicolor* $\Delta argR$ en medio MG sin adición de L-arginina.

4.1.1. Estudio de *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$ en una serie temporal

A fin de realizar un análisis de la expresión génica a lo largo del tiempo se extrajo ARN de 3 réplicas biológicas de *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$ a las 32, 42, 49, 56 y 66 horas de cultivo en medio MG sin L-arginina. Los patrones de crecimiento de las cepas fueron similares (fig 4.3) y el patrón de biosíntesis de actinorrodina y undecilprodigiosina de la cepa de referencia fue el esperado, alcanzando el pico máximo aproximadamente a las 70 horas, y siendo la producción de actinorrodina de unos 50 nmoles por mg de peso seco, y el de undecilprodigiosina de 6 nmol/mg (no mostrado).

El ADN genómico usado como referencia en la hibridación fue aislado mediante el método Kirby (Kieser *et al.*, 2000) cuando el cultivo se encontraba en fase estacionaria.

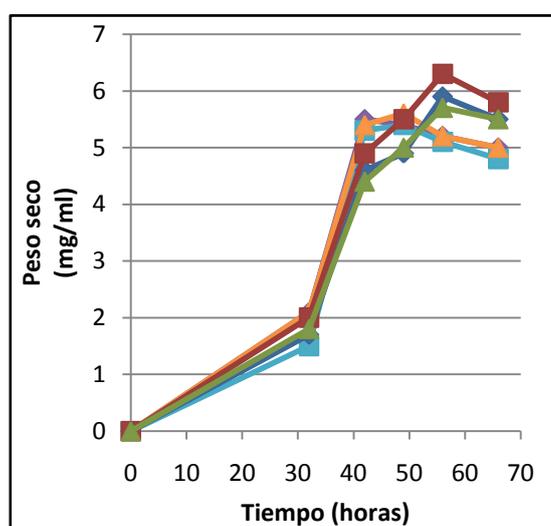


Fig. 4.3. Gráfica de crecimiento de las tres réplicas de las cepas *S. coelicolor* M145 (azul oscuro, granate y verde) y *S. coelicolor* $\Delta argR$ (azul claro, naranja y violeta).

Las micromatrices *Sco-Chip*²-v2 de *S. coelicolor* se adquirieron a OGT. Esta versión de cristales tiene 4 matrices independientes con 43798 sondas cada una (formato 4x44K) de 60 nucleótidos de longitud. Las sondas que pertenecen a secuencias codificantes corresponden a la cadena del ARNm para detección de la expresión génica. Para las regiones intergénicas, las sondas corresponden a una única cadena. El espaciado entre sondas en el genoma es de 135 pb de media (Bucca *et al.*, 2009). Por tanto, hay varias sondas para cada gen.

Tras la normalización y análisis de los datos de las hibridaciones los resultados se presentan mediante dos expresiones, valor Mg y Mc. El valor Mg es un valor absoluto obtenido mediante el logaritmo en base dos del cociente de la intensidad de hibridación del fluoróforo Cy3 respecto a la de Cy5 (en nuestro caso, al haber varias sondas para un mismo gen, se hace una media de los valores de intensidad de fluorescencia), lo que refleja la abundancia de un transcrito específico con respecto a la copia del gen que lo codifica. El valor Mc es un valor relativo que equivale al Mg de la cepa mutante menos el Mg de la cepa control. Un valor de Mc igual a +1 significa que un determinado gen se está expresando dos veces más en el mutante que el mismo gen en el control. Un valor de Mc negativo equivale a una disminución de la expresión del gen en el mutante respecto al control.

Como resultado del análisis de los datos (apartado 3.13.4.5), al comparar el transcriptoma de la serie temporal de la cepa parental *S. coelicolor* M145 frente a la cepa mutante *S. coelicolor* $\Delta argR$, se

obtuvieron 1544 genes estadísticamente significativos (GES) que presentaron un patrón de transcripción diferente en al menos uno de los tiempos ensayados poniendo el límite del nivel de significación en un valor $p < 0,01$. La elección del nivel de significación es en cierto modo arbitraria. El valor p es aquel en el cual todo nivel de significación inferior al valor p comporta aceptar la hipótesis planteada. Hay 245 GES a las 32 horas; 791 a las 42 horas; 537 a las 49 horas; 261 a las 56 horas; y 586 a las 66 horas.

Las diferencias transcripcionales encontradas (para un valor $p < 0,01$) muestran que los genes alterados están relacionados con (el anexo 6.2 recoge los más significativos con sus valores M_c y p):

- Metabolismo de aminoácidos (75)
- Metabolismo de purinas y pirimidinas (31)
- Metabolismo del nitrógeno y del fosfato (20)
- Estructura ribosomal, recombinación y reparación de ADN (25)
- Síntesis de coenzimas (13)
- Estructura y morfología celular (77)
- Metabolismo secundario (74)
- Sistemas de dos componentes y transportadores ABC (57)
- Proteínas de secreción (118)
- Proteínas de membrana (161)
- Reguladores y factores sigma (106)
- Genes no clasificados (174)
- Función hipotética o desconocida (613).

En la mayor parte de los casos los resultados de este segundo experimento de transcriptómica, serie temporal, corroboran los datos del primero, elaborado a las 32 horas de cultivo. Sin embargo, hay casos en los que se produce un efecto diferencial únicamente a tiempos tardíos (y entonces en el primer estudio no habían sido detectados).

Una vez obtenidos los resultados transcriptómicos con la lista de GES, se agruparon los distintos genes en base al perfil utilizando el programa **maSigPro**. La metodología *maSigPro* (*microarray Significant Profile*) usa análisis de regresión lineal para modelar la expresión génica. Detecta gen a gen los perfiles con evolución diferencialmente significativa en el tiempo y selecciona los GES (Conesa *et al.*, 2006). Gracias a este programa obtuvimos una clasificación de los genes en 9 patrones de expresión, comparando la cepa mutante con la control (fig. 4.4). Pero además, *maSigPro* proporciona una alternativa de agrupación, que emplea los coeficientes de regresión en lugar de los datos originales. Esta opción agrupa los genes en base a los cambios estadísticamente significativos del perfil. No todos los 1544 GES están incluidos en los 9 grupos, ya que este programa clasifica los genes más representativos en el número de grupos que se le indique con la comparación elegida, en este caso 9 grupos enfrentando el mutante al parental. Podría haberse elegido otra clasificación, como la otorgada por la comparación de la evolución del comportamiento de los genes a lo largo del tiempo en cada cepa.

De los genes incluidos en dichos grupos algunos se ajustan más al patrón de expresión y otros menos, como veremos en los casos concretos.

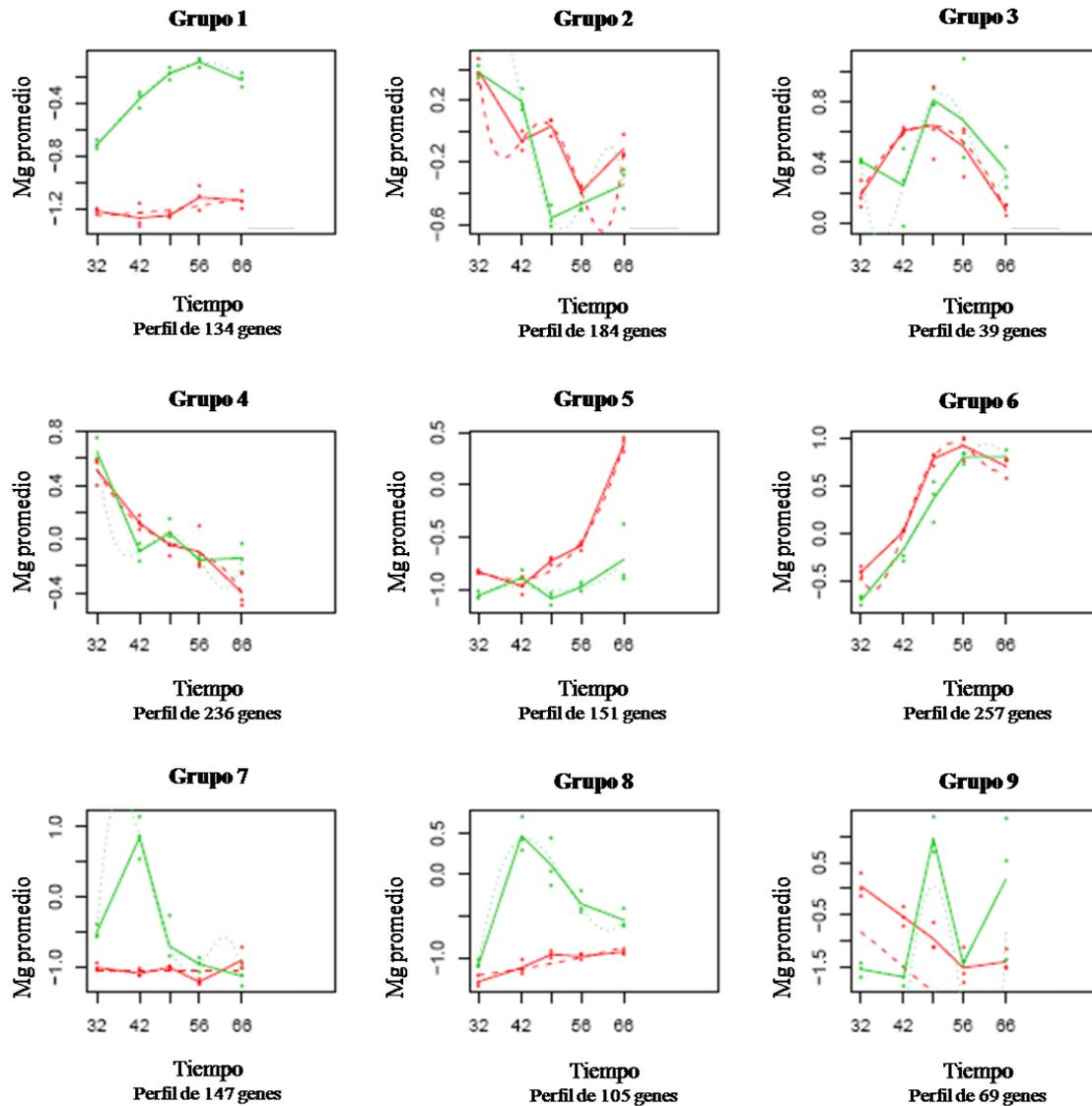


Fig. 4.4. Patrones de comportamiento obtenidos a partir del programa maSigPro en la comparación entre cepas. El color rojo representa la cepa *S. coelicolor* M145; el color verde, *S. coelicolor* $\Delta argR$. Las líneas continuas representan la unión del valor medio de expresión génica en cada tiempo para cada grupo experimental. Las curvas ajustadas empleando los coeficientes de regresión se representan como líneas de puntos.

Experimentos con micromatrices en distintas especies de microorganismos con ArgR y mutantes $\Delta argR$ revelan funciones como la represión de los genes que codifican transportadores de arginina e histidina en *E. coli* (Caldara *et al.*, 2006), la regulación de los genes de biosíntesis de pirimidinas en *L. lactis* (Larsen *et al.*, 2008) y la represión de los genes que codifican la glutamato sintasa implicada en la biosíntesis de glutamato (Lu *et al.*, 2004). En *S. coelicolor*, como veremos a continuación, el papel regulador de ArgR es mucho más amplio.

4.1.2. Genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos

Este grupo incluye genes que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis o degradación de aminoácidos y muestran una expresión alterada. Se analizarán más profundamente los genes implicados en la biosíntesis de arginina.

4.1.2.1. Genes relacionados con el metabolismo de arginina

En *S. coelicolor* los genes de biosíntesis de arginina *argCJBDR* (SCO1580-SCO1576) se hallan agrupados y se transcriben en un policistrón de acuerdo con la predicción de Charaniya *et al.* (2007), mientras que *argG* (SCO7036), *argH* (SCO1570) y *arcB* (SCO5976, denominado *argF* en *E. coli*) están aislados (ver apartado 1.5.4). Como veremos en el apartado 4.4, en la región promotora de la agrupación génica *argCJBDR* y en los promotores de *argG*, *argH* y *arcB* hay cajas ARG que encajan con la secuencia descrita por Rodríguez-García *et al.* (1997) para *S. clavuligerus*.

En *S. coelicolor*, igual que en *B. subtilis*, *E. coli* o *S. clavuligerus*, la expresión de los genes de biosíntesis de arginina está controlada por ArgR (Soutar y Baumberg, 1996), por lo que sería lógico pensar que el mutante que carece del gen represor tiene desreprimida la transcripción y por tanto muestra una mayor cantidad de transcrito de los genes *arg*, como se observa en los resultados de las micromatrices del primer experimento de transcriptómica a las 32 horas de cultivo (fig. 4.5.a).

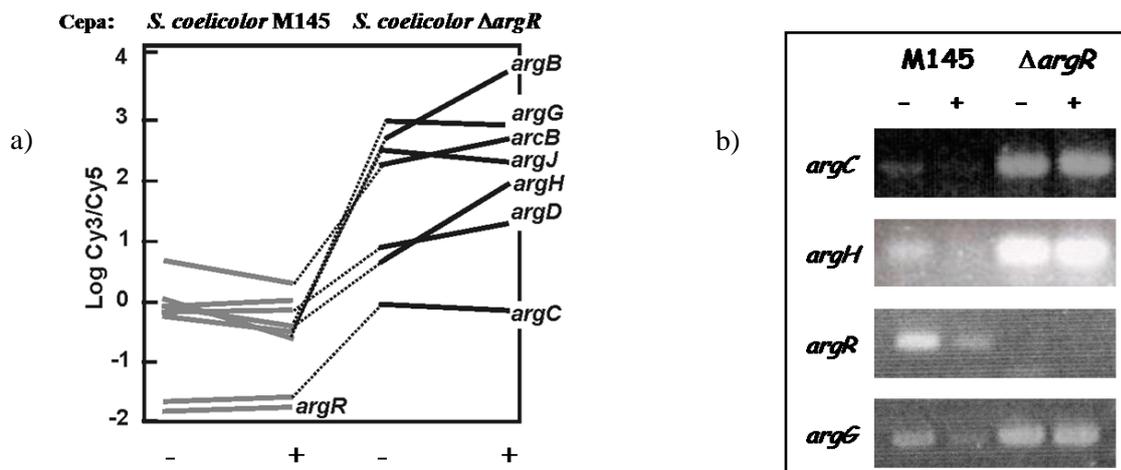


Fig. 4.5. a) Expresión (log Cy3/Cy5 equivalente al Mg) de los genes de biosíntesis de arginina y b) detección de distintos transcritos mediante RT-PCR. La imagen corresponde al siguiente número de ciclos de amplificación: *argH* 3+22, *argG* 3+22, *argC* 3+22, *argR* 3+30. El ARN se obtuvo a las 32 h de cultivo de *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$ en MG (-) y en MG con 25 mM de arginina (+).

Para comprobar por RT-PCR los resultados de las micromatrices de la fig. 4.5.a se eligieron los genes *argG* y *argH*, por estar aislados en el cromosoma, y *argC* por ser el primer gen del policistrón. Estos genes mostraron mayor nivel de transcripción en la cepa mutante que en la control, lo que coincide con lo observado en las micromatrices (fig. 4.5). Para *argR* no aparece amplificación con el ARN del mutante, ya que el gen fue sustituido por el casete de resistencia a apramicina. Además, se observa en la cepa control mayor amplificación en la muestra obtenida del cultivo sin arginina aunque tal efecto no se refleja en la fig. 4.5.a. Esta expresión diferencial de los genes *arg* a las 32 horas fue también validada mediante expresión de un gen testigo, el gen *luxAB*, y medida de la luminiscencia. La fig. 4.6 indica que, en *S. coelicolor*, la

actividad de los promotores *argH* y *arcB* se ve afectada por la presencia/ausencia del gen *argR*, siendo el resultado especialmente significativo a tiempos tempranos.

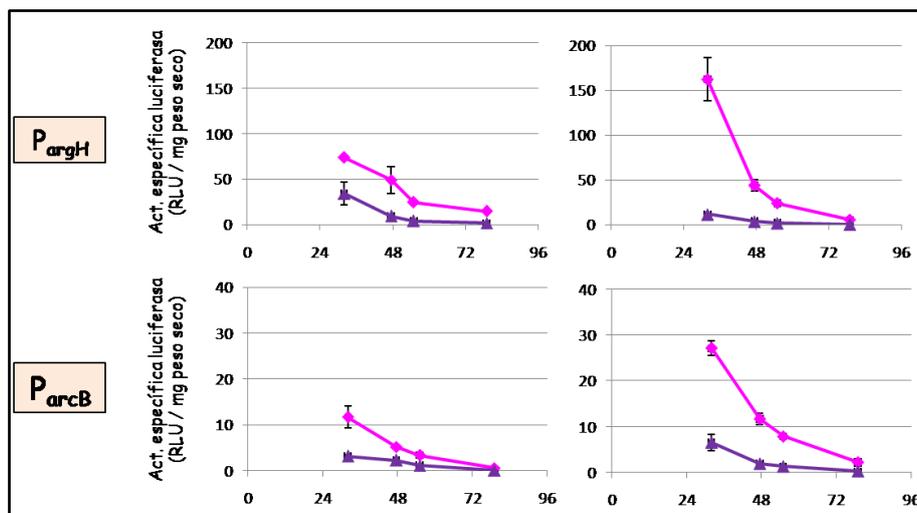


Fig. 4.6. Actividad luciferasa específica de los promotores de los genes *argH* y *arcB* fusionados a los genes *luxAB* en las cepas *S. coelicolor* M145 (▲) y *S. coelicolor* $\Delta argR$ (◆). Las gráficas de la izquierda corresponden al medio MG sin adición de L-arginina y las de la derecha al medio MG con suplemento de L-arginina 25 mM.

En el segundo experimento de micromatrices, todos los genes relacionados con la biosíntesis de arginina, salvo *argR*, muestran unas diferencias de Mc entre 2,89 y 5,25, lo que significa que en la cepa $\Delta argR$ estos genes se expresan entre 7 y 38 veces más, lo cual confirma el efecto represor de ArgR. De aquí en adelante la comparación será en todos los casos cepa mutante vs cepa parental. La sobreexpresión de estos genes en el mutante es continua a lo largo del tiempo y relativamente constante (Fig. 4.7).

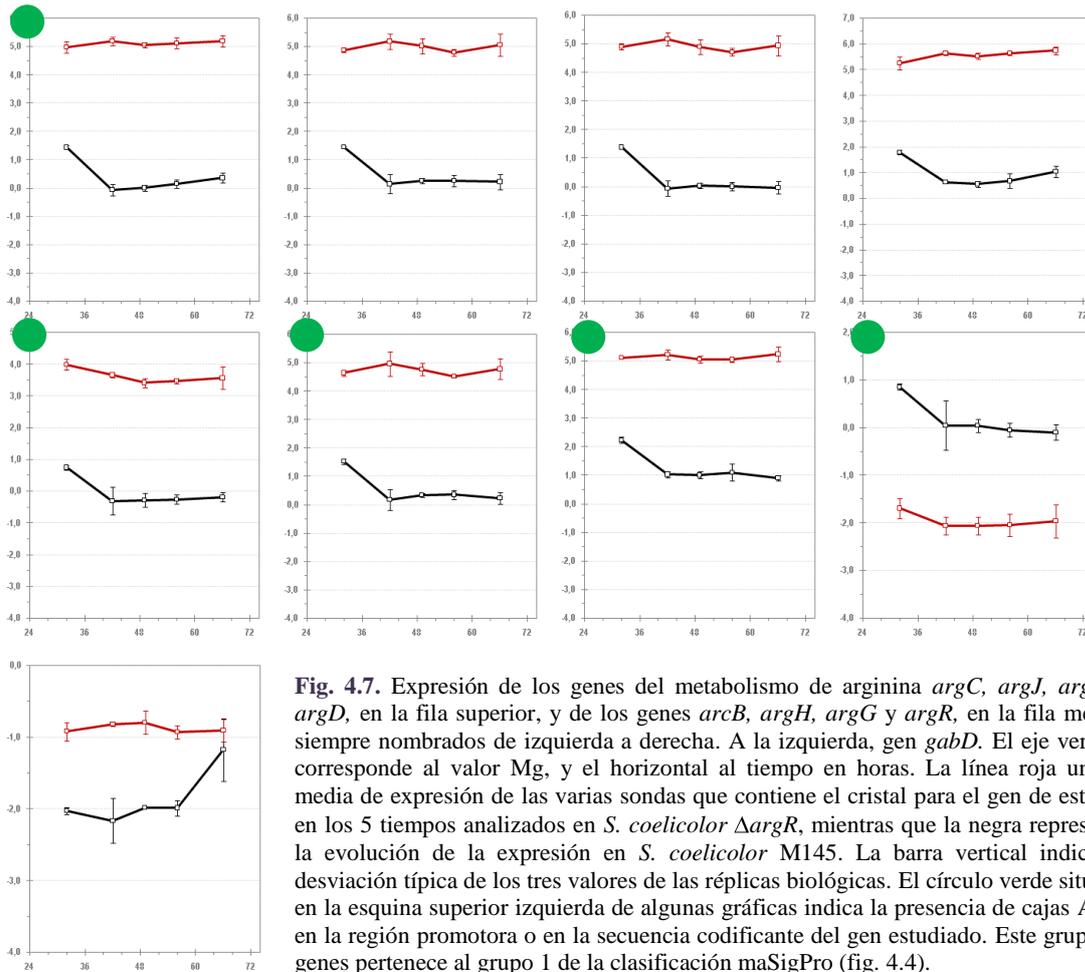
El gen que muestra mayor desrepresión es *argC*, cuyo promotor controla la expresión del operón *argCJBDR*. Se conoce la existencia de dos cajas ARG en el promotor de *argC* (apartado 4.4.3). El gen que presenta una menor desrepresión es *arcB* (SCO5976), quizás porque las cajas ARG presentes en su promotor son las de menor puntuación (comparando con el resto de cajas de los genes *arg*, ver apartado 4.4.3 o Anexo 6.3).

El gen *gabD* (SCO7035), por delante de *argG*, codifica una succinato-semialdehído deshidrogenasa dependiente de $NAD(P)^+$, que probablemente aporte el succinato necesario para que *argG* lo incorpore en su reacción, y dé lugar a argininosuccinato. Como era de esperar, mantiene el mismo patrón de expresión que el resto de los genes *arg*.

Las micromatrices realizadas en *P. aeruginosa*, *L. lactis* y *E. coli* muestran que ArgR regula los genes de biosíntesis de arginina de forma negativa, no así en *S. suis*, donde es esencial únicamente para la regulación positiva del operón *arcABC* implicado en la degradación de arginina (Lu *et al.*, 2004; Caldara *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2008; Fulde *et al.*, 2011).

En *P. aeruginosa* ArgR tiene un papel inductor sobre la expresión de los genes que codifican transportadores de arginina y ornitina, sobre los operones de las rutas de degradación de arginina y sobre transportadores ABC y proteínas de membrana (Lu *et al.* 2004). La regulación positiva de los genes catabólicos de arginina ocurre también en otros organismos, como en *L. lactis*, *S. suis* y *E. coli* (Larsen *et al.*, 2004, 2005, 2008; Caldara *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2009; Fulde *et al.* 2011). En nuestro trabajo no se

han detectado genes claros para el catabolismo de arginina en *Streptomyces*. De los genes anotados como implicados en transporte de arginina según StrepDB (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>), no obtenemos ninguno con un patrón de expresión diferencial en ambas cepas. Los homólogos de la agrupación que en *S. avermitilis* está anotada como transportador ABC para arginina y ornitina, y que en *S. coelicolor* no se dice que tengan esa función, tampoco presentan un patrón diferente (SCO5258-SCO5260). Por otra parte, una búsqueda de homólogos de los transportadores de arginina controlados por ArgR en *E. coli* (Caldara *et al.*, 2007) tampoco reveló la existencia de un sistema similar diferencialmente expresado en los experimentos transcriptómicos. Por tanto, desconocemos cuáles son los transportadores de arginina en *S. coelicolor* y si ArgR los controla.



4.1.2.2. Otros genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos

La ausencia de ArgR tiene efecto sobre genes implicados en el metabolismo de otros aminoácidos. Así, los genes relacionados con la biosíntesis de valina, leucina e isoleucina *leuA* (SCO2528), *leuB* (SCO5522) y *leuCD* (SCO5553-SCO5554), tienen mayor expresión en la cepa parental aunque no significativa (Fig. 4.8), a pesar de que en la región promotora de transcripción divergente *leuA*-SCO2529 se ha comprobado la existencia de una caja ARG funcional (fig. 4.76 del apartado 4.4.37).

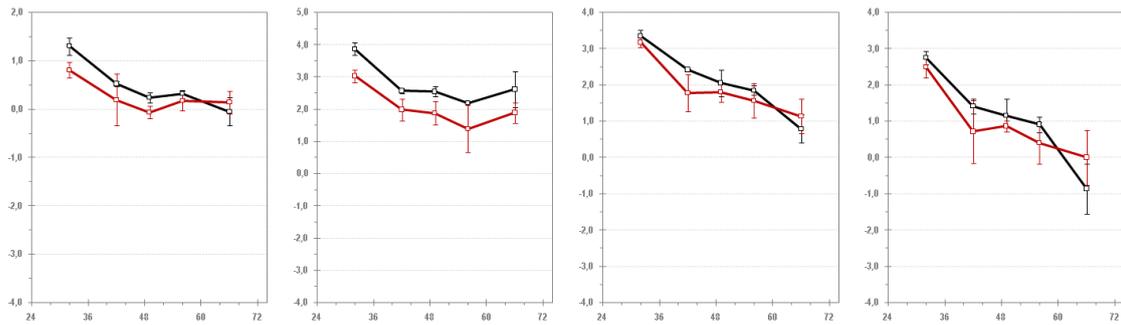


Fig. 4.8. Expresión de los genes *leuA*, *leuB*, *leuC* y *leuD*. Ver pie de la fig. 4.7. Estos genes pertenecen al grupo 2 de la clasificación maSigPro (fig. 4.4).

Los genes *hppD* (SCO2927) y *glyA3* (SCO5364), implicados en el metabolismo de glicina, serina y treonina, presentan mayor expresión en la cepa mutante como mínimo en dos tiempos (fig. 4.9). Cabe destacar que estos genes están implicados en otras funciones además de las indicadas, como la biosíntesis de terpenoides.

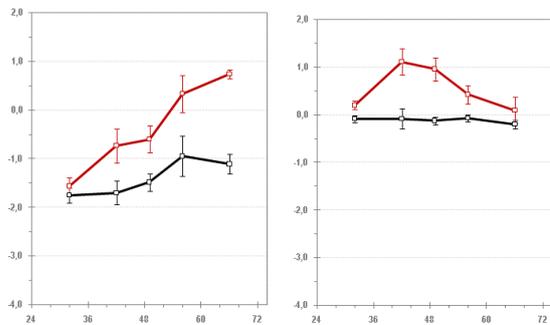


Fig. 4.9. Expresión de los genes *hppD* y *glyA3*. Ver pie de la fig. 4.7.

4.1.3. Genes relacionados con el metabolismo de purinas y pirimidinas

Las biosíntesis de arginina y pirimidinas tienen en común la incorporación de carbamoilfosfato (CP) en sus rutas de síntesis. La carbamoil-fosfato sintetasa es una enzima formada por dos subunidades, grande y pequeña, codificadas por los genes *pyrA* y *pyrAa* que producen CP. La síntesis de esta enzima se regula por represión acumulativa mediada por citosina, arginina y la proteína ArgR (Bussey y Ingraham, 1982). En la ruta de la arginina, *arcB* codifica la ornitina carbamoiltransferasa, que une CP con ornitina para dar citrulina. En la ruta de las pirimidinas, la aspartato carbamoiltransferasa codificada por *pyrB* sintetiza carbamoilaspartato a partir de aspartato y CP, que será transformado en UMP gracias a la actividad de las enzimas codificadas por *pyrCDEF* (Turnbough y Switzer, 2008). El operón de las pirimidinas (SCO1481-SCO1488) está regulado por la proteína codificada por *pyrR*, PyrR, a través de su unión a los sitios de atenuación del ARNm de los genes *pyr*. PyrR contiene cajas ARG en su secuencia promotora, las cuales unen *in vitro* ArgR. También detectamos cajas funcionales en los promotores de los genes *pyrA* y *pyrB* (apartado 4.4.4).

Según los datos obtenidos de las primeras micromatrices ArgR regula negativamente los genes de biosíntesis de pirimidinas, de modo que el mutante tiene mayores niveles de transcrito de varios de los genes implicados (fig. 4.10.a). A continuación se muestran los resultados para los genes que se validaron por RT-PCR: *pyrA*, *pyrR* y SCO1485. Se eligieron estos genes por ser el primero de la ruta, por ser el

regulador, y por presentar las mayores diferencias de transcripción en las micromatrices, respectivamente. Claramente los transcritos de *pyrA* y SCO1485 tienen una amplificación mayor en el mutante, si bien el resultado es más ambiguo en *pyrR*. En conjunto el resultado es el esperado, ya que los tres genes se sobreexpresan en el mutante (fig. 4.10.b).

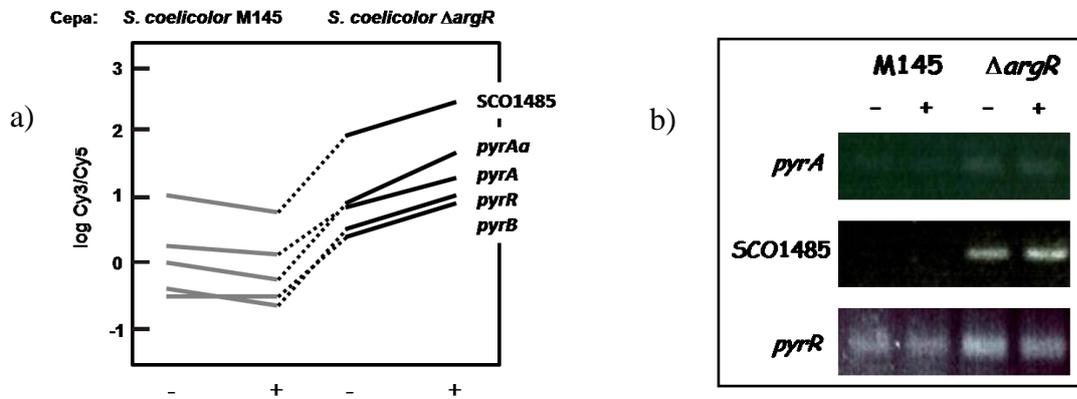


Fig. 4.10. a) Expresión de los genes de biosíntesis de pirimidinas y b) detección de distintos transcritos mediante RT-PCR. La imagen corresponde al siguiente número de ciclos de amplificación: *pyrA* 3+33, SCO1485 3+28 y *pyrR* 3+23. El ARN se obtuvo a las 32 horas de cultivo de *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$ en MG (-) y en MG con 25 mM de L-arginina (+).

Se hicieron experimentos de luminiscencia con el promotor del gen *pyrR*, que junto con la transcriptómica, indican que, en *S. coelicolor*, el promotor de *pyrR* está afectado por la presencia/ausencia del gen *argR* (fig. 4.11).

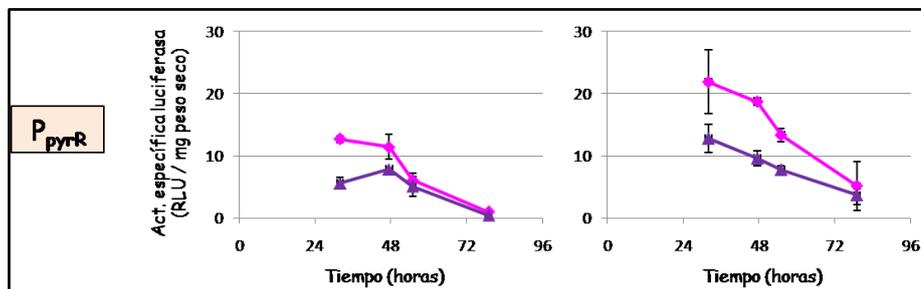


Fig. 4.11. Actividad luciferasa específica del promotor del gen *pyrR* fusionado a los genes *luxAB* en las cepas *S. coelicolor* M145 (▲) y *S. coelicolor* $\Delta argR$ (◆). Las gráficas de la izquierda corresponden al medio MG sin adición de L-arginina, y las de la derecha al medio MG con suplemento de L-arginina 25 mM.

En la serie temporal, el patrón de expresión de los genes *pyr* es similar al observado en los genes de biosíntesis de arginina, por lo que también pertenecen al grupo 1 de la clasificación maSigPro (fig. 4.4), con una amplia desregulación a lo largo de todos los tiempos, siendo la expresión en *S. coelicolor* $\Delta argR$ entre 3 y 13 veces mayor que en *S. coelicolor* M145 (Fig. 4.12).

Larsen *et al.* (2008) observaron en *L. lactis* que ArgR y AhrC regulan débilmente los genes de biosíntesis de pirimidinas. En *E. coli*, *B. subtilis* y *S. typhimurium*, el operón *carAB* que codifica la carbamoilfosfato sintetasa está reprimido por arginina, por ArgR y por PurR, lo cual es de esperar ya que, como hemos dicho, el carbamoilfosfato es esencial para la síntesis de arginina y de purinas y pirimidinas (Paulus y Switzer, 1979; Lu *et al.*, 1989; Devroede *et al.*, 2004).

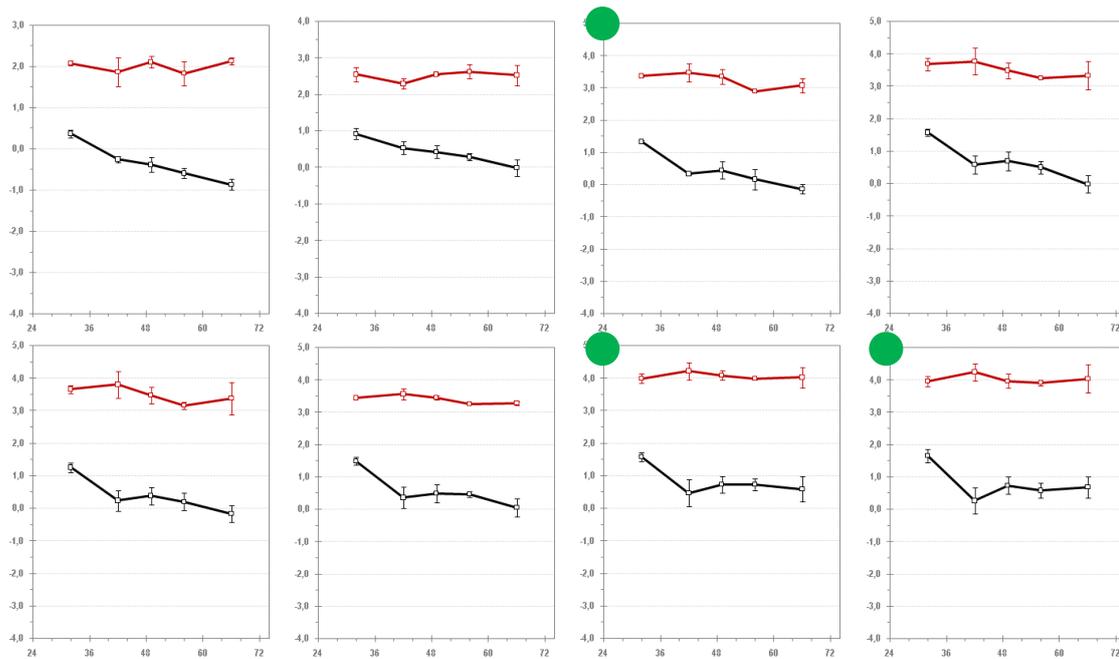


Fig. 4.12. Expresión de los genes del operón de las pirimidinas *pyrF*, *pyrD*, *pyrA* y *pyrAa*, arriba, y *SCO1485*, *pyrC*, *pyrB* y *pyrR*, abajo. Ver pie de la fig. 4.7.

Dos grupos de reductasas de ribonucleótidos (RNRs) en *Streptomyces*, que catalizan la conversión de ribonucleótidos en deoxiribonucleótidos, están codificadas por las agrupaciones *nrdABS* (SCO5226-5224) y *nrdRJ* (SCO5804-5805). La primera agrupación codifica una RNR dependiente de oxígeno y se regula por el riboswitch dependiente de B12 localizado por delante de *nrdA* (Borovok *et al.*, 2006), asociado al gen *nrdX* en la anotación original del genoma. En los resultados de las micromatrices, la expresión de esta zona (del gen *nrdS* que codifica un regulador de tipo AraC, y de *nrdJ*, que codifica el segundo RNR, independiente de oxígeno), es mayor en la cepa mutante (fig. 4.13). Las micromatrices en las que se realizó un estudio de expresión a lo largo del tiempo, permiten observar que las diferencias en estas RNRs aparecen únicamente en tiempos tempranos (no mostrado), quizás por el hecho de ser esenciales para la síntesis de ADN *de novo* y para su reparación. A tiempos tempranos no sería necesaria su actuación, mientras que a tiempos más tardíos, el micelio comenzaría a envejecer y el cultivo comenzaría a saturarse, por lo que la expresión de estas RNRs aumentaría.

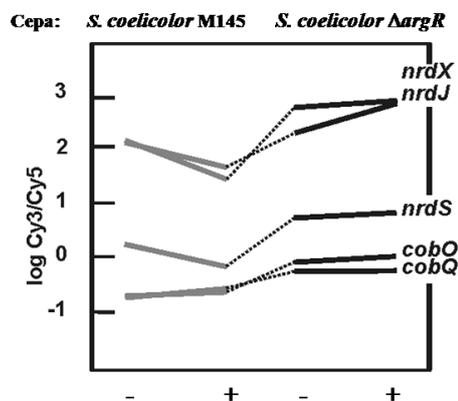


Fig. 4.13. Expresión de los genes de biosíntesis de cobalaminas y desoxiribonucleótidos (ver fig. 4.5). Sólo se representa el patrón de expresión del gen *nrdS*, asumiendo que los genes *nrdA* y *nrdB* presentan el mismo comportamiento. La cobalamina se requiere para la expresión de *nrdJ* (Borovok *et al.*, 2006).

Otra agrupación diferencialmente expresada en la serie temporal es SCO0689-SCO0691 (fig. 4.14), que participa en la degradación de purinas. Estos genes se cotranscriben y pertenecen al grupo 1 de la clasificación maSigPro (fig. 4.4). La hipoxantina es un producto de degradación de la adenina, y este grupo

de enzimas interviene degradándola a su vez a xantina, y esta a urato, que posteriormente dará lugar a urea, la cual a su vez tras sucesivas reacciones quedará en forma de NH_3 y CO_2 . El resto de genes que participan en la degradación de purinas son SCO1132, SCO1133, SCO1134, SCO4971 y SCO4972, cuyo patrón de expresión es contrario al de esta agrupación, es decir, con menores niveles de transcrito en la cepa mutante (no se muestra). No se han encontrado cajas ARG en los promotores de estos genes, por lo que nuestra hipótesis apunta a un tipo de regulación indirecta. Sí se ha encontrado una caja ARG de puntuación 6,77 bits en la secuencia codificante del gen SCO0691, a 525 pb de su inicio de transcripción. Salvo el primer tiempo, la expresión en la cepa mutante oscila entre 1,5 y 2,4 veces más que en la cepa parental.

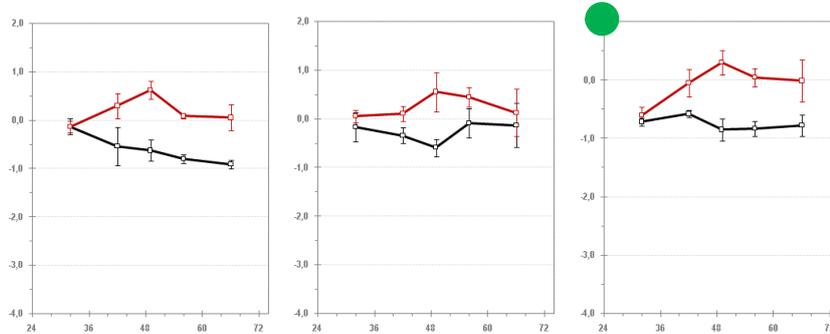


Fig. 4.14. Expresión de los genes SCO0689-SCO0691. Ver pie de la fig. 4.7.

4.1.4. Genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno

En bacterias, la asimilación de nitrógeno implica la incorporación de nitrógeno inorgánico a los procesos metabólicos de la célula (Merrick y Edwards, 1995) y resulta en la síntesis de glutamato y glutamina, que son los mayores donadores de nitrógeno de la célula. Debido a la limitación ambiental y la variable disponibilidad de nitrógeno, las bacterias han desarrollado complejas redes de regulación para el control transcripcional de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno (Tiffert *et al.*, 2011). Los reguladores GlnR y GlnRII, ambos de tipo OmpR, intervienen en el control transcripcional de importantes genes del metabolismo de nitrógeno (Reuther *et al.*, 2007).

Las glutamina sintetasas (GS) son enzimas clave en la asimilación de nitrógeno. *S. coelicolor* tiene dos GS funcionales (GlnA y GlnII). El gen *glnII* (SCO2210), que codifica la glutamina sintetasa de tipo eucariota GlnII, cotranscribe con el gen SCO2211. El gen *glnA* (SCO2198) codifica la glutamina sintetasa de tipo procariota. Fink *et al.* (2002) indican que la actividad GS dominante está representada por GlnA. Estas enzimas se regulan a nivel transcripcional por reguladores como GlnR y post-transcripcional por una adenililtransferasa, GlnE (Fisher y Wray, Jr., 1989; Fink *et al.*, 1999). Ambos genes, *glnII* y *glnA* muestran mayor expresión en la cepa parental a las 32 horas de cultivo en MG (fig. 4.15).

La agrupación SCO5583-SCO5586 (*amtB*, *glnK*, *glnD* y *ffh*) codifica proteínas con un importante papel en el transporte y metabolismo del nitrógeno. El gen *glnK* (SCO5584) codifica una proteína PII transmisora de señales que modula la activación/inactivación de la glutamina sintetasa por adenilación/desadenilación. Los genes flanqueantes de *glnK*, *amtB* y *glnD*, que codifican un transportador de amonio y una uridililtransferasa respectivamente, muestran la misma regulación, ya que forman un operón: todos ellos están menos expresados en la cepa mutante (fig. 4.15). La uridililtransferasa GlnD responde a cambios en las condiciones de nitrógeno modificando la proteína PII posttranscripcionalmente por adenilación (Dong *et al.*, 2006; Sola-Landa *et al.*, 2013).

Según los resultados de las primeras micromatrices, ArgR regula positivamente los genes que codifican las glutamina sintetasas y el operón *amtB*, *glnK* y *glnD*, de modo que en el mutante hay menor nivel de transcritos que en la cepa control. Se analizaron por RT-PCR los transcritos de *glnK*, *glnII* y *glnA*. En la fig. 4.15b se confirma este resultado, observándose diferencias del nivel de amplificación especialmente clara para *glnK* y *glnA*. Todos estos genes parecen requerir la acción de ArgR para una expresión óptima. Resultó sorprendente encontrar un patrón transcripcional diferente de los genes *amtB-glnK-glnD* y *glnII* y *glnA* en el mutante $\Delta argR$, donde, sin embargo, los reguladores *glnR* y *glnRII* (SCO2213 y SCO4159 respectivamente) no están afectados por la presencia/ausencia de ArgR. Por tanto, parece que la regulación positiva de ArgR en el metabolismo del nitrógeno no está mediada por GlnR o GlnRII.

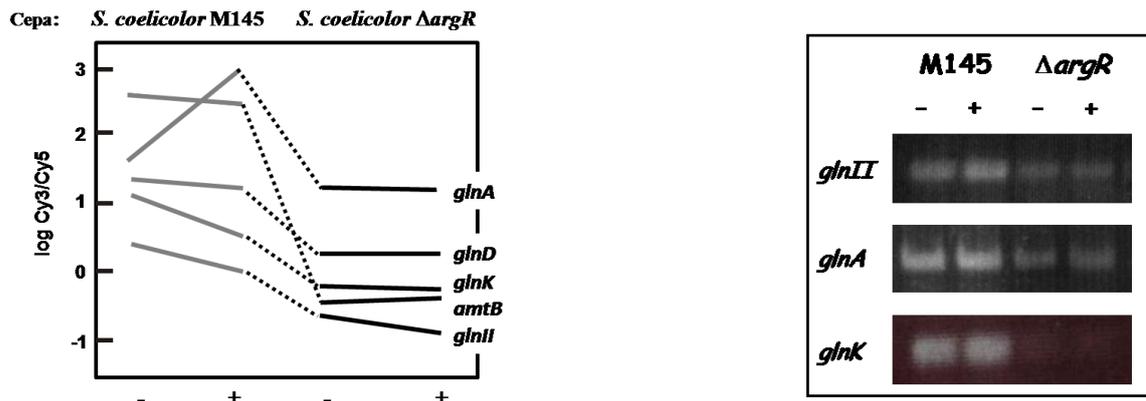


Fig. 4.15. a) Expresión de los genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno y b) detección de distintos transcritos mediante RT-PCR. La imagen corresponde al siguiente número de ciclos de amplificación: *glnK* 3+21, *glnA* 3+18 y *glnII* 3+21. El ARN se obtuvo a las 32 horas de cultivos de *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$ en MG (-) y en MG con 25 mM de arginina (+).

Los resultados de la serie temporal indican que los genes que codifican las glutamina sintetasas *glnA* (SCO2198), *glnII* (SCO2210), y el gen para la posible glutamina sintetasa SCO2241 están afectados por la ausencia de ArgR de una forma irregular y el efecto solo se detecta a tiempos tempranos y tardíos, siendo la diferencia de Mc de hasta -6,5 por ejemplo en el caso de *glnII* (90 veces menor expresión en la cepa delecionada en *argR* que en la cepa parental, M145) a las 32 horas, mientras que en tiempos intermedios, la diferencia máxima de expresión es de 2,6 veces más en la cepa carente de *argR* (a las 42 horas).

La agrupación reguladora *amtB-glnK-glnD*, además de verse afectada por la ausencia de ArgR, está regulada por PhoP, el regulador global del metabolismo del fosfato, y por GlnR, un regulador global del metabolismo del nitrógeno, contribuyendo a mantener el equilibrio fosfato-nitrógeno celular (Sola-Landa *et al.*, 2013). La regulación por ArgR se confirma por la presencia de una caja ARG en el promotor de *amtB*, que une ArgR (apartado 4.4.2). Podría ser este un caso de regulación por, al menos, tres proteínas diferentes, ArgR, PhoP y GlnR, lo que dificulta la interpretación de los datos. El patrón de expresión temporal muestra grandes diferencias de expresión a las 32 y 66 horas, de entre 2 y 43 veces más. Este grupo de genes muestra en la fig. 4.16 un perfil muy característico que los incluye en el grupo 6 de la clasificación dada por maSigPro (fig. 4.4).

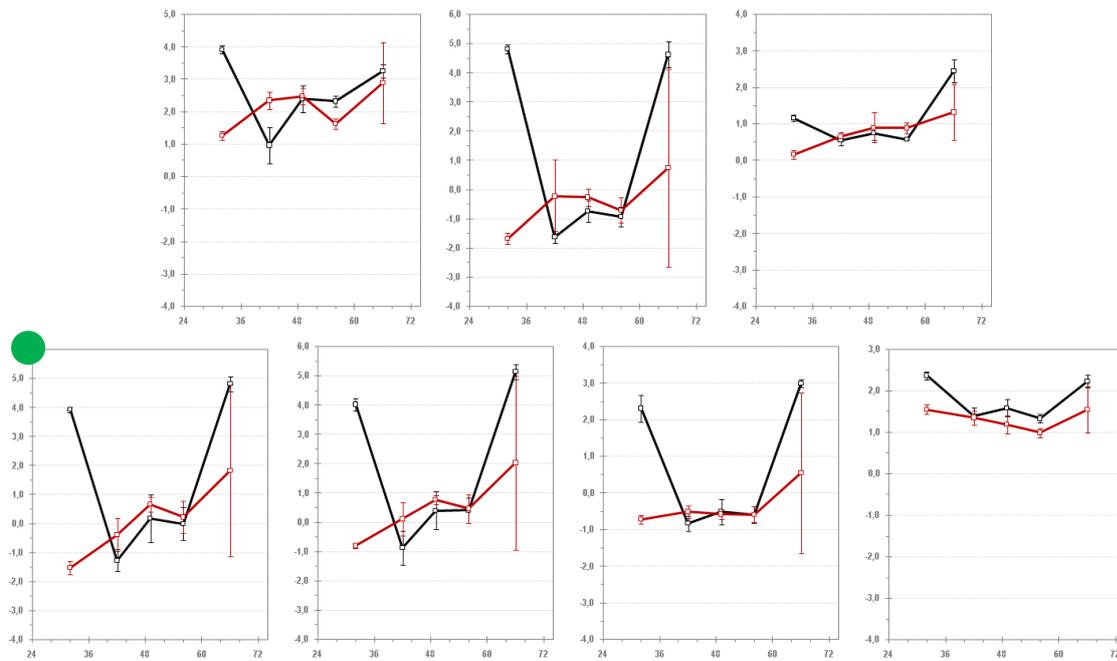


Fig. 4.16. Expresión de los genes del metabolismo del nitrógeno *glnA*, *glnII*, SCO2241, arriba, y *amtB*, *glnK*, *glnD* y *ffh*, abajo. Ver pie de la fig. 4.7.

Otro conjunto de genes relacionados con el nitrógeno es el de la utilización de nitrato. Desde hace tiempo se conoce la existencia en *S. coelicolor* de tres complejos enzimáticos nitrato reductasas relacionados con la asimilación de nitrato y codificadas por los genes *narGHJI* (van Keulen *et al.*, 2005a; Fischer *et al.*, 2010). En *B. subtilis*, el complejo Nar permite a la bacteria crecer en anaerobiosis, mientras que en el aerobio estricto *M. tuberculosis* es un importante factor de virulencia inducido por la escasez de oxígeno, además de servir para asimilar nitratos aeróbicamente (Hoffmann *et al.*, 1998; Wayne y Hayes, 1998). En *S. coelicolor*, los tres complejos tienen una identidad relativamente baja, lo que sugiere distinta afinidad y capacidad de interactuar con diferentes complejos redox. Las funciones de todos ellos incluyen obtención de energía en situaciones de escasez de oxígeno. Fischer *et al.* (2010) relacionan la actividad de Nar1 con esporas, la de Nar2 con esporas y micelio, y la de Nar3 con micelio. Los genes que codifican la nitrato reductasa 3 (SCO4947-SCO4950) muestran una expresión diferente en nuestro experimento de serie temporal. Como observamos en la fila superior de la fig. 4.17, en todos los transcritos hay un patrón similar, con entre 2 y 5,5 veces menor expresión en la cepa *S. coelicolor* $\Delta argR$ con respecto a *S. coelicolor* M145 en los puntos en que las diferencias son significativas. La agrupación SCO4947-SCO4950 pertenece al grupo 4 del maSigPro (fig. 4.4). No se han encontrado cajas ARG en los promotores de estos genes, por lo que el efecto activador de *argR* sobre la expresión de este operón podría ser de tipo indirecto.

Los genes SCO0216-SCO0219 codifican el complejo Nar2. No son GES en la serie temporal, pero su patrón de expresión es llamativamente diferente en ambas cepas (fig. 4.17, fila inferior). Se han encontrado cajas ARG en distintas localizaciones en las cercanías o en esta agrupación: en la secuencia codificante del gen SCO0215, divergente al operón SCO0216-SCO0219, de R_i 10,2 bits; en la secuencia codificante del gen SCO0216, de 6,5 bits; en la secuencia codificante de SCO0219, de 5,8 bits, aunque no se ha probado la unión *in vitro* de ArgR a ninguna de estas cajas. Ese valor R_i se relaciona con el grado de conservación de la posición nucleotídica (apartado 4.4).

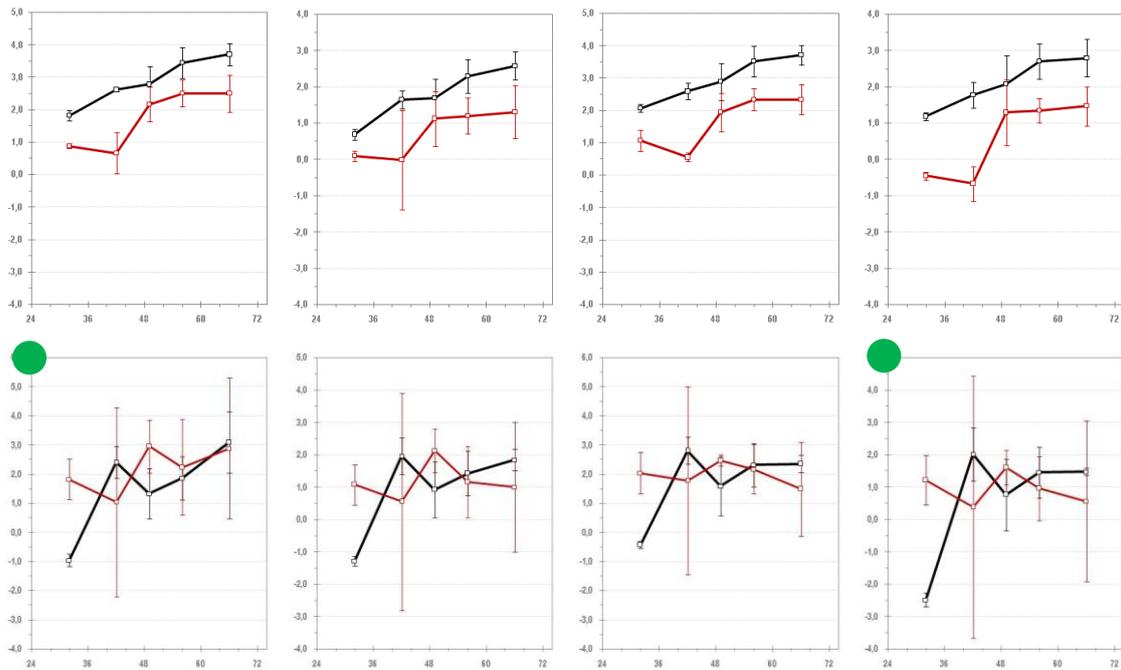


Fig. 4.17. Expresión de los genes relacionados con la respiración de nitrato *narG*, *narH*, *narJ* y *narI*, SCO4947-SCO4950, arriba, y SCO0216-SCO0219, abajo. Ver pie de la fig. 4.7.

El último paso antes de la asimilación del nitrógeno proveniente del nitrato a aminoácidos es la reducción del nitrito, catalizado por las nitrito reductasas NirB y NirD, sin las cuales *S. coelicolor* es incapaz de procesar los nitratos y los nitritos (Fischer *et al.*, 2012). La transcripción de los genes que codifican estas nitrito reductasas están afectados por la ausencia de ArgR, además de la del regulador transcripcional de la familia TetR que cotranscribe con ellos (SCO2486-SCO2489), y del transportador de nitratos y nitritos (SCO2959), si bien a tiempos tardíos. La transcripción de los genes *nir* se induce en condiciones de limitación de nitrógeno (Tiffert *et al.*, 2008), lo que asumimos ocurre a tiempos tardíos de cultivo, cuando todos los nutrientes comienzan a agotarse. Quizá sería ese el momento en el que ArgR interaccionaría con la posible caja ARG existente en el promotor de SCO2486 de R_i 3,1 bits, para regular toda la agrupación, aunque antes de confirmar esta hipótesis, tendríamos que comprobar la unión de ArgR a esa caja *in vitro*. En cualquier caso, las diferencias entre cepas son claras a tiempos tardíos en todos estos genes (fig. 4.18), en los que la expresión se dispara en la cepa M145, habiendo diferencias de entre 4 veces, en el regulador SCO2489, y 21 veces, en el primer gen de la agrupación SCO2486.

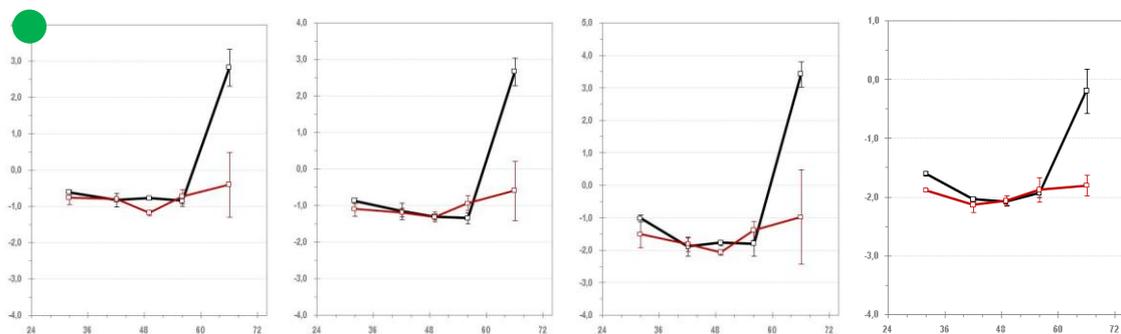


Fig. 4.18. Expresión de los genes del metabolismo de las nitrito reductasas NirB (SCO2486 y SCO2487) y NirC (SCO2488), y del transportador de nitratos y nitritos SCO2959. Ver pie de la fig. 4.7. El regulador SCO2489 no se representa por mantener el mismo patrón de expresión

4.1.5. Estructura ribosomal, recombinación y reparación

La expresión de varios genes que codifican proteínas ribosomales está afectada por la ausencia de ArgR, al menos en algún tiempo de su expresión. Es el caso de la agrupación SCO0569-SCO0570 (este último conocido como *rpmG2*) y del gen SCO3428 (*rpmG*), que codifican las proteínas L36 y L33 de la subunidad ribosomal 50S (Owen *et al.*, 2007). El patrón de expresión de estos genes es diferente en la cepa control y mutante, estando sobreexpresados en la cepa mutante a tiempos intermedios (42 y 49 horas), y subexpresada a tiempos tardíos (66 horas, fig. 4.19). Su perfil los incluye en el grupo 5 de la clasificación del maSigPro (fig. 4.4).

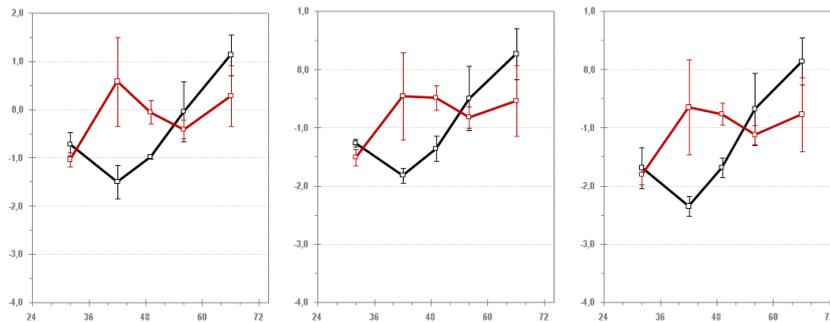


Fig. 4.19. Expresión de los genes SCO0569, *rpmG2* y *rpmG*. Ver pie de la fig. 4.7.

Otros genes afectados son aquellos que codifican proteínas para la recombinación homóloga, como *recO* (SCO2510), *recG* (SCO5566) y *recX* (SCO5770), siendo este último el regulador de la recombinación. El primer gen, *recO*, presenta menor nivel de expresión en la cepa mutante de forma constante a lo largo del tiempo, en torno a 1,5 veces, mientras que los otros dos genes, que se incluyen en el grupo 8 de la clasificación dada por maSigPro (fig. 4.4), muestran mayor expresión en dicha cepa (fig. 4.20). En *S. lividans*, RecX y RecA constituyen un operón, en el que RecX regula negativamente la actividad enzimática de RecA, cuya sobreexpresión tiene efectos tóxicos para la célula (Vierling *et al.*, 2000). En caso de que la función sea similar en *S. coelicolor*, ambos genes están sobreexpresados en ausencia de ArgR, de modo que asumimos que habría suficiente cantidad de RecX para regular el exceso de RecA (*recA*, SCO5769 no es un GES en ninguno de los tiempos analizados, pero tiene igual perfil de transcripción que *recX*). En cualquier caso, la ausencia de ArgR tiene efecto sobre distintos genes implicados en la recombinación homóloga, y en la mayoría de ellos el nivel de expresión es mayor en la cepa mutante. En el apartado 1.5.8.1 se trató el papel de ArgR en el sistema de recombinación específica en *E. coli* (Summers y Sherratt, 1984; Cornet *et al.*, 1994).

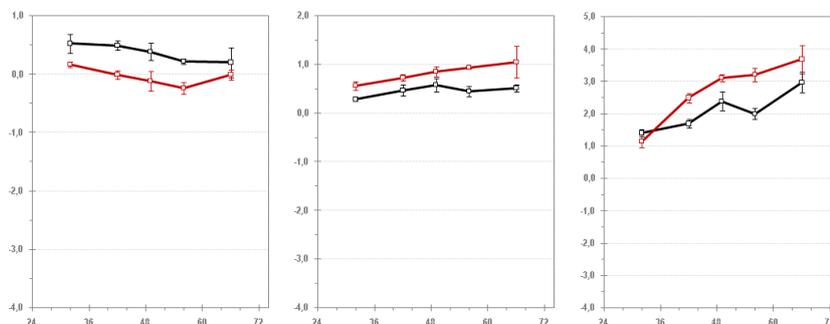


Fig. 4.20. Expresión de los genes *recO*, *recG* y *recX*. Ver pie de la fig. 4.7.

La respuesta al daño en el ADN es crucial para la supervivencia bacteriana, ya que mantiene los genomas, además de modular la resistencia a antibióticos. En *E. coli*, cuando el daño provoca una interrupción en la replicación del ADN, se inactiva LexA, que es el mayor represor del sistema SOS de daño en el ADN. Inmediatamente se inducen los genes de reparación *uvrA*, *uvrB* y *uvrD* y *recA* (Butala *et al.*, 2012). Las proteínas codificadas por *uvrA* y *uvrB* (SCO1958 y SCO1966) son las encargadas de reparar el daño en las lesiones en el ADN, tanto en la reparación global del ADN como en la reparación acoplada a la transcripción (Little y Mount, 1982). En *uvrB* las diferencias de expresión entre cepas aparecen sobre todo a tiempos finales, llegando a expresarse estos genes el doble en *S. coelicolor* $\Delta argR$ respecto a *S. coelicolor* M145 (fig. 4.21).

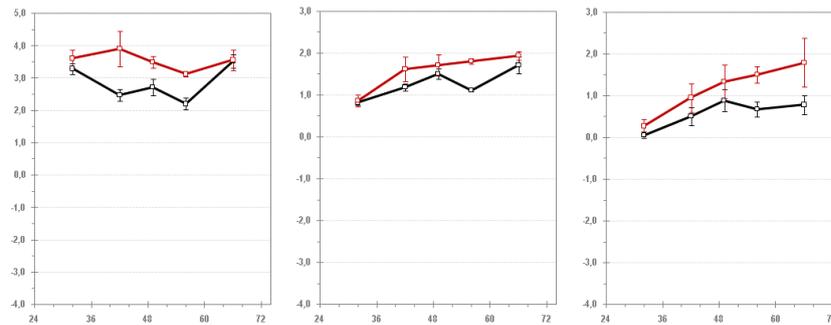


Fig. 4.21. Expresión de los genes *lexA*, *uvrA*, *uvrB*. Ver pie de la fig. 4.7. El primero pertenece al grupo 7 y los dos siguientes al 8 de la clasificación del maSigPro (fig. 4.4).

4.1.6. Genes relacionados con la síntesis de coenzimas

Las coenzimas son cofactores orgánicos no proteicos claves en la reacción enzimática que, a diferencia de las enzimas, se modifican durante la reacción química.

El gen *bioF* (SCO1243) y la agrupación *bioBAD* (SCO1244-SCO1246) están implicados en la síntesis de la biotina, una vitamina que interviene en el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas, aminoácidos y purinas. El proceso de biosíntesis en el que interviene esta agrupación parte de ácidos grasos para dar lugar, en los últimos 4 pasos de la ruta gracias a las proteínas codificadas por estos genes, a la biotina. La comparación del patrón de expresión (fig. 4.22) muestra que a tiempos tempranos, principalmente a las 32 y 42 horas, el nivel de expresión de la cepa control es mayor, por lo que, de forma directa o indirecta, son genes activados por *argR*. Las diferencias de Mc oscilan entre -0,49 y -1,39, lo que se traduce en 1,4-2,6 veces menos expresión en la cepa mutante con respecto a la parental. Estos genes están en el grupo 3 de la clasificación dada por maSigPro (fig. 4.4).

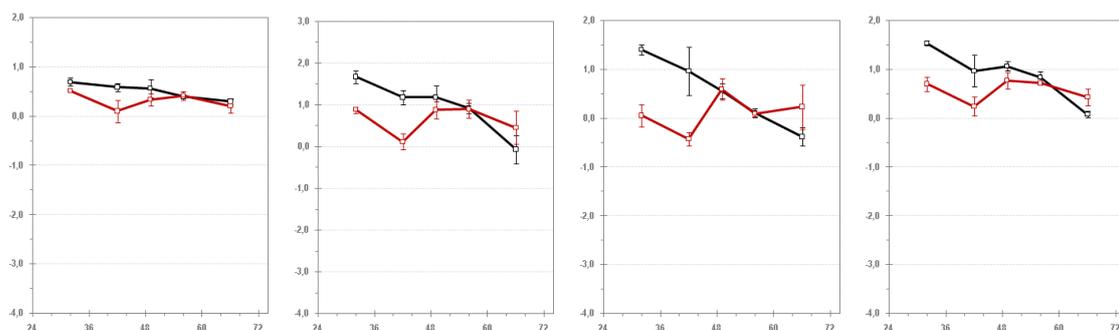


Fig. 4.22. Expresión de los genes del metabolismo de la biotina *bioF*, *bioB*, *bioA* y *bioD*. Ver pie de la fig. 4.7.

Los genes *pdxT* y *pdxS* (SCO1522-SCO1523), que se transcriben juntos, están relacionados con el metabolismo de la vitamina B6, importante en la síntesis de carbohidratos, proteínas y grasas, y en el equilibrio de sodio-potasio. Estos genes codifican enzimas para la síntesis de piridoxal 5-fosfato a partir de ribulosa 5-fosfato y gliceraldehido 3-fosfato, que dará lugar al piridoxal, uno de los tres compuestos químicos que son la vitamina B6. El piridoxal 5-fosfato desempeña funciones de coenzima de las transaminasas, siendo su función la transferencia de grupos amino (Lehninger, 1976). La comparación de las dos cepas muestra una clara desrepresión a partir del segundo tiempo, que alcanza su máximo a las 49 horas, siendo la expresión del gen *pdxS* en la cepa mutante hasta 4 veces mayor que la de la cepa parental (*pdxT*, aunque tiene el mismo perfil transcripcional, no da resultados estadísticamente significativos, ambos pertenecen al grupo 3 de la clasificación maSigPro (fig. 4.4). Esta diferencia tardía de expresión explica que esta agrupación no mostrara diferencias en el primer conjunto de micromatrices. Se ha encontrado una posible caja ARG en la secuencia codificante del gen *pdxT* de puntuación 10,39 bits según la matriz v1.2 (ver apartado 4.4), por lo que, a falta de comprobar la unión de ArgR a ese promotor mediante EMSA, podríamos aventurarnos a decir que el control de *argR* es directo. Varios genes para transaminasas dependientes de piridoxal fosfato están regulados por ArgR: *bioA* (SCO1245), *argD* (SCO1577), fig. 4.22 y 4.7, respectivamente, y *cpkG* (SCO6279), no mostrado, lo que concuerda con que la síntesis de piridoxal fosfato esté afectada.

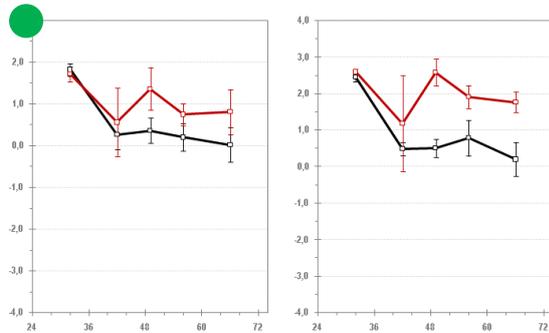


Fig. 4.23. Expresión de los genes *pdxT* y *pdxS*. Ver pie de la fig. 4.7.

Otro gen cuya transcripción es dependiente de *argR* es *nadE* (SCO2238), implicado en la síntesis de la coenzima NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido), cuya función es el intercambio de electrones e hidrógenos en la producción de energía, y por tanto, en las reacciones de oxidación-reducción. La expresión de este gen, incluido en el grupo 6 de la clasificación maSigPro (fig. 4.4), es hasta 3 veces mayor en la cepa parental, de forma especialmente significativa a las 32 y 66 horas.

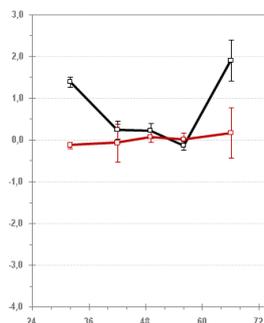


Fig. 4.24. Expresión del gen *nadE*. Ver pie de la fig. 4.7.

4.1.7. Genes relacionados con estructura y morfología celular

En este apartado se han agrupado genes relacionados con la formación de vesículas de gas, con la formación de chaplinas y rodlinas, con la diferenciación celular y la esporulación, con la división celular, y con la morfología alargada del micelio, entre otros. Entre tanta variabilidad en cuanto a funciones, no es de extrañar que observemos variabilidad en el perfil de expresión de los genes. Analizaremos más detenidamente algunos de los subgrupos.

La bacteria filamentosa *S. coelicolor* tiene un programa de desarrollo complejo que incluye una serie de cambios morfológicos en las hifas aéreas sujetas a un estricto control a múltiples niveles antes de comenzar la esporulación (apartado 1.2.2.1). Las chaplinas y rodlinas se requieren para la formación del micelio aéreo y de las esporas (Claessen *et al.*, 2004). Estas proteínas, codificadas por los genes *chp* y *rdl*, forman la funda que envuelve las hifas aéreas y las esporas, proporcionándoles hidrofobicidad (Elliot *et al.*, 2003). Las chaplinas ayudan a que las hifas emerjan del sustrato; una vez emergen, se inicia la expresión de los genes *rdl* (Claessen *et al.*, 2004). Los genes que codifican las chaplinas y rodlinas están dispersos por el genoma de *S. coelicolor*, localizándose en cinco lugares diferentes. *chpA* y *chpD* están agrupados con *rdlA* y *rdlB* para rodlinas (SCO2716-SCO2719).

La mayoría de los genes de biosíntesis de chaplinas y rodlinas muestran mayor expresión en la cepa mutante a las 32 horas de cultivo, fig. 4.25, como *chpA*, *chpG*, *chpE*, *chpH*, *rdlA* y *chpC* (SCO2699, SCO1800, SCO1675, SCO2718 y SCO1674, respectivamente). La RT-PCR de *chpE*, no mostrada, corroboró la mayor transcripción del gen en la cepa carente de ArgR.

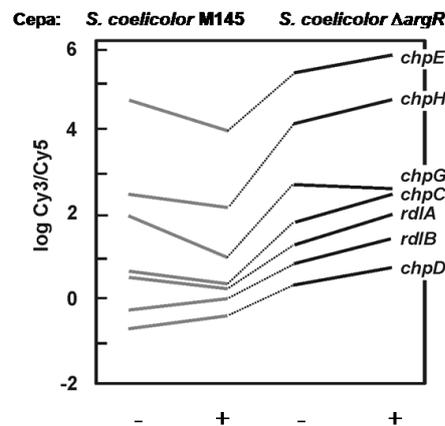


Fig. 4.25. Expresión de los genes para chaplinas y rodlinas. Ver pie de la fig. 4.5.

En la serie temporal todos los genes están sobreexpresados en el mutante Δ argR, si bien los que presentan un mayor incremento en su transcripción, de 3 a 114 veces en *S. coelicolor* Δ argR con respecto a M145, son *chpA* (SCO2716), *chpD* (SCO2717), *rdlA* (SCO2718), *rdlB* (SCO2719) y *chpB* (SCO7257) (fig. 4.26). Todos ellos pertenecen al grupo 7 de la clasificación obtenida mediante maSigPro (fig. 4.4). No se han encontrado cajas ARG en los promotores de estos genes.

En *S. venezuelae*, la expresión de chaplinas y rodlinas está controlada por el factor sigma BldN y por el factor anti-sigma RsbN (Bibb *et al.*, 2012). En *S. coelicolor*, la transición de micelio sustrato a micelio aéreo requiere la actividad de los genes *bld*, conformando una intrincada red de regulación. El único de los genes *bld* que muestra una expresión significativamente distinta en nuestro experimento es *bldD* (SCO1489), que según los datos de den Hengst *et al.* (2010) es esencial para el desarrollo morfológico y

controla otros genes reguladores del desarrollo. Este gen, que en su región promotora posee una posible caja ARG de 7,72 bits, está ligeramente afectado por la ausencia de ArgR (datos no mostrados). Sin embargo, por sí solo, esto no explica el fuerte efecto que se produce sobre la expresión de rodlinas y chaplinas. Como vimos en el apartado 1.3, existe una complicada red en la que no sólo participa una proteína reguladora, sino que son varios los efectores implicados en cada proceso. Sería interesante hacer estudios de microscopía electrónica para observar la existencia de diferencias en las hifas de *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$.

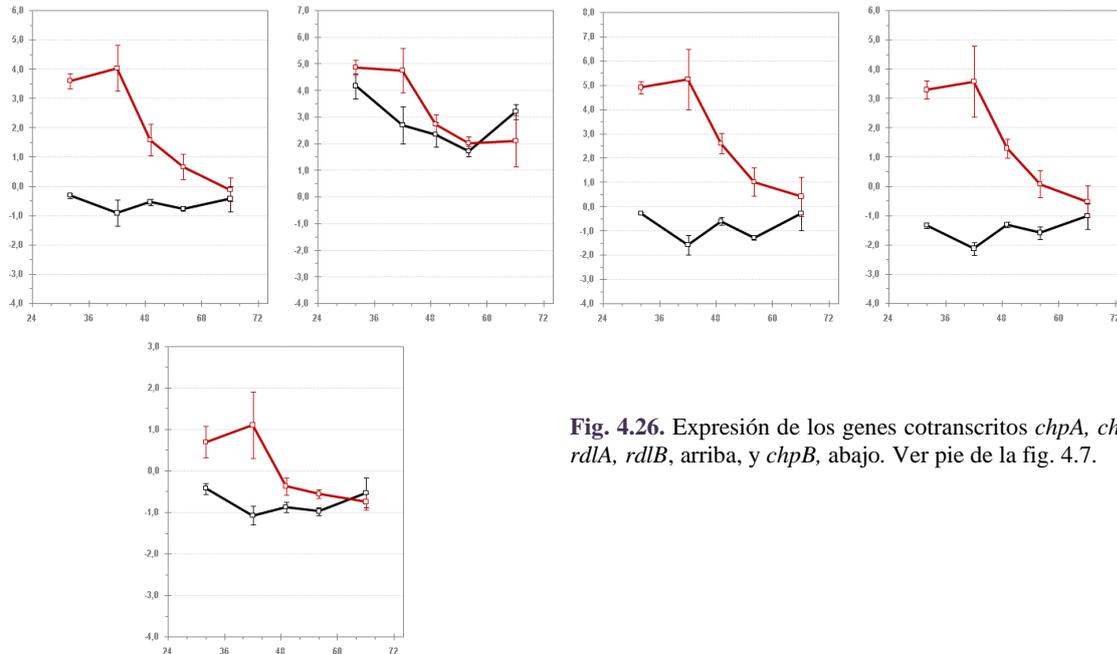


Fig. 4.26. Expresión de los genes cotranscritos *chpA*, *chpD*, *rdlA*, *rdlB*, arriba, y *chpB*, abajo. Ver pie de la fig. 4.7.

En medio sólido el micelio de *S. coelicolor* contiene glucógeno en dos localizaciones: en la región que bordea el micelio aéreo en desarrollo y en la región superior de las hifas aéreas, que se están dividiendo o se acaban de dividir, para dar lugar a los compartimentos “pre-esporas”. El operón SCO5443-SCO5440 (*pep1A-treS-pep2A-glgBI*) está relacionado con el depósito de glucógeno en la primera región. El gen *glgBI* codifica una enzima que ramifica el glucógeno (Yeo y Chater, 2005); la proteína TreS probablemente convierte maltosa en trehalosa; Pep1 es posiblemente una alfa-amilasa (Schneider *et al.*, 2000). El gen de transcripción divergente a este operón es SCO5444, *glgP*, que codifica una posible glucógeno fosforilasa. Schneider *et al.* (2000) sugieren que estos genes participan en la interconversión de los depósitos de glucógeno y trehalosa, disacárido que se degrada durante la germinación de la espora. Estos genes no fueron detectados como GES en el primer experimento de transcriptómica debido a que las diferencias no son muy apreciables a las 32 horas, pero en la serie temporal todos ellos muestran menor expresión, entre 2,4 y 6,5 veces menos, en la cepa mutante a tiempos tardíos, especialmente a las 66 horas (fig. 4.27, fila superior). Todos pertenecen al grupo 6 de la clasificación dada por maSigPro (fig. 4.4). Dos de estos genes, *treS* y *pep1A*, además, presentan posibles cajas ARG en sus secuencias codificantes con R_i de 7,3 bits, a las que sería necesario comprobar la unión *in vitro*.

La β -N-acetilhexosaminidasa codificada por *hexA* (SCO2786) es una glucosil hidrolasa que libera residuos N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina de los oligosacáridos y sus conjugados mediante un mecanismo ácido-base. Por tanto es importante para la degradación eficiente de los polisacáridos. El mecanismo catalítico de estas enzimas está conservado incluso en la especie humana (Mark *et al.*, 1998). El

patrón de expresión de *hexA* es unas 2,5 veces menor en la cepa mutante que en la parental a las 66 horas (fig. 4.27), y como la agrupación anterior, también está en el grupo 6.

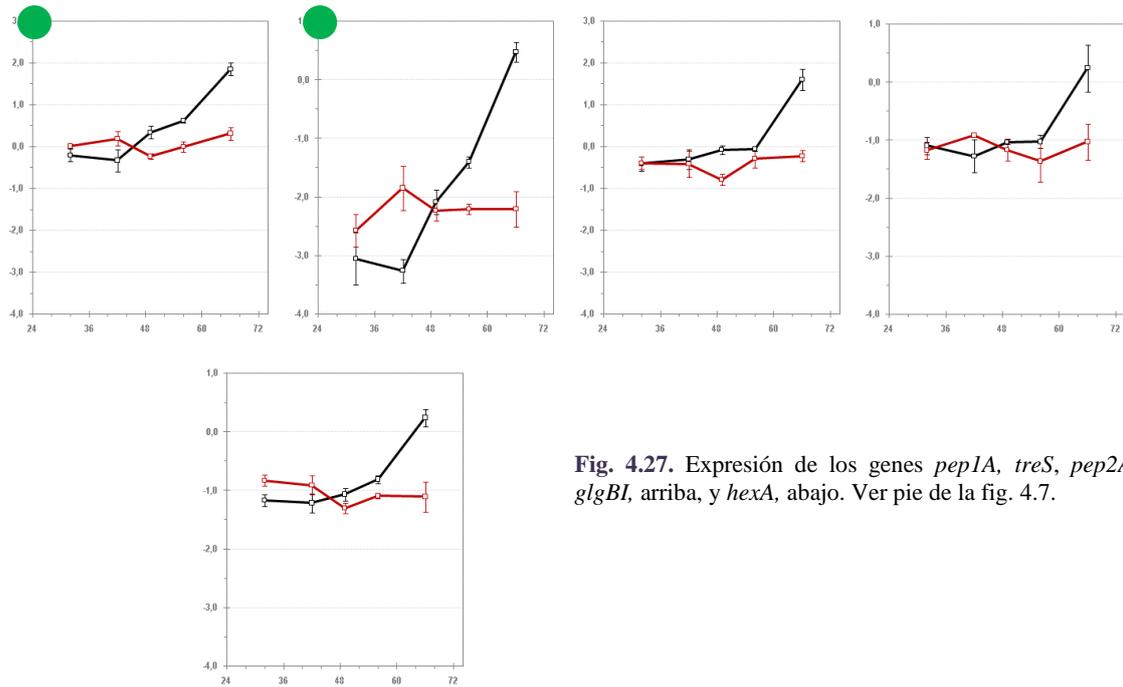


Fig. 4.27. Expresión de los genes *pep1A*, *treS*, *pep2A* y *glgBI*, arriba, y *hexA*, abajo. Ver pie de la fig. 4.7.

Algunos genes *whi*, relacionados con la esporulación y su regulación, también mostraron diferencias de expresión ya a las 32 horas de cultivo (fig 4.28.a). Adicionalmente, se eligió el gen *whiB* para ser validado por RT-PCR (imagen no mostrada) y luminiscencia (fig. 4.28.b). Los resultados concuerdan con los de micromatrices, de modo que este promotor está afectado por la ausencia de *argR*.

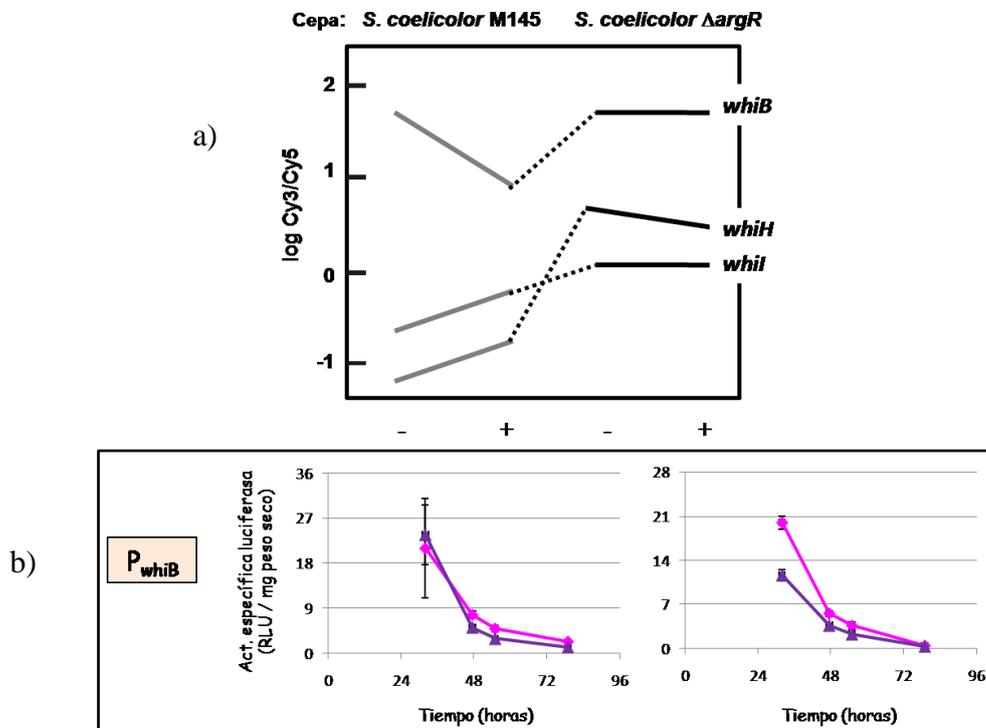


Fig. 4.28. a) Expresión de algunos genes de esporulación. Ver pie de la fig. 4.5. b) Actividad luciferasa específica del promotor del gen *whiB* fusionado a los genes *luxAB* en las cepas *S. coelicolor* M145 (▲) y *S. coelicolor* $\Delta argR$ (◆). La gráfica de la izquierda corresponde al medio MG sin adición de L-arginina, y la de la derecha al medio MG con suplemento de L-arginina 25 mM.

La expresión de alguno de los genes *whi* a lo largo de la fermentación se muestra en la fig. 4.29. Estos genes actúan de forma secuencial, *whiH* (SCO5819) y *whiI* (SCO6029) son necesarios para la septación de las hifas aéreas y la condensación del cromosoma durante la esporulación (Chater, 2001). En las etapas tardías de la esporulación *whiD* (SCO4767) interviene en el engrosamiento de la pared de las esporas y en la acumulación del policétido que dará la pigmentación característica de las esporas, sintetizado por la agrupación *whiE* ORFI-VIII (SCO5314-SCO5321) (Ryding *et al.*, 1999). Se han encontrado varias cajas ARG en las secuencias codificantes de SCO5818, de *Ri* 6,4 bits, de SCO6030, de 5,8 bits y de SCO4768, de 6,6 bits, y en la región promotora de *whiB* de 6 bits, que no es un GES, pero a cuya caja hemos comprobado la unión de ArgR (apartado 4.4.5).

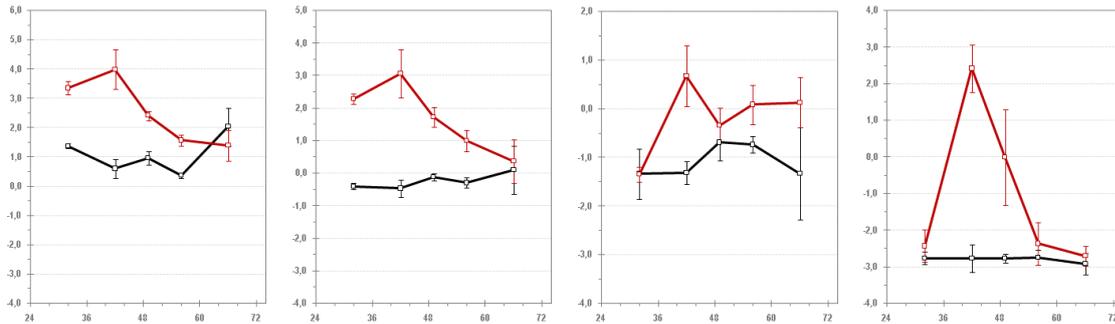


Fig. 4.29. Expresión de los genes *whiH*, *whiI*, *whiD* y *whiE* ORF VII (SCO5314). Ver pie de la fig. 4.7. Los genes *whiH* y *whiI* pertenecen al grupo 7 de la clasificación maSigPro. Únicamente se muestra un gen de la agrupación SCO5314-SCO5321 por abreviar; el resto de genes tienen el mismo patrón de expresión y todos ellos pertenecen al grupo 5 de la clasificación maSigPro (fig. 4.4).

Otros genes relacionados con la esporulación que solo se han encontrado en los actinomicetos son los *wbl* y concretamente, el gen *wblI* (SCO5046) de tipo *whiB*, solo está presente en las especies de *Streptomyces* (Soliveri *et al.*, 2000). Su función puede estar relacionada con la activación de otros genes, posiblemente mediante cambios en el estado redox de la célula, bien por factores ambientales o por cambios metabólicos (Soliveri *et al.*, 2000). La ausencia de *argR* afecta a la expresión de este gen con aproximadamente la mitad de expresión que la de la cepa parental a tiempos tardíos (Fig. 4.30). Cabe destacar que *wblH*, un posible regulador transcripcional, presenta sobreexpresión en la cepa mutante a las 66 horas de cultivo (5,4 veces más) respecto de la cepa parental. Se conoce poco acerca de su función, dianas, etc. Si suponemos que controla al resto de genes *wbl*, lo hace reprimiéndolos, ya que se expresa más en la cepa mutante, mientras que los genes a los que supuestamente regula se expresan menos.

En el mutante *S. coelicolor* $\Delta argR$ el proceso de esporulación está afectado y forma esporas apenas pigmentadas (apartado 4.1). Hemos visto que los genes implicados en la coloración de las esporas están sobreexpresados en la cepa mutante a tiempos tempranos respecto de la cepa *S. coelicolor* M145, de modo que el mutante no debería presentar menor pigmentación. Pero también sabemos que los genes *whi* actúan de forma secuencial, de modo que aunque algunos estén sobreexpresados en el mutante, la baja transcripción del resto hará de “cuello de botella”. ¿Por qué, a pesar de tener sobreexpresión de algunos genes implicados en esporulación, su proceso está afectado? Porque también presenta sobreexpresión en genes como *wblH*, posible represor del resto de los genes *wbl*. Esto es únicamente una hipótesis; lo único que está claro es que esta desregulación en los genes *whi/wbl* debe estar relacionada con la no pigmentación de las esporas. Se ha encontrado una caja ARG de *Ri* 5,64 bits en la región promotora del gen *wblI*, a la que no se ha probado la unión de ArgR *in vitro*.

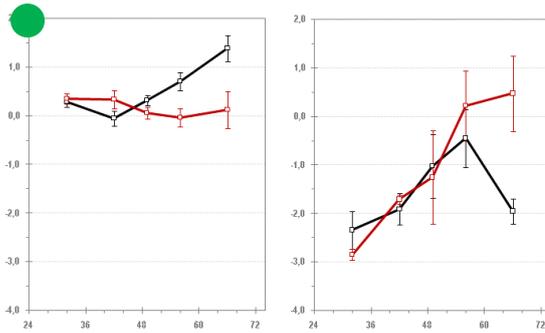


Fig. 4.30. Expresión de los genes *wblI* y *wblH*. Ver pie de la fig. 4.7.

En *Streptomyces* y bacterias relacionadas el operón regulador *cvn* codifica un complejo de señalización asociado a la membrana parecido al sistema regulador acoplado a la proteína G eucariota (Komatsu *et al.*, 2006). Distribuidas por el genoma de *S. coelicolor* hay 13 copias del operón *cvn* (Bentley *et al.*, 2002), cada uno de los cuales contiene genes que codifican un posible sensor kinasa (*cvnA*), una proteína de la familia LC7 (*cvnB*), una proteína conservada de función hipotética (*cvnC*), otra de unión a GDP/GTP (*cvnD*), y en algunos casos un citocromo P450 tentativamente denominado *cvnE* (Komatsu *et al.*, 2006; Takano *et al.*, 2011). Por su similitud con los receptores de membrana acoplados a la proteína G de eucariotas la función de las agrupaciones *cvn* podría ser la de transductores de señales. El operón *cvn11*, formado por SCO0588-SCO0584 (*cvnA11*, *cvnB11*, *cvnC11*, *cvnD11* y *cvnE11*), está afectado por la ausencia de *argR* (fig. 4.31), mostrando todos los genes el mismo comportamiento con un perfil correspondiente al del grupo 5 de la clasificación maSigPro (fig. 4.4): presentan una ligera desrepresión a las 42 horas, de entre 2,6 y 4,4 veces más en la cepa $\Delta argR$ vs M145, mientras que a las 66 horas se produce una activación en la cepa parental, triplicando los niveles de expresión de la cepa mutante. En *S. hygroscopicus* estos genes regulan negativamente la diferenciación morfológica (Wang *et al.*, 2006), así que asumimos que en *S. coelicolor* probablemente estén relacionados con la diferenciación celular.

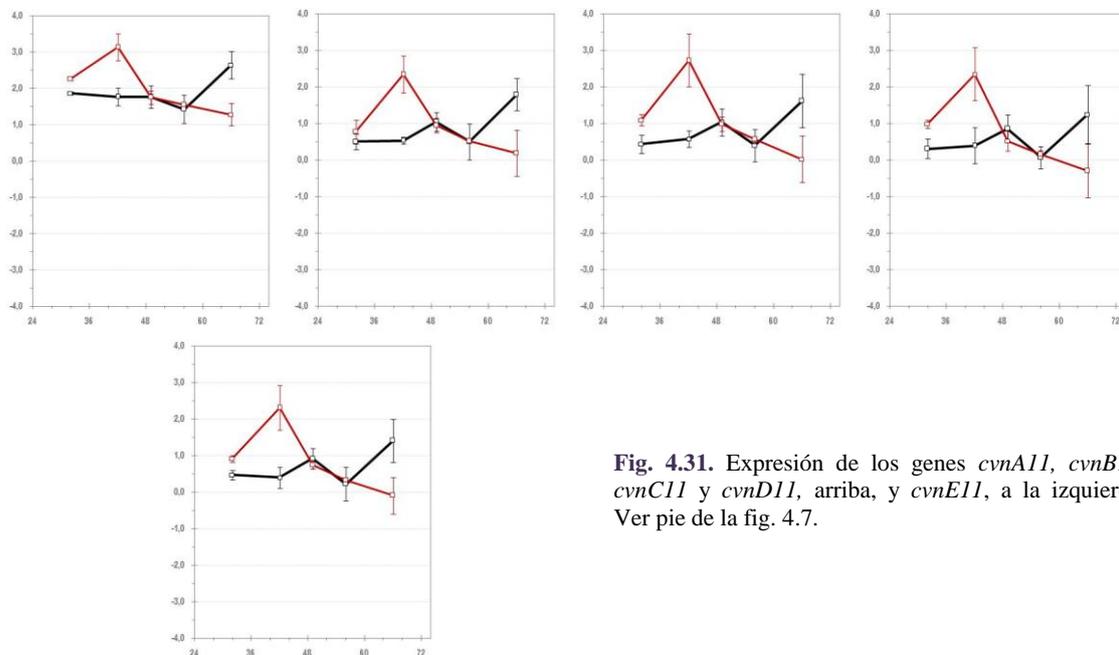


Fig. 4.31. Expresión de los genes *cvnA11*, *cvnB11*, *cvnC11* y *cvnD11*, arriba, y *cvnE11*, a la izquierda. Ver pie de la fig. 4.7.

Otros ejemplos de genes a los que la ausencia de *argR* provoca mayor expresión de forma significativa en al menos un tiempo, son SCO2451 y SCO2082 (*ftsZ*). SCO2451 codifica una proteína tipo MreB, que interactúa con otras proteínas para posicionarse en un complejo de síntesis de la pared celular,

de modo que la incorporación de nuevo peptidoglucano provoca elongación celular, lo que da lugar a la morfología alargada del micelio (Heichlinger *et al.*, 2011). *S. coelicolor*, a diferencia de otras bacterias del filo *Actinobacteria*, posee 3 proteínas de tipo MreB; solo la codificada por SCO2451, Mbl, está afectada por la ausencia de *argR*. Según Heichlinger *et al.* (2011), esta proteína coopera en la síntesis de la pared de las esporas. Otra proteína relacionada con la esporulación es la codificada por *ftsZ*. La división celular comienza con la localización de los sitios de división por la proteína SsgB vía SsgA (SCO1541 y SCO3926, respectivamente), y posterior polimerización de la proteína de tipo tubulina FtsZ para formar el anillo Z en el sitio de división; dicho anillo recluta a su vez la maquinaria de división para permitir la citoquinesis (Monahan y Harry, 2013; Willems *et al.*, 2011). SsgR codificado por SCO3925 actúa como activador transcripcional de tipo IclR de *ssgA* (Traag *et al.*, 2004) y ambos transcritos, *ssgR* y *ssgA*, junto con *ssgB*, están sobreexpresados entre 2,3 y 30,6 veces respecto a la cepa parental (Fig. 4.32). No se han encontrado cajas ARG en la región promotora de *ssgR*. Sí en la de *ssgB*, con R_i de 6,6 bits, y en la secuencia codificante del gen previo a *ssgB*, de R_i 6,8 bits. El patrón de expresión es el mismo para SCO2451 y *ftsZ*, oscilando las diferencias de expresión entre 3 y 9 veces más (mutante *vs* parental), pero en ambos casos el pico de desrepresión se produce a las 42 horas. También se ha encontrado una caja ARG al final de la secuencia codificante de SCO2451, de R_i 6,65 bits, aunque de ninguna de ellas se ha comprobado su funcionalidad.

Se sabe que otros reguladores como PepA (SCO2179) regulan transcripcional y tradicionalmente *ftsZ*, *ssg* y otros genes relacionados con la producción de actinorrodinas. Así, aunque la ausencia de ArgR afecta a la expresión de estos genes, no creemos que sea el único factor.

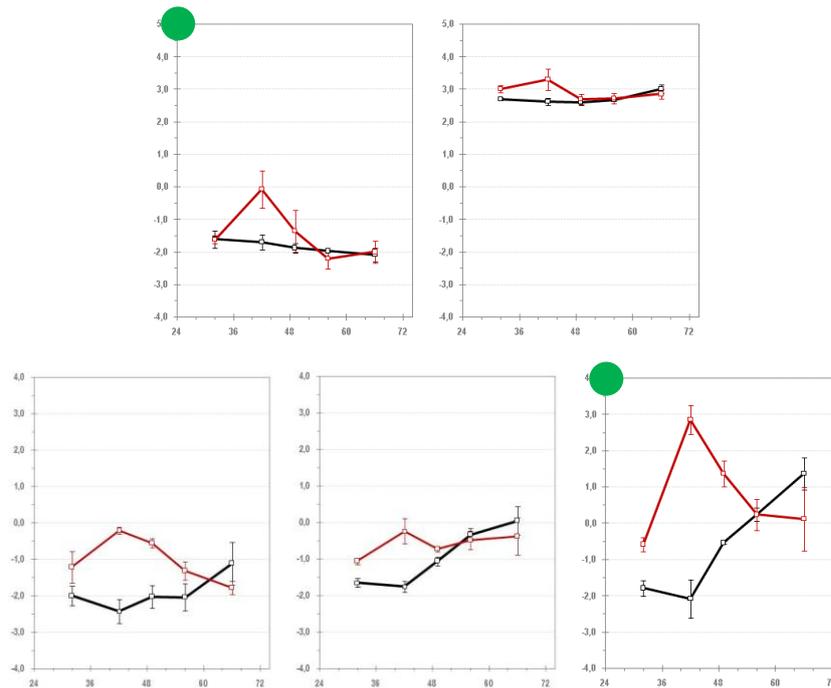


Fig. 4.32. Expresión de los genes SCO2451 (en grupo 5 de la clasificación maSigPro) y *ftsZ* (en grupo 7), arriba, y *ssgA*, *ssgR* y *ssgB*, abajo (los tres en el grupo 5 de maSigPro). Ver pie de la fig. 4.7.

El operón de 12 genes implicado en la biosíntesis del glucano de la pared celular, *cwgABCDEFGHIJKL* (SCO6179-SCO6190), controlados por *sigE* (SCO3356) (Hong *et al.*, 2002), también muestra un patrón de transcripción característico perteneciente al grupo 1 de la clasificación maSigPro (fig. 4.4), con una expresión incrementada en la cepa mutante con respecto de la control con valores lineales de entre 1,3 y 4,3 veces. Sólo se muestran en la fig. 4.33 cuatro de estos genes. El gen regulador *sigE* también

es un GES, pero su patrón de expresión es diferente, y las diferencias entre cepas mucho menores (datos no mostrados). La predicción informática ha encontrado una posible caja ARG de 6,34 bits, en la región promotora del primer gen de la agrupación, *cwgA* (SCO6179), de la que desconocemos su funcionalidad.

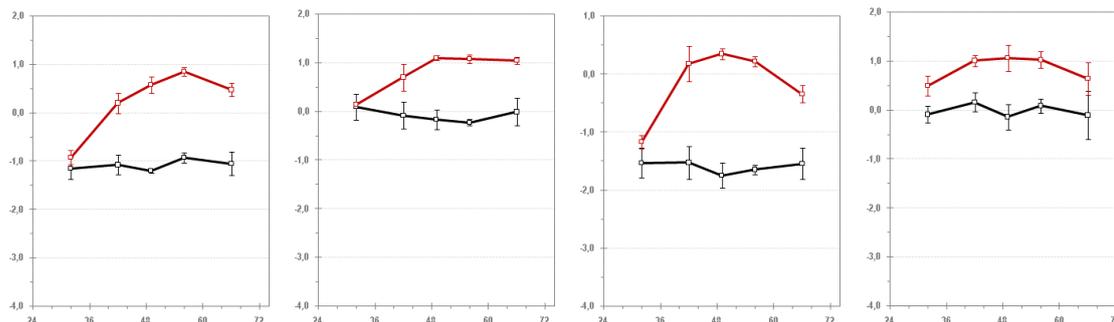


Fig. 4.33. Expresión de los genes *cwgB*, *cwgC*, *cwgG* y *cwgH*. Ver pie de la fig. 4.7.

En el genoma de *Streptomyces* hay dos agrupaciones génicas para los genes que codifican vesículas de gas: SCO0649-SCO0657 y SCO6499-SCO6508, siendo el orden en que aparecen estos genes *gvpA**AOFGYZJLSK*. Las vesículas de gas son orgánulos procariontas cuya función es mantener a flote la bacteria que las contiene, lo que les permite un óptimo uso de luz y nutrientes (van Keulen *et al.*, 2005b). Se conocen pocos microorganismos terrestres que contengan este tipo de genes: *Streptomyces*, *Frankia* y *Rhodococcus*, aunque no se han detectado en ellos vesículas de gas. Su presencia sería explicable en actinomicetos en ambientes marinos, pero no en especies terrestres. En cultivos líquidos de *S. coelicolor* sin agitación se ha visto que hay colonias que se mantienen en la superficie para evitar las regiones anóxicas del cultivo. Sin embargo, mutantes carentes de ambas agrupaciones productoras de vesículas de gas aún flotan, lo que indica que estas moléculas no son indispensables para la flotación (van Keulen *et al.*, 2005b). GvpA, GvpY y GvpZ tienen regiones ricas en arginina, glutamato y prolina, lo que podría indicar un posible papel de unión a ácidos nucleicos o en la traslocación de otros péptidos a través de la membrana (van Keulen *et al.*, 2005b). Walsby y Dunton (2006) indican que la proteína codificada por *gvpA* en actinomicetos es incompatible con la estructura de las vesículas de gas, y proponen un papel asociado a la interfase aire-agua. Sin tener clara su función y ciñendonos a los datos, vemos que ambas agrupaciones tienen un patrón de expresión muy distinto en la cepa mutante (fig. 4.34) ya que los genes de la agrupación SCO0649-SCO0657 tienen un pico de expresión a las 42 horas y la transcripción desciende progresivamente a partir de ese tiempo, mientras que los genes de la agrupación SCO6499-SCO6508 van incrementando su transcripción a partir de las 42 horas y esta no ha decaído al final del tiempo de muestreo. Esto indica un distinto mecanismo de regulación de la transcripción para las dos agrupaciones en la cepa mutante. Las diferencias en la cepa M145 no son tan marcadas entre los dos operones. No sabemos si el control de ArgR sobre estas agrupaciones es directo o indirecto, pero dado que la predicción informática no indica la existencia de posibles cajas ARG en ninguno de los promotores, todo apunta a un efecto indirecto. Sí se ha encontrado una caja ARG en la secuencia codificante del gen *gvpL* (SCO0656), con R_i de 7,7 bits, a la que desconocemos la posible unión de ArgR, pero suponemos que ArgR, aunque se uniera, no tendría efecto sobre la expresión de la unidad transcripcional, que comprende *gvpGYZJL*.

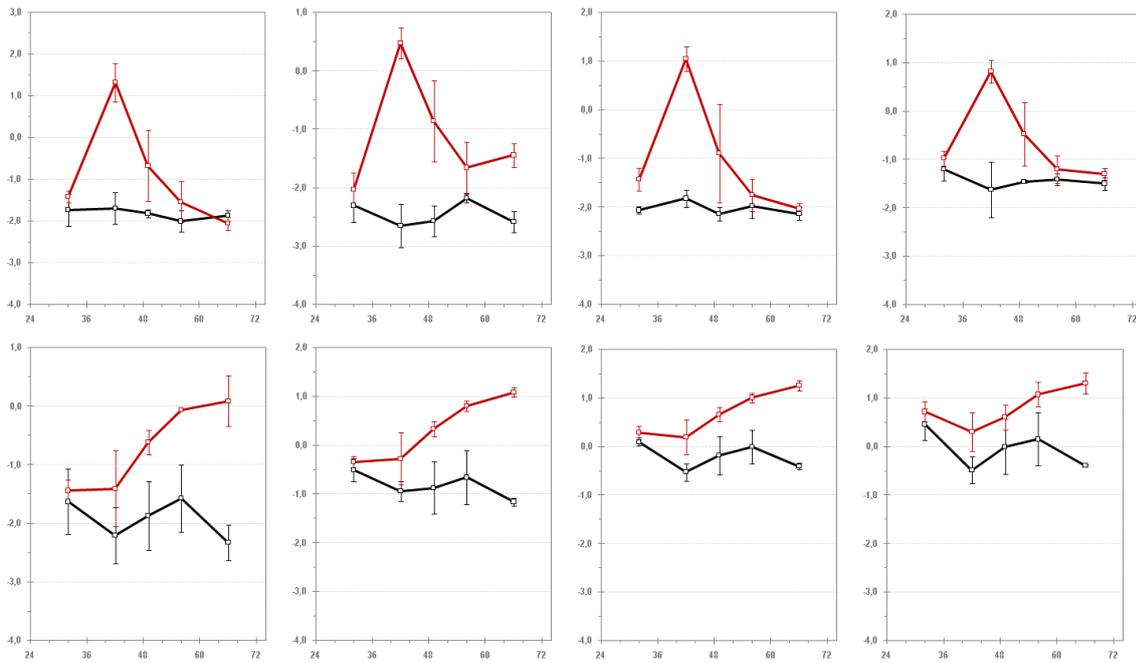


Fig. 4.34. Expresión de los genes *gvpO*, *gvpA*, *gvpG* y SCO0654, pertenecientes a la agrupación SCO0649-SCO0657, (en el grupo 5 de maSigPro) en la fila superior, y *gvpO*, *gvpA*, *gvpF* y *gvpG*, de la agrupación SCO6499-SCO6508 (alguno de ellos clasificado en el grupo 1 de la clasificación maSigPro), en la fila inferior. Ver pie de la fig. 4.7.

El gen implicado en la adaptación osmótica *pk28* (SCO4820) tiene menor expresión en la cepa carente de *argR* (fig. 4.35), con el perfil del grupo 4 de la clasificación maSigPro.

Con menores diferencias entre cepas pero también subexpresados en *S. coelicolor* Δ *argR* (no mostrado), están otros genes que codifican proteínas quinasas (no relacionadas con la adaptación osmótica), como *pk15* (SCO3860), *pk3* (SCO6626), *pk1* (SCO3344), *pk2* (SCO4488), *pk23* (SCO4776), *pkd* (SCO4777) y *pkal* (SCO4778) (Petrickova y Petricek, 2003).

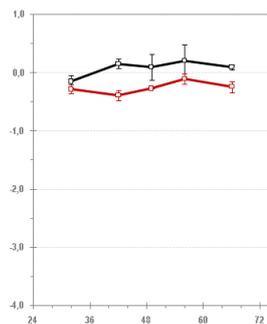


Fig. 4.35. Expresión del gen *pk28*. Ver pie de la fig. 4.7.

4.1.8. Genes relacionados con metabolismo secundario

La adición de arginina o la delección de *argR* provocan una drástica reducción o desaparición en las producciones de actinorrodina y undecilprodigiosina (fig. 4.1). La biosíntesis de antibióticos es un proceso complejo y altamente regulado, en el que influyen el estado nutricional, la concentración de moléculas señal (butirolactonas), la propia biosíntesis y resistencia a antibióticos, y reguladores pleiotrópicos, globales y específicos (Hindra *et al.*, 2010). Se ha visto que hay genes que afectan a la producción de metabolitos secundarios, como son SCO2179, *afsS*, *scbR*, SCO4132, SCO0877, SCO7173, *rpoZ*, SCO3063-SCO3064, SCO5784-SCO5785 (Santos-Beneit *et al.*, 2009; Guerra *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012; Rozas *et al.*, 2012;

Song *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2013). Waldvogel *et al.* (2011) han visto que GlnK no es tan importante como sensor de nitrógeno, sino que está implicado en la morfogénesis de *S. coelicolor*, en las biosíntesis de vesículas de gas, de ectoína y en el metabolismo secundario. Recientemente se ha publicado un trabajo en el que *stgR*, un regulador de la familia LysR regula la expresión de metabolitos secundarios de forma positiva (Mao *et al.*, 2013). La agrupación *abeABCD* (SCO3287-SCO3290) codifica proteínas que estimulan la producción de antibióticos; concretamente, el gen adyacente *abeR* (SCO3291), que codifica un regulador de tipo SARP, induce la producción de actinorrodina (Hindra *et al.*, 2010). Algunos de estos genes están afectados por la ausencia de *argR*, de forma más o menos marcada. En esta red tan intrincada de regulación, ¿cómo apuntar a un único culpable de la disminución o desaparición de la producción de metabolitos secundarios en *S. coelicolor* $\Delta argR$?

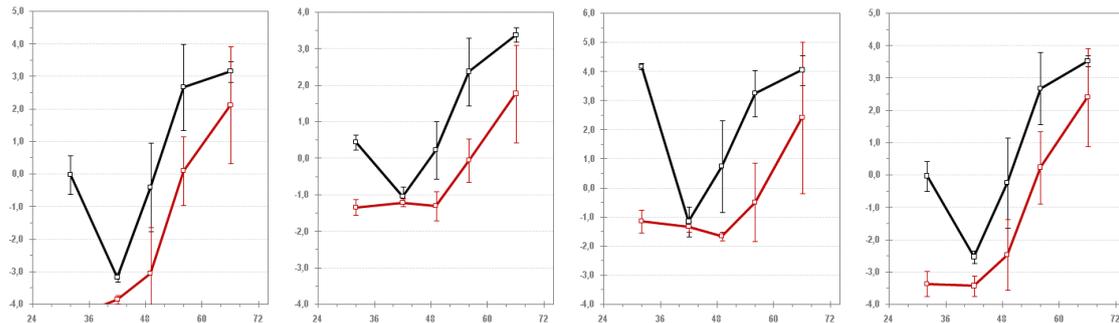


Fig. 4.36. Expresión de los genes de actinorrodinas *ORFA*, *actVAI*, *actII-1* y *actIORF3* (SCO5071, SCO5076, SCO5082 y SCO5089). Ver pie de la fig. 4.7.

Dos genes de la ruta *act*, *actII-orf2* (SCO5083) que codifica un posible transportador de actinorrodina (Fernández-Moreno *et al.*, 1991) y el gen *actIII* (SCO5086) para la cetoacilreductasa ActIII, están afectados a las 32 horas, teniendo mayor expresión en la cepa parental M145 que en el mutante deletado. Debido a lo temprano del tiempo de cultivo utilizado para la extracción del ARN en dicho experimento, no se encontraron diferencias en el resto de genes de biosíntesis de actinorrodina, y en ninguno de los de undecilprodigiosina (Pérez-Redondo *et al.*, 2012). Este hecho se solventó con el análisis de micromatrices de la serie temporal, que indica que todos los genes del metabolismo secundario de actinorrodina y undecilprodigiosina muestran menor expresión en *S. coelicolor* $\Delta argR$, aunque con un patrón de transcripción en ambas cepas muy similar, salvo en el primer tiempo de muestreo para los genes *act*, pero claramente retardado en la cepa mutante (fig. 4.36 y 4.37). La herramienta maSigPro incluye en el grupo 6 a todos los genes *act* y en el 4 a los *red* (fig. 4.4). Las diferencias entre cepas (como siempre, teniendo en cuenta únicamente los valores con diferencias significativas, y comparando mutante *vs* control) son entre 2 y 95 veces menor expresión en el caso de los genes de actinorrodina, y entre 2 y 20 veces en el caso de los de undecilprodigiosina. La disminución es menor en el caso de la undecilprodigiosina, lo que corrobora el análisis de producción de ambos antibióticos de Pérez-Redondo *et al.* (2012), que muestran que *S. coelicolor* $\Delta argR$ produce trazas de undecilprodigiosina pero apenas actinorrodina. En el apartado 4.4.6 se indica la posibilidad de la existencia de cajas ARG en algunos de los genes de biosíntesis de estos antibióticos, a los que no se probó la unión de ArgR *in vitro*, de modo que desconocemos si ArgR pudiera tener un efecto directo o indirecto sobre el metabolismo secundario.

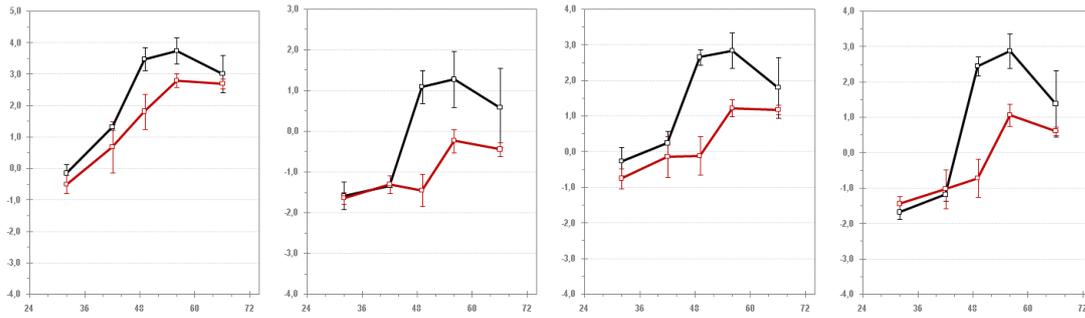


Fig. 4.37. Expresión de los genes de undecilprodigiosinas *red*, *redU*, *redP* y *redH* (SCO5877, SCO5883, SCO5888 y SCO5896). Ver pie de la fig. 4.7.

En el cromosoma de *S. coelicolor* la agrupación génica *cpk* codifica un policétido, CPK, de color amarillo con actividad antibacteriana (Gottelt *et al.*, 2010). Además de los genes para las subunidades policétido sintasa I (PKS) encargadas de condensar pequeñas unidades carboxílicas de forma similar a lo que ocurre en la síntesis de ácidos grasos, y codificadas por los genes *cpkABC* (SCO6275-SCO6273), se encuentran los genes relacionados, algunos de los cuales se cotranscriben (*scF*, *cpkDEFGOHIJKL*, *scbR2*, *scoT*, *cpkN*-SCO6272, SCO6276-SCO6278) para enzimas de modificación, enzimas implicadas en la síntesis de azúcares añadidos al esqueleto primario del policétido, proteínas de transporte, resistencia, y reguladoras, entre ellas una proteína receptora de butirolactonas codificada por *scbR* (SCO6265, Floriano y Bibb, 1996; Takano *et al.*, 2001, apartado 1.3.3).

La producción de metabolitos secundarios, incluyendo antibióticos, proporciona una ventaja competitiva al microorganismo productor en su hábitat natural. La producción de estos compuestos está altamente coordinada: los antibióticos a menudo son tóxicos incluso para sus productores, de modo que una producción coordinada permite a los microorganismos proveerse de mecanismos de defensa para resistir a sus propios antibióticos antes de comenzar la producción. Un posible mecanismo de coordinación es la producción de moléculas señal. El sistema de las γ -butirolactonas en *S. coelicolor* es uno de esos sistemas señal para la producción de metabolitos secundarios. La proteína represora específica de ruta codificada por *scbR* media la acción de una γ -butirolactona. ScbR se une a secuencias específicas de ADN reprimiendo su transcripción (Takano *et al.*, 2001). Cuando se alcanza una determinada concentración de la γ -butirolactona sintetizada por ScbA en la fase de transición, ScbR libera la secuencia de ADN para permitir la transcripción de los genes de la agrupación génica de la policétido sintasa (Mehra *et al.*, 2008).

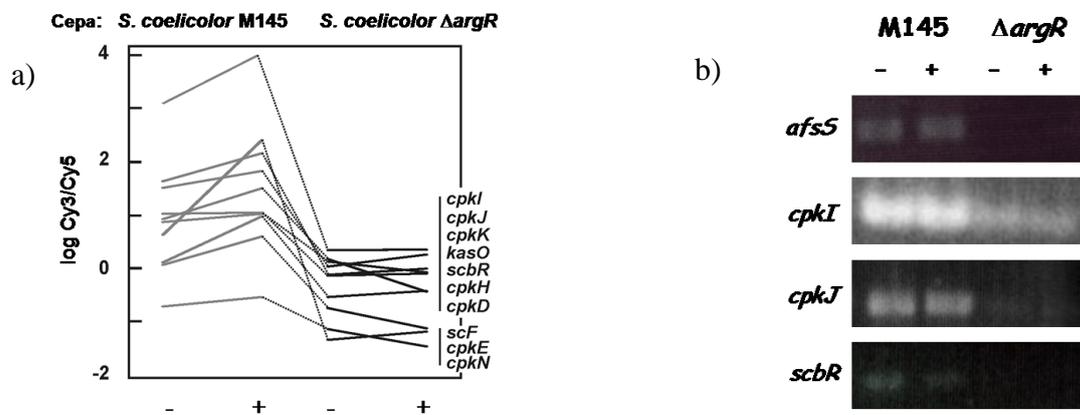


Fig. 4.38. a) Expresión de los genes de biosíntesis de CPK, incluyendo *scbR* y b) detección de distintos transcritos mediante RT-PCR. La imagen corresponde al siguiente número de ciclos de amplificación: *afsS* 3+23, *cpkI* 3+33, *cpkJ* 3+21 y *scbR* 3+20. El ARN se obtuvo a las 32 horas de cultivos de *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* Δ *argR* en MG (-) y en MG con 25 mM de arginina (+).

En las micromatrices desarrolladas con el ARN obtenido a las 32 horas ya se detectó que los genes *cpk* y *scbR* están reprimidos en el mutante (fig. 4.38.a), y mediante RT-PCR se confirmó la disminución de la transcripción de *afsS* y *scbR*, *cpkI* (SCO6282) y *cpkJ* (SCO6283), que codifican una reductasa y una epimerasa, de modificación del policétido (fig. 4.38.b).

En la serie de expresión temporal, fig. 4.39, el perfil transcripcional de todos los genes pertenecientes a esta agrupación *cpk* es común: en la cepa control es de disminución progresiva a lo largo de los tiempos muestreados, mientras que en la cepa mutante es irregular con un pico a las 49 horas y una caída posterior, lo que implica menos expresión a tiempos tempranos (entre 2 y 165 veces, según el gen considerado), y más a tiempos intermedios y tardíos (entre 2,5 y 20 veces). Todos los genes *cpk* pertenecen al grupo 9 de la clasificación maSigPro.

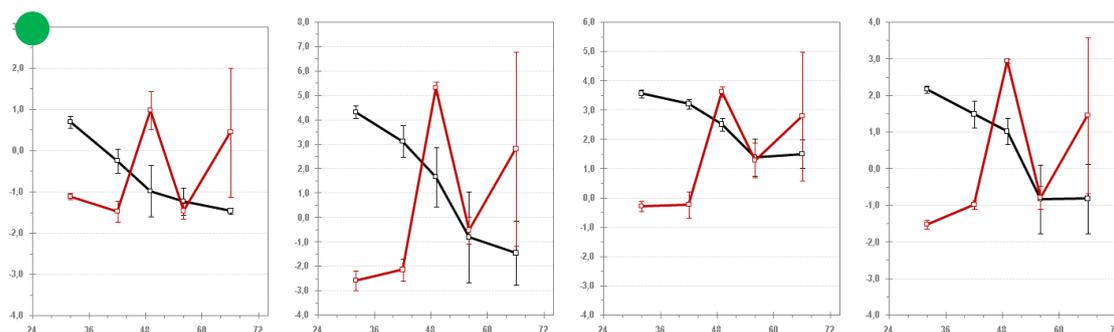


Fig. 4.39. Expresión de los genes relacionados con la producción del policétido CPK *scF*, *cpkD*, *cpkO* y *scbR2* (SCO6272, SCO6276, SCO6280 y SCO6286). Ver pie de la fig. 4.7.

El análisis bioinformático muestra la existencia de posibles cajas ARG en varios lugares a lo largo de dicha agrupación, como en la secuencia codificante del gen *scF*, donde hay tres posibles cajas ARG de Ri 5,2, 6,6 y 9 bits (desconocemos la posible unión de ArgR *in vitro*). La realización de ensayos EMSA nos mostraría si ArgR tiene algún sitio de unión en estos genes. Pero, aunque los tuviera, parece que sobre estos genes (como en tantos otros), la regulación no es llevada a cabo por un solo gen/señal, sino por la acción combinada de varios de ellos. La agrupación génica es la principal diana de la molécula reguladora ScbR (Takano *et al.*, 2005), que controla la expresión de los genes de la agrupación reprimiéndola, por lo que esperaríamos que, al estar ScbR sobreexpresado en la cepa parental, la presencia de transcritos de genes *cpk* fuera menor en dicha cepa. Pero los resultados indican lo contrario, por lo que debe haber algún otro punto de regulación, además del ejercido por ScbR. Podría explicarse por el hecho de que ScbA, enzima que sintetiza la butirolactona que hace que ScbR libere la secuencia de ADN, también tiene mayor nivel de expresión en la cepa parental. También puede haber una cascada de regulación mediada por los reguladores específicos codificados por *kasO* y *cpkN*, con menor expresión en el mutante.

Los genes *scbR* y *scbA* (SCO6265-SCO6264) de transcripción divergente codifican, respectivamente, la proteína de unión a γ -butirolactonas y la proteína que las sintetiza. ScbR regula la transcripción de *scbA* y la suya propia. La molécula de tipo butirolactona se une a su receptor ScbR, que libera el ADN al que estaba anclado, permitiendo su expresión. Ambas proteínas median la síntesis de la γ -butirolactona SCB1, y controlan la producción de antibióticos, estimulándola (Gottelt *et al.*, 2012). Nuestra serie temporal, fig. 4.40, muestra que ambos genes están significativamente más expresados en la cepa parental en los dos primeros tiempos (32 y 42 horas), con diferencias de entre 2 y 7 veces más que en el mutante. Si nos fijamos únicamente en el patrón de expresión de la cepa M145, vemos que a tiempos tempranos los niveles de *scbR* son elevados, mientras que a tiempos tardíos disminuye, lo cual se traduce en un efecto represor de *scbR* sobre los genes del metabolismo secundario a tiempos tempranos de cultivo. En

la región intergénica entre *scbR* y *scbA* hemos encontrado una posible caja ARG de R_i 7,5 bits, a la que habría que comprobar la unión de ArgR.

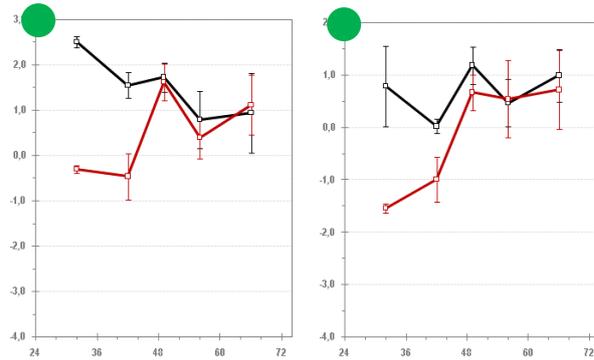


Fig. 4.40. Expresión de los genes *scbR* y *scbA*, pertenecientes a los grupos 9 y 4 de la clasificación dada por maSigPro, respectivamente. Ver pie de fig. 4.7.

El operón SCO7699-SCO7701 también está relacionado con el metabolismo secundario y la esporulación. El primer gen de esta agrupación, *eshA* (SCO7699), codifica una proteína que se produce al final del crecimiento de *S. coelicolor*, quizá como respuesta a la escasez nutricional, y es esencial en la producción de actinorrodina (Saito *et al.*, 2006). Los otros dos genes, SCO7700 y SCO7701 son responsables de la biosíntesis de metilisoborneol, compuesto orgánico volátil que, junto con la geosmina, sintetizada por el gen *geoA* (SCO6073), es responsable del típico olor a tierra mojada (Wang y Cane, 2008). La transcripción de *eshA*, SCO7700 y SCO7701 en la cepa control va incrementándose a lo largo del tiempo, mientras que en la mutante a primeros tiempos los genes se encuentran desreprimidos, y a partir de las 32 horas desciende su expresión por debajo de la de la cepa de referencia de forma que esta pasa de casi 6 veces más que la cepa parental M145 a las 42 horas, a unas 4,5 veces menos a las 66 horas. Estos genes se incluyen en el grupo 5 de la clasificación maSigPro. El gen que antecede a *eshA* contiene, en su secuencia codificante, una posible caja ARG de R_i 6,8 bits, a la que habría que comprobar la unión de ArgR. Desconocemos si ArgR ejerce un efecto directo o indirecto sobre estos genes, lo que está claro es que, de un modo u otro, a tiempos tempranos estos genes se encuentran reprimidos, y posteriormente se activan. La transcripción de *geoA* también está reducida en el mutante (fig. 4.41).

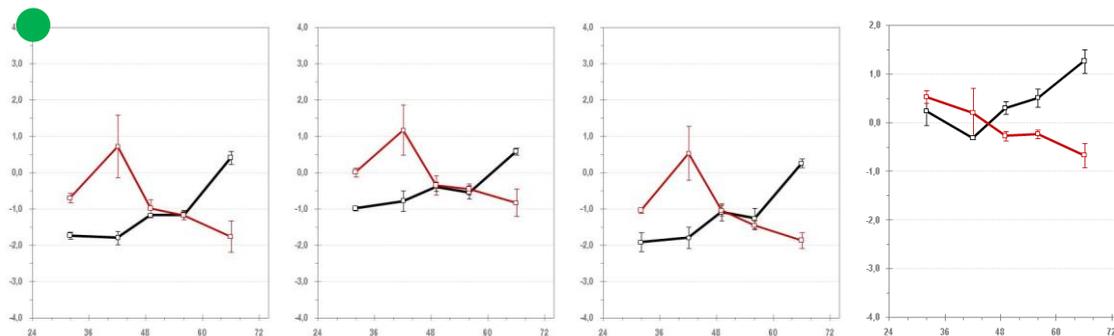


Fig. 4.41. Expresión de los genes *eshA*, SCO7700, SCO7701 y *geoA*. Ver pie de la fig. 4.7.

Otros genes afectados por la ausencia de *argR* son el gen *paaK* y la agrupación *paaABCDE*, relacionados con la degradación del producto tóxico fenilacetato a dihidrofenilacetil-CoA (Law y Boulanger, 2011), en los que observamos mayor expresión en el mutante a las 42 horas y menor a tiempos tardíos (fig. 4.42), lo que podría ser otro ejemplo de genes cuya expresión depende de ArgR, aunque quizá no exclusivamente, ya que la predicción informática ha encontrado posibles cajas ARG en la secuencia promotora de alguno de los genes, como en la de *paaB*, de R_i 6,1 bits.

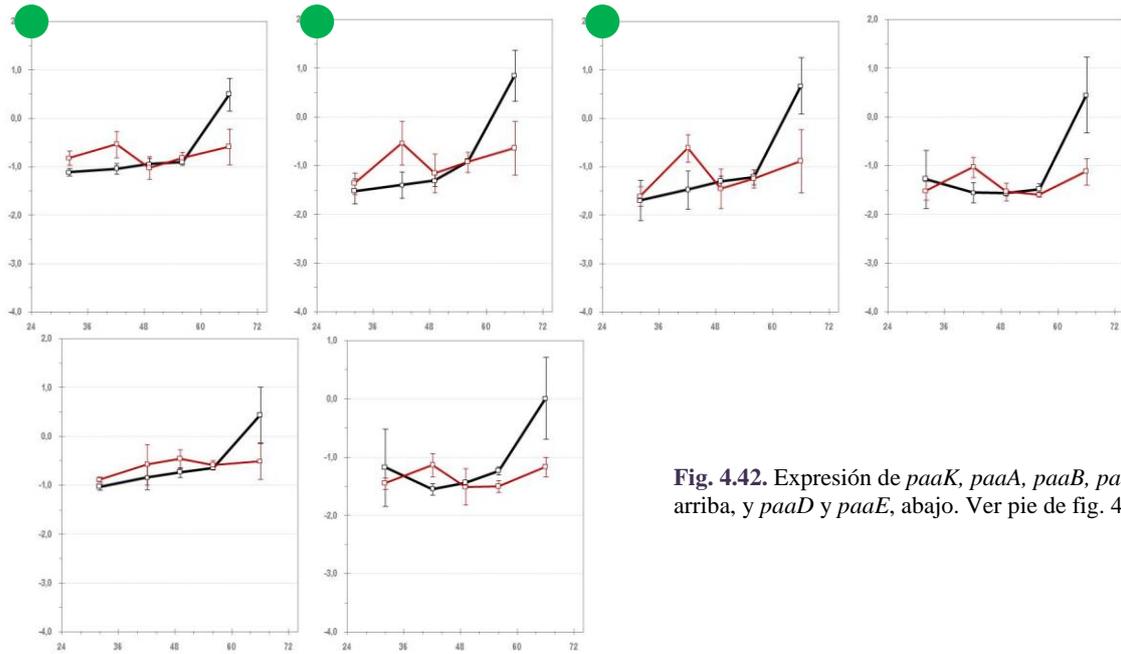


Fig. 4.42. Expresión de *paaK*, *paaA*, *paaB*, *paaC*, arriba, y *paaD* y *paaE*, abajo. Ver pie de fig. 4.7.

Una pequeña agrupación afectada por la ausencia de *argR* es la que colabora en la síntesis de la vancomicina, antibiótico del grupo de los glicopéptidos, y de CDA a partir de fenilalanina, tirosina, triptófano y piruvato, compuesta por los genes SCO3227-SCO3229 (los dos más afectados son el primero y el último de la agrupación, es decir, *hpgT* y *hmaS*). Como vemos en la fig. 4.43, la ausencia de *argR* provoca una subexpresión de entre 2 y 4,4 veces entre las 49 y las 66 horas de cultivo. Dado que no se han encontrado cajas ARG en estos genes, podemos suponer que es un efecto indirecto de la ausencia de *argR*.

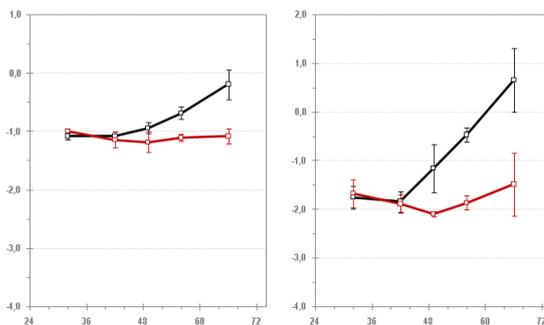


Fig. 4.43. Expresión de los genes *hpgT* (SCO3227) y *hmaS* (SCO3229) relacionados con la producción de vancomicina. Ver pie de fig. 4.7.

Cabe destacar la expresión diferencial de algunas agrupaciones no incluidas en el anexo 2, como la de la ectoína, SCO1864-SCO1867, claramente sobreexpresada en la cepa mutante (fig. 4.44). La ectoína es un metabolito secundario que actúa como sustancia protectora frente al estrés osmótico extremo y confiere resistencia a la temperatura, ya que estabiliza proteínas y otras estructuras celulares (Van-Thuoc *et al.*, 2012). Este metabolito secundario, al igual que la arginina, se sintetiza a partir de glutamato. Las proteínas EctB y EctA son similares a ArgD y ArgA de la ruta de biosíntesis de arginina (una aminotransferasa y una acetiltransferasa), pero usan un sustrato de 4 carbonos. Ambas cepas presentan el mismo patrón descendente a lo largo del tiempo para estos transcritos, aunque retardado en el mutante, donde se expresan entre 1,4 y 2,9 veces más. Estos genes son del grupo 3 según la clasificación obtenida gracias a maSigPro (fig. 4.4).

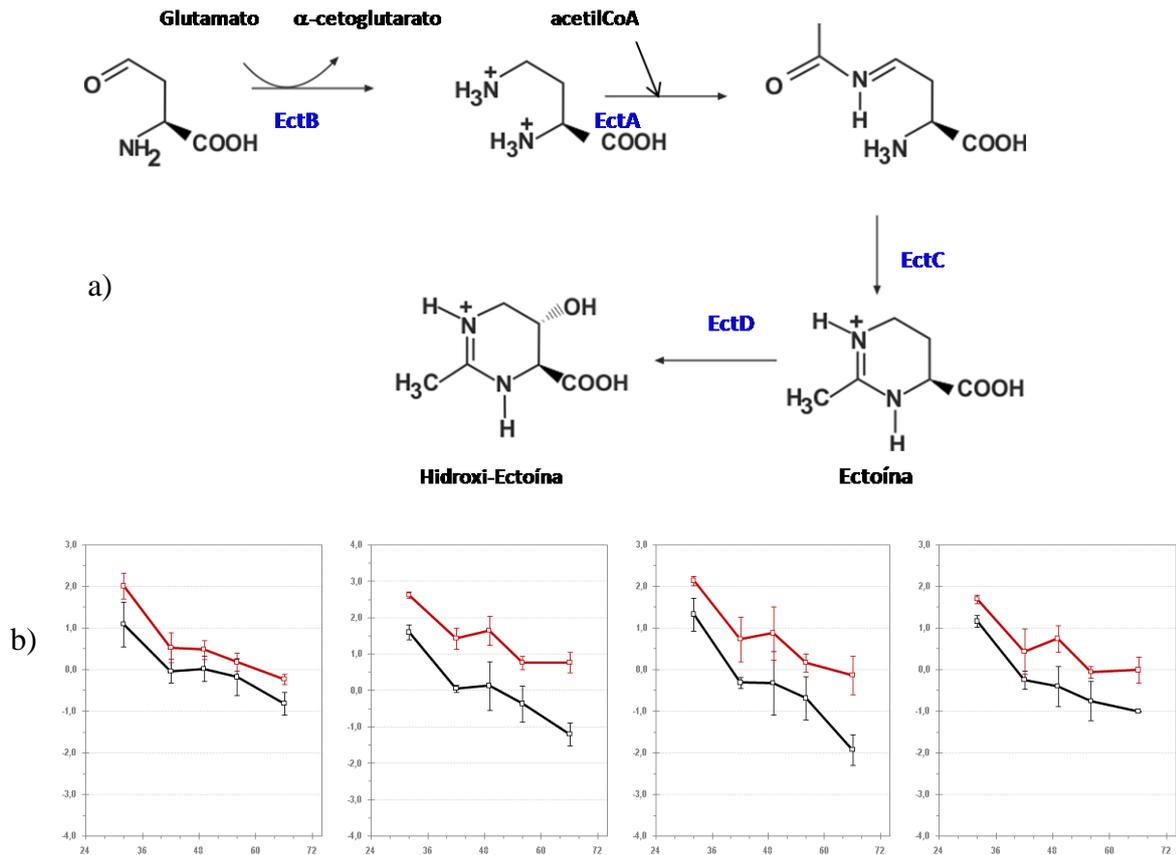


Fig. 4.44. a) Ruta de biosíntesis de la ectoína, cuyo nombre sistemático es ácido (S)-2-metil-3,4,5,6-tetrahidropirimidino-4-carboxílico. b) Expresión de los genes de biosíntesis de ectoína SCO1864-SCO1867. Ver pie de fig. 4.7.

4.1.9. Genes que codifican proteínas de secreción

Hay 115 GES en alguno de los tiempos estudiados que codifican proteínas de secreción. Algunos de ellos están desregulados a lo largo de todos los tiempos ensayados, mientras que otros lo están sólo a tiempos tempranos, o a tiempos tardíos. Citaremos unos cuantos ejemplos representativos de subexpresión en *S. coelicolor* Δ argR, y unos cuantos de sobreexpresión (fig. 4.45). Dentro del grupo de genes que codifican proteínas de secreción algunos de los subexpresados son: SCO0297, expresado entre 1,6 y 2,4 veces menos; SCO2591, entre 1,6 y 2,9; SCO4251, entre 1,5 y 7; SCO3220, entre 2,6 y 4,2; SCO6934, entre 2,4 y 17,2; y, por último, SCO7717, entre 2,5 y 3,2 veces menos. El gen SCO6935 presenta en su secuencia codificante una caja ARG de R_i 6,92 bits a la que desconocemos si ArgR se une. En el grupo de genes sobreexpresados en la cepa mutante, se encuentra el gen SCO0615, cuyos niveles de expresión superan entre 2,3 y 4,7 los de la cepa parental M145; SCO0665, entre 1,9 y 8,1; SCO2704, entre 2,1 y 15,6; SCO3097, entre 2 y 4,8; SCO4902, entre 4,2 y 5,1; y SCO6375, entre 3,7 y 9,9 veces más. Uno de los genes sobreexpresados, SCO4902, presenta en su región promotora una posible caja ARG con un R_i de 6 bits. Estos genes presentan distintos perfiles de expresión.

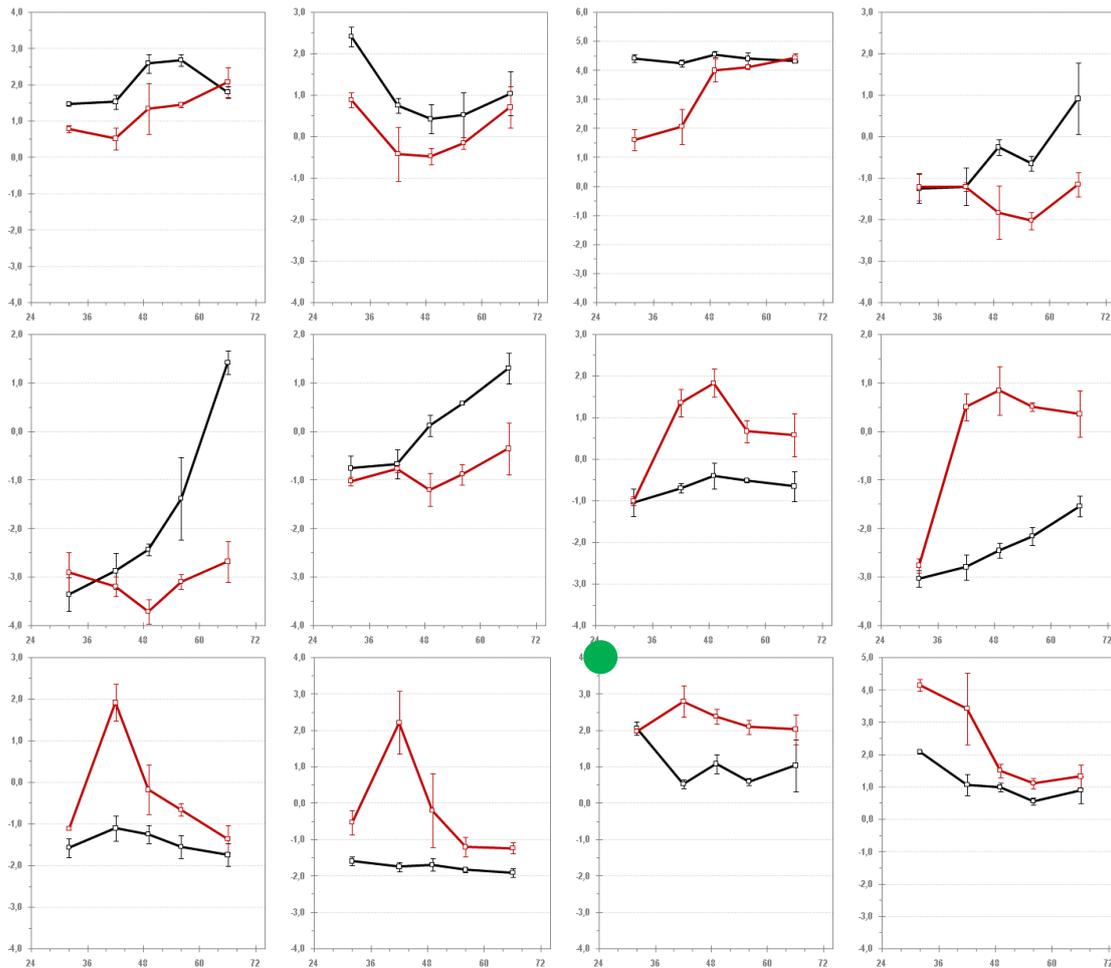


Fig. 4.45. Expresión de los genes que codifican proteínas de secreción SCO0297, SCO2591, SCO4251 (grupo 4), SCO3220, fila superior; SCO6934, SCO7717, SCO0615, SCO6375 (grupo 8), fila intermedia; SCO0665 (grupo 5), SCO2704 (grupo 5), SCO3097 (grupo 1) y SCO4902 (grupo 7 de la clasificación maSigPro), fila inferior. Ver pie de fig. 4.7.

4.1.10. Genes que codifican proteínas de membrana

Hay 179 GES que codifican proteínas de membrana, y del mismo modo que en el punto anterior, los hay desregulados a lo largo de los 5 tiempos analizados o solo en alguno, y con más o menos diferencias entre cepas (fig. 4.46). Algunos ejemplos de genes desreprimidos en la cepa mutante son SCO0853, cuya expresión es entre 4,2 y 12 veces mayor que la de la cepa control; SCO3786, entre 1,8 y 7; SCO4982, entre 3,5 y 8,1; y SCO6825, con entre 2,6 y 10,6 más expresión.

Ejemplos de genes con menor expresión en la cepa mutante (Fig. 4.46) son SCO0973, con niveles de expresión entre 1,6 y 2,7 veces menos; SCOSCO2309, entre 1,5 y 2,5, y SCO4174, entre 1,4 y 2,1 veces menos que la cepa parental M145.

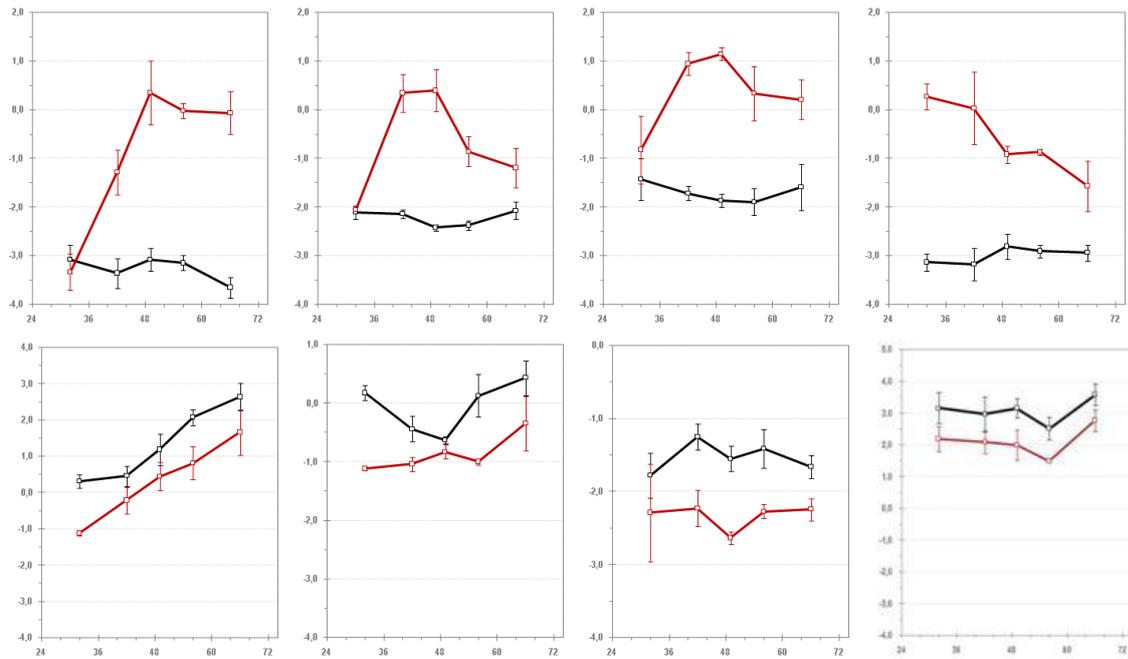


Fig. 4.46. Expresión de los genes que codifican proteínas de membrana SCO0853 (grupo 1), SCO3786, SCO4982 y SCO6825 (grupo 1), en la fila superior, y SCO0973, SCO2309, SCO4174 y SCO6624 (grupo 2 de la clasificación maSigPro), en la fila inferior. Ver pie de fig. 4.7.

4.1.11. Genes que codifican reguladores y factores sigma

Además de reguladores como *argR*, *pyrR* o *cpkN*, de metabolismo de aminoácidos, purinas y pirimidinas y metabolismo secundario, que hemos clasificado con sus respectivas agrupaciones, hay 98 GES que también codifican reguladores y factores sigma. Veremos unos cuantos ejemplos a continuación.

El gen *stil* (SCO0762) codifica un inhibidor de proteasas que se transcribe activamente a lo largo de todo el desarrollo. La función de dicho gen es modular la actividad proteasa extracelular (Kato *et al.*, 2005). La cepa mutante $\Delta argR$ expresa este gen entre 3,6 y 4,6 veces menos que la cepa parental M145 y, a pesar de que observamos menor expresión a lo largo de todos los tiempos, no todos son estadísticamente significativos (sí lo son los de las 32, 42 y 56 horas, fig. 4.47).

El gen *afsS* (SCO4425) codifica la proteína AfsS, factor sigma modulador de la síntesis de antibióticos y de la respuesta al estrés nutricional (Lian *et al.*, 2008). En el primer experimento de micromatrices con ARN aislado a las 32 horas este gen se transcribía menos en la cepa mutante, como corroboró la RT-PCR (ver fig. 4.38) y esta reducción de la expresión se relacionó con la deficiencia en las producciones de actinorrodina y undecilprodigiosina en dicha cepa (Pérez-Redondo *et al.*, 2012). En el promotor de este gen se detectó una caja ARG a la que demostramos la unión de ArgR (apartado 4.4.5), aunque dicha unión fue muy débil. Sin embargo, en la serie temporal la transcripción de *afsS* solo es estadísticamente significativa a las 66 horas, en las que se expresa 3,3 veces más que la cepa parental (fig. 4.47).

En el gen regulador *rstP* (SCO3943) no se observa efecto transcripcional de la ausencia de ArgR (imagen no mostrada), pero como se demuestra en el apartado 4.4.5 posee un sitio de unión a ArgR

funcional en su promotor. Habiendo unión directa del regulador *in vitro*, este es un caso en el que quizás no sean las condiciones óptimas para observar el efecto de ArgR *in vivo*.

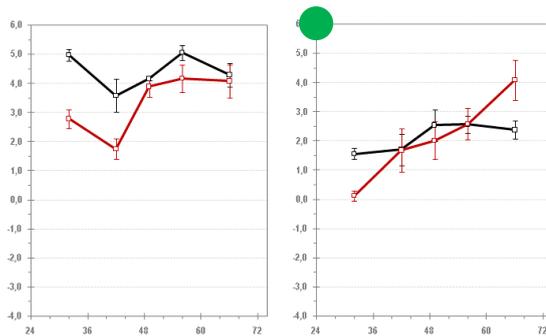


Fig. 4.47. Expresión de los genes *stil* y *afsS*. Ver pie de fig. 4.7. Ambos pertenecen al grupo 4 de la clasificación obtenida mediante maSigPro.

Otros ejemplos de reguladores, de función desconocida, y con diferencias que oscilan entre 1,4 y 40,9 veces más en la cepa mutante, son SCO2865, SCO3583 y SCO3857 (fig. 4.48). La búsqueda bioinformática ha encontrado una caja ARG de Ri 6 bits en la secuencia codificante de SCO2865.

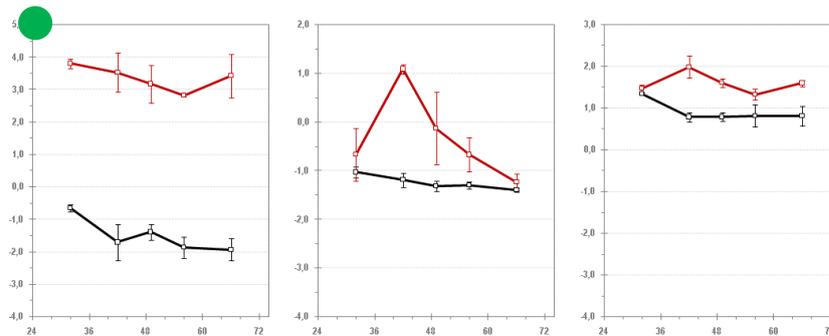


Fig. 4.48. Expresión de los genes que codifican los reguladores SCO2865, SCO3583 y SCO3857. Ver pie de fig. 4.7. Estos genes pertenecen a los grupos 1, 5 y 1, respectivamente, de la clasificación de maSigPro.

Los factores sigma de la ARN polimerasa codificados por los genes *hrdC* (SCO0895), *sigK* (SCO6520), *sigM* (SCO7314) y *sigG* (SCO7341) están desreprimidos en la cepa carente de ArgR, expresándose entre 1,8 y 7,6 veces más que la cepa parental M145 (fig. 4.49). SigK controla el cambio de micelio vegetativo a micelio aéreo, regula la producción de chaplinas y la producción de antibióticos (Mao *et al.*, 2009). Estos autores sugieren un papel represor en la transición morfológica y en el metabolismo secundario, por lo que la sobreexpresión de *sigK* implicaría una menor producción de transcritos de actinorrodina y undecilprodigiosina. *sigG* codifica un factor sigma del que poco se conoce en *S. coelicolor*, salvo su posible implicación en la regulación de un operón que codifica ARNr (Sevcikova *et al.*, 2005). En el apartado 4.4.5 veremos que el promotor de *sigM* contiene cajas ARG a las que ArgR se une *in vitro*.

Por último, SCO4027 codifica un antagonista de un factor antisigma claramente desreprimido en la cepa mutante, expresándose entre 3,4 y 8 veces más (fig. 4.49).

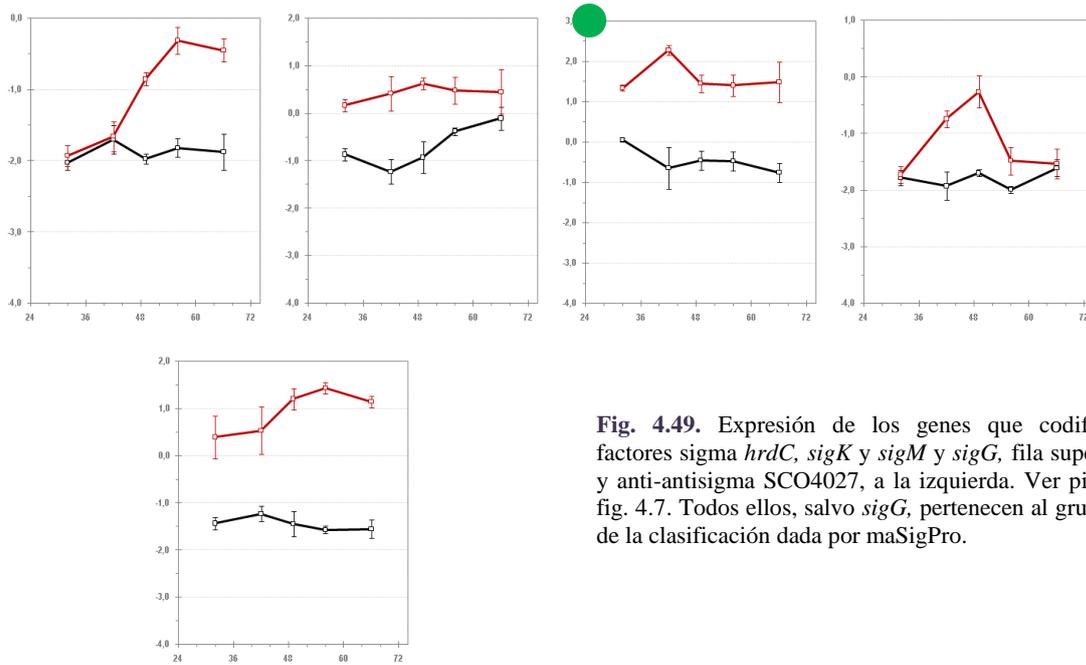


Fig. 4.49. Expresión de los genes que codifican factores sigma *hrdC*, *sigK* y *sigM* y *sigG*, fila superior y anti-antisigma SCO4027, a la izquierda. Ver pie de fig. 4.7. Todos ellos, salvo *sigG*, pertenecen al grupo 1 de la clasificación dada por maSigPro.

4.1.12. Genes no clasificados

En este apartado agrupamos genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos y fosfolípidos, en la degradación de terpenoides, cloroalcanos y cloroalquenos, en glucólisis y gluconeogénesis, en la ruta de las pentosas fosfato, etc., o son de función desconocida.

SCO1086 codifica una proteína con dominio transaminasa, con función proteasa según Makarova *et al.* (1999), claramente desreprimido en la cepa mutante ya a las 32 horas de cultivo (fig. 4.50). En las micromatrices de la serie temporal la expresión del gen SCO1086 está fuertemente incrementada en ausencia de ArgR, con unas diferencias en los valores de Mc de entre 5,15 a las 32 horas y 6,97 a las 56 horas, lo que se traduce en una expresión entre 35,5 y 125,7 veces mayor. Se desconoce la función de la proteína codificada por este gen, pero está claro que su perfil de transcripción lo incluye en el grupo 1 del maSigPro, junto con los genes *arg*. Existen cajas ARG de alta puntuación (apartado 4.4.3) en la región previa a SCO1086. El ensayo de luminiscencia realizado con el promotor de este gen da unos resultados que concuerdan con lo visto en ambos experimentos de micromatrices (fig. no mostrada).

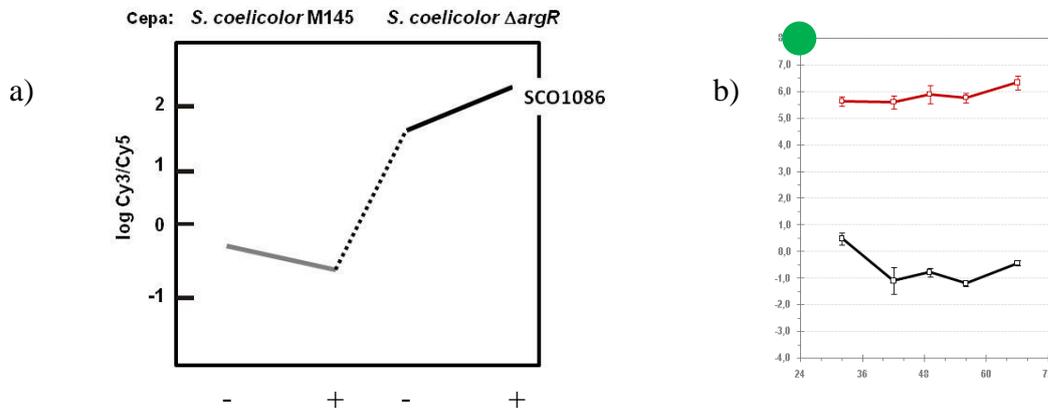


Fig. 4.50. a) Expresión del gen SCO1086 a las 32 horas de cultivo de *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$ en MG (-) y en MG con 25 mM de arginina (+). b) Expresión del gen SCO1086 en la serie temporal. Ver pie de la fig. 4.7.

La acetil-CoA carboxilasa (ACC, codificada por *accB* y *accE*, SCO5535 y SCO5536, respectivamente) y la propionil-CoA carboxilasa (PCC, codificada por *accA1/accA2*, *pccB* y *pccE*, SCO6271/SCO4921, SCO4926 y SCO4925, respectivamente) catalizan la carboxilación de acetil y propionil-CoA para generar malonil y metilmalonil-CoA, respectivamente, importantes en los primeros pasos de la biosíntesis de ácidos grasos. Ambas enzimas son acil-CoA carboxilasas, y están formadas por varias subunidades, cuyo centro cataliza la transcarboxilación entre biotina y acil-CoA (Diacovich *et al.*, 2004). Rodríguez *et al.* (2001) sugieren una participación directa en el aporte de malonil-CoA a través de ACC para la síntesis de actinorrodina y undecilprodigiosina. Nuestros experimentos muestran unas 2–2,6 veces menor expresión del gen *accB* en la cepa mutante, mientras que en *pccB*, no hay diferencias entre las dos cepas excepto al final del tiempo de muestreo (66 horas) en que en *S. coelicolor* $\Delta argR$ la transcripción es casi 2 veces mayor (fig. 4.51). La menor expresión de los genes *accB*, *pccB* y *accE* (que no se muestra, por no ser estadísticamente significativo, pero cuyo patrón de transcripción es similar al de *accB*), resulta en menos acetil-CoA carboxilasa y en una menor disponibilidad de malonil-CoA, precursor de los antibióticos pigmentados actinorrodina y undecilprodigiosina, lo que podría ser otra de las razones que explicasen el por qué de la menor producción de antibióticos en *S. coelicolor* $\Delta argR$.

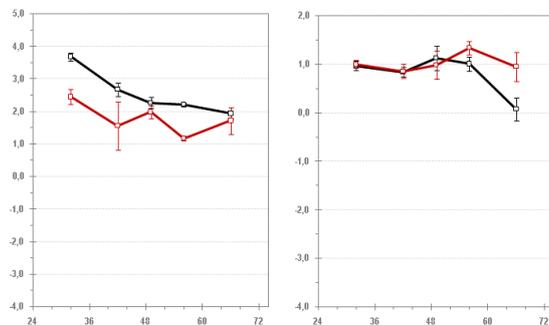


Fig. 4.51. Expresión de *accB* (grupo 3 de maSigPro) y *pccB*. Ver pie de fig. 4.7.

El NADH se produce durante la glicolisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y se oxida a NAD^+ por la NADH deshidrogenasa de la cadena de transporte de electrones que mantiene el balance $NADH/NAD^+$ (Brekasis y Paget, 2003; Gyan *et al.*, 2006). El operón *nuoABCDEFGHIJKLMN* (SCO4562-SCO4575) codifica las 14 subunidades de la NADH deshidrogenasa 1. El patrón de expresión es en todos los genes el mismo: una clara desrepresión en los tres primeros tiempos en la cepa $\Delta argR$, lo que redundaría en un aumento de la transcripción de hasta 9 veces respecto a la cepa parental (fig. 4.52). La predicción informática señala posibles cajas ARG en los promotores del primer gen de la agrupación, *nuoA*, y en las secuencias codificantes de *nuoE*, *nuoG* y *nuoH*, de R_i 5,75, 5,8, 9,1 y 6 bits, respectivamente. Un ensayo de retraso en gel podría confirmar la unión de ArgR, y por tanto, definir una regulación directa de ArgR.

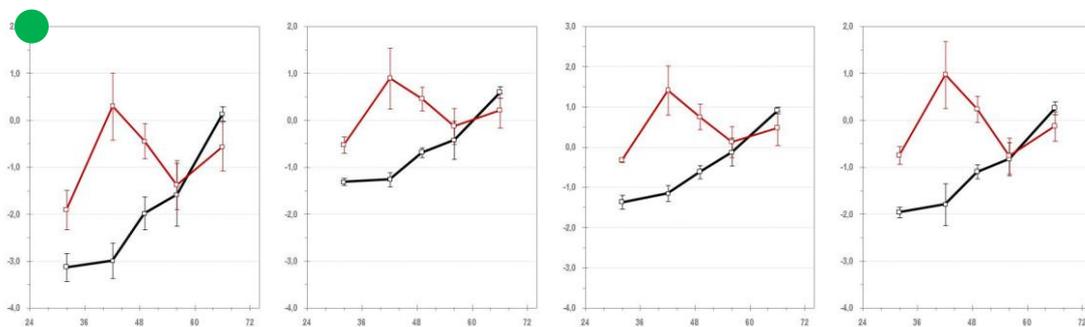


Fig. 4.52. Expresión de *nuoA*, *nuoB*, *nuoC* y *nuoD*. Se representan 4 de los 14 genes de la agrupación pero el resto mantienen el mismo patrón. Ver pie de fig. 4.7. El programa maSigPro incluye a estos genes en el grupo 5.

Hay otros genes afectados por la ausencia de ArgR relacionados con el metabolismo de ácidos grasos y policétidos, como *inhA* y *fabG* (SCO1814-SCO1815), la agrupación *fabDHPF* (SCO2387-SCO2390, de la que solo es estadísticamente significativa la expresión del gen SCO2390), SCO3244, *hcmO* (SCO3245), SCO3246, *hxcO* (SCO3247), *fabF3* (SCO3248) y SCO3249 (del operón SCO3249-SCO3244). Las policétido sintetas utilizan ACP (proteína transportadora de grupos acilo) como unidad de inicio y de extensión para dar lugar a una amplia variedad de policétidos mediante condensaciones descarboxilativas con el grupo malonil, donador de dos carbonos. Los genes citados codifican reductasas, sintetas y oxidasas, encargadas de transferir y modificar los grupos acil y malonil utilizados como unidades de extensión de las cadenas de policétidos y ácidos grasos (Zhou *et al.*, 1999; Florova *et al.*, 2002; Keatinge-Clay *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2013). Todos ellos presentan menor expresión en la cepa mutante, desde 1,5 hasta 4 veces menos (fig. 4.53). Los genes *inhA*, *fabG* y *fabDHPF* presentan el mismo perfil y maSigPro los clasifica en el grupo 3. En las secuencias codificantes de *fabG* y *fabF* se han encontrado posibles cajas ARG de R_i 5,9 y 5,6 bits, a las que no se ha probado la unión de ArgR *in vitro*.

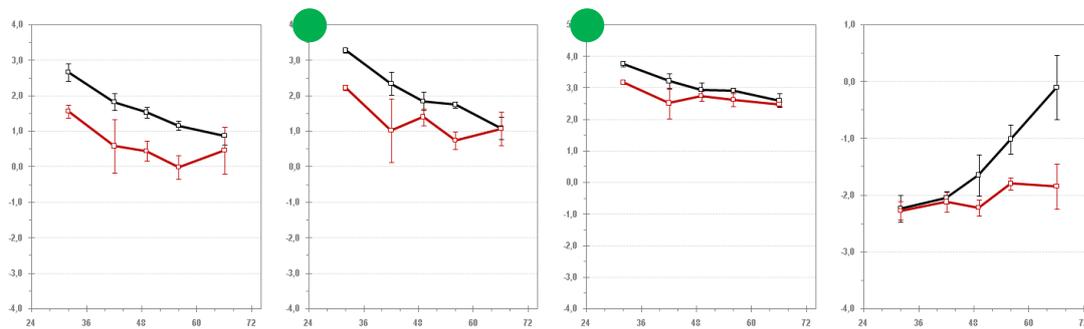


Fig. 4.53. Expresión de *inhA*, *fabG*, *fabF* y *hxcO*. Ver pie de fig. 4.7.

El operón SCO1659-SCO1661 contiene los genes para la toma de glicerol a través de un facilitador de membrana permeasa (*glpF*, SCO1659), y su conversión a gliceraldehido 3-fosfato mediante una quinasa (*glpK*, SCO1660) y a dihidroxiacetona-fosfato, útil en el metabolismo de glicerolípidos y éter lípidos, mediante una deshidrogenasa (*glpD*, SCO1661). Estos tres genes están desreprimidos en el mutante *S. coelicolor* Δ *argR*, aunque el patrón de transcripción es muy similar entre ambas cepas. El gen *glpK* posee, al principio de su secuencia codificante, una posible caja ARG de R_i 5,4 bits. El parálogo *glpK2* (SCO0509) también se sobreexpresa en el mutante con diferencias de hasta 4 veces con respecto a la cepa parental (fig. 4.54).

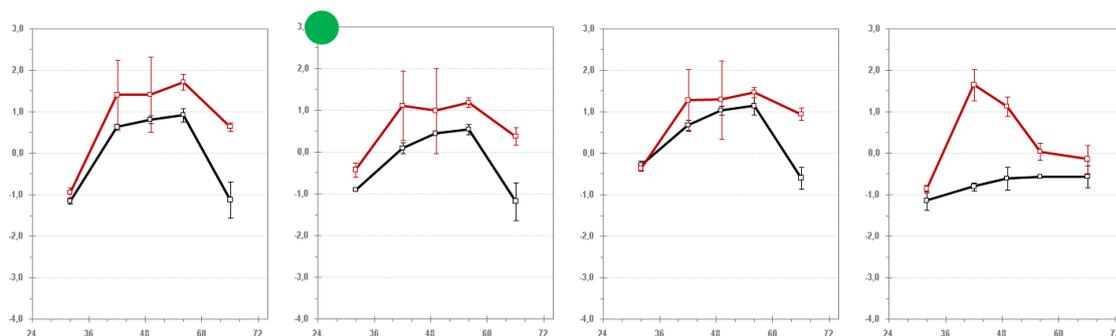


Fig. 4.54. Expresión de *glpF*, *glpK*, *glpD* y *glpK2*. Ver pie de fig. 4.7. Pertenecen al grupo 5 de maSigPro.

Los genes *aceA* y *aceB2* (SCO0982 y SCO0983), SCO6205-SCO6206 y *gcl* (SCO6201) codifican proteínas cuya función está relacionada con el metabolismo del glioxilato y dicarboxilato. En muchas bacterias, la asimilación de acetato se lleva a cabo mediante el ciclo del glioxilato, cuyas enzimas clave son

la isocitrato liasa y la malato sintasa (sintetizadas por *aceA* y *aceB2*), dando como resultado una molécula de succinil-CoA a partir de dos moléculas de acetyl-CoA (Akopiants *et al.*, 2006). El gen *gcl* codifica la enzima glioxilato carboligasa, que cataliza la reacción reversible que forma tartronato semialdehído a partir de dos moléculas de glioxilato liberando CO₂. También está relacionado con el catabolismo de la alantoina, sustancia nitrogenada que contiene dos moléculas de urea. Los cinco genes están desreprimidos en la cepa mutante, expresándose entre 1,7 y 8,6 veces más que la cepa de referencia (fig. 4.55) y pertenecen al grupo 1 de la clasificación dada por maSigPro.

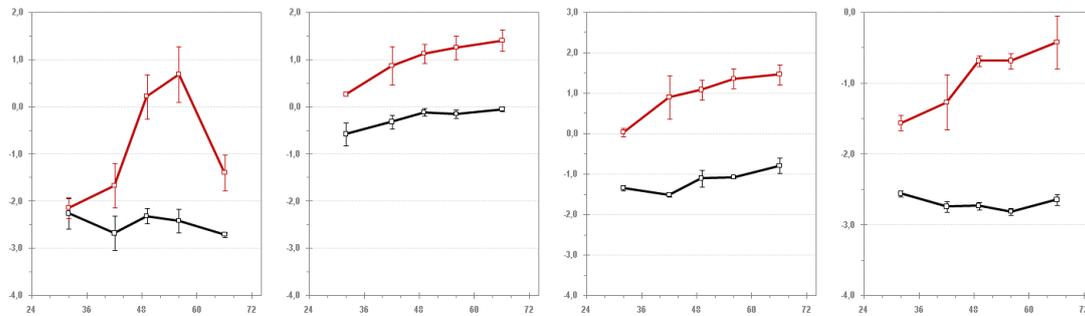


Fig. 4.55. Expresión de *aceA*, SCO6205 y SCO6206 y *gcl*. El gen *aceB2* presenta el mismo patrón de expresión que *aceA*. Ver pie de fig. 4.7.

Otros genes desreprimidos en la cepa mutante y con distintas funciones son los enumerados a continuación (fig. 4.56): SCO6496-SCO6498, implicados en la fosforilación oxidativa y en la ruta de las pentosas fosfato; *kata2* (SCO7590), que codifica una catalasa que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua y participa en múltiples procesos biológicos, como el metabolismo del triptófano o del metano; SCO7412-SCO7413 cuya función es catalizar la conversión de piruvato en acetato; *thiL* (SCO5399) y SCO5400 que participan en el metabolismo de ácidos grasos, en la síntesis y degradación de cuerpos cetónicos, en la degradación de valina, lisina, leucina e isoleucina, en la degradación de benzoato, etc. La clasificación maSigPro incluye a SCO6496, SCO6497, SCO6498, SCO7412 y SCO7413 en el grupo 1 y a *kata2* en el grupo 8.

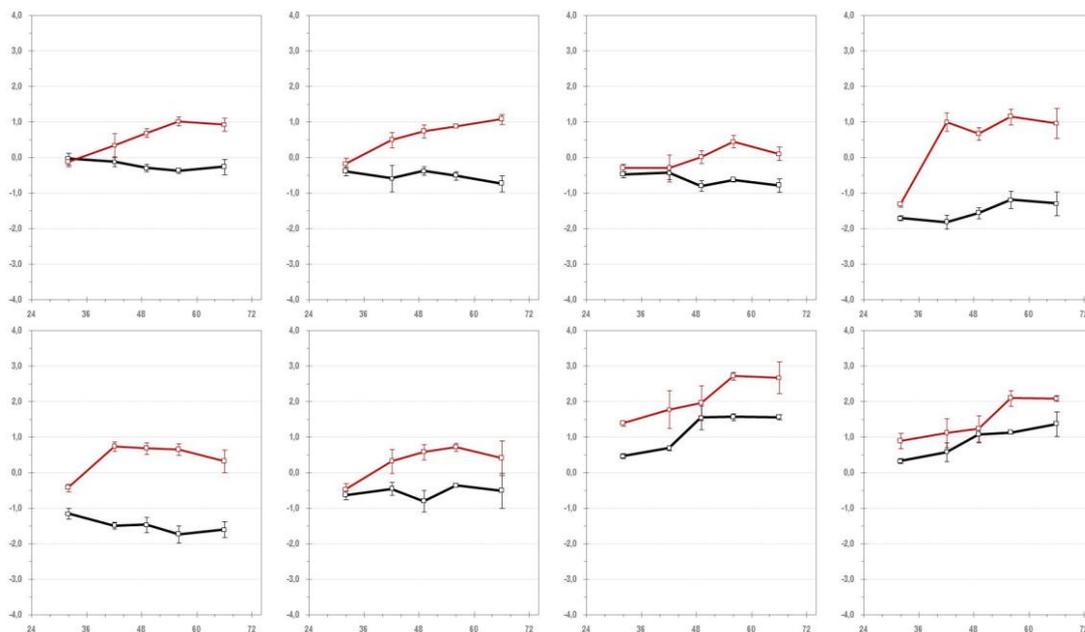


Fig. 4.56. Expresión de SCO6496, SCO6497, SCO6498, *kata2*, arriba, y SCO7412, SCO7413, *thiL* y SCO5400, abajo. Ver pie de fig. 4.7.

4.1.13. Validación de los resultados de las micromatrices mediante Q-PCR

En función de la clasificación obtenida a partir del programa maSigPro (apartado 4.1.1) elegimos 20 genes que adecuaran su transcripción a distintos patrones para validar los resultados de la serie temporal.

La cuantificación del ARNm mediante Q-PCR permite validar los resultados obtenidos mediante micromatrices y descartar los falsos positivos. La fiabilidad de los datos depende de la introducción de varias reacciones de control negativo en cada una de las placas para comprobar si existe formación de dímeros o contaminación de las muestras de ARN con ADN.

La expresión génica así cuantificada es relativa ya que se realiza comparando la transcripción de dichos genes en la cepa mutante respecto a los mismos genes en la cepa parental, a la que se asigna un valor relativo de 1. El método de cuantificación se basa en la determinación del ciclo umbral o Ct, y la cuantificación relativa de las diferencias de expresión entre cepa mutante y control se realiza a través del método del $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001). En este sistema es necesaria la introducción de un control endógeno para normalizar los valores obtenidos (en este caso, el gen constitutivo que codifica el factor sigma HrdB, cuyo nivel de expresión permanece estable) (Buttner *et al.*, 1990). Valores relativos de expresión superiores a 1 indican que la expresión del gen analizado se encuentra sobreexpresado en la cepa mutante, mientras que valores inferiores a 1 indican una menor expresión del gen en cuestión. Dichos valores son los que se representan en la tabla 4.1.

Para analizar los resultados de la Q-PCR se utilizó el programa *Rest*, de Qiagen (*Relative Expression Software Tool*), en el que la expresión de un gen diana se estandariza mediante un gen de referencia de expresión constitutiva (*hrdB*). Utiliza varios algoritmos matemáticos para conocer el ratio de expresión, basados en la eficiencia de la Q-PCR y en la desviación de Ct (ΔCt) de la muestra tratada (mutante, ΔargR) frente a la muestra control (parental, M145). Cabe destacar que los 20 genes elegidos dieron resultados estadísticamente significativos tomando como valor $p < 0,01$. Los valores obtenidos son el resultado del análisis de tres réplicas biológicas de cada cepa y dos réplicas técnicas. No se analizaron todos los tiempos de la serie temporal, sino únicamente dos de cada gen. Esos dos tiempos se eligieron en función de los puntos donde las diferencias fueran mayores entre cepas y, en todos los casos, que dichas diferencias fueran significativas.

El perfil de expresión del mutante *S. coelicolor* ΔargR obtenido mediante Q-PCR para los genes analizados concuerda exactamente con el obtenido con las micromatrices (tabla 4.1). Por lo general, los valores de expresión de las micromatrices son menores que los obtenidos mediante la técnica de Q-PCR, lo que significa que la sensibilidad de la técnica de Q-PCR es mayor.

Gen	Micromatrices serie temporal					Q-PCR					Grupo maSigPro
	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	
SCO0464	1,201	1,913	3,910	3,213	2,959			12,145	7,117		1
SCO0509	1,218	5,464	3,324	1,520	1,339		8,273	7,114			5
SCO0524	1,381	1,379	1,408	1,444	1,691		7,357		6,113		1
SCO0870	1,800	2,118	2,129	2,442	2,813	3,298				3,650	n.c.
SCO1814	0,465	0,422	0,473	0,446	0,749	0,577		0,433			4
SCO1865	2,034	2,612	2,862	2,180	3,912		5,066			3,430	n.c.
SCO2716	15,116	30,974	4,359	2,696	1,240	22,482	22,567				7
SCO5076	0,292	0,893	0,345	0,186	0,327	0,122			0,236		6
SCO5316	2,032	47,013	7,245	1,618	1,370		23,983	13,924			5
SCO5658	0,893	0,741	0,539	0,433	0,185				0,276	0,559	5
SCO5803	1,241	2,687	1,702	1,891	1,030		5,163		7,492		7
SCO5879	0,857	0,655	0,311	0,485	0,745			0,302	0,319		4
SCO6201	2,001	2,778	4,138	4,380	4,678			9,109	15,663		1
SCO6473	1,325	9,754	4,627	2,723	2,202		36,774		8,477		5
SCO6497	1,166	2,116	2,163	2,617	3,509			9,528		7,098	1
SCO6501	1,146	1,647	1,794	2,020	3,165				13,583	3,660	1
SCO7314	2,444	7,616	3,745	3,683	4,721	7,711	15,838				1
SCO7336	1,943	21,097	15,168	1,535	0,969		19,416	8,097			7
SCO7412	1,660	4,695	4,435	5,220	3,803		18,958		4,985		1
SCO7590	1,311	7,052	4,678	5,060	4,790		11,692			11,692	8

Tabla 4.1. Valores relativos de expresión de los genes analizados en micromatrices de la serie temporal y Q-PCR. La columna de la derecha indica el grupo de la clasificación del programa maSigPro (mutante vs parental, fig. 4.4) al que pertenecen. Dos de los genes no se ajustan a ningún grupo de dicha clasificación (n.c.).

4.2. Complementación del mutante *S. coelicolor* $\Delta argR$ para la restauración de la función génica de *argR*

La caracterización de la función de *argR* se llevó a cabo utilizando el mutante *S. coelicolor* $\Delta argR$, en el que el gen *argR* se ha sustituido por el casete de resistencia a apramicina (Pérez-Redondo *et al.*, 2012). Dicho mutante muestra una pérdida casi total de la capacidad de producción de los antibióticos pigmentados actinorrodina y undecilprodigiosina con respecto a la cepa de la que proviene, *S. coelicolor* M145, además de tener alterados los metabolismos de arginina, pirimidinas y nitrógeno, entre otros.

La complementación del mutante *S. coelicolor* $\Delta argR$ mediante la introducción de una copia del gen *argR* presenta el problema de que desconocemos si existe un promotor propio por delante de *argR*, además del que precede al gen *argC*, y desde el que se puede formar un mensajero policistrónico *argCJBDR*, como sucede en *S. clavuligerus* (Rodríguez-García *et al.*, 2000). Una posibilidad para solventar esta situación era colocar el gen *argR* tras un promotor exógeno y la otra diseñar un promotor fusionando las regiones promotoras de *argR* y *argC*. Elegimos construir este promotor de fusión, al considerar que el control transcripcional de *argR* en la nueva cepa sería más semejante a la situación real.

4.2.1. Construcción de los plásmidos de complementación pMS83-StrepargR y pMS83-argRStrep para la complementación del mutante *S. coelicolor* $\Delta argR$

El primer paso consistió en hacer la construcción *in silico* de un promotor que combinase las secuencias que preceden a *argR* y a *argC*. Para ello se utilizó la opción “Primer design” del programa informático *Vector NTI* y se diseñó un cebador, PargR21, de 91 pb. El cebador incluye 53 nucleótidos provenientes del final del gen *argD*, los 7 nucleótidos existentes entre *argD* y *argR*, 3 nucleótidos que codifican un codón de STOP y 18 nucleótidos correspondientes al inicio del gen *argC*. La pareja de este cebador, PargR22, hibrida en la región anterior al promotor del gen *argC*, concretamente a 158 pb de su inicio de transcripción. En ambos cebadores se incluyeron en posición 5' sitios de corte NdeI (PargR21) y PstI (PargR22) para la clonación posterior del fragmento amplificado. El sitio NdeI, que contiene un ATG, permitirá la inserción del gen *argR* en un paso posterior del diseño de las construcciones de complementación. Los cebadores diseñados se utilizaron para amplificar mediante PCR un fragmento, denominado P_{C-R} (fig. 3.57), de 314 pb a partir del plásmido pTC123-*aphII* (Pérez-Redondo *et al.*, 2012).

Por otra parte, se obtuvieron fragmentos de 661 y 588 pb mediante PCR a partir del plásmido pTC123-*aphII* con los cebadores argR17 / argR18 y argR19 / argR20, respectivamente. El cebador argR17, además de la secuencia complementaria al gen *argR*, incorpora 24 pb que codifican la etiqueta Strep y los sitios de corte NdeI y EcoRI. El cebador argR18 incorpora el sitio HindIII. En la otra pareja de cebadores argR19 incorpora los sitios de corte NdeI y EcoRI, y el cebador argR20, las 24 pb que codifican la etiqueta Strep y el sitio de corte HindIII. Los fragmentos fueron clonados en el pBluescript SK⁺ mediante digestión con las endonucleasas de restricción HindIII y EcoRI para originar las construcciones pBluescript SK⁺-StrepargR y pBluescript SK⁺-argRStrep. Dichas construcciones incorporan la etiqueta Strep II fusionada al gen *argR* en su extremo 5' o 3', respectivamente. Además en el caso de la clonación en el extremo 3' el

codón de parada de la proteína de fusión se coloca tras la etiqueta Strep II. Como se vio en el apartado 3.18.1, este péptido sirve para facilitar la purificación de la proteína de fusión y, en el protocolo de ChIP-chip, es la diana de los anticuerpos anti-Strep (apartado 3.14).

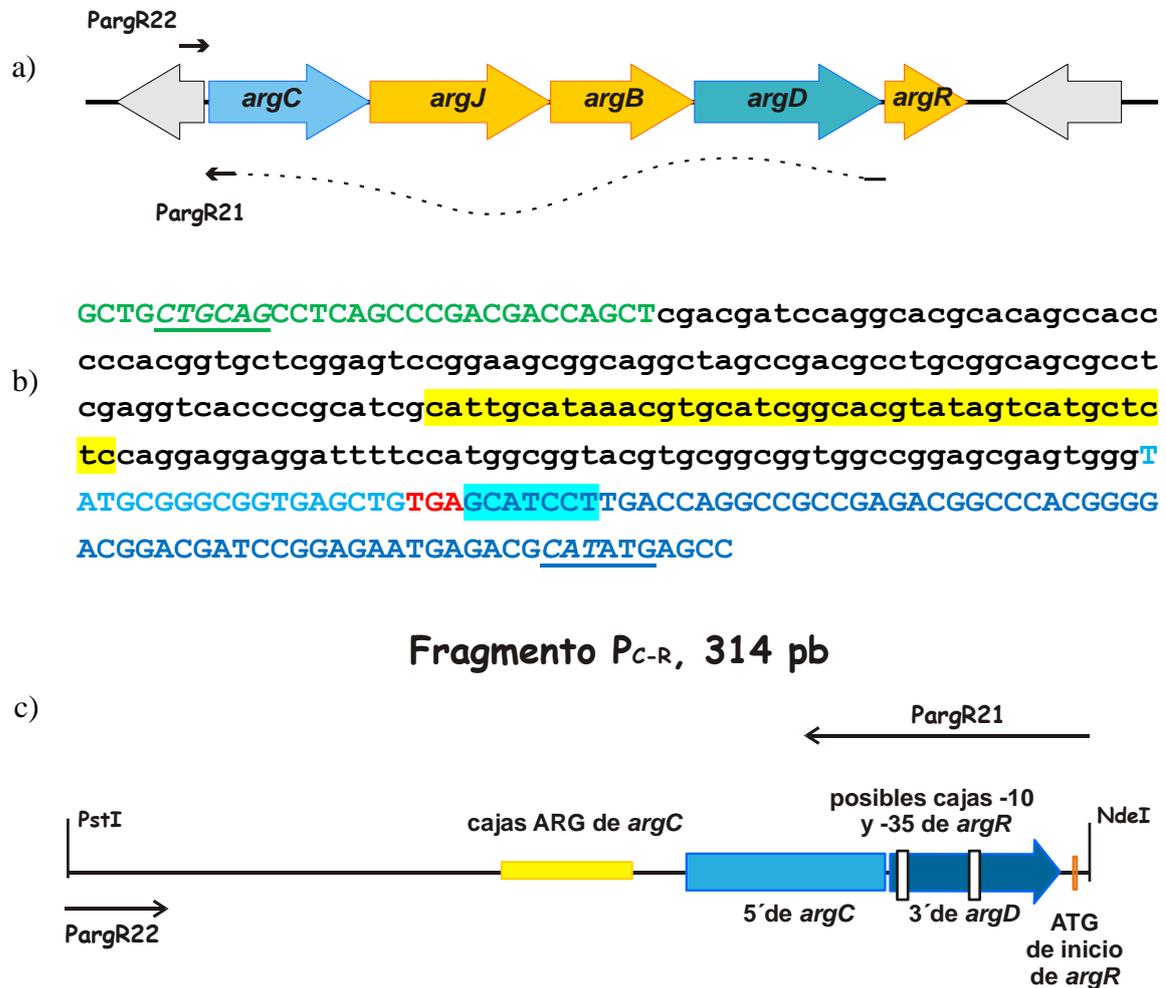


Fig. 4.57. a) Agrupación *arg* de *S. coelicolor* mostrando los cebadores usados para amplificar el promotor P_{C-R} . El cebador PargR21 es una fusión de dos segmentos de ADN distantes. b) Secuencia del fragmento promotor de 314 pb P_{C-R} en el que se fusionan las regiones que preceden a *argC* y *argR*. En verde se indica el cebador PargR22, y los dos tonos de azul representan los segmentos de secuencia fusionados en la secuencia complementaria del cebador PargR21. En rojo se resalta el codón de STOP y con fondo azul claro los 7 nucleótidos entre los genes *argD* y *argR*. Los sitios de restricción añadidos a ambos cebadores aparecen subrayados y en cursiva si su secuencia no es homóloga a la del genoma. Resaltado con fondo amarillo se indican las cajas ARG del promotor de *argC* de acuerdo con el modelo v1.2 (ver apartado 4.4). c) Esquema de la secuencia P_{C-R} de 314 pb amplificada con PargR22 y PargR21.

El fragmento promotor P_{C-R} de 314 pb se clonó en las construcciones SK-Strep*argR* y SK-*argR*Strep por digestión con las enzimas de restricción NdeI y PstI. Se obtuvieron así en *E. coli* DH5a las construcciones pBluescript SK⁺- P_{C-R} -Strep*argR* y pBluescript SK⁺- P_{C-R} -*argR*Strep (fig. 4.58).

El paso siguiente fue extraer ese inserto con promotor-gen del pBluescript y clonarlo en el plásmido pMS83 (M. Smith, University of York, UK). Para ello, se digirieron con PstI y HincII las construcciones SK- P_{C-R} -Strep*argR* y SK- P_{C-R} -*argR*Strep, obteniéndose fragmentos de 880 y 957 pb, respectivamente. El plásmido pMS83 se digirió con Acc65I y se rellenaron sus extremos, tras lo cual se digirió con NsiI. El extremo NsiI es compatible con PstI, mientras que HincII es romo, por lo que se

requirió el rellenado de *Acc65I*. Se ligaron los fragmentos de aproximadamente 1 kb con el fragmento de 6322 pb del plásmido pMS83, obteniéndose así las construcciones pMS83-*StrepargR* y pMS83-*argRStrep*, que finalmente se introdujeron mediante conjugación en *S. coelicolor* $\Delta argR$, dando lugar a las cepas *S. coelicolor* $\Delta argR::pMS83-StrepargR$ y *S. coelicolor* $\Delta argR::pMS83-argRStrep$.

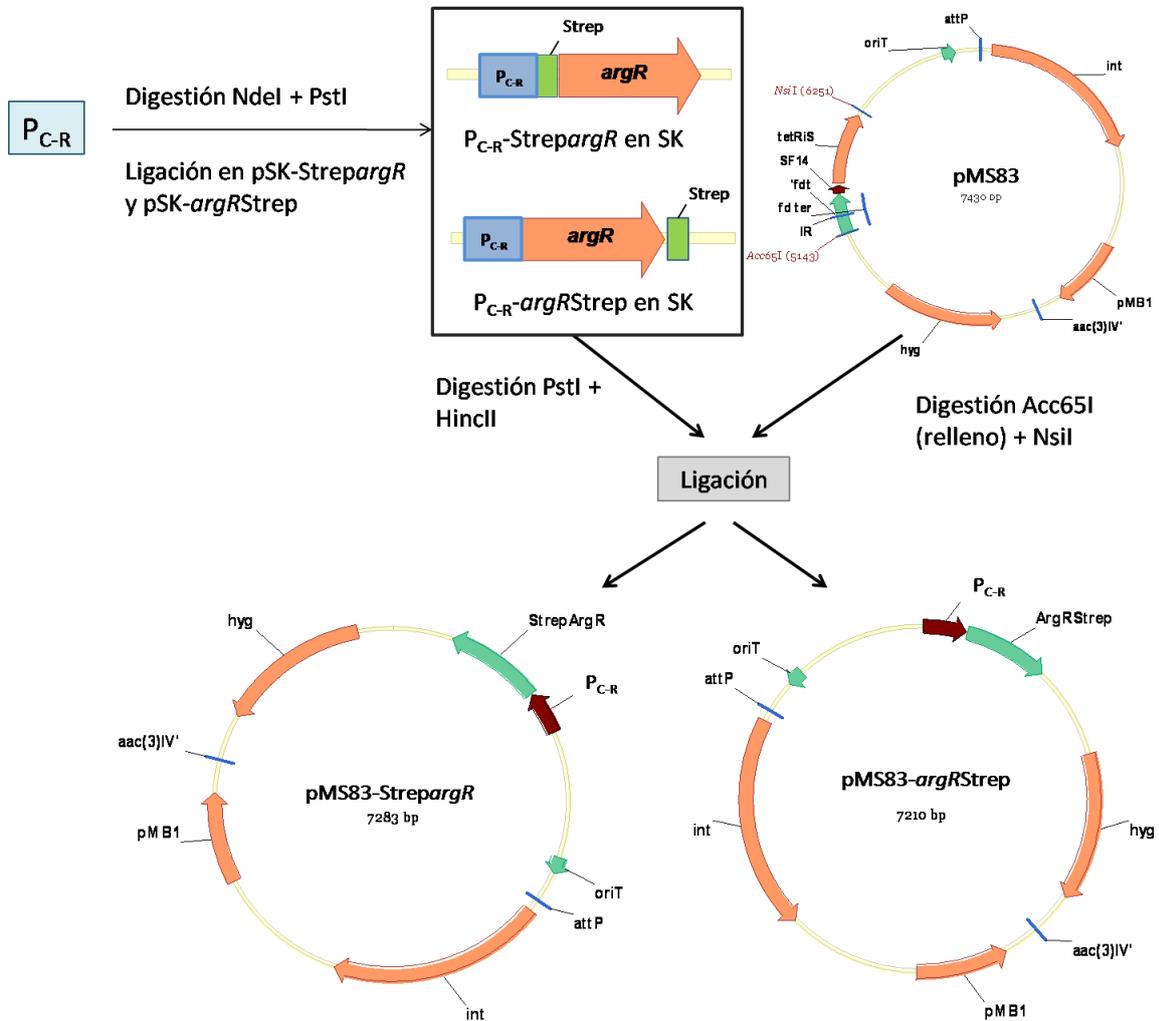


Fig. 4.58. Construcción de los plásmidos de complementación pMS83-*StrepargR* y pMS83-*argRStrep*.

4.2.2. Efecto de la complementación de *S. coelicolor* $\Delta argR$

Pérez-Redondo *et al.* (2012) vieron que *S. coelicolor* $\Delta argR$ produce un 20 % de undecilprodigiosina respecto a la cepa parental y pierde completamente la producción de actinorrodina. Como se puede observar en la fig. 4.59.a), la introducción del gen *argR* bajo el control del promotor P_{C-R} en *S. coelicolor* $\Delta argR::pMS83-StrepargR$ restaura la producción de los antibióticos pigmentados en las cepas resultantes (gráficos no mostrados), lo que demuestra que la delección de *argR* en *S. coelicolor* era la causante de la drástica disminución en la biosíntesis de antibióticos. Estos resultados hacen pensar que ArgR actúa como regulador pleiotrópico sobre la producción de antibióticos en *S. coelicolor*, posiblemente a través de la acción de ArgR sobre un regulador específico de la producción de antibióticos (apartado 4.1.8).

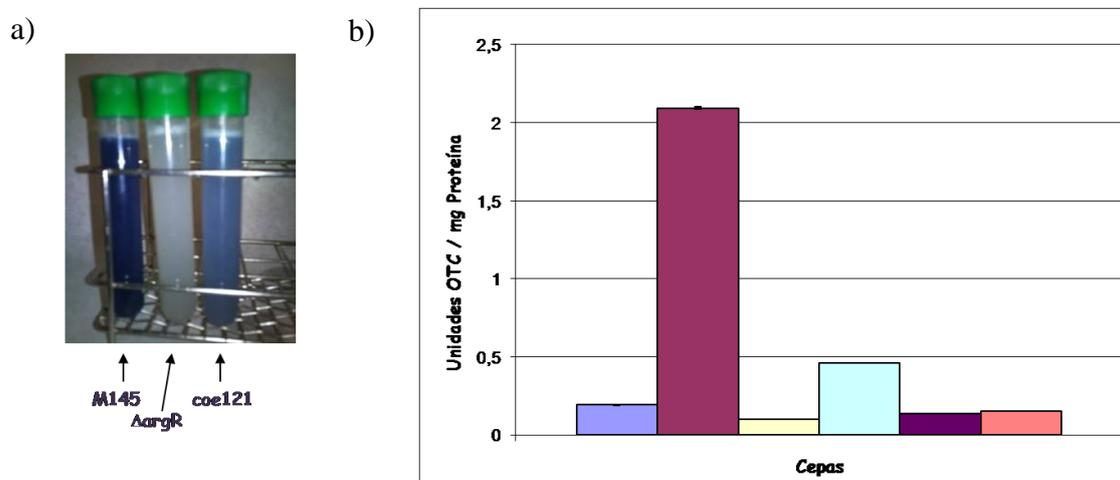


Fig. 4.59. Efecto de la complementación de la delección de *argR* en medio MG. a) Aspecto de los caldos de cultivo a las 70 horas de las cepas *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor* $\Delta argR$ y *S. coelicolor* $\Delta argR::pMS83-StrepargR$. b) Actividad OTC a las 48 horas de cultivo en las cepas *S. coelicolor* M145 (■), *S. coelicolor* $\Delta argR$ (■) y 4 clones de complementación, dos de *S. coelicolor* $\Delta argR::pMS83-StrepargR$ (■ y ■) y otros dos de *S. coelicolor* $\Delta argR::pMS83-argRStrep$ (■ y ■).

Con el fin de comparar los niveles de actividad ornitina carbamoiltransferasa (OTC, apartado 3.17.2) de las cepas control, delecionada y complementada, se llevaron a cabo fermentaciones en medio líquido MG. La enzima OTC está codificada por el gen *arcB* (*argF* en otros microorganismos), gen reprimido por ArgR. La cepa delecionada carece de represión, por lo que los niveles de actividad OTC son elevados. La introducción del gen *argR* restaura dicha actividad a niveles similares a los de la cepa control (fig. 4.59.b).

4.3. Expresión heteróloga y purificación a homogeneidad de ArgR

Las proteínas del tipo ArgR son reguladores transcripcionales por interacción con las cajas ARG situadas en los operadores de los promotores de los genes que controlan (Maas, 1994). A la vista de la importancia de la proteína reguladora ArgR en la producción de metabolitos secundarios en *S. coelicolor*, nos propusimos esclarecer si su modo de acción es directo, activando la transcripción de los genes biosintéticos de actinorrodina y undecilprodigiosina (tal y como correspondería a la actuación de un regulador específico de ruta), o bien si su influencia sobre la producción de estos antibióticos tiene lugar a un nivel superior en la jerarquía de la cascada regulatoria que gobierna su biosíntesis. Además, quisimos conocer otras dianas de la acción de ArgR. Con el fin de dilucidar estas cuestiones se decidió sobreexpresar de manera heteróloga la proteína ArgR en forma de una proteína de fusión en la que se presentase unida por sus extremos N o C-terminales (N_t o C_t) a la etiqueta Strep. Esta proteína recombinante puede purificarse a homogeneidad mediante cromatografía de afinidad para analizar su interacción con diferentes regiones promotoras.

4.3.1. Análisis informático de la secuencia de la proteína ArgR de *S. coelicolor*

El gen *argR* de *S. coelicolor*, anotado como SCO1576 en la base de datos <http://streptomyces.org.uk/>, codifica una proteína de 179 aa, 19,2 kDa de masa molecular y pI de 5,72. Para el modelado de la proteína ArgR de *S. coelicolor* (fig. 4.60) se utilizó el servidor SWISS-MODEL (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>). La estructura predicha por este programa coincide con la de las proteínas ArgR previamente cristalizadas, que la definen como una proteína formada por un extremo amino de estructura wHTH con tres hélices (Brennan, 1993) y un extremo carboxilo con cuatro hojas beta antiparalelas y dos hélices alfa antiparalelas. Estos dos dominios están separados por una zona de unión que actúa como bisagra. Las hélices α_2 y α_3 del extremo N_t forman el motivo HTH y las dos hojas β_1 y β_2 constituyen el ala. Las cadenas laterales de las hojas β_3 y β_4 forman el núcleo hidrofóbico que cohesionan tres polipéptidos para formar un trímero (Sunnerhagen *et al.*, 1997).

Las proteínas ArgR de distintos microorganismos son muy similares entre sí, en función y estructura: la mitad N_t del péptido es básica y la mitad C_t es ácida (apartado 1.5.6). A pesar de la relativa baja identidad de secuencia entre las distintas proteínas ArgR, existen zonas conservadas, que corresponden a las zonas específicas de unión al ADN y de oligomerización. En torno a la posición 60 de la secuencia aminoacídica de *S. coelicolor* se encuentran los residuos esenciales SR para la interacción con el ADN (excepto en *T. maritima*, cuyos residuos son AR) (Grandori *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 2011). Alrededor de la posición 150 se observa el motivo GTIAGDDTL/I de unión a arginina (Yim *et al.*, 2011).

<i>S. coelicolor</i>	NGG----	179
<i>S. clavuligerus</i>	NDRA----	178
<i>C. glutamicum</i>	-----	
<i>T. maritima</i>	-----	
<i>B. subtilis</i>	-----	
<i>G. stearothermophilus</i>	-----	
<i>S. suis</i>	PFFFSKL	157
<i>E. coli</i>	QEL----	156

Fig. 4.61. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de proteínas ArgR. Los residuos conservados en todas las secuencias aparecen representados con un asterisco bajo el alineamiento. Uno o dos puntos indican el menor o mayor grado de relación entre aminoácidos, según la matriz PAM250. En color rojo y sombreados en amarillo aparecen los residuos SR implicados en la interacción con el ADN. En azul se observa el motivo de unión a arginina.

4.3.2. Sobreexpresión heteróloga de la proteína GST-ArgR

En un estudio inicial la proteína ArgR se purificó por cromatografía de afinidad como proteína de fusión GST-ArgR. El tamaño esperado de la proteína de fusión GST-ArgR es de 47 kDa, que, sin embargo, en la electroforesis desnaturalizante es minoritaria (fig. 3.62.a). Para dilucidar la naturaleza de la banda de 47 kDa, esta fue cortada del gel y mediante MALDI-TOF se pudo comprobar que los péptidos derivados de su fragmentación procedían de las proteínas GST y ArgR, como se esperaría de una proteína de fusión que implicase a ambas. La banda de 20 kDa, también analizada, correspondía a la proteína ArgR. Esta señal, junto con la de 27 kDa, mayoritarias en cada una de las fracciones purificadas, podrían relacionarse con un procesamiento no esperado de la proteína de fusión.

Las fracciones resultantes de la purificación GST-ArgR se emplearon en experimentos de retrasos en gel con promotores diana de ArgR marcados con digoxigenina (fig 4.62.b). En todos los casos observamos dos bandas de retraso, lo que podría corresponder al retraso debido a la proteína de fusión GST-ArgR, y al provocado por la proteína ArgR fragmentada.

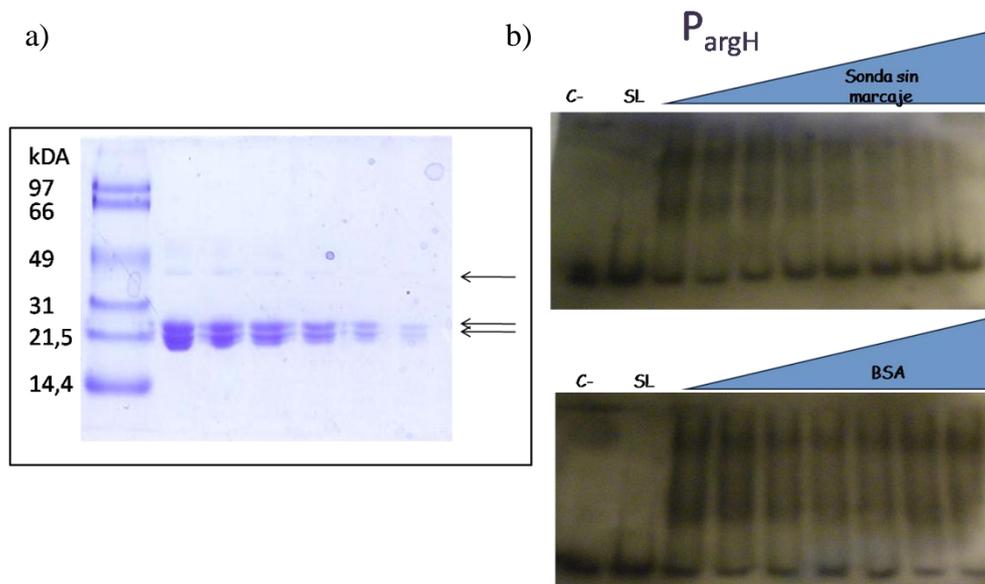


Fig. 4.62. Estudios con la proteína de fusión GST-ArgR. a) Análisis mediante SDS-PAGE de distintas fracciones de la purificación. Carril izquierdo, marcador de peso molecular, con el tamaño de cada banda indicado en kDa. Las flechas indican las bandas proteicas observadas. b) Ensayos de competición y especificidad del promotor del gen *argH* (P_{argH}). C-, reacción control con proteína GST. SL, sonda sin proteína. El resto de carriles muestran la movilidad electroforética de la sonda en presencia de $0,84 \mu\text{M}$ de GST-ArgR y concentraciones crecientes de sonda fría, arriba (hasta 100 veces más sonda sin marcaje que sonda marcada) o BSA, abajo (hasta 160 veces más BSA que GST-ArgR).

Se planteó la posibilidad de que la Glutacion-S-Transferasa, por su gran tamaño (27 kDa), interfiriese en la configuración tridimensional de la proteína ArgR y por tanto en la unión a los promotores, concretamente a las cajas ARG menos conservadas. Por ello, en primer lugar, se intentó digerir la proteína de fusión GST-ArgR con trombina, pero al no conseguir una buena eficiencia de digestión, y por tanto suficiente cantidad de proteína de interés, la decisión fue realizar un cambio de estrategia. Esta consistió en utilizar una etiqueta de menor tamaño y bioquímicamente inerte, de modo que no afectase a la configuración tridimensional de ArgR ni a su unión al ADN. Dicha etiqueta fue el péptido de 8 aminoácidos Strep II, cuya secuencia codificante se incorporó al extremo 5' o 3' del gen *argR* (apartado 3.18.1). Para simplificar, a partir de ahora hablaremos únicamente de la construcción que incorpora la etiqueta en el extremo 5' aunque ambas se realizaron y ensayaron en paralelo.

Una vez verificada la secuencia de pBluescript SK⁺-*StrepargR* (apartado 4.2.1), se digirió la construcción con las endonucleasas NdeI y HindIII, y el fragmento resultante se clonó en el plásmido pET24a(+) previamente digerido con las mismas enzimas, obteniéndose la construcción pET24a(+)-*StrepargR*, que se introdujo en la cepa de expresión *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS], obteniéndose la cepa *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] [pET24a(+)-*StrepargR*] y la paralela *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] [pET24a(+)-*argRStrep*], que se utilizaron para sobreexpresar de forma heteróloga ArgR como proteína de fusión.

4.3.3. Expresión y purificación de las proteínas StrepArgR y ArgRStrep

El principal problema vinculado a la sobreexpresión heteróloga de proteínas es la formación de cuerpos de inclusión, así que tras diversas pruebas de temperatura, agitación, medios de cultivo y concentraciones de IPTG, se emplearon las siguientes condiciones: en primer lugar, se cultivó un preinóculo de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] con el plásmido de expresión correspondiente durante toda la noche a 37 °C y 220 rpm. Al día siguiente, se refrescó el cultivo con un 1 % de este preinóculo, que creció en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,6 y 0,8, momento en que se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG 0,1 mM. A partir de entonces, el cultivo se mantuvo a 18 °C y 220 rpm durante 16-20 horas. En la fig. 4.63 se muestra la inducción de cuatro clones de *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] [pET24a(+)-*StrepargR*], observándose diferencias de inducción entre ellos.

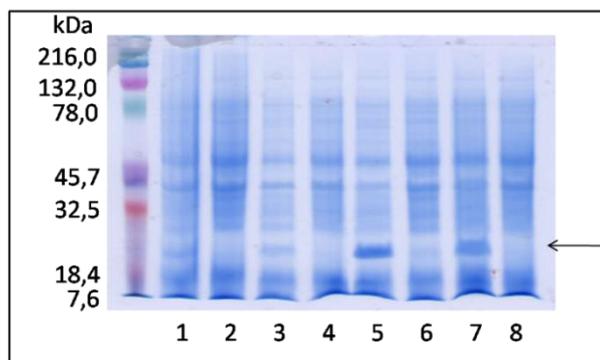


Fig. 4.63. Gel SDS-PAGE tras la inducción con IPTG de *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] [pET24a(+)-*StrepargR*]. A la izquierda, el marcador de peso molecular, con el tamaño de cada banda indicado en kDa. Los siguientes carriles corresponden a los cuatro clones ensayados, siendo los números impares los de muestras inducidas con IPTG 0,1 mM, y los pares sin inducir. La flecha señala la banda correspondiente a la proteína de fusión StrepArgR.

Una vez obtenido el extracto crudo de proteínas del cultivo, se purificó mediante cromatografía de afinidad, por interacción del péptido Strep con la Strep-tactina inmovilizada en la columna de sefarosa, con el fin de aislar la proteína de fusión del resto de especies proteicas existentes en el extracto. Se recogieron distintas fracciones durante la elución, una alícuota de las cuales fue sometida a electroforesis desnaturizante para verificar el tamaño y pureza de la proteína purificada.

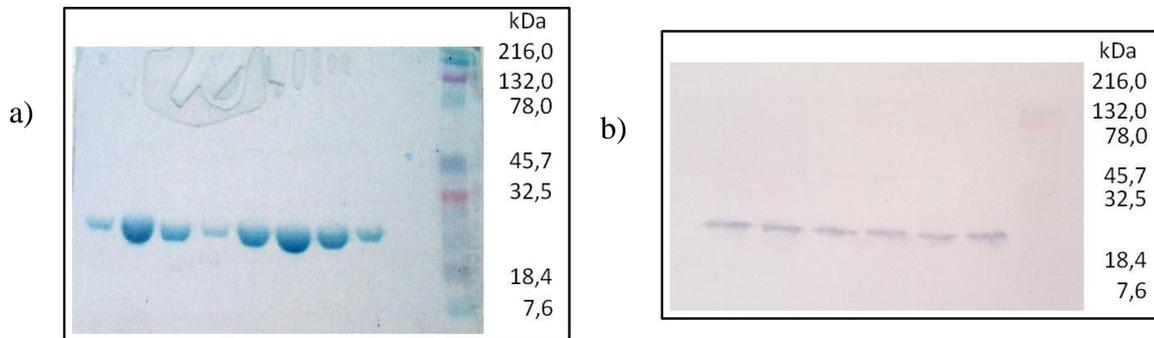


Fig. 4.64. a) Análisis mediante SDS-PAGE de 8 fracciones de la purificación de StrepArgR. Carril derecho, marcador de peso molecular. b) Western blot de 6 de las 8 fracciones de la purificación con anticuerpos anti-Strep.

Como se observa en la fig. 4.64.a, en la purificación se obtuvo una única banda, con movilidad electroforética de unos 21 kDa, que corresponde con lo esperado para la proteína de fusión StrepArgR, ya que el tamaño de la etiqueta Strep es de aproximadamente 1 kDa y el de ArgR de 19,2 kDa. Mientras que el rendimiento global del proceso de expresión y purificación fue de 10,5 mg de proteína GST-ArgR por cada 100 ml de cultivo inducido en el caso de la proteína StrepArgR fue de aproximadamente 2 mg por cada 100 ml de cultivo inducido. El rendimiento es unas 5 veces menor con la etiqueta Strep que con la GST, pero el resultado es una banda única de proteína. La inmunodetección de la proteína StrepArgR frente a anticuerpos monoclonales anti-Strep confirmó la afinidad que dichos anticuerpos presentan por la proteína de fusión (fig. 4.64.b).

4.4. Identificación de las regiones promotoras que actúan como dianas de ArgR

Las cajas ARG, como vimos en el apartado 1.5.6.2, se definen tradicionalmente como secuencias de 18 pb parcialmente palindrómicas localizadas en la región promotora de los genes regulados por ArgR (Cunin *et al.*, 1983; Maas, 1994; Makarova *et al.*, 2001). Se conocía la existencia de dos cajas ARG dispuestas en tándem y separadas por 2 nucleótidos en los promotores de los genes *argC* (Hindle *et al.*, 1994), *argG* (Rodríguez-García *et al.*, 1995), *argH* (Rodríguez-García *et al.*, 2000) y *arcB* (A. Rodríguez-García, comunicación personal) de *S. coelicolor*. Con las 8 secuencias de dichas cajas (considerando como unidad la secuencia de 18 nucleótidos) y sus complementarias se creó un alineamiento donde se observó que las posiciones de nucleótidos con menor variación eran las 4, 6, 13 y 15. A partir de este alineamiento se crearon las matrices v1 (versión 1) de frecuencia y de puntuación (Pérez-Redondo *et al.*, 2012).

En las matrices de puntuación se otorga un valor de contenido de información individual, R_i , cuya unidad es el bit, a cada una de las 4 bases para una posición concreta de la secuencia. Los valores R_i individuales pueden sumarse para obtener el R_i global de la secuencia. El valor R_i individual se relaciona con el grado de conservación de la posición nucleotídica y puede ser negativo o positivo. Por ejemplo, que en una posición dada de todas las secuencias del alineamiento haya siempre C otorgará a ese nucleótido el valor positivo máximo, mientras que una A, una T o una G tendrán un valor muy negativo si apareciesen en ese lugar, lo que repercutirá en el valor R_i de la secuencia candidata a caja ARG.

Con la matriz de puntuación v1 se rastreó el genoma de *S. coelicolor* mediante la herramienta informática *RSAT* (Regulatory Sequence Analysis Tools), poniendo como requisitos de búsqueda una secuencia de 38 nucleótidos, correspondientes a dos cajas ARG con 2 nucleótidos de separación (18+2+18 nt), una puntuación mínima R_i de 12,2 bits para al menos una de las cajas y con la otra conservada en las posiciones importantes (4, 6, 13 y 15). Estos parámetros resultaron ser muy restrictivos puesto que el motor de búsqueda sólo detectó 2 nuevas cajas por delante del gen SCO1086, que codifica una enzima con dominio transglutaminasa, quizá relacionada con el transporte y metabolismo de aminoácidos.

En función de los datos de Song *et al.* (2002), Charlier *et al.* (2004) y Garnett *et al.* (2008) se consideró que quizá fuese suficiente para la regulación una sola caja ARG o un rango no estricto de separación entre ellas y, por ello, en sucesivas búsquedas se fueron variando los valores de la separación entre cajas (de 1 a 4 bases) y/o los valores R_i de cada una de las cajas: por ejemplo, una conservada (mayor que 0 bit) y la otra conservada únicamente en las posiciones más importantes, etc. Así, se encontró una única caja de 10,4 bits en la región promotora *leuA*-SCO2529. Esta caja, junto con las del gen SCO1086 anteriormente descubierta y las de los promotores de los genes de biosíntesis de arginina, se integró en una nueva matriz v1.2 (fig. 4.65). En ella, una caja ARG estaría definida por un palíndromo imperfecto de 20 nucleótidos como resultado de extender la caja original de 18 nt uno más a cada lado (1+18+1).

El logotipo es la representación gráfica de la matriz de puntuación que ilustra la estructura del sitio de unión junto con la conservación de cada base para cada posición (el tamaño de la letra es proporcional a la frecuencia de la base que representa) y una cuantificación de su valor informativo expresado en bits (la altura de la fila de letras es la conservación en bits para esa posición). El logotipo de la secuencia de unión de ArgR (fig. 4.65.c) se obtuvo introduciendo el alineamiento de secuencias de la matriz v1.2 en la página <http://weblogo.berkeley.edu/>.

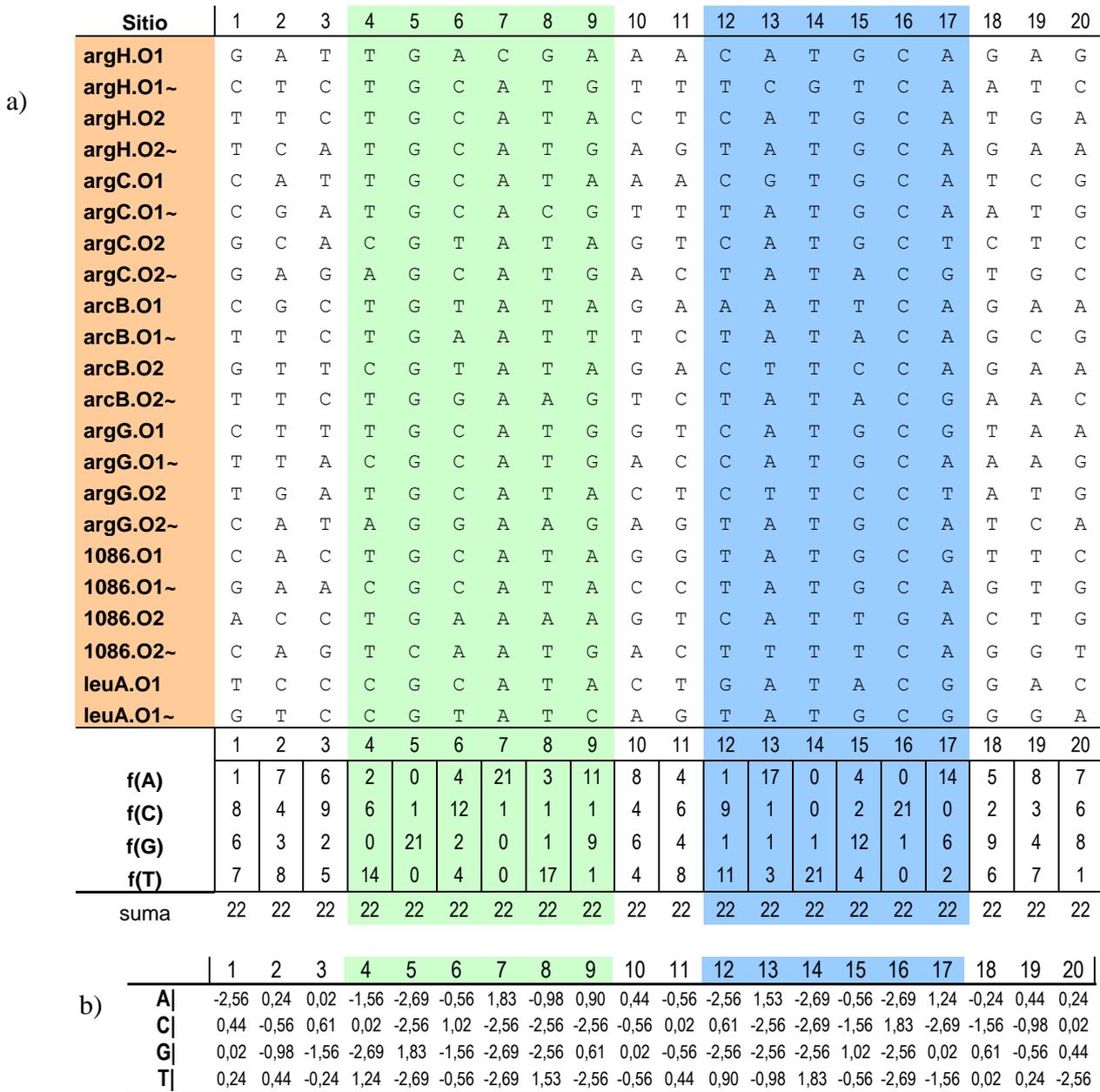


Fig. 4.65. Matriz v1.2. a) Alineamiento de las cajas ARG y sus complementarias (-) encontradas en los genes *argH*, *argC*, *arcB*, *argG*, *SCO1086* y *leuA-SCO2529*; y matriz de frecuencias, donde f(_) es el número de veces que aparece el nucleótido A, C, G o T en la posición correspondiente, y la suma el número de nt alineados. b) Matriz de puntuación obtenida a partir del alineamiento. c) Logotipo de la zona de unión al ADN reconocida por ArgR en *S. coelicolor* según la matriz v1.2. La línea sinusoidal representa la accesibilidad a una cara del ADN.

Con la matriz v1.2 se realizó una nueva búsqueda de posibles sitios de unión a ArgR, considerando que podrían estar definidos por 1 o más cajas ARG con un R_i mayor de 5 bits. De esta forma se localizaron 1583 candidatos que se examinaron manualmente considerando factores como la puntuación R_i de la caja o cajas (si había más de una); cuáles eran las posiciones nucleotídicas conservadas, la situación de la caja con respecto al inicio del gen (distancia al ATG no mayor de 100 nucleótidos), el que la caja precediese a un gen relacionado con el metabolismo de la arginina o a un gen que fuese transcripcionalmente regulado por ArgR, la función de dicho gen, etc. Cabe destacar que no todas las cajas seleccionadas, 45, cumplían todos los criterios considerados.

4.4.1. Puesta a punto de las condiciones para EMSA con StrepArgR y ArgRStrep

Con el fin de probar la funcionalidad de estos operadores se realizaron ensayos de retraso de movilidad electroforética (EMSA) en geles de poliacrilamida utilizando ambas versiones de la proteína ArgR fusionada a la etiqueta Strep y sondas de ADN marcadas con fluorescencia. El marcaje con fluorescencia 6-FAM no sólo mejoró visiblemente las imágenes obtenidas con respecto al empleo de sondas marcadas con digoxigenina (comparar fig. 4.62 con fig. 4.66), sino que disminuyó el tiempo empleado en cada ensayo.

Otros factores relacionados con la electroforesis fueron probados para mejorar la visualización de los resultados, como el aumento del porcentaje de la mezcla acrilamida:bisacrilamida (de 29:1 a 50:1). En la fig. 4.66 varios promotores que no mostraban retraso en una proporción 29:1 sí lo hicieron al aumentar el porcentaje de acrilamida:bisacrilamida (como en el caso de P_{pyk1}) o este retraso adquirió mayor definición (como en el caso de $P_{SCO1086}$).

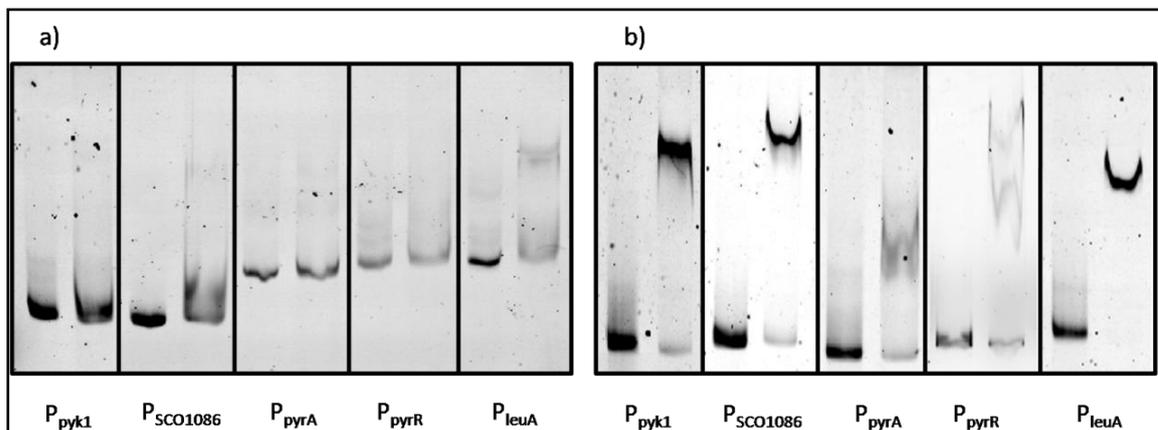


Fig. 4.66. Efecto de la concentración de la mezcla acrilamida:bisacrilamida en EMSA. a) Mezcla 29:1. b) Mezcla 50:1.

Como se expuso en la Introducción y detallaremos a continuación, la afinidad de unión por los operadores varía en función de la composición de nucleótidos de las cajas ARG y la distancia que las separa (ver apartado 1.5.6.1). La amplitud de la respuesta reguladora es función del grado de solapamiento con el promotor, de la presencia de otros factores de regulación y de la fuerza del promotor (Glansdorff, 1996; Charlier *et al.*, 1992; Tian *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1997).

Las proteínas StrepArgR y ArgRStrep se emplearon en los ensayos de retraso con iguales resultados, decantándose finalmente por la primera por la mayor concentración obtenida en el proceso de purificación. De las 45 sondas empleadas en los ensayos de retraso con posibles cajas ARG (anexo 6.3), un total de 29 dieron lugar a claras bandas retrasadas en presencia de la proteína StrepArgR (fig. 3.67 a 3.75. No se muestra el gen SCO5864) y 3 dieron resultados dudosos. Las regiones que contienen los promotores de los genes *ptr* (SCO2209), SCO1417-SCO1418, *absR1-absR2*, SCO6144-SCO6145, SCO3769, SCO1220, SCO0800 y SCO7303 presentan posibles cajas ARG de puntuación R_i entre 3,2 y 7,42 bits, pero a ellas no se observó unión de ArgR mediante las condiciones establecidas de retraso en gel.

Una vez obtenida la sonda marcada y realizado EMSA de los promotores señalados en el anexo 6.3, se estudiaron diferentes aspectos de la unión de StrepArgR a sus dianas moleculares, con el fin de verificar que las interacciones observadas se correspondían con uniones específicas y reales, y no con artefactos derivados de la unión inespecífica de ArgR con la sonda de ADN. Estas comprobaciones resultan imprescindibles durante la caracterización de la unión de una proteína al ADN y se fundamentan en dos tipos de pruebas: la de competición y la de especificidad.

La prueba de competición consiste en añadir a la reacción de unión un exceso de otra proteína, en este caso seroalbúmina bovina (BSA), para comprobar que la unión del ADN es específica, en este caso, para StrepArgR y que no aparece ninguna otra banda de retraso en los carriles en los que se añade exceso de proteína BSA.

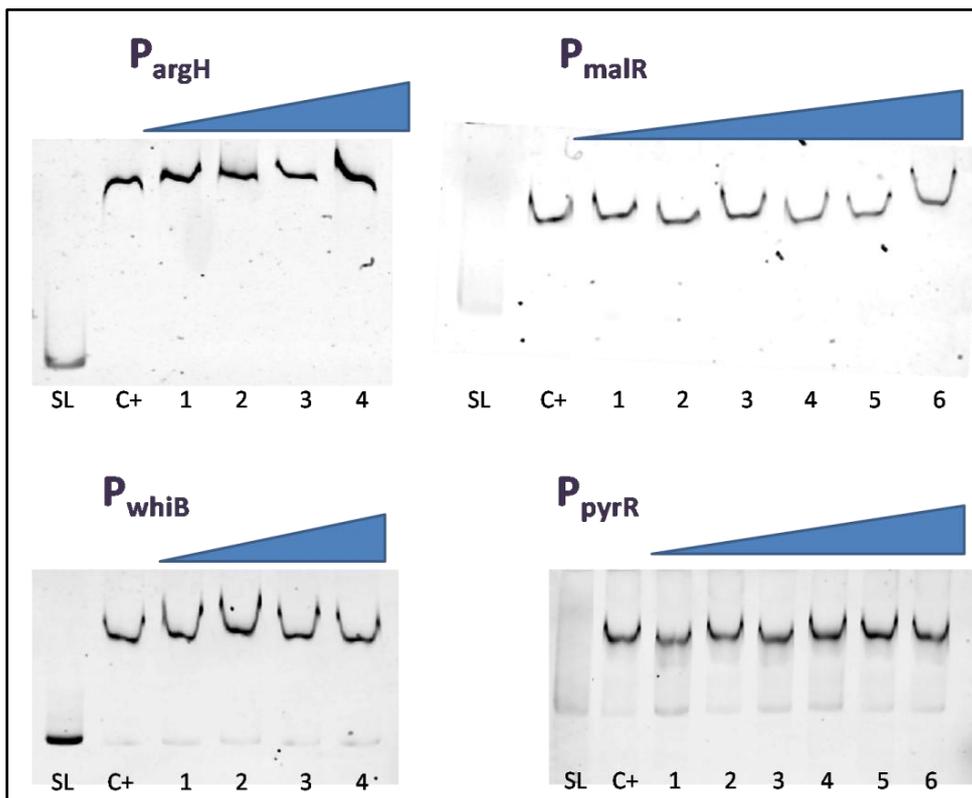


Fig. 4.67. Ensayos EMSA de competición con BSA. SL, sonda libre, C+, sonda retardada con $0,84 \mu\text{M}$ de StrepArgR, e indicado por el triángulo superior y por la numeración 1-6, concentraciones crecientes entre 1X y 160X de BSA respecto a la proteína de fusión. En ningún caso el retraso desaparece o varía.

La prueba de especificidad hace referencia a la desaparición de la señal producida por la unión ADN-proteína cuando una molécula de ADN no marcada o fría se añade a la reacción de unión. La sonda competidora fría es idéntica en secuencia nucleotídica a la sonda marcada, con lo que se espera que la proteína se una a ella con la misma afinidad y conduzca a la progresiva desaparición de las bandas retrasadas a medida que se incremente la concentración de sonda competidora. La cantidad de sonda fría necesaria para hacer desaparecer el retraso es distinta para cada sonda, por la menor o mayor afinidad de unión de StrepArgR. La sonda sin marcar se obtuvo mediante PCR utilizando cebadores universales sin marcaje en sus extremos 5'.

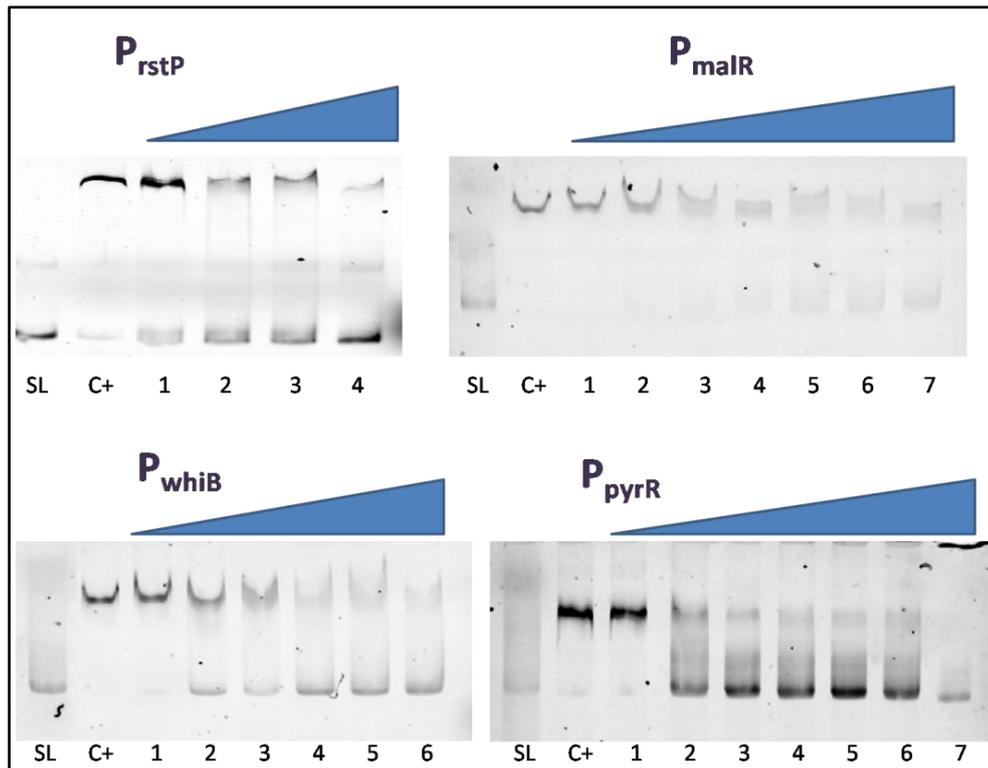


Fig. 4.68. Especificidad de la unión de la proteína StrepArgR a distintas sondas, utilizando sonda fría del mismo promotor. SL, sonda libre, C+, sonda retardada con 0,84 μ M de StrepArgR y, indicado por el triángulo superior y numerado de 1 a 7, concentraciones crecientes de sonda fría respecto de la marcada que van desde 0,5X a 100X.

Los resultados de ambas pruebas para algunas de las sondas estudiadas se muestran en las figuras 4.67 y 4.68, y demuestran que la interacción observada entre la proteína StrepArgR y las sondas ensayadas responde a una unión basada en la secuencia específica del ADN.

Se comprobó la importancia de L-arginina como cofactor para la unión de ArgR a dos dianas-promotor, la de *argH*, con dos cajas contiguas de 17,3 y 7,7 bits, y la de *argR*, con únicamente media caja ARG, y por tanto baja puntuación (0,9 bits). En la fig. 4.69 se observa cómo, en el caso del P_{argH} , la ausencia de arginina hace que no toda la sonda se retrase (carril 4). Sin embargo, en el P_{argR} , cuya unión es más débil (no toda la sonda es retrasada), la ausencia de L-arginina en la reacción de unión provoca que el retraso desaparezca (carril 3). Por tanto concluimos, por una parte, que este aminoácido es importante para la acción de ArgR en las reacciones de unión débiles o en aquellas reacciones en las que la concentración de la proteína sea crítica, situación posiblemente más parecida a la real; y por otra parte, que la unión a cajas de menor puntuación necesita mayor concentración de proteína ArgR.

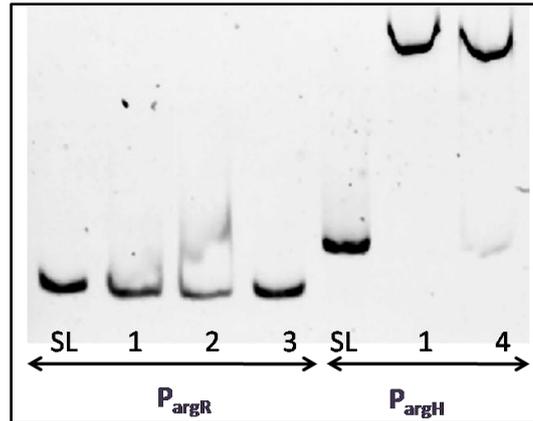


Fig. 4.69. Ensayos de unión para los promotores de *argR* y *argH*. SL, sonda libre; 1, sonda con 0,84 μM de StrepArgR; 2, sonda con 1,68 μM de StrepArgR; 3, sonda con 1,68 μM de StrepArgR, sin L-arginina en el tampón de reacción; 4, sonda con 0,84 μM de StrepArgR, sin L-arginina en el tampón de reacción.

No en todos los casos en que una sonda fue retardada por ArgR se observó un efecto en el patrón de transcripción del gen presuntamente regulado a través de los experimentos de micromatrices que comparan el transcriptoma de *S. coelicolor* M145 con el de *S. coelicolor* $\Delta argR$ (apartados 4.1.2 a 4.1.12). Esto probablemente es debido a que los EMSA son experimentos *in vitro* (en condiciones controladas y con una única proteína) comparados con resultados *in vivo* que son producto de una compleja interacción en la que se desconocen muchos factores. En un EMSA se muestra la unión directa de ArgR a una secuencia determinada mientras que un patrón de expresión alterado por *argR* puede serlo por un efecto directo de la proteína o indirecto por una proteína intermediaria o una cascada o interacción reguladora. Veremos el caso concreto de los promotores de *amtB* y *glnA*, a los que se unen al menos tres reguladores transcripcionales: GlnR, PhoP y ArgR. Además los datos de micromatrices corresponden a una condición concreta (tiempo, medio de cultivo, etc.) que quizás no sea apropiada para observar la acción de ArgR. Desde esta perspectiva hubiese sido interesante repetir estos EMSA añadiendo caldos de cultivo de *S. coelicolor* para ver si algún factor (proteico o no) desplaza o impide la unión de ArgR a sus dianas.

4.4.2. Interacción de ArgR con genes del metabolismo de nitrógeno

La agrupación para el transporte de amonio y su metabolismo comprende los genes *amtB*, *glnK* y *glnD*. Los análisis transcriptómicos muestran mayor nivel de expresión en *S. coelicolor* M145 respecto de *S. coelicolor* $\Delta argR$ de todos ellos a las 32 y 66 horas (apartado 4.1.4). Este patrón transcripcional, de ser directamente debido a ArgR, indicaría que esta proteína es un activador del operón, por lo que fue uno de los candidatos analizados en la búsqueda de cajas ARG. A 234 nucleótidos del inicio del gen *amtB*, el primero de la agrupación, se encontró una caja ARG con un R_i de 8,3 bits, que muestra unión directa a ArgR *in vitro* (sonda P_{amtB} en fig. 4.70). Como se muestra en la fig. 4.71, el promotor de *amtB* es un lugar de interacción para otros dos reguladores transcripcionales, GlnR y PhoP (Sola-Landa *et al.*, 2013). Además, de esa agrupación se analizó por RT-PCR la transcripción del gen *glnK* resultando en mayores niveles de transcrito en la cepa parental que en la mutante (apartado 4.1.4).

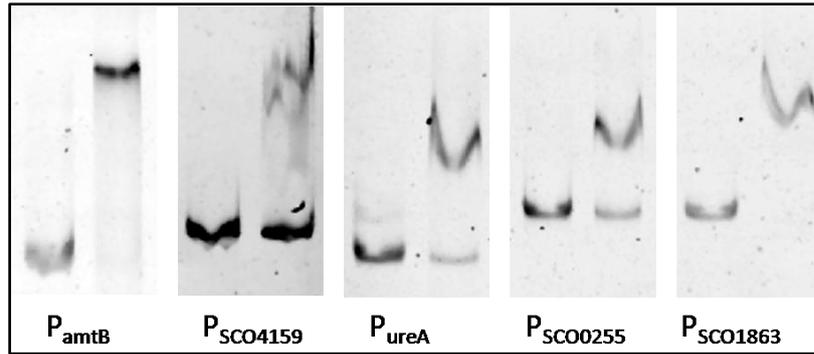


Fig. 4.70. Ensayos de retraso de los genes del metabolismo del nitrógeno. En todos los casos, el carril izquierdo muestra la movilidad electroforética de la sonda indicada en ausencia de proteína, mientras que el carril derecho muestra esa movilidad en presencia de una concentración de StrepArgR de 0,84 μ M.

En el extremo 3' del gen *glnR* (SCO4159) se encontró una posible caja ARG de 7,39 bits, a la que hemos visto que se une ArgR (sonda P_{SCO4159} en fig. 4.70), y que podría regular el gen posterior, SCO4158, que codifica una proteína reguladora de la familia LacI que estimula la producción de antibióticos pigmentados en *S. coelicolor* y *S. lividans* (Meng *et al.*, 2012). Los experimentos de micromatrices a las 32 horas no permiten apreciar diferencias entre cepas, mientras que los de la serie temporal (apartado 4.1.4) muestran un pequeño efecto activador de ArgR sobre este gen, pero ningún efecto regulador sobre *glnR* o *glnRII*. Parece por tanto que la regulación positiva ejercida por ArgR sobre los genes del metabolismo del nitrógeno no está mediada por GlnR o GlnRII.

El promotor situado antes de la agrupación de la ureasa *ureABCF* (SCO1236-SCO1233), contiene dos posibles cajas ARG de R_i 7,5 y 3,1 bits, con 7 nucleótidos de separación, a 182 pb de distancia del inicio de traducción del primer gen, *ureA*. Los experimentos *in vitro* permiten observar la unión de ArgR a dicho promotor (fig. 4.70, P_{ureA}). Las micromatrices de la serie temporal no muestran diferencias significativas entre cepas control y mutante $\Delta argR$, salvo a tiempos tardíos, donde los resultados no son estadísticamente significativos, pero el comportamiento de todo el operón sugiere una regulación por parte de ArgR.

Conocer el papel de ArgR sobre el promotor de *ureA* y su relación reguladora con las otras dos proteínas, PhoP y GlnR, requeriría estudios adicionales.

```

CGGCCGGCCCTCCCGAACTGCCGACTCGGCTCCCCCATGCCAGGTCATTCGGAGGCCGCCGCGG
CCGGCTTGCGTTCCGGGCCGGACGGCCCCGGGCACGACGACGACCGGCCCGGCCGTTTACCCACG
CGTAACACGCACCGTGCCTTCGTCACGGCGGCGAAACAACGAGGGGCTTCCACCGAAACCGCGGT
GCGTCAATGTGCTGGCGCATAACCGGCCCACCCCTCACCGCCCGCCAGGCTTCGCCCCAC
GGGGCCGCACCAACGACGAGGAGACGCCGATG

```

Fig. 4.71. Región promotora del gen *amtB*. Encuadrado en amarillo se representan dos cajas ARG, en verde tres cajas Pho (Pho DRus) y en azul cuatro cajas GlnR (adaptado de Sola-Landa *et al.*, 2013). Resaltado en rojo, el ATG inicial de *amtB*, y en negrita y subrayado, los 4 posibles inicios de transcripción según Sola-Landa *et al.* (2013).

4.4.3. Interacción de ArgR con genes de metabolismo de aminoácidos

El efecto regulador de ArgR sobre los genes de biosíntesis de arginina es de sobra conocido. Ya en el apartado 4.1.2 se explicó la presencia de cajas ARG en los promotores de los genes *argH* (de puntuaciones 17,3 y 7,7 bits sin separación entre cajas), *argG* (Ri 8,1 y 17 bits, adyacentes), *arcB* (de 10,9 y 9,5 bits solapando en 1 nucleótido) y de la agrupación *argCJBDR*, (3 cajas por delante de *argC* de 12,1, 9,4 y 6,1 bits, las dos primeras sin separación entre ellas, y la tercera a 44 nucleótidos de distancia). En todos ellos se ha demostrado la unión de ArgR *in vitro* (fig. 4.72) y el incremento de su transcripción en ausencia de *argR* (ver apartado 4.1.2) lo que prueba el efecto represor de ArgR sobre los genes implicados en la biosíntesis de arginina.

Nos planteamos si ArgR regularía su propia expresión. La búsqueda bioinformática no encontró mejor candidato a caja ARG que una posible media caja con Ri de 0,9 bits situada a 48 pb del inicio de traducción de *argR*. Como se ve en la fig. 4.69, el doble de ArgR que lo utilizado en el resto de ensayos de unión es capaz de unir P_{argR} . Al ser esta unión tan débil creemos que la mayor parte de la transcripción de *argR* procede del policistrón que comienza en *argC*, existiendo además una expresión minoritaria y constitutiva de *argR*.

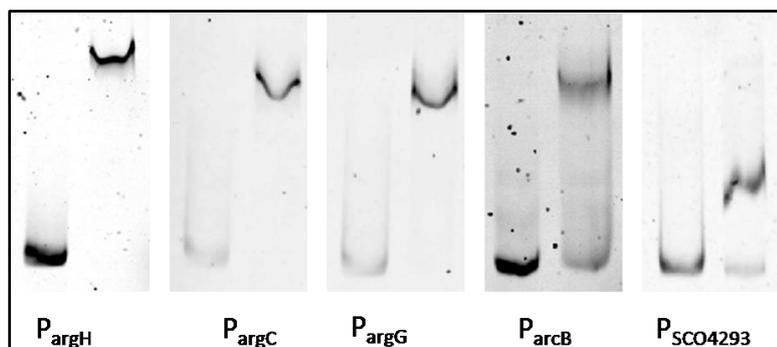


Fig. 4.72. Ensayos de retraso de los genes del metabolismo del aminoácidos. En el carril izquierdo se muestra la movilidad electroforética de la sonda indicada en ausencia de proteína, mientras que el carril derecho muestra esa movilidad en presencia de una concentración de StrepArgR de 0,84 μ M.

Otra región de transcripción divergente la encontramos entre el gen SCO4292, de función desconocida, y la agrupación SCO4293-SCO4294, implicada en la biosíntesis de treonina. En ella hay una posible caja ARG de 9,3 bits, la mitad de la cual se encuentra en la secuencia codificante del gen SCO4293. La sonda que incluye dicha caja ($P_{SCO4293}$ en la fig. 4.72) es diana de ArgR. Las micromatrices indican una leve acción represora sobre los genes SCO4293 y SCO4294.

4.4.4. Interacción de ArgR con genes de biosíntesis de purinas y pirimidinas

Se han encontrado dos cajas ARG de Ri 4,6 y 6 bits separadas por 3 nt en la región anterior al operón *nrdABS*, que codifican la ribonucleótido difosfato reductasa y la proteína reguladora de la transcripción implicadas en el metabolismo de purinas y pirimidinas. Borovok *et al.* (2006) han demostrado que la coenzima B12 controla la transcripción del operón *nrdABS* a través de su unión a la región 5' del ARN mensajero en la secuencia conocida como “interruptor” (*riboswitch*). La caja ARG de 6 bits solapa ligeramente (en 3 nt) con la secuencia que originará en el ARNm el tallo de esta estructura secundaria,

mientras que la de 4,6 bits está en lo que será el lazo central (fig. 4.73). Los genes *nrdABS* están afectados por la ausencia de *argR*, según las micromatrices (apartado 4.1.3), únicamente a las 32 horas de cultivo, y su región promotora muestra unión a ArgR *in vitro* (fig. 4.74). Estos resultados indican que existe un efecto represor de ArgR sobre los genes *nrdABS* y añaden un mecanismo regulatorio en su expresión.

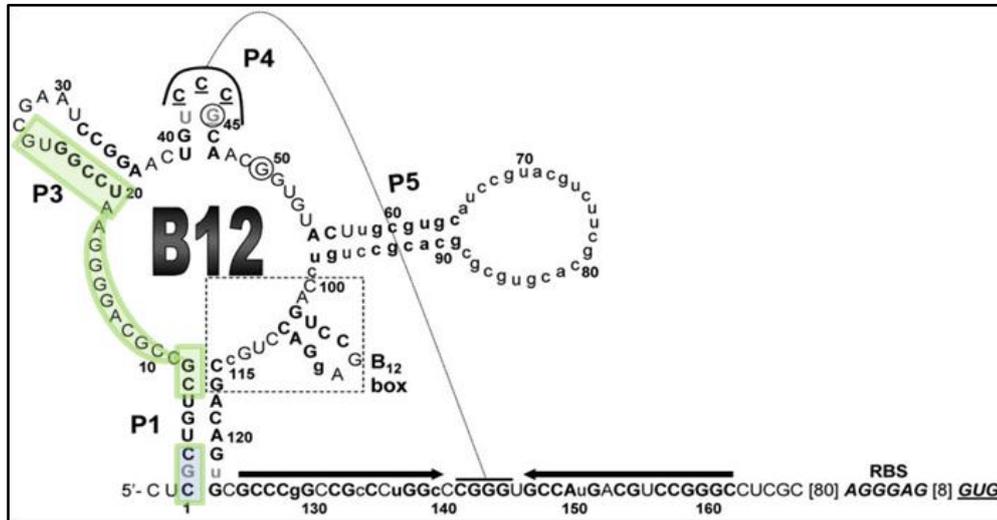


Fig. 4.73. Secuencia del ARNm que conforma el riboswitch según Borovok *et al.* (2006). En sombreado se indican los nt que forman en el ADN las cajas ARG de 6 bits, en azul (solo se muestran 3 nt de esta caja), y 4,6 bits, en verde.

La agrupación de biosíntesis de pirimidinas comprende los genes *pyrRBC-SCO1485-pyrAaADF* (SCO1488-SCO1481), que se transcriben juntos, siendo *pyrR* el gen que codifica el regulador. La proteína bifuncional PyrR es la encargada de regular la transcripción del operón de las pirimidinas en respuesta a pirimidinas exógenas. Turnbough y Switzer (2008) presentan un resumen de la regulación de la agrupación biosintética de pirimidinas en bacterias. Todos los genes de la agrupación *pyr* están desreprimidos en *S. coelicolor* $\Delta argR$ respecto a *S. coelicolor* M145, en ambas micromatrices (fig. 4.10 y 4.12). La RT-PCR de *pyrR* y *pyrA* muestra mayor nivel de transcrito en la cepa mutante $\Delta argR$ (fig. 4.10.b), y los resultados de acoplamiento del promotor de *pyrR* a los genes *luxAB* indican una actividad lucifera mayor en la cepa mutante respecto a la parental (fig. 4.11).

Se han encontrado dos cajas ARG en la región de transcripción bidireccional que media entre *pyrR* y *bldD*, donde *bldD* codifica el regulador transcripcional BldD, con un R_i de 7,7 y 5,1 bits, y una separación entre ellas de más de 200 nucleótidos. Además, hay cajas ARG en los genes de biosíntesis *pyrA* (R_i total de 1,8 bits: media caja es de 6,1 bits, y en la otra mitad las 2 posiciones importantes están conservadas) y *pyrB* (R_i de 7,1 bits). Todas ellas unen ArgR *in vitro* (sondas P_{pyrA} , P_{pyrB} y P_{pyrR} en fig. 4.74). Las dos cajas ARG presentes en la región intergénica entre *pyrR* y *bldD*, separadas 200 nucleótidos, parecen controlar los genes *pyrR* y *bldD* ya que la sonda P_{pyrR} origina dos retrasos de diferente movilidad (fig. 4.74). Esta doble banda de retraso se explica por la presencia de dos cajas tan distantes. Los datos de transcriptómica muestran regulación de *pyrR* y *bldD* por parte de ArgR, lo cual apoya la existencia de las dos cajas y, por tanto, de los dos complejos ADN-proteína de distinta movilidad.

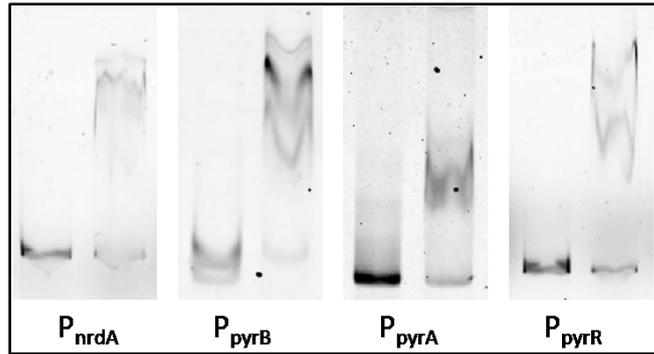


Fig. 4.74. Ensayos de retraso de los genes de biosíntesis de purinas y pirimidinas. En todos los casos, el carril izquierdo muestra la movilidad electroforética de la sonda indicada en ausencia de proteína, mientras que el carril derecho muestra esa movilidad en presencia de una concentración de StrepArgR de 0,84 μ M.

4.4.5. Interacción de ArgR con reguladores, factores sigma y anti-sigma

Los resultados de micromatrices revelan que existe un gran número de reguladores regulados a su vez por ArgR, con lo que no es extraño que la predicción informática sitúe posibles cajas ARG en los promotores de un elevado número de reguladores y factores sigma. En los estudios de análisis funcional de teóricas cajas ARG mediante EMSA 18 de las sondas ensayadas corresponden a factores transcripcionales, de los cuales 10 resultaron ser retardadas por ArgR. El efecto en la expresión de estos genes no siempre tiene significación estadística, pero en esos casos su perfil transcripcional suele ser característico o coincidente con el de genes adyacentes, lo que nos llevó a incluir a genes de transcripción no estadísticamente significativa en nuestros análisis.

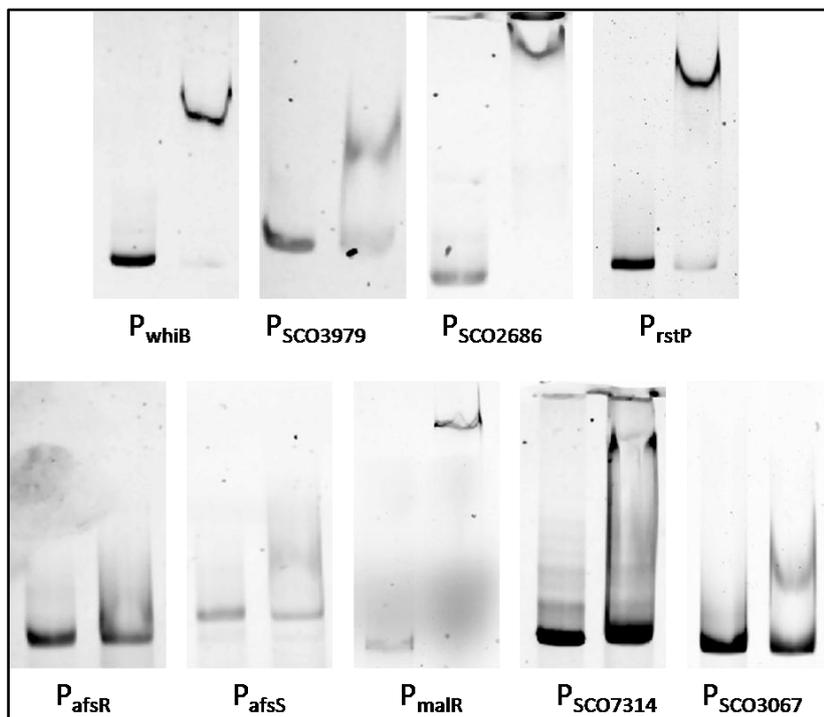


Fig. 4.75. Ensayos de retraso de los genes de biosíntesis de reguladores, factores sigma y antisigma. En todos los casos, el carril izquierdo muestra la movilidad electroforética de la sonda indicada en ausencia de proteína, mientras que el carril derecho muestra esa movilidad en presencia de una concentración de StrepArgR de 0,84 μ M.

El gen *whiB*, que codifica un regulador de la esporulación (Davis y Chater, 1992), no es un gen estadísticamente significativo (GES) en las micromatrices de la serie temporal. Sí fue un GES en el primer experimento, por lo cual se consideró para su estudio. El análisis por RT-PCR muestra diferencias de expresión entre cepas (apartado 4.1.7). Además, por delante del gen *whiB* existe una caja ARG de R_i 6 bits a la que se une ArgR *in vitro* (P_{whiB} en fig. 4.75).

El gen SCO3979 codifica un posible regulador transcripcional de la familia TetR, cuya región promotora, de transcripción divergente para SCO3978-SCO3979, tiene una caja ARG de R_i 10 bits a la que se une ArgR *in vitro* (sonda $P_{SCO3979}$ en fig. 4.75). Los resultados de las micromatrices indican que no es GES. Lo mismo ocurre con los genes SCO2686-*ribA1* (promotor con caja de R_i 12,79 bits) y *rstP* que codifica un posible regulador transcripcional (promotor con caja de R_i 9 bits), que sin tener diferencias de transcripción estadísticamente significativas entre cepas con y sin *argR in vivo*, sus regiones promotoras muestran unión a ArgR *in vitro* (sondas $P_{SCO2686}$ y P_{rstP} en fig. 4.75).

El gen *afsR* codifica una proteína reguladora de tipo SARP implicada en la regulación de la producción de antibióticos. Santos-Beneit *et al.* (2012) demuestran que esta proteína regula, de forma coordinada con PhoP, la expresión de genes como *glnR*, de control del metabolismo del nitrógeno, o *afsS*, que codifica un factor sigma que actúa como activador de varios reguladores específicos de ruta como *actII-ORF4* y *redD* en *S. coelicolor* (Santos-Beneit *et al.*, 2011). Nuestros resultados transcriptómicos indican que *afsR* no es un GES pero sí lo es *afsS* (apartado 4.1.11). La búsqueda informática predijo la existencia de posibles medias cajas ARG en la región promotora de *afsR* y *afsS* (R_i de las medias cajas de *afsR*, de 5,6 y 5 bits; de *afsS*, 2,9 bits). En ambos casos los ensayos indican un débil retardo provocado por la unión ADN-proteína (sondas no completamente retardadas P_{afsR} y P_{afsS} en fig. 4.75). Esto parece indicar que ArgR también interviene en la regulación de la expresión de *afsR* y *afsS*. Una vez más queda patente la intrincada red de regulación en *S. coelicolor*.

La existencia de dos cajas ARG de R_i 9,3 y 8,6 bits, separadas por 94 pb, en la región intergénica bidireccional de los genes *malR* y *malEFG*, podría ser un caso similar al del promotor de *pyrR* ya analizado, en el que cada caja gobierna la transcripción de un gen o agrupación génica. Todos los genes citados, *malR* (regulador transcripcional), *malE*, *malF* y *malG*, están relacionados con el metabolismo de la maltosa y muestran diferencias de expresión en el primer y último tiempo del experimento de la serie temporal. Sin embargo, el EMSA sólo permite diferenciar una banda de retraso (sonda P_{malR} en fig. 4.75), probablemente porque una de las cajas no es funcional o porque tiene menor afinidad por ArgR, a pesar de ser cajas con elevado R_i . Entonces, la hipótesis más lógica sería que ArgR regula directamente la expresión de *malR*, y a través de este regula indirectamente el resto de genes *mal*.

Otros factores sigma o anti-sigma en los que se ha demostrado unión de ArgR *in vitro* a su región promotora son SCO7314 y SCO3067-*sig15* (sondas $P_{SCO7314}$ y $P_{SCO3067}$ en fig. 4.75). El primero, que codifica un factor sigma de la ARN polimerasa, y cuya expresión es diferencialmente significativa, posee en su promotor una caja ARG con un R_i de 7,5 bits. La región intergénica entre SCO3067 (que codifica un posible factor anti-anti-sigma) y *sig15* (SCO3068, que codifica un posible factor sigma de la ARN polimerasa) contiene una caja de 5,24 bits, pero ninguno de los genes situados a ambos lados del promotor es GES, ni SCO3067, ni *sig15*.

4.4.6. Interacción de ArgR con el metabolismo secundario

Dado que la interrupción/delección de *argR* resulta drástica en la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina, uno de nuestros supuestos era que la proteína ArgR controlase transcripcionalmente los reguladores o genes de biosíntesis implicados. Los resultados de micromatrices para estos genes a las 32 horas de cultivo no mostraban diferencias entre las cepas, probablemente debido a que este tiempo es temprano para su expresión. Sin embargo, en la serie temporal (apartado 4.1.8), la comparación de los transcritos pertenecientes a estas agrupaciones muestra un patrón de expresión característico, con mayores niveles de transcrito en la cepa M145 (fig. 4.36 y 4.37). Por ello buscamos cajas ARG mediante la matriz de puntuación v1.2 y la herramienta informática RSAT. Además de la posible caja del gen SCO5878 (posterior al que codifica el regulador específico de ruta *redD*) de puntuación 3,9 bits en el que no observamos retardo de la sonda, se encontraron otras dos secuencias candidatas a cajas ARG en la agrupación de la undecilprodigiosina, de *Ri* 6,21 y 9,2 bits, pero ninguna de ellas se localiza en la región operadora de los genes reguladores *redD* o *redZ*. No se llegó a analizar si existe unión directa de ArgR a estas cajas *in vitro*. En la agrupación de la actinorrodina hay una posible zona de unión a ArgR, de 6,49 bits, pero, al igual que en el caso anterior, no se encuentra en el promotor de un gen regulador o en el principio de un policistrón. Por ello se podría concluir que el efecto de la ausencia de ArgR sobre el metabolismo secundario (a falta de saber si existe o no unión a esas posibles cajas, y aunque la hubiera), es un efecto indirecto. En tal sentido es importante que ArgR afecta la expresión de genes que controlan la diferenciación del metabolismo secundario, como puede ser *afsS*, pero también de *scbR* y *scbA*.

Los reguladores específicos de ruta *actII-ORF4*, *redD* o *redZ* están controlados transcripcionalmente por distintas proteínas reguladoras (Liu *et al.*, 2013). Algunos de los genes que las codifican están afectados por la ausencia de *argR* (apartado 4.1.8), Además, conocemos la existencia de posibles cajas ARG en algunos de sus operadores, como la media caja de *afsS* con unión a ArgR y una posible caja ARG situada aproximadamente en el centro de la secuencia codificante de *relA* de *Ri* 7 bits. De modo que la cuestión ¿sobre qué regulador/es del metabolismo secundario ejerce su efecto ArgR? permanece sin resolver.

4.4.7. Interacción de ArgR con otras regiones reguladoras

Se han encontrado dos cajas ARG adyacentes de *Ri* 17 y 3,4 bits en el gen SCO1086, de la familia de transglutaminasas, y que podría estar relacionado con metabolismo de aminoácidos ($P_{SCO1086}$ en la fig. 4.76). Su patrón transcriptómico es el mismo que el de los genes de metabolismo de arginina.

En la región de transcripción divergente entre *pykI* y SCO2015 se ha encontrado una caja ARG, con *Ri* de 8,2 bits, la cual une ArgR. Estos genes codifican una piruvato quinasa y una posible fosfodiesterasa.

La región intergénica presente entre el gen *leuA*, de metabolismo de leucina, y el gen SCO2529, que codifica una posible metaloproteasa, contiene una caja ARG con un *Ri* de 10,4 bits, situada a 199 pb del inicio de *leuA* y 143 pb de SCO2529. Esta caja es diana de unión a ArgR como indica la fig. 4.76 para la sonda llamada $P_{SCO2529}$. Las micromatrices no evidencian una regulación clara de la transcripción del gen *leuA*, mientras que la expresión del gen SCO2529 es claramente mayor en *S. coelicolor* $\Delta argR$ que en la cepa parental. Parece por tanto que el gen cuya transcripción regula ArgR, reprimiéndola, es SCO2529.

Las micromatrices no revelan resultados estadísticamente significativos en los transcritos de la agrupación *hisDCBHAF* implicada en la síntesis de histidinas (Limauro *et al.*, 1992), pero sí en SCO2055, de transcripción divergente. Se ha observado un claro retraso de la región intergénica SCO2055-*hisD*, sonda P_{SCO2055}, que contiene cajas de puntuaciones 4,4 y 5,7 bits, donde existe además protección frente a DNasa I (apartado 4.4.8). El que no se haya observado efecto *in vivo* pero sí *in vitro*, implica que ArgR tiene un sitio de unión en el promotor de la agrupación génica de este aminoácido pero que las condiciones experimentales no revelan el efecto de esta interacción o que otros factores intervienen bloqueándolo o enmascarándolo.

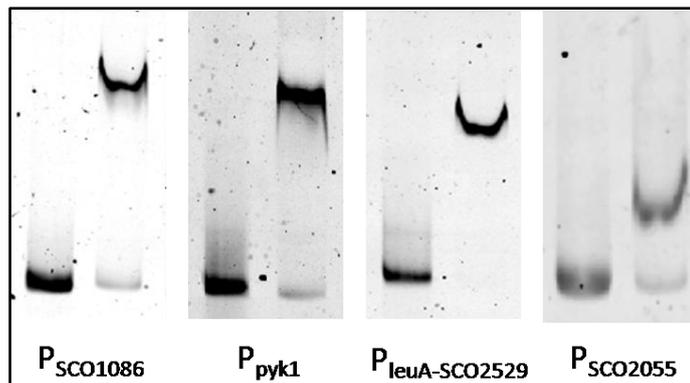


Fig. 4.76. Ensayos de retraso de distintas regiones reguladoras. En todos los casos, el carril izquierdo muestra la movilidad electroforética de la sonda indicada en ausencia de proteína, mientras que el carril derecho muestra esa movilidad en presencia de una concentración de StrepArgR de 0,84 μ M.

4.4.8. Secuencias protegidas por StrepArgR frente a la digestión con DNasa I

Una vez determinadas aquellas regiones de ADN a las que se une ArgR, se realizaron ensayos de protección frente a DNasa I para identificar los nucleótidos de las cajas ARG implicados directamente en la interacción con ArgR. La técnica se siguió según lo descrito por Rodríguez-García *et al.* (1997) para los promotores de genes *arg* de *S. clavuligerus*, pero resultó ser muy poco efectiva en nuestro caso, ya que la protección era apenas visible utilizando la secuencia de las cajas ARG de *argH* que considerábamos control positivo. Este problema puede deberse a que el marcaje con fluoróforos no sea suficientemente sensible o, más probablemente, a que la unión de ArgR a sus dianas estando en solución pudiera ser lábil, mientras que en los gels de poliacrilamida (EMSA) dicha unión se mantendría debido a la red del polímero. Así, si durante el protocolo de protección frente a DNasa I ArgR se desprendiese de la sonda, la DNasa I podría digerir completamente el ADN y no se detectaría protección en los fragmentos en los que sí se demostró retraso. Puesto que en los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (apartado 3.14) se sirven del formaldehído en concentración 1 % para fijar las uniones proteína-ADN, decidimos incluir en las reacciones de protección concentraciones decrecientes de este reactivo (0,1 %, a 0,0001 %, datos no mostrados). La reacción se optimizó con 0,1 % formaldehído, cuyo exceso se neutralizó con 0,05 M glicina para evitar que interfiriese con la actividad de la DNasa I. Se utilizó un máximo de 0,003 unidades de DNasa I para la cantidad máxima de proteína permitida por el volumen de reacción, entre 6-8 μ M.

Fueron ensayadas 18 regiones cuya unión a ArgR se había demostrado mediante EMSA, pero solo en 3 casos (las regiones promotoras de *argH*, SCO1086 y SCO2055-*hisD*) se consiguió detectar un patrón de digestión diferencial al comparar los electroferogramas de las reacciones de digestión de DNasa I en

presencia y ausencia de ArgR (fig. 4.77 a 4.82). En el promotor de *argH* se presentan la hebra codificante y su complementaria, puesto que en ambas es visible la protección de ArgR, mientras que en los otros dos casos solo se detectó protección en una de las hebras. El número de regiones protegidas en cada una de las sondas coincidió con el número de cajas ARG predicho bioinformáticamente. La protección no es total, de manera que prácticamente existen todos los fragmentos de digestión aunque los implicados en la protección se hallan en menor proporción. Se pueden observar además nucleótidos hipersensibles a la digestión en presencia de StrepArgR junto con la secuencia protegida. La secuencia nucleotídica que se indica por debajo de los picos de digestión con DNasa I se obtuvo por secuenciación con *Sequenase* (no se muestran los electroferogramas).

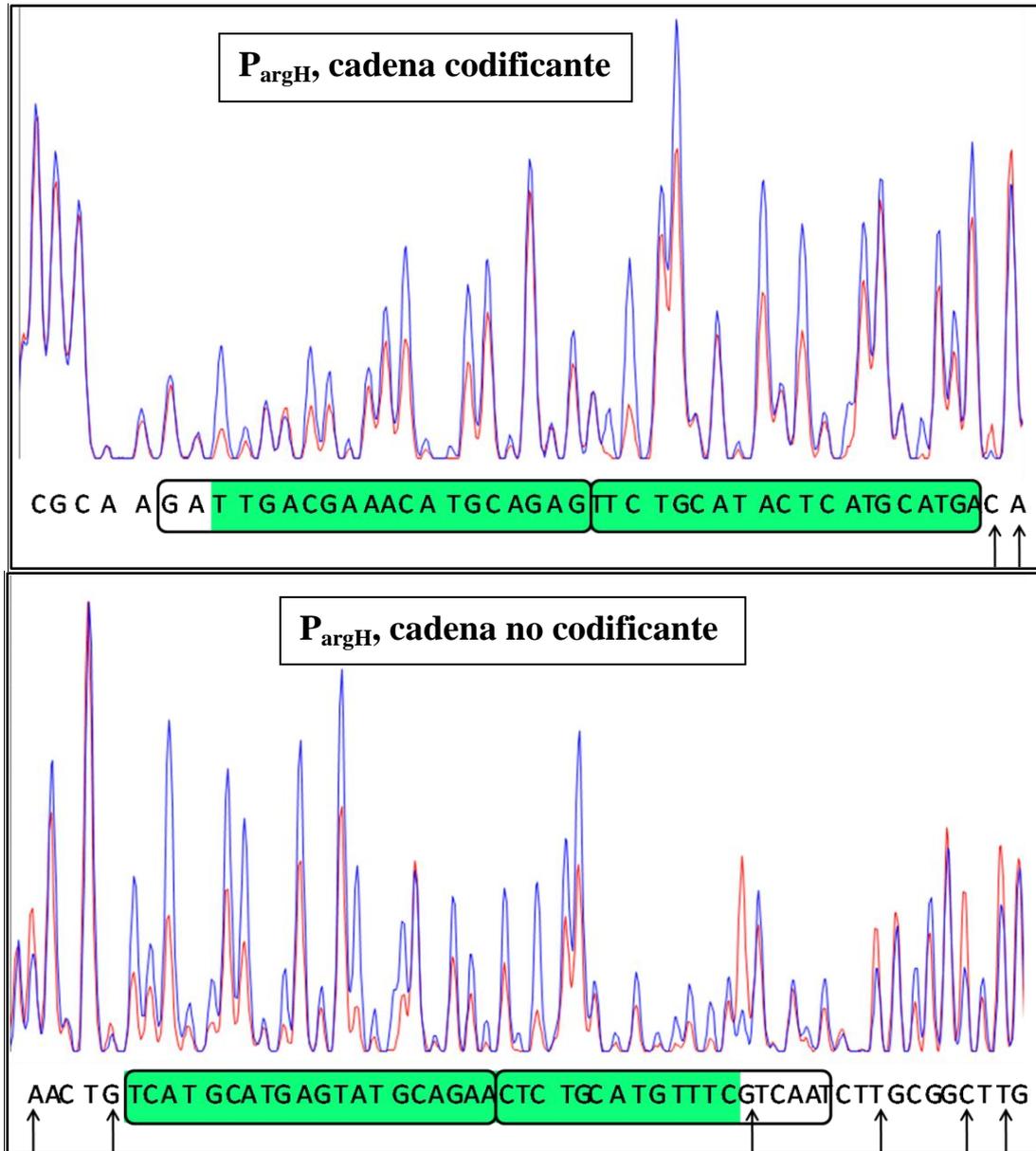


Fig. 4.77. Ensayo de protección frente a StrepArgR para la sonda P_{argH} en sus cadenas codificante y no codificante. La línea azul representa un patrón de digestión de DNasa I control, en ausencia de proteína, y la roja el patrón de digestión en presencia de StrepArgR 8 μ M. La caja ARG teórica se muestra encuadrada. La región protegida por ArgR está sombreada en verde. Los picos hipersensibles están señalados con flechas.

Los ensayos de protección para la sonda P_{argH} (fig. 4.77) revelaron una región protegida de 38 nucleótidos de longitud en la hebra codificante del gen *argH* (cubriendo los nucleótidos del -30 al -67, ambos incluidos, con respecto al inicio de traducción del gen). En la hebra complementaria, la región protegida se extendió un total de 34 nucleótidos (del -30 al -63). Las regiones protegidas en ambas hebras solapan, y coinciden casi completamente con las cajas ARG de R_i 17,3 y 7,7 bits predichas informáticamente, que corresponden a los nucleótidos -24 a -63.

Dos posibles secuencias promotoras -10 y -35 se localizan dentro de las cajas ARG teóricas y, más concretamente, la caja -10 se encuentra dentro de la secuencia protegida y la caja -35 incluye 2 nt en la secuencia protegida (fig. 4.78).

GCAA GATTGA GAAACATGCAGAG TTCTGCATACTCATGCATGA CAGTGATCGTACGGTGAGGAG
CGACCCAAGTG

Fig. 4.78. Secuencia promotora de *argH* (cadena codificante en la fig. 4.77). En verde se representa el codón de inicio de *argH*, subrayado en rojo las posibles cajas -10 y -35. En azul y encuadradas, las cajas ARG teóricas y sombreado en verde la secuencia protegida.

En cuanto a la sonda $P_{SCO1086}$ (fig. 4.79), la zona protegida consta de 44 nucleótidos de longitud en la hebra no codificante del gen *SCO1086*, cubriendo los nucleótidos del -3 al -47 con respecto al inicio de traducción del gen. Esa zona protegida corresponde con las cajas teóricas adyacentes de R_i 3,4 y 17 bits, y 2 nucleótidos a cada extremo (2+40+2).

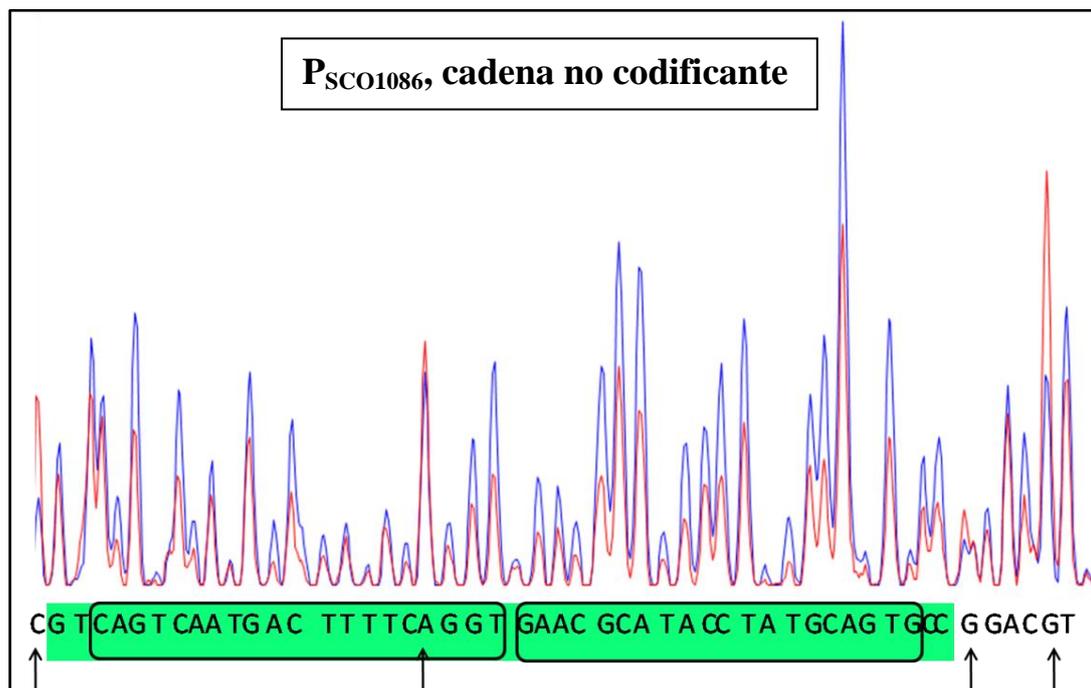


Fig. 4.79. Ensayo de protección frente a StrepArgR para la sonda $P_{SCO1086}$, cadena no codificante. Ver pie fig. 4.77.

En la región anterior a *SCO1086* se localizan tres posibles promotores teóricos, uno de los cuales incluye la caja -35 dentro de la región protegida (fig. 4.80). La anotación de *SCO1086* de *S. coelicolor* indica que comienza con un triplete GTG para valina, pero la mayor parte de sus homólogos comienzan en un ATG para metionina localizado 24 nt después. Pese a que se han descrito secuencias en los transcritos para unión al ARN 16S con un grado de complementariedad muy laxo (Strohl, 1992), ninguno de los dos

codones de inicio tiene una caja ribosomal que pueda ser identificada como tal y nos permita dirimir cuál es el inicio de la proteína.

Tanto en este caso como en el anterior, ArgR actúa como represor de la transcripción, ya que al unirse a las cajas ARG impide la unión de la ARN polimerasa. Consecuentemente, en ausencia de ArgR, la expresión de *argH* y SCO1086 se encuentra desreprimida.

ACGGGAACACGTCCGGCACTGCATAGGTAAGGTTCCCTGAAAAGTCATTGACTGACGGGTGAT
CGCTTTCCTATGCTCTGCGGGCATGG

Fig. 4.80. Secuencia promotora de SCO1086. En verde se representa el codón de inicio de SCO1086, subrayado en rojo las posibles cajas -10 y -35. En azul y encuadradas, las cajas ARG teóricas y sombreado en verde la secuencia protegida. En cursiva, el inicio alternativo de SCO1086.

La región promotora de SCO2055-*hisD* mostró una región protegida de 49 nucleótidos (del -118 al -166 con respecto al codón de inicio de *hisD*) en la hebra codificante, mientras que las cajas teóricas corresponden a la región que va desde el nucleótido -118 al -158 (fig. 4.81). Por tanto, experimentalmente se protegen 8 nucleótidos más hacia el extremo 5' del promotor. La predicción informática indica la posible existencia de dos cajas ARG de 20 pb separadas por un nucleótido. Una de ellas tiene una puntuación de 5,7 bits, y la otra, más distal respecto al inicio del gen, de 4,4 bits (fig. 4.81, la de la derecha e izquierda respectivamente). Se puede observar una protección más débil (es decir, con menor diferencia de altura entre los picos protegidos y los no protegidos) en la caja de menor puntuación ya que, como era de esperar, cuanto más “perfecta” sea una caja ARG, es decir, cuanto más se acerque su secuencia a la consenso, y, por tanto, tenga un mayor valor R_i , más afinidad de unión tendrá ArgR a ella.

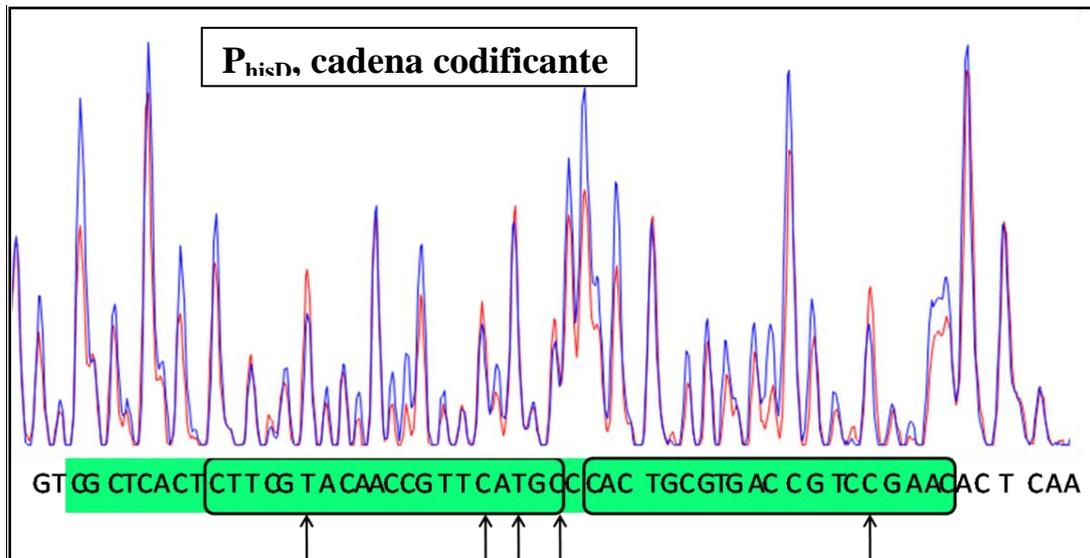


Fig. 4.81. Ensayo de protección frente a StrepArgR para la sonda P_{hisD}, cadena codificante. Ver leyenda de la fig. 4.77.

La secuencia analizada corresponde a una región promotora de transcripción bidireccional. En la fig. 4.82 se muestra la región intergénica entre ambos genes en las dos direcciones. Para *hisD*, las secuencias -10 y -35 están fuera de la región protegida por ArgR, pero hay posibles cajas -10 y -35 incluidas en la región promotora de SCO2055 protegida por ArgR.

Los resultados de micromatrices muestran que *hisD* no es un GES, mientras que SCO2055 sí lo es, incrementándose su expresión a tiempos tardíos. Por tanto, ArgR actuaría como activador de la expresión de SCO2055, no de *hisD*. Si asumimos esto, la región protegida comprendería los nucleótidos -34 al -82 con respecto al codón de inicio de SCO2055, y la cadena protegida sería la no codificante de SCO2055. La explicación para este tipo de regulación sería que ArgR ejercería un control positivo por inducción, de modo que ArgR estaría inactiva, hasta que algún efector la activase, activando a su vez la expresión del gen regulado, en este caso SCO2055, o que ArgR actuaría como represor a tiempos tempranos, mientras que a tiempos tardíos liberaría el promotor permitiendo su expresión.

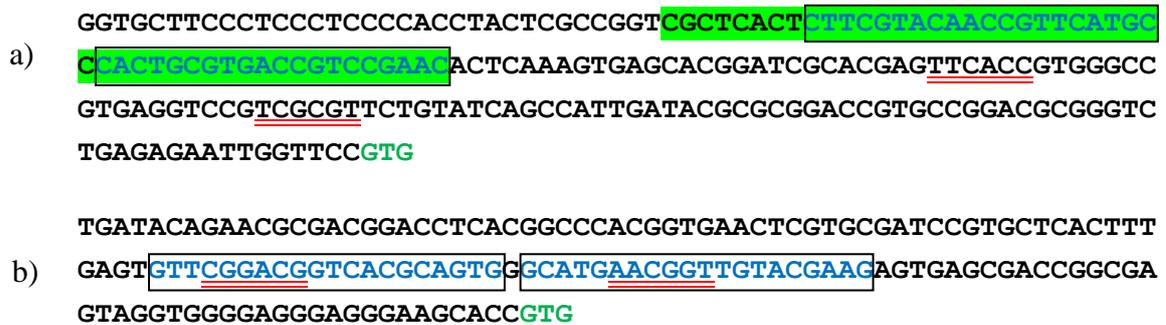


Fig. 4.82. Región de transcripción divergente con secuencias promotoras de a) *hisD* y b) SCO2055. Las letras en verde representan los respectivos codones de inicio. Las secuencias -10 y -35 están subrayadas en rojo. En azul y encuadradas se indican las cajas ARG teóricas y sombreado en verde la secuencia protegida (en la cadena para *hisD*).

Desconocemos por qué no observamos protección en ambas cadenas de los promotores de los genes SCO1086 y SCO2055. Tal vez la conformación tridimensional de las sondas de ADN dificulta el acceso de la DNasa I a la hora de digerir el ADN protegido. Posiblemente una mejor puesta a punto de la técnica habría facilitado la obtención de mayor número de resultados, tanto en estas como en otras sondas.

4.4.9. Definición de un nuevo modelo de caja ARG

Según los EMSA, ArgR se puede unir a fragmentos de ADN con dos cajas, como en el caso de P_{argH} , a una única caja como en el caso de P_{amtB} o P_{pyrB} , e incluso a media caja, como en $P_{SCO0255}$ y P_{argR} . Se ha trabajado con sondas de ADN que contienen dos posibles cajas ARG distantes entre sí, como P_{pyrR} y P_{malR} , donde ambas o solo una, respectivamente, son sitios de unión a ArgR. En el caso de cajas no tan separadas entre sí (como las de P_{nrdA} con los 3 nt de separación), desconocemos si ArgR interacciona con ambas ya que no obtuvimos resultado con los ensayos de protección frente a DNasa I. No parece que exista una puntuación mínima para que ArgR se una a su diana *in vitro*. De hecho, hay cajas con la misma puntuación que en un caso se unen a ArgR y en otro no: por ejemplo, $P_{SCO3067}$, cuya caja tiene un R_i de 5,24 bits, se une a ArgR, mientras que $P_{SCO2209}$, con caja de 5,29 bits, no lo hace. Incluso hay cajas de puntuación más elevada, como la de P_{argS} (R_i de 11,84 bits) que no se unen a ArgR *in vitro*. También hemos visto un amplio rango de distancias entre la posición de la caja ARG y el inicio del gen regulado; la más proximal de SCO1086 dista 2 nt al ATG, y la de SCO4293, mantiene 312 nt de distancia al inicio. De modo que la posición de la caja puede ser importante, pero concretamente la de los nucleótidos conservados en el surco mayor de la hélice del ADN (Song *et al.*, 2002).

De acuerdo con los resultados de EMSA y teniendo en cuenta las secuencias de las cajas y sus complementarias, se construyó una nueva matriz, v1.3 (anexo 4). Todas las secuencias alineadas se

introdujeron en el servidor <http://weblogo.berkeley.edu/>, generándose un nuevo logotipo de secuencia de unión. Como se aprecia en la fig. 4.83, el sitio consenso deducido para la unión de ArgR al ADN tiene una longitud de 20 pb y una estructura palindrómica. La conservación de las bases es especialmente elevada en las posiciones 4, 6, 13 y 15, lo que indica la importancia de esas posiciones en el establecimiento de interacciones entre ArgR y el ADN. Como hemos visto, en algunos casos es suficiente la existencia de media caja conservada para una interacción débil de ArgR con el ADN.

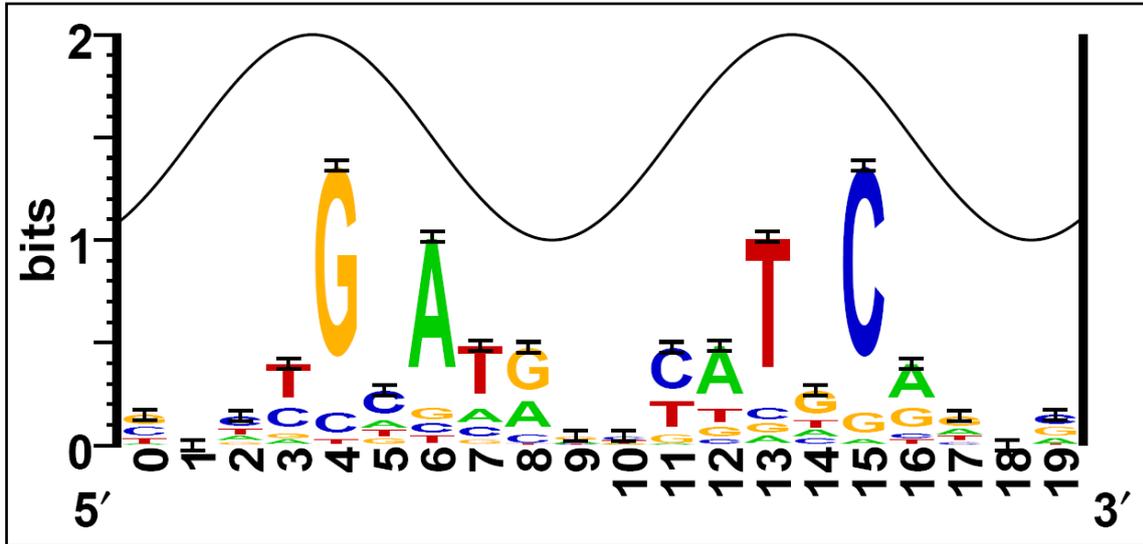


Fig. 4.83. Logotipo de la secuencia de unión de ArgR según la matriz v1.3 del alineamiento del anexo 4.

4.5. Funcionalidad del extremo amino de ArgR

En la proteína ArgR el extremo N_t es el responsable de la unión a ADN (Burke *et al.*, 1994). En *E. coli* se ha demostrado que esta porción de la proteína es suficiente para interaccionar *in vitro* con las secuencias operadoras de los genes regulados y para reprimir los niveles OTC *in vivo* (Grandori *et al.*, 1995). En nuestro caso pretendimos averiguar si la proteína ArgR truncada de *Streptomyces coelicolor* tendría efecto *in vivo* e *in vitro*.

4.5.1. Caracterización de los mutantes *argR* de *S. coelicolor*

En nuestro laboratorio se han obtenido dos cepas mutantes de *S. coelicolor* (fig. 4.84): la que carece del gen *argR* completo, *S. coelicolor* $\Delta argR$ (Pérez-Redondo *et al.*, 2012), y la que mantiene la región 5' del gen *argR*, y por tanto puede producir una proteína truncada de 119 aminoácidos, frente a los 179 de ArgR, denominada *S. coelicolor argR::apra* (R. Pérez-Redondo, sin publicar).

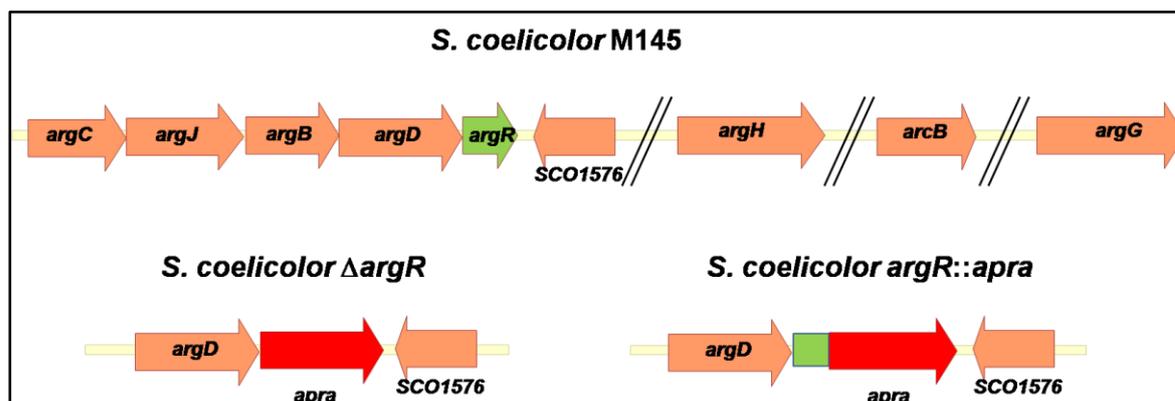


Fig. 4.84. Región del genoma que contiene los genes *arg* en *S. coelicolor* y en dos mutantes en *argR*.

Para explorar la posible funcionalidad en *S. coelicolor* del extremo amino de unión a ADN de ArgR, la proteína $ArgR_N$, se comparó la producción *in vivo* de los antibióticos pigmentados undecilprodigiosina y actinorrodina, la actividad enzimática OTC, y la expresión desde las regiones promotoras reguladas por *argR* en las cepas mutantes *S. coelicolor* $\Delta argR$ y *S. coelicolor argR::apra* y parental.

4.5.1.1. Comparación de la producción de antibióticos

Con el fin de estudiar el efecto que la delección y la interrupción del gen *argR* tienen en la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina, se realizó, junto con la cepa parental *S. coelicolor* M145, una fermentación en medio definido MG con y sin suplemento de L-arginina. Tras inocular dicho medio como se indica en el apartado 3.17.1 con esporas de las distintas cepas, los matraces triplicados se incubaron a 30 °C y se recogieron muestras cada 12 horas, entre las 32 y las 116 horas. Para cuantificar la producción específica de actinorrodina y undecilprodigiosina se determinó el peso seco de cada cultivo y se relacionó con la producción volumétrica (fig. 4.85).

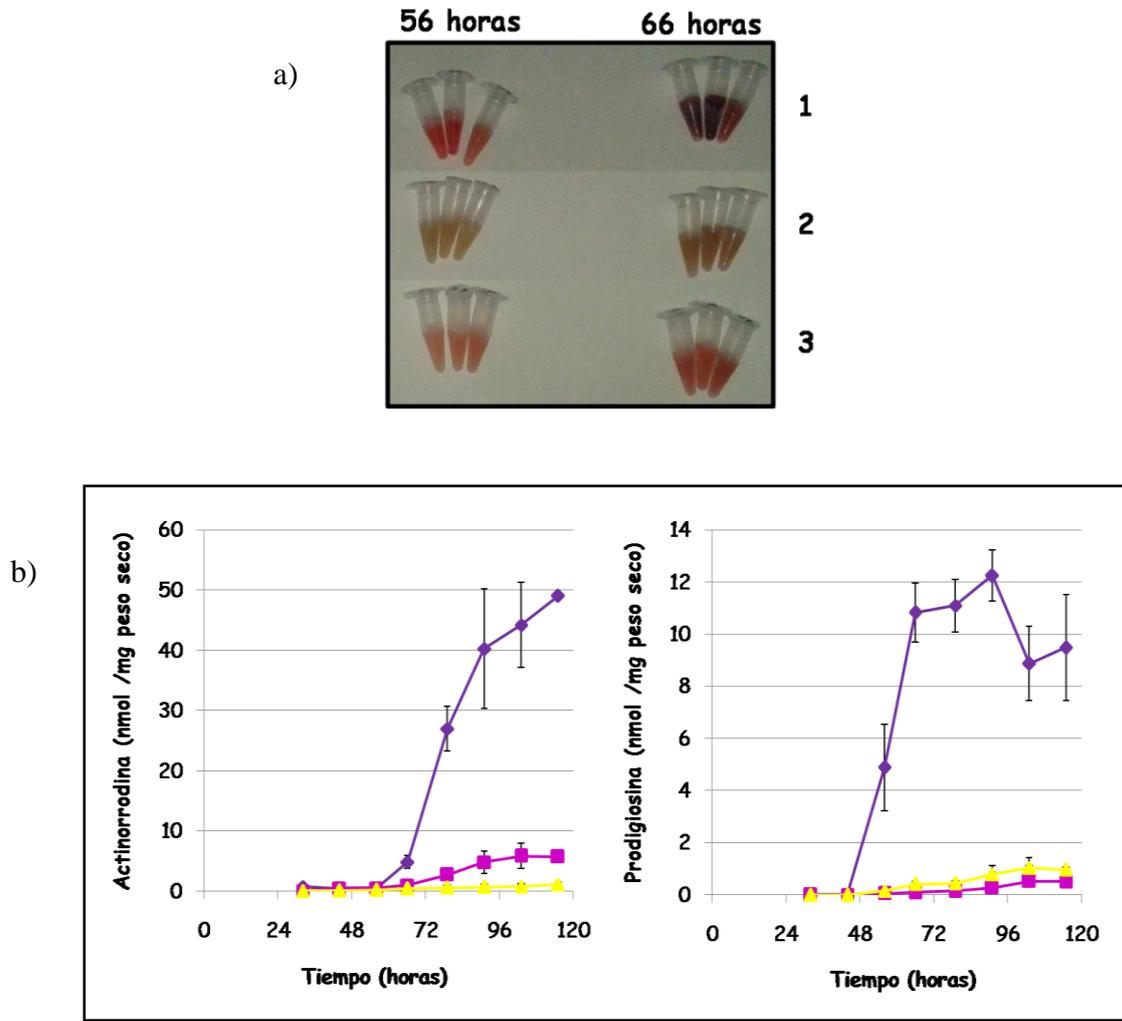


Fig. 4.85. a) Muestras de fermentación en medio MG de 1, *S. coelicolor* M145; 2, *S. coelicolor* $\Delta argR$; 3, *S. coelicolor* $argR::apra$, donde se aprecian las diferencias de pigmentación debidas a la undecilprodigiosina y actinorrodina. b) Producción de actinorrodina (izquierda) y undecilprodigiosina (derecha) en *S. coelicolor* M145 (◆), *S. coelicolor* $\Delta argR$ (■) y *S. coelicolor* $argR::apra$ (▲) en MG sin adición de L-arginina.

Las tres cepas mostraron cinéticas de crecimiento similares (datos no mostrados) y en ambos mutantes la biosíntesis de los dos antibióticos fue muy inferior a la de la cepa de referencia. Esta disminución tan drástica de la producción en los dos mutantes da a entender que ArgR tiene un efecto claro en el metabolismo secundario de *S. coelicolor*, comportándose en este caso como activador. Los resultados de biosíntesis de antibióticos en MG con arginina 25 mM (no se muestra) siguen un perfil similar, pero la producción de antibióticos es menor que en MG.

4.5.1.2. Comparación de la actividad OTC

Los dos mutantes $argR$ y la cepa parental de *S. coelicolor* se cultivaron en medio MG con y sin L-arginina y se tomaron muestras a distintos tiempos entre las 32 y las 96 horas para analizar la actividad OTC (fig. 4.86). Las cinéticas de crecimiento fueron similares en las tres cepas (no mostrado), mientras que la actividad OTC de ambos mutantes fue superior a la de la cepa M145. Sabemos que ArgR regula la expresión de *arcB*, que codifica la enzima ornitina carbamoiltransferasa, de manera que la ausencia de la proteína represora o la presencia de una proteína truncada, ArgR_N, provocan una mayor expresión del gen *arcB*, y una mayor actividad OTC. Por tanto, la proteína ArgR completa es indispensable para la regulación

del metabolismo de arginina. En los cultivos donde se adicionó L-arginina los niveles de actividad OTC son menores (fig. 4.86.b) por inhibición de la expresión de *arcB*, pero el comportamiento de los dos mutantes es también similar entre ellos y con valores superiores a los de *S. coelicolor* M145.

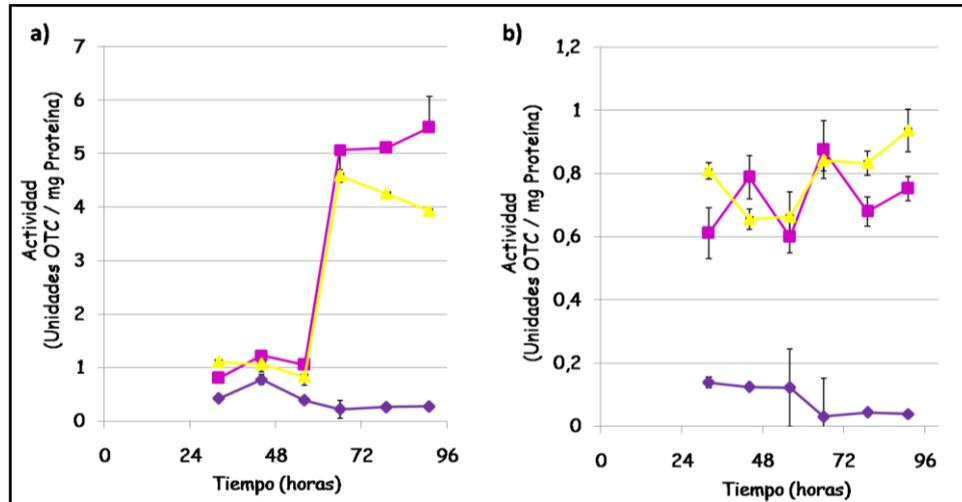


Fig. 4.86. Actividad OTC en *S. coelicolor* M145 (◆), *S. coelicolor* $\Delta argR$ (■) y *S. coelicolor* *argR::apra* (▲) en a) MG y b) MG con L-arginina 25 mM.

4.5.1.3. Comparación de la actividad luciferasa en distintos entornos génicos

Tres promotores que contienen cajas ARG a las que demostramos unión de ArgR, *argH*, *whiB* y SCO1086, se fusionaron a los genes *luxAB* en el plásmido pLUXARneo (Santos-Beneit *et al.*, 2008). Las construcciones obtenidas se introdujeron en *S. coelicolor* M145, *S. coelicolor* $\Delta argR$ y *S. coelicolor* *argR::apra* y se cultivaron en medio MG tanto con adición de L-arginina como sin ella. La luminiscencia se analizó a las 32 horas de cultivo y se observó que en ambos mutantes los niveles de expresión de luciferasa controlada desde un mismo promotor son similares (Fig. 4.87), lo que quiere decir que la no existencia de ArgR y la presencia de ArgR_N tienen el mismo efecto desrepressor sobre estos promotores. Al contrario de lo que ocurre con el promotor de *whiB*, la desrepresión de los promotores de *argH* y SCO1086 es mayor ante L-arginina que en su ausencia.

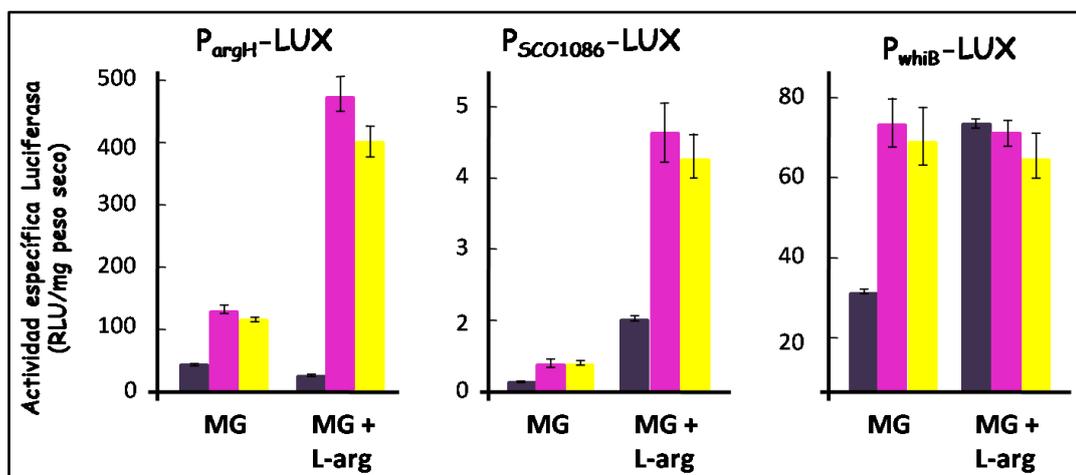


Fig. 4.87. Actividad luciferasa controlada por distintos promotores en *S. coelicolor* M145 (■), *S. coelicolor* $\Delta argR$ (■) y *S. coelicolor* *argR::apra* (■) en MG y MG con L-arginina 25 mM. Cada una de las gráficas tiene una escala de unidades de luz relativa (RLU) diferente, debido a que unos promotores son más fuertes que otros, haciendo que el gen de la luciferasa se exprese más o menos según ello, y que varíen los rangos de luminiscencia entre promotores.

4.5.1.4. Ensayos de retraso en gel con Strep-ArgR_N

Con el objetivo de conocer el papel del dominio amino terminal en la funcionalidad de la proteína reguladora ArgR se construyó, con una estrategia análoga a la desarrollada en el caso de pET24(a)-StrepargR, un vector de expresión que permitiese la purificación a homogeneidad de ArgR_N en forma de proteína de fusión con la etiqueta Strep (apartado 4.3). La suposición de partida fue que el extremo amino de ArgR, encargado de la unión al ADN, podría ser suficiente para interactuar con sus dianas y ejercer su función de regulación, sin necesidad del extremo carboxilo terminal de oligomerización y unión a L-arginina (Tian y Maas, 1994).

Para realizar esta construcción se hizo una PCR utilizando los cebadores argR17 y argR21, que incorpora un codón de parada de la transcripción para el truncado del gen *argR*, y con el plásmido pTC123-aphII como molde. El fragmento de 411 pb resultante, que codifica un péptido de 127 aminoácidos (119 aminoácidos correspondientes a ArgR_N y 8 aminoácidos correspondientes a la etiqueta Strep) se digirió con EcoRI y HindIII y se clonó en pBluescript SK⁺. Una vez que la secuenciación verificó la ausencia de errores en el fragmento, se digirió esta construcción intermedia con NdeI y HindIII y la secuencia que codifica el extremo amino de *argR* se clonó en el plásmido pET24a(+) digerido con las mismas restrictasas. La construcción pET24a(+)-StrepargR_N resultante se introdujo en la cepa de expresión BL21 (DE3) [pLysS], dando lugar a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS] [pET24a(+)-StrepargR_N] y se llevó a cabo el proceso de purificación como se indica en el apartado 3.18.1.

Una vez purificadas y cuantificadas dos fracciones obtenidas de la proteína Strep-ArgR_N de 14 kDa de tamaño, con concentraciones 10 y 6 μM, respectivamente (datos no mostrados), se llevó a cabo la reacción de unión a distintas sondas de ADN conteniendo dos o una cajas ARG. Todo el proceso de purificación, unión, electroforesis y visualización en escáner de fluorescencia se realizó en las mismas condiciones que las utilizadas con la proteína de fusión Strep-ArgR (apartado 4.4.1).

Como demuestra la fig. 4.88, la proteína truncada es incapaz de unirse a las cajas ARG *in vitro*, tanto a las simples (en los promotores de *leuA*-SCO2529 y *rstP*) como a las dobles (en los promotores de *arcB* y *argH*) ni siquiera cuando se incrementa la concentración de ArgR_N más de tres veces con respecto a la proteína completa. Por tanto, ArgR necesita tanto de su extremo amino como del carboxilo para interactuar con sus dianas en *S. coelicolor*. Este resultado es llamativo en tanto que la proteína ArgR_N representa 127 de los 179 aminoácidos totales de ArgR y de que existen estudios con los extremos de unión a ADN de otras proteínas como PimM y PhoP (Santos-Aberturas *et al.*, 2011; Sola-Landa *et al.*, 2005; Mendes *et al.*, 2007), en los que dicho péptido, por sí solo, interacciona con el ADN *in vitro*, incluso de forma más eficiente que la proteína original.

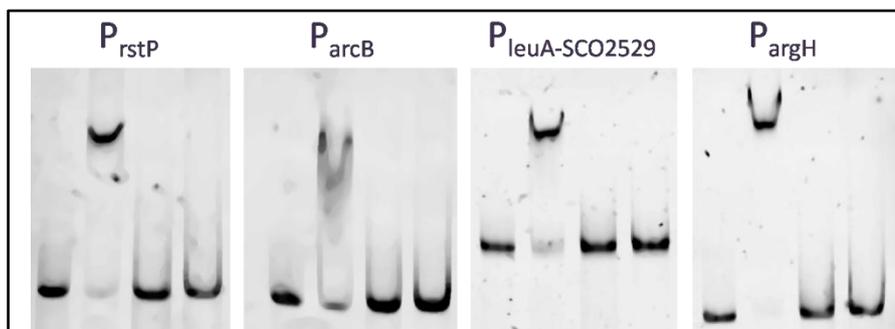


Fig. 4.88. Ensayos EMSA realizados con la proteína Strep-ArgR_N. De izquierda a derecha, sonda libre, reacción control de unión con 0,84 μM de Strep-ArgR, reacción de unión con 0,84 μM de Strep-ArgR_N y reacción de unión con 3 μM de Strep-ArgR_N.

En *E. coli* la sobreexpresión del extremo amino de ArgR reprime los niveles de OTC *in vivo*. Además este péptido, con 96 de los 157 aminoácidos, se une a las secuencias operadoras *in vitro*, independientemente de la presencia de L-arginina (Grandori *et al.*, 1995). Ghochikyan *et al.* (2002) además de crear proteínas quiméricas con el extremo N_t de *E. coli* y el carboxilo de *G. stearothermophilus* y viceversa, han visto que el dominio de unión a ADN junto con la zona de bisagra y la hélice $\alpha 4$ del dominio de oligomerización, sin el resto del dominio C_t, interacciona con el ADN aunque de forma más débil e independiente de arginina que la proteína completa. Varias observaciones de estos autores indican que la hélice $\alpha 4$ y la zona de bisagra contribuyen al reconocimiento de cajas ARG, tanto únicas como dobles.

En nuestro caso, el planteamiento inicial fue que, del mismo modo que ocurre en *E. coli* y *G. stearothermophilus*, ArgR_N fuese capaz, quizás con menor afinidad, de interactuar con las secuencias de ADN diana. El conjunto de resultados muestran que el extremo amino de ArgR en *S. coelicolor* por sí solo es incapaz de unirse al ADN, comportándose por tanto *S. coelicolor argR::apra* del mismo modo que *S. coelicolor* $\Delta argR$. La proteína producida por el mutante *S. coelicolor argR::apra* incluye los aminoácidos hasta la posición 119 (120 en la fig. 4.61, por la presencia de un hueco en el alineamiento), lo que significa que incorpora esas 3 zonas de unión al ADN, de bisagra y de hélice $\alpha 4$, que Gochickyan *et al.* (2002) incluyen también en su fragmento N_t funcional. Grandori *et al.* (1995), en su construcción de ArgR_N de *E. coli*, incorporan hasta la posición 121 de la fig. 4.61. El dominio N_t de la proteína de *Streptomyces* no se asemeja al de *E. coli* y *G. stearothermophilus* y no es suficiente para interactuar con el ADN. Por tanto los efectos observados en ambos mutantes *argR*, en la producción de act y red, en el control de la expresión de los genes *luxAB* en los exconjugantes derivados o en la desrepresión de la actividad OTC, se deben a la falta de proteína o a la presencia de una proteína no funcional.

4.6. Análisis mediante ChIP on chip

El protocolo ChIP on chip toma su nombre de *Chromatine Immunoprecipitation on chip* y se utiliza para determinar mapas genómicos de una proteína dada mediante la fijación de las proteínas al ADN e inmunoprecipitación de los complejos proteína-ADN gracias al uso de anticuerpos específicos frente a la proteína de interés. Posteriormente el ADN inmunoprecipitado se hibrida en micromatriz junto con un ADN de referencia.

En nuestro caso, viendo el gran número de posibles cajas ARG presentes en el genoma de *S. coelicolor*, se utilizó esta técnica para conocer las dianas de ArgR a las 32 horas de crecimiento en medio MG suplementado con L-arginina 25 mM.

4.6.1. Puesta a punto de los pasos clave para la obtención de la cromatina

El primer paso de este protocolo (apartado 3.14) consiste en el entrecruzamiento de las proteínas al ADN *in vivo* mediante la adición de formaldehído al 1 %. Se ha de tener en cuenta que el formaldehído es un compuesto muy volátil, por lo que utilizamos un vial recientemente abierto.

La obtención del ADN entrecruzado con las proteínas (o cromatina) y su fragmentación es el punto más crítico del procedimiento. Esto implica la ruptura del micelio congelado y la sonicación del ADN, teniendo cuidado de mantener el material frío en todo momento, tanto al romper el micelio mecánicamente como al fragmentar la cromatina mediante el uso de ultrasonidos.

En la literatura encontramos gran cantidad de ejemplos de ruptura del micelio mediante *FastPrep*, de MP Biomedicals. Realizamos varios intentos con este sistema, basándonos en los trabajos de Pullan *et al.* (2011) y den Hengst *et al.* (2010). Para ello, preparamos un tampón de lisis con 15 mg/ml de lisozima (en Tris-HCl y NaCl) y un tampón IP con Tritón y SDS (en Tris-HCl y NaCl). Partiendo de 100 mg de micelio (peso húmedo), se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de lisis con inhibidor de proteasas e incubaron durante 30 minutos a 25 °C, para posteriormente dar dos pulsos de 30 segundos cada uno en *FastPrep 120*. Se recuperaron aproximadamente 250-300 µl, que se mezclaron con 0,5 ml de tampón IP antes de sonicar.

Alternativamente, la ruptura se realizó por disrupción mecánica y cizallamiento en el aparato *Mikrodismembrator U*, de Sartorius, tal y como utiliza el grupo del Dr. Colin Smith en la Universidad de Surrey, UK. Dado que usamos cápsulas de 7 ml de capacidad para la ruptura del micelio, utilizamos en torno a los 50 mg de peso seco (o, lo que es lo mismo, el micelio proveniente de 50 ml de cultivo a $DO_{600} = 1$). Un volumen mayor de muestra apenas dejaba espacio para el movimiento de la bola de acero cromado, y, por tanto, el micelio no era golpeado y cizallado.

En cuanto a la fragmentación de la cromatina, este es el proceso más variable, ya que depende de la cantidad de material de partida, de las condiciones de cultivo utilizadas, del grado de entrecruzamiento, de la concentración de cromatina en el volumen de líquido, del volumen de sonicación... En cualquier caso, debe ponerse a punto para cada punta y/o aparato de sonicación utilizado. Nosotros usamos un *Ultrasonic Processor XL*, Misonix Inc., con una punta de 2,4 mm de diámetro. El grado óptimo de fragmentación del ADN se encuentra entre los 500 y 1000 pb y, en nuestro caso, se consiguió entre 10 y 14 pulsos de

sonicación, que corresponden a, aproximadamente, 22000 julios. Durante el proceso de sonicación, se extrajeron alícuotas de 100 μ l cada cierto número de ciclos, para elegir la muestra más apropiada (fig. 4.89). Un defecto en el grado de sonicación provoca una pérdida de la resolución de las dianas de unión, ya que los fragmentos de menor tamaño permiten una localización más precisa de dichas dianas. Un exceso de sonicación origina gran cantidad de ruido de fondo en el posterior análisis de las micromatrices, y dificulta la identificación correcta de dianas. El exceso de sonicación es más difícil de evaluar, ya que la mayoría de material entrecruzado tiene un límite de sonicación, y por encima de este (más ciclos de sonicación) no se producen resultados visibles, pero se afectan los resultados del análisis de las micromatrices.

El proceso de ruptura del micelio con *FastPrep* presentó la ventaja de ser más cómodo y rápido que con *Mikrodismembrator*, pero también un gran inconveniente: la cantidad de cromatina obtenida fue menor, no solo por la menor cantidad de micelio de partida (limitado por la capacidad del tubo de 2 ml), sino porque con *Mikrodismembrator* todo el material obtenido (lo que incluye micelio sin romper) es tratado mediante ultrasonidos, mientras que con *FastPrep*, únicamente se sonica el sobrenadante obtenido tras la incubación con el tampón de lisis y los pulsos de ruptura, de modo que se “pierde” una importante cantidad de micelio aún sin romper. Fue por ello que elegimos y terminamos de poner a punto la ruptura y sonicación con *Mikrodismembrator*.

En cada experimento se dividieron los ~8 ml de micelio en tampón IP en 5 alícuotas de ~1,6 ml, a las cuales se daban 10, 12, 14, 12 y 14 pulsos de sonicación para utilizar una parte en la visualización en gel (fig. 4.89). Tras optimizar las condiciones de material de partida y sistema de rotura de las células, el grado óptimo de fragmentación del ADN se obtuvo en torno a los 12 ciclos.

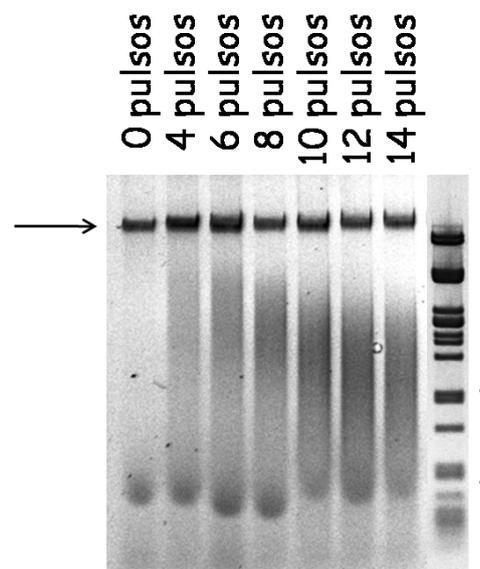


Fig. 4.89. Grado de ruptura mediante ultrasonidos de micelio de *S. coelicolor* M145. Se extrajeron muestras de 100 μ l de la misma suspensión sin sonicar (0 pulsos) y cada 2 pulsos (4 a 14 pulsos). Estas muestras se trataron con proteínaasa K, se centrifugaron y 5 μ l se cargaron en el gel. A la derecha de la imagen se muestra el marcador de tamaño λ PstI, y en la barra vertical se indica el tamaño óptimo de ruptura, entre 500 y 1000 pb aproximadamente. La flecha apunta al ADN total que no ha sido fragmentado. En este experimento se eligió el ADN de los pulsos 12 y 14 para continuar con la inmunoprecipitación.

Los rendimientos de ADN finales del proceso de inmunoprecipitación, previos al marcaje fluorescente, fueron bajos, de unos 600–1000 ng, a pesar de los múltiples intentos de incrementar el rendimiento de la ruptura, aumentando la cantidad de micelio, con digestión enzimática previa, con varios sistemas de ruptura mecánica, etc.

4.6.2. Diseño experimental: comparación directa vs comparación indirecta

Debido a que en el ADN entrecruzado de la cepa *S. coelicolor* $\Delta argR$, carente de la proteína ArgR, los anticuerpos anti-ArgR no encontrarían sitio de unión y de que no se podría establecer una comparación con la cepa parental, se construyeron las cepas *S. coelicolor* $\Delta argR::pMS83-StrepargR$ y *S. coelicolor* $\Delta argR::pMS83-argRStrep$, en las que, controlado por el promotor de fusión *argC-argR* (apartado 4.2.1), se traduciría una proteína ArgR fusionada a una etiqueta Strep. Para inmunoprecipitar específicamente el ADN de estas cepas se adquirieron anticuerpos frente al péptido Strep, además de los anticuerpos frente a ArgR. Este juego de cepas y anticuerpos nos proporcionaba distintas alternativas a la hora de diseñar el experimento de comparación mediante hibridación en micromatriz (fig. 4.90).



Fig. 4.90. Posibles combinaciones de las cepas control (M145), mutante ($\Delta argR$) y mutante complementado ($\Delta argR::pMS83-StrepargR$), el uso de ADN inmunoprecipitado (IP) con los anticuerpos frente a ArgR o la etiqueta Strep, o no inmunoprecipitado (NoIP).

En vista de que los mayores rendimientos de ADN inmunoprecipitado (ADN_{IP}) los obtuvimos con los anticuerpos anti-ArgR, el diseño óptimo sería la comparación del ADN_{IP} de las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$. Esta opción, frente a la comparación del ADN_{IP} de *S. coelicolor* M145 vs el ADN sin inmunoprecipitar, presenta la ventaja de que muestra cuál es el ADN que inmunoprecipita por interacciones inespecíficas del anticuerpo. Sin embargo, nos fue difícil conseguir suficiente cantidad de ADN_{IP} a partir de la cepa mutante. Fue por ello que comenzamos trabajando con el diseño de ADN_{IP} frente a ADN no inmunoprecipitado (ADN_{NoIP}), ambos de la cepa *S. coelicolor* M145.

4.6.3. Control del enriquecimiento en el ADN inmunoprecipitado, marcaje e hibridación en micromatriz

El protocolo de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-ArgR desde *S. coelicolor* M145 (apartado 2.14) rindió entre 600–1000 ng de ADN_{IP} . Una parte de esta cromatina (18–36 ng) se utilizó para comprobar por Q-PCR el enriquecimiento de dos dianas de ArgR (los promotores *argC* y SCO1086) con respecto a un fragmento de ADN no regulado (perteneciente al gen *hrdB*), y por tanto no enriquecido, en la mezcla de ADN_{IP} . Se utilizaron 2–4 ng de ADN por reacción en la Q-PCR, para que el Ct se situara entre los 15 y los 30 ciclos. Para analizar los resultados de la Q-PCR se utilizó el programa *Rest*, de Qiagen

(*Relative Expression Software Tool*, apartado 4.1.13). La tabla 4.2 refleja el enriquecimiento de los fragmentos diana de ArgR en distintas muestras inmunoprecipitadas. Una prueba estadística para determinar la precisión de las expresiones relativas es compleja porque los índices de distribución no tienen desviación estándar. El software del programa *Rest 2009* supera esta limitación mediante simples análisis de aleatoriedad estadística. Es por ello que los valores de desviación superiores son diferentes a los inferiores.

<i>argC</i>			SCO1086		
media	desv. Sup	desv. Inf	media	desv. Sup	desv. Inf
15,5	9,1	5,6	22,1	15,6	11,1
25,8	7,5	9,8	-	-	-
254,2	90,0	80,3	170,4	81,9	61,11
355,2	121,6	187,1	258,7	97,1	55,9
38,9	17,7	8,8	25,2	14,8	18,7
93,7	34,6	23,2	15,5	8,0	6,6
538,6	63,6	125,5	38,6	8,6	18,6
182,9	130,2	100,9	19,8	5,5	4,0
111,8	161,6	58,8	37,8	23,5	16,5
619,5	247,8	171,9	217,5	180,9	122,6
11,5	4,3	2,7	26,7	6,2	4,7
89,9	4,3	4,0	94,4	11,0	9,0
257,8	34,6	28,7	207,2	66,1	30,0
346,1	129,3	86,5	295,1	98,0	61,4
133,0	11,1	10,3	134,4	9,1	8,3
163,7	11,4	10,6	162,0	35,4	29,1
192,7	37,1	30,8	150,1	13,8	12,6
53,1	2,7	2,5	71,8	15,8	12,7
85,6	16,2	13,6	94,7	6,0	5,5
55,9	12,6	10,2	57,3	16,4	11,6
54,2	5,6	4,9	64,7	10,0	8,6
167,2	23,2	20,3	146,0	73,5	48,4

Tabla 4.2. Resultados de varias pruebas de inmunoprecipitación con anticuerpos frente a ArgR de ADN de *S. coelicolor* M145 frente a ADN de la misma cepa sin inmunoprecipitar y cuantificadas mediante Q-PCR. Los valores de la columna “media” corresponden al $\Delta\Delta Ct$ del fragmento amplificado y se refieren al número de veces más que aparece el promotor *argC* o SCO1086 en la muestra inmunoprecipitada respecto a la control.

Como vemos en la tabla 4.2, el proceso de inmunoprecipitación es válido porque las muestras estaban enriquecidas en al menos dos dianas conocidas de la proteína ArgR. De modo que el siguiente paso era marcar los ADN_{IP} y ADN_{NoIP} con Cy3 y Cy5. Como se ha dicho anteriormente la muestra limitante es la que corresponde al ADN_{IP}. En una primera ronda de marcaje nunca conseguimos incorporar más de 50 pmoles de Cy3/5, lo cual era insuficiente para los cristales OGT Chip *S. coelicolor*, ya que según Lee *et al.* (2006) son necesarios entre 200 y 500 pmoles de marcaje. Nuestra decisión fue realizar una segunda ronda de marcaje sobre las muestras ya marcadas, obteniendo así en torno a 120 pmoles de fluoróforo incorporado, cantidad que creímos suficiente para dichos cristales. Tras la hibridación en micromatriz, la cuantificación de las señales reveló mucho ruido de fondo, que pensamos quizás era debido a las uniones inespecíficas de los anticuerpos anti-ArgR en las muestras inmunoprecipitadas. Por ello se inmunoprecipitó

con anticuerpos anti-ArgR ADN de *S. coelicolor* $\Delta argR$ (donde no existe proteína ArgR) y comparó con el ADN_{IP} de *S. coelicolor* M145. Los resultados se muestran en la tabla 3.3, donde se puede observar el enriquecimiento de ambas dianas de ArgR en las muestras provenientes de *S. coelicolor* M145.

<i>argC</i>			SCO1086		
media	desv. Sup	desv. Inf	media	desv. Sup	desv. Inf
24,4	0,6	0,9	16,1	0,9	0,5
36,0	0,6	0,1	31,3	0,5	0,5

Tabla 4.3. Resultados de dos pruebas de inmunoprecipitación con anticuerpos frente a ArgR del ADN de las cepas *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta argR$. Ver el pie de la tabla 4.2.

Los ADN_{IP} de las dos cepas, mutante y parental, se sometieron a dos rondas de marcaje con el fluoróforo, y con 100 pmoles de cada cepa se hibridó una matriz, y con 140 pmoles, otra matriz. En ambos casos el análisis mostró gran cantidad de ruido de fondo. Además, las dianas obvias de ArgR como las sondas correspondientes a las regiones promotoras de *argG*, *argH*, *arcB* o incluso *argC*, cuyo enriquecimiento habíamos demostrado por Q-PCR, no aparecían representadas en la comparación. Nuestra explicación tras la no obtención de resultados es que la baja eficiencia de marcajes (entre 70 y 120 pmol) resultaba insuficiente para la matriz 1x (que abarcan toda la superficie del cristal del porta en el que está impresa) que estábamos usando. Lee *et al.* (2006), para este mismo formato de cristales de 1x, utilizan entre 200 y 500 pmoles de marcaje y un mínimo de 3 μ g de ADN. Estos autores aseguran que, en los casos en que utilizaron la cantidad mínima de ADN y marcaje (3 μ g y 200 pmoles en lugar de 5 μ g y 500 pmoles), el ruido de fondo les impedía tener unos resultados claros.

La solución podría haber radicado en amplificar el ADN inmunoprecipitado, mediante el uso de kits o clonando en plásmidos, o en reducir el tamaño de la matriz de hibridación: mientras los cristales en los que las sondas están repartidas por toda la superficie del cristal (formato 1x) necesitan un mínimo de 200 pmoles, los cristales con 4 zonas de hibridación (formato 4x), por ser de menor superficie, necesitan menos de 50 pmoles de marcaje.

5. CONCLUSIONES

1. Las cajas ARG son las dianas de unión de ArgR y están constituidas por una secuencia palindrómica de 20 pb, donde las posiciones más conservadas son las 4, 6, 13 y 15. Es suficiente una única caja o incluso media caja ARG para que ArgR se una *in vitro*.
2. Para la unión *in vitro* de ArgR a promotores con cajas ARG es prescindible la presencia de L-arginina.
3. El extremo amino de la proteína ArgR es insuficiente por sí solo para ejercer su función de represor transcripcional *in vivo* y tampoco reconoce a los promotores con cajas ARG *in vitro*.
4. La ausencia del gen *argR* en *S. coelicolor* crecido en medio MG afecta a la transcripción de 1544 genes cuando se utiliza un valor $p < 0,01$. En muchos casos el efecto se debe a la unión directa de ArgR a cajas ARG.
5. ArgR regula el metabolismo de arginina y otros aminoácidos, de purinas y pirimidinas y afecta al metabolismo del nitrógeno. Este control es directo en muchos casos pero a veces es indirecto a través de la regulación de la expresión de reguladores, factores sigma y anti-sigma.
6. Las cepas mutantes en el gen *argR*, *S. coelicolor* $\Delta argR$ y *S. coelicolor* *argR::apra*, tienen la actividad ornitina carbamoiltransferasa desreprimida respecto de la cepa parental *S. coelicolor* M145.
7. La producción de undecilprodigiosina (RED) disminuye y la de actinorrodina (ACT) desaparece en el mutante *S. coelicolor* $\Delta argR$. La causa es la reducción de los transcritos de los genes *red* y *act*. La ausencia de ArgR también disminuye los niveles de los transcritos de las agrupaciones génicas para el poliquétido de tipo I CPK y el antibiótico dependiente de calcio CDA.
8. ArgR afecta a la expresión de genes que codifican distintas proteínas de secreción y proteínas de membrana, así como a genes implicados en la formación de estructuras celulares, morfología y esporulación. Afecta a la expresión de múltiples sistemas de dos componentes y transportadores ABC, a la síntesis de coenzimas, y a muchos genes implicados en la producción y conversión de energía, el transporte y metabolismo de carbohidratos y lípidos, entre otras funciones.

6. ANEXOS

6.1. Listado de cebadores

Nombre cebador	Secuencia 5'-3'	Uso
6FAM-Directo	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	Oligo directo para amplificar sondas marcadas con 6-FAM para EMSA a partir de las construcciones en pBluescript SK ⁺
6FAM-Reverso	CAGGAAACAGCTATGAC	Oligo reverso para amplificar sondas marcadas con 6-FAM para EMSA a partir de las construcciones en pBluescript SK ⁺
Directo	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	Oligo directo para amplificar sondas sin marcar para EMSA a partir de las construcciones en pBluescript SK ⁺
Reverso	CAGGAAACAGCTATGAC	Oligo reverso para amplificar sondas sin marcar para EMSA a partir de las construcciones en pBluescript SK ⁺
LUX-FAM +47	GATAGCTCAGGTGGCTGATAAG	Oligo directo para amplificar sondas marcadas con 6-FAM para EMSA a partir de las construcciones en pLUXARneo
LUX-FAM +135	GTGGTGCTCTAGCAACCAAAC	Oligo reverso para EMSA a partir de las construcciones en pLUXARneo
Alma1	<u>AAGCTT</u> GGGTGACCAGGAGCGCGGG GAACT	Oligo reverso para expresión de <i>argR</i> en pGEX2T
Alma2	<u>GGATCC</u> AGCCACGCGCAGGAGCACG AG	Oligo directo para expresión de <i>argR</i> y <i>argR_N</i> en pGEX2T
Alma3	<u>AAGCTT</u> GCCGCATCCGCTCCTCCTTC	Oligo reverso para expresión de <i>argR_N</i> en pGEX2T
ArgR11	<u>CATATG</u> TGGAGCCACCCGAGTTCG AAAAGAGCCACGCGCAGGAGCACGA GCAGCCGGC	Oligo directo para la construcción pET-Stre $\text{p}argR$ carente de nt flanqueantes al sitio de restricción
ArgR13	<u>AAGCTT</u> TGACCAGGAGCGCGGGGAA C	Oligo reverso para la construcción pET-Stre $\text{p}argR$ carente de nt flanqueantes al sitio de restricción
ArgR14	<u>AAGCTT</u> CACTTTTCGAACTGCGGGT GGCTCCAGCCCCGTTCTGGGCAAG C	Oligo directo para la construcción pET- <i>argR</i> Strep carente de nt flanqueantes al sitio de restricción
ArgR16	<u>CATATG</u> AGCCACGCGCAGGAGCACG	Oligo reverso para la construcción pET- <i>argR</i> Strep carente de nt flanqueantes al sitio de restricción
ArgR17	<u>GGGGAATTC</u> CATATGTGGAGCCAC CCGAGTTCGAAAAGAGCCACGCGC AGGAGCACGAGCAGC	Oligo directo para la construcción del plásmido pET-Stre $\text{p}argR$
ArgR18	<u>CGGCGGAAGCTT</u> TGACCAGGAGCG CGGGGAAC	Oligo reverso para la construcción del plásmido pET-Stre $\text{p}argR$
ArgR19	<u>CGTGCCAAGCTT</u> CACTTTTCGAAC TGCGGGTGGCTCCAGCCCCGTTCTG GGCCAAGC	Oligo directo para la construcción pET- <i>argR</i> Strep
ArgR20	<u>AATGAAATTC</u> CATATGAGCCACGCGC AGGAGCACG	Oligo reverso para la construcción pET- <i>argR</i> Strep
ArgR21	<u>CGGCGGAAGCTT</u> TCAGAGGTTTCGCC GACGCTCCGCGGAGAT	Oligo reverso para la construcción pET-Stre $\text{p}argRN$
CAR140	ACACCGAGGATGTGGCCG	Oligo directo para análisis por Q-PCR de SCO0464
CAR141	CGAACTGGAGGCGCTCGT	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de SCO0464
CAR142	GGTGCGGTGGACCAGGGA	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>glpK2</i>
CAR143	GCGCGGGAGGATCTGCTC	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>glpK2</i>
CAR144	ACGGCCCGTACGAGATCC	Oligo directo para análisis por Q-PCR de SCO0524
CAR145	CCAGACCAGCTGACGCCA	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de SCO0524
CAR146	CGCCACGTCGGTAGAGGA	Oligo directo para análisis por Q-PCR de SCO0870
CAR147	GAGCTGATGACCCGCGAG	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de SCO0870
CAR148	GCCGGGCGAGGTGCTCGT	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>inhA</i>
CAR149	CCGCGAAGCTGGCCAGG	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>inhA</i>

CAR150	TTCGTGGCGGCCCGTCC	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>chpA</i>
CAR151	CGCCGCGACGGGCATCCT	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>chpA</i>
CAR152	GGACCAGGGCCACCCGCG	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>actVAI</i>
CAR153	GCGCCCAGGCCCTGCTCG	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>actVAI</i>
CAR154	GTCCAGGCCGAAGGTGTC	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>whiE</i> ORF V
CAR155	GGTGACCGTCGAGGAGCT	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>whiE</i> ORF V
CAR156	CGAACGGCGGCTGATCTG	Oligo directo para análisis por Q-PCR de SCO5658
CAR157	TCGAAGGCCTCCAGCGTG	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de SCO5658
CAR158	GCCGAGGACGGAGGTGCC	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>recX</i>
CAR159	GGTCCCGGTGAGCAGGCG	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>recX</i>
CAR160	CCGGCGCGAGCTGGACTC	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>redW</i>
CAR161	GTCCAGTCCGCTGCCGCC	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>redW</i>
CAR162	AGCCCTTCCAAC TCCCGC	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>geoA</i>
CAR163	CCCTCCAGCATGCCCATC	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>geoA</i>
CAR164	GCGGCGATCAACCCCTTC	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>gcl</i>
CAR165	TAGCCCTCGGCCATGTGC	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>gcl</i>
CAR166	CGCCCTTCCTCCGAGA	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>dcdA</i>
CAR167	CGCAGCCGGTGCATCTGG	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>dcdA</i>
CAR168	GCTCGAAGATCGAGGTCC	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>ccr</i>
CAR169	GATCCACCTGGACGACGT	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>ccr</i>
CAR170	ACCTCGGACAGCAGCTGC	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>tktA2</i>
CAR171	GGTTGGCCAGCAGTACGG	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>tktA2</i>
CAR172	AGGTGCGGATCCTCAAGG	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>gvpF</i>
CAR173	TCAGCACGTTCTGGTGGG	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>gvpF</i>
CAR174	TACCACCCAGTCCGCCCA	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>sigM</i>
CAR175	CGTGACGAGTTCGTCGCG	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>sigM</i>
CAR176	AAGGTGGTCCGGACGGTG	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>pepA</i>
CAR177	GAAGAGCGAAGTCGCCCC	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>pepA</i>
CAR178	CGTGCTCCAGCGCCTGTC	Oligo directo para análisis por Q-PCR de SCO7412
CAR179	AACTCCGGGTCCCCGTCC	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de SCO7412
CAR180	GTGCGTCACCTCGAAGTG	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>kata2</i>
CAR181	ACGCTACCTCATCGAGC	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>kata2</i>
CAR182	GCCCGACCTCAGCGTCTT	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>ectB</i>
CAR183	GTACATGCGGCTGCCGAC	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>ectB</i>
CAR184	TGCTGGAGAGGCCGACGG	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>lexA</i>
CAR185	CAGCGCCGGGTGATCGAG	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>lexA</i>
CAR186	GTACGCTCCCGCCGAGA	Oligo directo para análisis por Q-PCR de <i>hrdB</i>
CAR187	GAAGGCCCGACGCACGTC	Oligo reverso para análisis por Q-PCR de <i>hrdB</i>
Coe_argR-5	GCTCAGGACGCCGAATC	Oligo reverso para diferenciar entre la cepa <i>S. coelicolor</i> M145, <i>S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> y <i>S. coelicolor</i> <i>apra::argR</i>
Coe_argR-4	ACCGGTGCTGTCGCTGAGGTAC	Oligo directo para diferenciar entre la cepa <i>S. coelicolor</i> M145, <i>S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> y <i>S. coelicolor</i> <i>apra::argR</i>
CRP13	<u>CCCAGGATCC</u> GCCGTCTATGCGCTC ATAAG	Oligo directo para clonación del promotor de <i>argH</i> para luciferasa y EMSA
CRP14	TGCT <u>CATATG</u> GGTCGCTCCTCACCG TACGATC	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>argH</i> para luciferasa y EMSA
CRP17	GATGGT <u>CATATG</u> GAGCACTCCCTCG CTCGGCACGG	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>nrda</i> para luciferasa y EMSA
CRP18	<u>GGGCGGATCC</u> CTGTGCGACGCAGGCC	Oligo directo para clonación del promotor de <i>nrda</i> para

	GCCAT	luciferasa y EMSA
CRP19	CGATCATATG TCAGTCAATGACTTT TCAGGTG	Oligo reverso para clonación del promotor de SCO1086 para luciferasa y EMSA
CRP20	GCGGGATCC TCCGCTTCTACTTCT GGGA	Oligo directo para clonación del promotor de SCO1086 para luciferasa y EMSA
CRP21	GATCATATG ACCAATTCTCTCAGAC CCGCG	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>hisD</i> para luciferasa y EMSA de la región intergénica <i>hisD</i> -SCO2055
CRP22	GCGGATCC CTTCGGTCACGGTGCTT C	Oligo directo para clonación del promotor de <i>hisD</i> para luciferasa y EMSA de la región intergénica <i>hisD</i> -SCO2055
CRP23	CGGTCATATG CGCCCCTCGTCTGTC TTTCG	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>whiB</i> para luciferasa y EMSA
CRP24	GCGGATCC GCGTGTATCGGAACGGG ATC	Oligo directo para clonación del promotor de <i>whiB</i> para luciferasa y EMSA
CRP25	GCTGCATATG TCAGGCTCCGTAAGG CGATTC	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>pyrB</i> para luciferasa y EMSA
CRP26	GCGGATCC TACGTCCGCAAGAACCT C	Oligo directo para clonación del promotor de <i>pyrB</i> para luciferasa y EMSA
CRP27	CGATCATATG GACGGACTGGATATC GGTGCG	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>pyrA</i> para EMSA
CRP28	CCGGATCC GGCACCTTCAAGCTGAA G	Oligo directo para clonación del promotor de <i>pyrA</i> para EMSA
CRP29	CACCCATATG ATGTCGGGCCCTTCG AGAAC	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>pyrR</i> para luciferasa y EMSA
CRP30	GCGGATCC TATGGCTCCCCGGACAA G	Oligo directo para clonación del promotor de <i>pyrR</i> para luciferasa y EMSA
CRP31	GTGGCCATATG GGCGTGGGCTCCT CGTGATGTC	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>leuA</i> -SCO2529 para luciferasa y EMSA
CRP32	GTGGATCC ACTGTCACTACCCGCAA C	Oligo directo para clonación del promotor de <i>leuA</i> -SCO2529 para luciferasa y EMSA
CRP33	GGCGCATATG TCGAGCCTATGACTT ACTGCCGGGTAG	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>pyk1</i> para luciferasa y EMSA de la región intergénica <i>pyk1</i> -SCO2015
CRP34	GCGGATCC CAACGGCATGGCTGATT C	Oligo directo para clonación del promotor de <i>pyk1</i> para luciferasa y EMSA de la región intergénica <i>pyk1</i> -SCO2015
CRP35	CCGAATTC TGACCCGCGTTGGAGTT G	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>argC</i> para EMSA
CRP36	TCCGATCC ACGACCAGCTCGACGAT C	Oligo directo para clonación del promotor de <i>argC</i> para EMSA
CRP37	CCGAATTC ATGTCGGGCTCGTCGTA C	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>argG</i> para EMSA
CRP38	GCGGATCC GATCGAGGAGTTCCTGG AGTAC	Oligo directo para clonación del promotor de <i>argG</i> para EMSA
CRP39	CCGCCATATG GGCGCTCCAGAGGTG CAGGTC	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>arcB</i> para luciferasa y EMSA
CRP40	CCGGATCC AACAGGGCATCGAGGTG A	Oligo directo para clonación del promotor de <i>arcB</i> para luciferasa y EMSA
CRP41	CCGGATCC GTCGGGCGACGTGAACG TAAC	Oligo directo para clonación del promotor de <i>malR</i> para EMSA
CRP42	TGGTCATATG GGTGGACTGTACCTG TCGGCC	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>malR</i> para EMSA
CRP43	CCGGATCC CCGAGGATGTTGCTTT G	Oligo directo para clonación del promotor de SCO5864 para EMSA
CRP44	TTGCCATATG CGCTCTCCCCCTCTGG GTGTC	Oligo reverso para clonación del promotor de SCO5864 para EMSA
CRP45	TGCTGAAGCTT GCCGATAGTAGGGC TCATGG	Oligo directo para clonación del promotor de <i>rstP</i> para EMSA

CRP46	CGGGATCC GTGAGTTGAGACCTCTT C	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>rstP</i> para EMSA
CRP47	TCGGATCC TCAACCGTCTGGCCTT C	Oligo reverso para clonación del promotor SCO4293 para EMSA
CRP48	CAGTCATATG GCTCCTCCTATCAGA GGTCGACGGCGGCGTCGGTG	Oligo directo para clonación del promotor SCO4293 para EMSA
CRP49	CAGTCATATG GCTCCTCCTATCAGA ACGCCGCGGGACGAGG	Oligo directo para clonación del promotor de <i>ecrA2</i> para EMSA
CRP50	CAGGATCC TACCCGACGACGGCACC G	Oligo reverso para clonación del promotor de <i>ecrA2</i> para EMSA
FAM-CRP51	GATCGTCGCAGAGGCGGAAG	Oligo directo marcado con 6-FAM para EMSA del promotor de SCO2209
CRP52	ACCTCCACGGTGACCCTGGC	Oligo reverso para EMSA del promotor de SCO2209
FAM-CRP53	GAGGTGGTGCCTGGTCATG	Oligo directo marcado con 6-FAM para EMSA del promotor de SCO7303
CRP54	TCGACAGCTCCTCGATC	Oligo reverso para EMSA del promotor de SCO7303
FAM-CRP55	TACCCAGTTCCTTGATC	Oligo directo marcado con 6-FAM para EMSA del promotor de SCO4159
CRP56	GGCGAGAAGAGCGATAAG	Oligo reverso para EMSA del promotor de SCO4159
FAM-CRP57	GAGGGCAACTCGACCGGATG	Oligo directo marcado con 6-FAM para EMSA del promotor de SCO3979
CRP57	GAGGGCAACTCGACCGGATG	Oligo directo para EMSA del promotor de SCO3979
CRP58	ATGCCACCGCGTCGTAC	Oligo reverso para EMSA del promotor de SCO3979
FAM-CRP59	GGGCATCTGGATGTCGAGGAAG	Oligo directo marcado con 6-FAM para EMSA del promotor de SCO1220
CRP59	GGGCATCTGGATGTCGAGGAAG	Oligo directo para EMSA del promotor de SCO1220
CRP60	TCCGATCTCCGCGCCGATC	Oligo reverso para EMSA del promotor de SCO1220
FAM-CRP63	CCCCCTGGACAGTGCAAG	Oligo directo marcado con 6-FAM para EMSA del promotor de SCO0452
CRP64	GTGGGCGGTGAAGTCTTG	Oligo reverso para EMSA del promotor de SCO0452
CRP65	GCATCACCGTGGTCGTTT	Oligo directo para clonación del promotor de SCO7341 para EMSA
CRP66	CCATGCCGTGACGAGTTC	Oligo reverso para clonación del promotor de SCO7341 para EMSA
CRP67	CAGCCCCTGCTCGGTGAAC	Oligo directo para clonación del promotor de SCO3769 para EMSA
CRP68	GAAGCGGAGTGCCGGATG	Oligo reverso para clonación del promotor de SCO3769 para EMSA
CRP69	TCCCGTACCTCGACCAGAAG	Oligo directo para clonación del promotor de SCO3067 para EMSA
CRP70	AGCCGGGGTGACATGATG	Oligo reverso para clonación del promotor de SCO3067 para EMSA
CRP71	GAAGACCCAGGCTCGTCAAG	Oligo directo para clonación del promotor de SCO2686 para EMSA
CRP72	AAAGGCGCGGTCTTGAAC	Oligo reverso para clonación del promotor de SCO2686 para EMSA
CRP73	CGTAGGGGCTCTCCGAGAAC	Oligo directo para clonación de la región intergénica SCO0800-SCO0801 para EMSA
CRP74	TCGCTCCCACGACGTCTC	Oligo reverso para clonación de la región intergénica SCO0800-SCO0801 para EMSA
CRP75	GCCCGCACAGCATAGGAAAAG	Oligo directo para analizar por Q-PCR el promotor del gen <i>argC</i> para ChIP-chip
CRP76	CGCTTTCGTGTCCGCCCT	Oligo reverso para analizar por Q-PCR el promotor del gen <i>argC</i> para ChIP-chip

CRP77	CACCGCTGTTGCTGCTCACTTG	Oligo directo para analizar por Q-PCR el promotor del gen SCO1086 para ChIP-chip
CRP78	GATTATGCGGGTGC GGGA	Oligo reverso para analizar por Q-PCR el promotor del gen SCO1086 para ChIP-chip
CRP79	CCGGTTGAGGATGTCCAC	Oligo directo para para amplificar el supuesto promotor de ArgR para EMSA
CRP80	GGACTGCTCCTGGGTATC	Oligo reverso para para amplificar el supuesto promotor de ArgR para EMSA
6FAM-CRP81	TCCTCCTCTCCGCCGGGAATC	Oligo directo marcado con 6-FAM para EMSA del promotor de <i>afsR</i>
CRP81b	TCCTCCTCTCCGCCGGGAAT	Oligo directo para EMSA del promotor de <i>afsR</i>
CRP82	CCTCCCCGCCTCAACAGCGT	Oligo reverso para EMSA del promotor de <i>afsR</i>
6FAM-CRP83	TGTGGCGTCCGCGTCCTTC	Oligo directo marcado con 6-FAM para EMSA del promotor de <i>afsS</i>
CRP83b	TGTGGCGTCCGCGTCCTTC	Oligo directo para EMSA del promotor de <i>afsS</i>
CRP84	CCGGAGCGTTCAGCGTTC	Oligo reverso para EMSA del promotor de <i>afsS</i>
ChIP1	GCAGGGCGGAGCTTCTCGGTG	Oligo directo para EMSA del promotor de <i>mhA</i>
6FAM-ChIP2	CGCGTCGGCGACCACCCA	Oligo reverso marcado con 6-FAM para EMSA del promotor de <i>mhA</i>
ChIP3	AGGCTGCCGCGGAGCGA	Oligo directo para EMSA del promotor bidireccional <i>absR1-absR2</i>
6FAM-ChIP4	CCACGGACCCGCGCACCA	Oligo reverso marcado con 6-FAM para EMSA del promotor bidireccional <i>absR1-absR2</i>
6FAM-ChIP5	CGAGGACGTCGAGGTCTCC	Oligo directo marcado con 6-FAM para EMSA del promotor bidireccional SCO3303- <i>argS</i>
ChIP6	GCTGCCACAGATCGAGGG	Oligo reverso para EMSA del promotor bidireccional SCO3303- <i>argS</i>
6-FAM-ChIP7	TGGCCGTTTCAGTCTCCG	Oligo directo marcado con 6-FAM para EMSA del promotor bidireccional SCO2344-SCO2345
ChIP8	GGTGTGTCCGCCGCCCT	Oligo reverso para EMSA del promotor bidireccional SCO2344-SCO2345
ChIP9	GGTTTCATGCTAGGGCAGG	Oligo directo para EMSA del promotor bidireccional SCO6144-SCO6145
6FAM-ChIP10	CTGTTCCGGTGGCGTGCTC	Oligo reverso marcado con 6-FAM para EMSA del promotor bidireccional SCO6144-SCO6145
ChIP13	GGGGTACCCGGTGGCTGC	Oligo directo para EMSA del promotor SCO3774
6FAM-ChIP14	TCGAGCATGGCCGCGAGC	Oligo reverso marcado con 6-FAM para EMSA del promotor SCO3774
ChIP15	CGTATGACCCGCCCGGACA	Oligo directo para EMSA del promotor SCO0454
6FAM-ChIP16	AGACCAGCGCGGGCACCG	Oligo reverso marcado con 6-FAM para EMSA del promotor SCO0454
ChIP17	CGGCCGAGGTCCACTGCG	Oligo directo para EMSA del promotor bidireccional SCO1417-SCO1418
6FAM-ChIP18	CCAGCAGCGCCGAACCTCG	Oligo reverso marcado con 6-FAM para EMSA del promotor bidireccional SCO1417-SCO1418
ChIP19	CGGTACGGCCTCAACACAT	Oligo directo para EMSA del promotor bidireccional <i>trkA-redD</i>
6FAM-ChIP20	CGTTCTCCGACTCCCAT	Oligo reverso marcado con 6-FAM para EMSA del promotor bidireccional <i>trkA-redD</i>
6FAM-ChIP23	CGCGTGGGGACGAGGACGG	Oligo directo marcado con 6-FAM para EMSA del promotor bidireccional SCO4301-SCO4302
ChIP24	GAGGGCCTGCCGACAGGA	Oligo reverso para EMSA del promotor bidireccional SCO4301-SCO4302
ChIP25	TTCGGCAACGGCAACGGC	Oligo directo para EMSA del promotor <i>pfkA3</i>

6FAM-ChIP26	AGCCGTCCCGGAAACCGA	Oligo reverso marcado con 6-FAM para EMSA del promotor <i>pfkA3</i>
PargR21	GGTCATATGCGTCTCATTCTCCGGA TCGTCCGTCCCGTGGGCCGTCTCGG CGGCCTGGTCAAGGATGCTCACAGC TCACCGCCCGCATA	Oligo directo para amplificar el promotor de fusión de <i>argR</i> y <i>argC</i>
PargR22	GCTGCTGCAGCCTCAGCCGACGAC CAGCT	Oligo reverso para amplificar el promotor de fusión de <i>argR</i> y <i>argC</i>
RT-afsR-21	ACGCCACACCGCAGGACAAC	Oligo reverso para RT-PCR de <i>afsR</i>
RT-afsR-22B	TCGTGGTGATCGCTTCGTTC	Oligo directo para RT-PCR de <i>afsR</i>
RT-SCO1581_43	ATGCGATGCGGGGTGACCTCGAG	Oligo directo para RT-PCR de SCO1581
RT-SCO1581_44	CGGCCCGTCCACTCGCAGT	Oligo reverso para RT-PCR de SCO1581
RT-argC-1	GGTGGCCGGAGCGAGTGGGTATG	Oligo directo para RT-PCR de <i>argC</i>
RT-argC-2	CAGGGAGACGGCCGTGGGGTAGCA	Oligo reverso para RT-PCR de <i>argC</i>
RT-argG-7	GCGGGCGGGCGTACTTCAACACCA	Oligo directo para RT-PCR de <i>argG</i>
RT-argG-8	ATGCCGGGCGCCTCGTAGATGC	Oligo reverso para RT-PCR de <i>argG</i>
RT-argH-5	GGATGATCGCCGGACTGGAC	Oligo directo para RT-PCR de <i>argH</i>
RT-argH-6	CCGGCTGGGCGTGTGGAGGTG	Oligo reverso para RT-PCR de <i>argH</i>
RT-argR-3	ACACCGACGGCGACCTCATCTACG	Oligo directo para RT-PCR de <i>argR</i>
RT-argR-4	TGGGCCAAGCGCAGCAAGTG	Oligo reverso para RT-PCR de <i>argR</i>
RT-cpkI-33	TGACTGCCCTACGAACAAG	Oligo directo para RT-PCR de <i>cpkI</i>
RT-cpkI-34	TGACACCGGAGGAGATGTTG	Oligo reverso para RT-PCR de <i>cpkI</i>
RT-cpkJ-31	TCGACACACCCGGCTACTAC	Oligo directo para RT-PCR de <i>cpkJ</i>
RT-cpkJ-32	CGGAGACCTTGCTCTGAAG	Oligo reverso para RT-PCR de <i>cpkJ</i>
RT-chpC-29	GCAAGGGCCTGATGACGATG	Oligo directo para RT-PCR de <i>chpC</i>
RT-chpC-30	TCGGCACCTCGACGTGGTTG	Oligo reverso para RT-PCR de <i>chpC</i>
RT-chpE-27	AGGCAGCGGCCGTGACGATG	Oligo directo para RT-PCR de <i>chpE</i>
RT-chpE-28B	TGACGCCCAGGTTGCCGAAG	Oligo reverso para RT-PCR de <i>chpE</i>
RT-glnA-41	ACGCCGACGACGTCGAAGAAG	Oligo directo para RT-PCR de <i>glnA</i>
RT-glnA-42	GGAAGTAGCCGCCCTTGATG	Oligo reverso para RT-PCR de <i>glnA</i>
RT-glnII-39	CCAAGCTCCGTTCCAAGACGAAG	Oligo directo para RT-PCR de <i>glnII</i>
RT-glnII-40	GCATGACCTCGGCGTTGATG	Oligo reverso para RT-PCR de <i>glnII</i>
RT-glnK-37	ACCGGCTCGACGAGATCAAG	Oligo directo para RT-PCR de <i>glnK</i>
RT-glnK-38	TCGCCGGTCCACCCGTAC	Oligo reverso para RT-PCR de <i>glnK</i>
RT-nrdS-39	ACGATGTGCAGGCAGGCATC	Oligo directo para RT-PCR de <i>nrdS</i>
RT-nrdS-40	TCTGCGAGGTCTTCGGCATC	Oligo reverso para RT-PCR de <i>nrdS</i>
RT-pyr1485-11	CCTTCCGTTTCCGTCTTGTTG	Oligo directo para RT-PCR de SCO1485
RT-pyr1485-12B	TCTTCGTGCGCTCGTCTAC	Oligo reverso para RT-PCR de SCO1485
RT-pyrA-13	TGTCGTTCTTGTCGCGCATC	Oligo directo para RT-PCR de <i>pyrA</i>
RT-pyrA-14B	TCATGACCGACCCGGAGATC	Oligo reverso para RT-PCR de <i>pyrA</i>
RT-pyrR-10B	GCTGGAGCAGATCACCGAAC	Oligo reverso para RT-PCR de <i>pyrR</i>
RT-pyrR-9	GGAGGTTCTTGCCGACGTAG	Oligo directo para RT-PCR de <i>pyrR</i>
RT-rdlA-23	CGGCTGCCGCTTCTGTGATC	Oligo directo para RT-PCR de <i>rdlA</i>
RT-rdlA-24B	GGATCGGCACGAGGTTGATG	Oligo reverso para RT-PCR de <i>rdlA</i>
RT-scbR-19	GCAGGTCTTCGAGAAGCAGGGCTAC	Oligo directo para RT-PCR de <i>scbR</i>
RT-scbR-20B	TGACCACATGGGGCAGCAAC	Oligo reverso para RT-PCR de <i>scbR</i>

RT-<i>whiB</i>-35	ATGACCGAGCTGGTGCAGCAAC	Oligo directo para RT-PCR de <i>whiB</i>
RT-<i>whiB</i>-36	TTCTTGAGACGGCGGCGTTC	Oligo reverso para RT-PCR de <i>whiB</i>
RT-<i>hrdB</i>	ACGCCCCGGCCCAGCAGTC	Oligo directo para RT-PCR de <i>hrdB</i>
RT-<i>hrdB</i>	CAGGTGGCGTACGTGGAGAACTTGT	Oligo reverso para RT-PCR de <i>hrdB</i>

Anexo 1. Listado de cebadores utilizados a lo largo de este trabajo. En negrita se representa aquella parte de la secuencia que no hibrida con el ADN. En aquellos casos en los que se han introducido sitios de corte para enzimas de restricción, estos se subrayan.

6.2. Transcriptómica serie temporal

SCO	Producto	Nombre del gen	Mc <i>S. coelicolor</i> Δ argR – Mc <i>S. coelicolor</i> M145					Valor p <i>S. coelicolor</i> Δ argR – valor p <i>S. coelicolor</i> M145				
			32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h
(1) Aminoácidos												
SCO1569	putative oxidoreductase		1,529	1,981	1,920	1,730	1,569	0	0	0	0	0
SCO1570	argininosuccinate lyase	<i>argH</i>	3,119	4,787	4,424	4,173	4,547	0	0	0	0	0
SCO1572	putative secreted protein		0,614	1,196	1,224	1,159	0,487	0,001	0	0	0	0,004
SCO1576	arginine repressor	<i>argR</i>	-2,55	-2,10	-2,10	-1,99	-1,87	0	0	0	0	0
SCO1577	acetonitrile aminotransferase	<i>argD</i>	3,470	5,006	4,980	4,965	4,702	0	0	0	0	0
SCO1578	acetylglutamate kinase	<i>argB</i>	3,526	5,223	4,863	4,707	4,968	0	0	0	0	0
SCO1579	putative glutamate N-acetyltransferase	<i>argJ</i>	3,434	5,046	4,759	4,534	4,840	0	0	0	0	0
SCO1580	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	<i>argC</i>	3,538	5,248	5,053	4,970	4,842	0	0	0	0	0
SCO1581	putative membrane protein		1,948	2,929	1,976	1,736	2,488	0,003	0	0,002	0,009	0
SCO2927	putative 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	<i>hppD</i>	0,187	0,966	0,883	1,286	1,847	0,908	0,004	0,009	0,001	0
SCO5364	serine hydroxymethyltransferase	<i>glyA3</i>	0,280	1,196	1,086	0,492	0,294	0,444	0	0	0,060	0,27
SCO5976	ornithine carbamoyltransferase	<i>ArcB</i>	3,249	3,961	3,692	3,733	3,744	0	0	0	0	0
SCO5977	putative amino acid permease		2,116	1,996	2,251	2,781	2,048	0	0	0	0	0
SCO7035	succinate-semialdehyde dehydrogenase	<i>gabD</i>	1,105	1,345	1,183	1,062	0,27	0	0	0	0	0,379
SCO7036	argininosuccinate synthase	<i>argG</i>	2,893	4,192	4,054	3,946	4,325	0	0	0	0	0

SCO	Producto	Nombre del gen	Mc <i>S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> – Mc <i>S. coelicolor</i> M145					Valor <i>p S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> – valor <i>p S. coelicolor</i> M145				
			32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h
(2) Purinas y pirimidinas												
SCO0689	putative oxidoreductase, iron-sulphur binding subunit		-0,01	0,834	1,247	0,882	0,961	0,999	0,002	0	0,003	0,001
SCO0690	putative oxidoreductase, molybdopterin binding subunit		0,226	0,449	1,143	0,536	0,259	0,892	0,265	0,004	0,308	0,678
SCO0691	putative oxidoreductase		0,118	0,533	1,155	0,876	0,766	0,938	0,026	0	0,001	0,002
SCO1481	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	<i>pyrF</i>	1,713	2,121	2,491	2,421	2,995	0	0	0	0	0
SCO1482	dihydroorotate dehydrogenase	<i>pyrD</i>	1,625	1,752	2,116	2,342	2,542	0	0	0	0	0
SCO1483	carbamoylphosphate synthetase large chain	<i>pyrA</i>	2,043	3,145	2,906	2,733	3,216	0	0	0	0	0
SCO1484	carbamoyl-phosphate synthase, pyrimidine-specific, small chain	<i>pyrAa</i>	2,113	3,186	2,797	2,753	3,350	0	0	0	0	0
SCO1485	putative integral membrane protein		2,402	3,571	3,093	2,954	3,537	0	0	0	0	0
SCO1486	dihydroorotase	<i>pyrC</i>	1,952	3,199	2,960	2,795	3,230	0	0	0	0	0
SCO1487	aspartate carbamoyltransferase	<i>pyrB</i>	2,409	3,742	3,350	3,246	3,438	0	0	0	0	0
SCO1488	pyrimidine operon regulatory protein	<i>pyrR</i>	2,309	3,981	3,225	3,326	3,350	0	0	0	0	0
(3) Metabolismo del nitrógeno												
SCO2198	glutamine synthetase I	<i>glnA</i>	-2,66	1,382	0,08	-0,70	-0,36	0	0,022	0,913	0,438	0,728
SCO2210	glutamine synthetase	<i>glnII</i>	-6,49	1,382	0,478	0,224	-3,88	0	0,401	0,777	0,954	0,011
SCO2211	hypothetical protein SC10B7.06		-4,39	0,211	0,299	0,443	-2,42	0	0,813	0,690	0,711	0,001
SCO2241	probable glutamine synthetase		-1,00	0,102	0,154	0,311	-1,13	0,022	0,845	0,721	0,624	0,005
SCO2486	putative nitrite reductase NirB		-0,15	0,023	-0,40	0,116	-3,23	0,984	0,971	0,369	0,907	0
SCO2487	putative nitrite reductase large subunit NirB		-0,21	-0,04	0,00	0,42	-3,26	0,920	0,948	0,998	0,500	0
SCO2488	putative nitrite reductase small subunit NirC		-0,48	0,08	-0,30	0,41	-4,40	0,816	0,937	0,688	0,732	0

SCO	Producto	Nombre del gen	Mc <i>S. coelicolor</i> Δ argR – Mc <i>S. coelicolor</i> M145					Valor p <i>S. coelicolor</i> Δ argR – valor p <i>S. coelicolor</i> M145				
			32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h
SCO2489	putative tetR-family transcriptional regulator		-0,25	-0,06	-0,10	-0,20	-2,00	0,638	0,865	0,709	0,638	0
SCO2959	putative nitrate extrusion protein		-0,28	-0,09	0,02	0,06	-1,61	0,355	0,710	0,951	0,903	0
SCO4947	nitrate reductase alpha chain NarG3	<i>narG3</i>	-0,94	-1,95	-0,61	-0,95	-1,20	0,182	0,001	0,258	0,171	0,033
SCO4949	nitrate reductase delta chain NarJ3	<i>narJ3</i>	-1,00	-2,04	-0,94	-1,19	-1,38	0,087	0	0,047	0,032	0,007
SCO4950	nitrate reductase gamma chain NarI3	<i>narI3</i>	-1,64	-2,45	-0,79	-1,35	-1,33	0,027	0	0,224	0,079	0,053
SCO5583	ammonium transporter	<i>amtB</i>	-5,45	0,898	0,473	0,224	-2,98	0	0,553	0,748	0,947	0,028
SCO5584	nitrogen regulatory protein P-II	<i>glnK</i>	-4,83	0,990	0,370	0,052	-3,10	0	0,499	0,804	0,988	0,019
SCO5585	putative protein pII uridylyltransferase	<i>glnD</i>	-3,03	0,318	-0,06	0,005	-2,44	0	0,786	0,956	0,999	0,010
(4) Estructura ribosomal, recombinación y reparación												
SCO0569	putative 50S ribosomal protein L36		-0,32	2,079	0,931	-0,37	-0,85	0,913	0,001	0,098	0,721	0,195
SCO0570	50S ribosomal protein L33	<i>rpmG</i>	-0,25	1,364	0,871	-0,33	-0,80	0,936	0,007	0,073	0,709	0,148
SCO1958	ABC excision nuclease subunit A	<i>uvrA</i>	0,047	0,430	0,205	0,692	0,231	0,999	0,031	0,304	0,002	0,351
SCO1966	ABC excision nuclease subunit B	<i>uvrB</i>	0,211	0,448	0,447	0,826	1,014	0,908	0,262	0,229	0,059	0,009
SCO2510	conserved hypothetical protein SCC121.13c	<i>recO</i>	-0,36	-0,51	-0,50	-0,46	-0,21	0,072	0,003	0,004	0,015	0,295
SCO3428	putative 50S ribosomal protein L33	<i>rpmG</i>	-0,12	1,696	0,919	-0,45	-0,91	0,999	0,002	0,083	0,617	0,126
SCO4820	putative serine/threonine protein kinase	<i>pk28</i>	-0,13	-0,54	-0,37	-0,31	-0,34	0,760	0,002	0,026	0,134	0,053
SCO5566	putative ATP-dependent DNA helicase	<i>recG</i>	0,282	0,258	0,278	0,479	0,542	0,193	0,130	0,085	0,010	0,002
SCO5770	RecX, putative regulatory protein	<i>recX</i>	-0,25	0,798	0,720	1,211	0,704	0,719	0,007	0,014	0	0,019
SCO5803	SOS regulatory protein	<i>lexA</i>	0,312	1,426	0,767	0,919	0,043	0,663	0	0,020	0,015	0,960

SCO	Producto	Nombre del gen	Mc <i>S. coelicolor</i> Δ argR – Mc <i>S. coelicolor</i> M145					Valor p <i>S. coelicolor</i> Δ argR – valor p <i>S. coelicolor</i> M145				
			32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h
(5) Metabolismo de coenzimas												
SCO1243	8-amino-7-oxonanoate synthase	<i>bioF</i>	- 0,19	-0,49	-0,22	0,025	-0,09	0,446	0,002	0,137	0,949	0,723
SCO1244	biotin synthase	<i>bioB</i>	-0,79	-1,06	-0,30	-0,02	0,518	0,018	0,001	0,304	0,977	0,102
SCO1245	adenosylmethionine-8-amino-7-oxonanoateaminotransferase	<i>bioA</i>	-1,35	-1,39	0,030	-0,02	0,612	0	0	0,942	0,987	0,071
SCO1246	dethiobiotin synthetase	<i>bioD</i>	-0,84	-0,73	-0,30	-0,12	0,353	0	0	0,126	0,728	0,095
SCO1523	Pyridoxal biosynthesis lyase pdxS	<i>pdxS</i>	0,143	0,703	2,072	1,122	1,572	0,999	0,315	0,002	0,172	0,019
SCO2238	NAD(+) synthase (glutamine-hydrolysing)	<i>nadE</i>	-1,52	-0,31	-0,14	0,154	-1,74	0,001	0,489	0,740	0,844	0
(6) Estructura y morfología												
SCO0585	putative ATP/GTP binding protein	<i>cvnD11</i>	0,683	1,960	-0,33	0,082	-1,54	0,525	0,002	0,609	0,959	0,014
SCO0586	conserved hypothetical protein SCF55.10c	<i>cvnC11</i>	0,655	2,150	-0,06	0,169	-1,59	0,492	0	0,934	0,892	0,006
SCO0587	conserved hypothetical protein SCF55.11c	<i>cvnB11</i>	0,266	1,817	-0,10	0,015	-1,60	0,905	0	0,868	0,990	0,001
SCO0588	putative sensor kinase	<i>cvnA11</i>	0,395	1,353	-0,02	0,119	-1,36	0,492	0	0,971	0,865	0
SCO0591	putative lysozyme precursor		0,470	3,153	0,787	0,164	-0,08	0,466	0	0,037	0,832	0,938
SCO0649	putative gas vesicle synthesis protein.	<i>gvpO</i>	0,328	3,008	1,143	0,467	-0,18	0,856	0	0,021	0,557	0,870
SCO0650	putative gas vesicle synthesis protein.	<i>gvpA</i>	0,274	3,122	1,713	0,522	1,138	0,868	0	0	0,414	0,011
SCO0651	putative gas vesicle synthesis protein	<i>gvpF</i>	0,230	1,843	0,510	0,216	0,035	0,799	0	0,092	0,681	0,967
SCO0652	putative gas vesicle synthesis protein.	<i>gvpG</i>	0,632	2,872	1,248	0,227	0,106	0,381	0	0,009	0,803	0,929
SCO0653	conserved hypothetical protein SCF91.13		0,023	1,157	-0,16	0,047	-0,01	0,999	0,004	0,715	0,964	0,992
SCO0654	conserved hypothetical protein SCF91.14.		0,224	2,443	0,979	0,211	0,204	0,909	0	0,015	0,781	0,790
SCO1489	BldD, transcriptional regulator of developmental genes	<i>bldD</i>	0,329	0,778	0,621	0,414	0,183	0,230	0	0,004	0,086	0,525

SCO	Producto	Nombre del gen	Mc <i>S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> – Mc <i>S. coelicolor</i> M145					Valor <i>p S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> – valor <i>p S. coelicolor</i> M145				
			32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h
			SCO1541	SsgA-like protein	<i>ssgB</i>	1,211	4,936	1,902	-0,01	-1,26	0,056	0
SCO2082	cell division protein	<i>ftsZ</i>	0,307	0,678	0,093	0,048	-0,16	0,244	0,001	0,658	0,915	0,578
SCO2451	putative rod shape-determining protein		0,002	1,625	0,518	-0,23	0,078	1	0	0,217	0,774	0,947
SCO2716	putative secreted protein	<i>chpA</i>	3,918	4,953	2,124	1,431	0,310	0	0	0	0,015	0,734
SCO2717	putative small membrane protein	<i>chpD</i>	0,689	2,057	0,388	0,304	-1,10	0,609	0,003	0,592	0,822	0,141
SCO2718	putative secreted protein	<i>rdlA</i>	5,182	6,836	3,209	2,305	0,705	0	0	0	0,005	0,486
SCO2719	putative secreted protein	<i>rdlB</i>	4,621	5,711	2,595	1,667	0,496	0	0	0	0,018	0,596
SCO2786	beta-N-acetylhexosaminidase	<i>hexA</i>	0,345	0,305	-0,24	-0,28	-1,35	0,091	0,077	0,154	0,197	0
SCO3925	IclR-type transcriptional regulator of <i>ssgA</i>	<i>ssgR</i>	0,594	1,519	0,329	-0,15	-0,43	0,159	0	0,322	0,815	0,271
SCO3926	sporulation factor	<i>ssgA</i>	0,785	2,219	1,472	0,728	-0,67	0,127	0	0,001	0,164	0,139
SCO5046	hypothetical protein	<i>wbII</i>	0,068	0,391	-0,26	-0,74	-1,26	0,999	0,126	0,302	0,008	0
SCO5314	whiE protein VII	<i>whiE ORF VII</i>	0,333	5,188	2,766	0,383	0,223	0,942	0	0	0,768	0,890
SCO5315	polyketide cyclase	<i>whiE ORF VI</i>	0,469	2,869	1,951	0,814	0,034	0,741	0	0,001	0,306	0,983
SCO5316	acyl carrier protein	<i>whiE ORF V</i>	1,023	5,555	2,857	0,694	0,454	0,270	0	0	0,5	0,679
SCO5317	polyketide beta-ketoacyl synthase beta	<i>whiE ORF IV</i>	0,023	1,395	0,409	-0,08	-0,31	0,999	0,003	0,388	0,941	0,683
SCO5318	polyketide beta-ketoacyl synthase alpha	<i>whiE ORF III</i>	0,143	3,152	1,263	-0,18	0,024	0,995	0	0,008	0,851	0,985
SCO5319	whiE protein II	<i>whiE ORF II</i>	0,245	2,398	1,389	0,101	0,216	0,960	0	0,014	0,944	0,860
SCO5320	whiE protein I	<i>whiE ORF I</i>	0,083	2,182	0,777	0,101	0,030	0,999	0	0,073	0,928	0,981
SCO5321	polyketide hydroxylase	<i>whiE ORF VIII</i>	0,023	1,479	0,325	-0,02	-0,13	0,999	0	0,374	0,980	0,877
SCO5440	1,4-alpha-glucan branching enzyme	<i>glgBI</i>	-0,08	0,356	-0,14	-0,34	-1,27	0,999	0,263	0,676	0,458	0
SCO5441	hypothetical protein	<i>pep2A</i>	0,02	-0,11	-0,71	-0,22	-1,83	0,999	0,706	0,005	0,563	0
SCO5442	putative trehalose synthase		0,482	1,411	-0,15	-0,81	-2,69	0,296	0	0,673	0,028	0
SCO5443	putative alpha-amylase	<i>pep1A</i>	0,21	0,524	-0,58	-0,63	-1,54	0,505	0,005	0,003	0,002	0

SCO	Producto	Nombre del gen	Mc <i>S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> – Mc <i>S. coelicolor</i> M145					Valor <i>p S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> – valor <i>p S. coelicolor</i> M145				
			32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h
SCO5819	sporulation transcription factor, WhiH	<i>whiH</i>	1,978	3,388	1,448	1,197	-0,65	0	0	0,004	0,026	0,241
SCO6029	two-component regulator	<i>whiI</i>	2,696	3,526	1,840	1,287	0,261	0	0	0,002	0,039	0,807
SCO6180	putative transferase	<i>cwgB</i>	0,225	1,275	1,786	1,779	1,527	0,572	0	0	0	0
SCO6181	putative transferase	<i>cwgC</i>	0,047	0,777	1,267	1,303	1,058	0,999	0,001	0	0	0
SCO6182	putative dehydratase	<i>cwgD</i>	0,148	0,396	0,682	1,108	0,695	0,822	0,061	0,002	0	0,002
SCO6183	putative transferase	<i>cwgE</i>	0,325	0,084	1,086	1,551	1,017	0,492	0,817	0	0	0,001
SCO6185	putative transferase	<i>cwgG</i>	0,361	1,704	2,091	1,867	1,200	0,341	0	0	0	0
SCO6186	putative phosphoheptose isomerase	<i>cwgH</i>	0,592	0,846	1,200	0,942	0,746	0,148	0,009	0,001	0,010	0,025
SCO6187	putative bifunctional synthase/transferase	<i>cwgI</i>	0,313	0,338	0,943	0,896	0,213	0,573	0,286	0,003	0,007	0,652
SCO6188	putative transferase	<i>cwgJ</i>	0,087	0,440	0,826	0,766	0,627	0,990	0,111	0,004	0,011	0,024
SCO6499	putative gas vesicle synthesis protein	<i>gvpO</i>	0,185	0,799	1,259	1,507	2,420	0,990	0,170	0,023	0,018	0
SCO6500	putative gas vesicle synthesis protein	<i>gvpA</i>	0,163	0,669	1,206	1,464	2,244	0,973	0,108	0,004	0,001	0
SCO6501	putative gas vesicle synthesis protein	<i>gvpF</i>	0,196	0,720	0,843	1,014	1,662	0,836	0,011	0,005	0,001	0
SCO6502	putative gas vesicle synthesis protein	<i>gvpG</i>	0,263	0,787	0,602	0,923	1,691	0,879	0,068	0,152	0,065	0
SCO6503	hypothetical protein SC1E6.12		0,126	0,396	0,521	0,767	0,966	0,978	0,271	0,114	0,049	0,006
SCO6504	conserved hypothetical protein SC1E6.13		0,323	0,781	0,777	1,201	1,910	0,722	0,039	0,035	0,005	0
SCO6505	putative gas vesicle synthesis protein	<i>gvpJ</i>	-0,08	0,408	0,768	1,036	1,300	0,999	0,183	0,011	0,002	0
SCO6506	putative gas vesicle protein	<i>gvpL</i>	0,172	-0,09	0,420	0,645	1,143	0,860	0,796	0,104	0,033	0
SCO6507	putative gas vesicle synthesis protein	<i>gvpS</i>	-0,38	-0,08	-0,44	0,416	0,955	0,391	0,840	0,109	0,284	0,001
SCO6715	putative transcriptional regulator	<i>wblH</i>	-0,51	0,203	-0,23	0,671	2,427	0,817	0,828	0,775	0,549	0,001
SCO7257	putative secreted protein	<i>chpB</i>	1,118	2,174	0,504	0,415	-0,22	0,017	0	0,221	0,520	0,772
SCO7699	EshA protein	<i>eshA</i>	1,043	2,524	0,185	-0,02	-2,17	0,030	0	0,688	0,988	0
SCO7700	putative cyclase		0,995	1,955	0,037	0,082	-1,41	0,018	0	0,938	0,93	0

SCO	Producto	Nombre del gen	Mc <i>S. coelicolor</i> Δ argR – Mc <i>S. coelicolor</i> M145					Valor p <i>S. coelicolor</i> Δ argR – valor p <i>S. coelicolor</i> M145				
			32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h
SCO7701	putative methyltransferase		0,868	2,332	0,055	-0,19	-2,13	0,052	0	0,907	0,801	0
(7) Metabolismo secundario												
SCO1865	putative aminotransferase	<i>ectB</i>	1.024	1.385	1.517	1.124	1.968	0.043	0.002	0.001	0.023	0
SCO1866	putative ectoine synthase	<i>ectC</i>	0.812	1.049	1.199	0.854	1.792	0.349	0.074	0.035	0.287	0.003
SCO1867	putative hydroxylase	<i>ectD</i>	0.539	0.684	1.142	0.694	0.991	0.394	0.101	0.007	0.187	0.019
SCO3227	putative 4-hydroxyphenylglycine aminotransferase	<i>hpgT</i>	0,082	-0,06	-0,25	-0,43	-0,89	0,932	0,764	0,117	0,018	0
SCO3229	putative 4-hydroxymandelate synthase	<i>hmaS</i>	0,083	-0,05	-0,94	-1,40	-2,14	0,999	0,942	0,035	0,008	0
SCO5070	hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	<i>ORFB</i>	-0,09	-0,35	-0,45	-0,58	-0,49	0,999	0,499	0,960	0,403	0,004
SCO5071	hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	<i>ORFA</i>	-4,40	-0,68	-2,65	-2,57	-1,03	0,002	0,657	0,035	0,092	0,592
SCO5074	putative dehydratase	<i>ORF3</i>	-4,19	-0,56	-2,40	-2,66	-1,35	0,001	0,666	0,023	0,029	0,298
SCO5076	integral membrane protein	<i>actVA1</i>	-1,78	-0,16	-1,53	-2,43	-1,61	0,054	0,879	0,045	0,006	0,052
SCO5082	putative transcriptional regulatory protein	<i>actII-1</i>	-2,96	0,140	-1,07	-2,08	-1,06	0,001	0,898	0,178	0,021	0,259
SCO5083	putative actinorhodin transporter	<i>actII-2</i>	-5,32	-0,17	-2,40	-3,74	-1,63	0,001	0,931	0,077	0,018	0,348
SCO5084	putative membrane protein	<i>actII-3</i>	-6,58	-0,11	-3,32	-4,44	-1,90	0,001	0,964	0,049	0,024	0,392
SCO5085	actinorhodin cluster activator protein	<i>actII-4</i>	-4,99	-1,01	-1,93	-2,17	-0,89	0	0,267	0,023	0,026	0,436
SCO5089	actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein	<i>actIORF3</i>	-3,33	-0,90	-2,22	-2,44	-1,12	0,010	0,491	0,052	0,070	0,489
SCO5877	transcriptional regulator RedD	<i>redD</i>	-0,34	-0,63	-1,67	-0,95	-0,32	0,871	0,279	0,004	0,172	0,737
SCO5878	polyketide synthase RedX	<i>redX</i>	-0,27	-0,68	-1,88	-1,25	-0,59	0,930	0,201	0,001	0,033	0,357
SCO5879	acyl-coa dehydrogenase RedW	<i>redW</i>	-0,22	-0,61	-1,69	-1,04	-0,43	0,921	0,159	0	0,028	0,446
SCO5880	RedY protein	<i>redY</i>	-0,58	-0,63	-2,09	-1,16	-0,33	0,622	0,326	0,001	0,099	0,761
SCO5883	hypothetical protein SC3F7.03c	<i>redU</i>	-0,06	0,029	-2,55	-1,51	-1,03	0,999	0,971	0	0,019	0,089

SCO	Producto	Nombre del gen	Mc <i>S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> – Mc <i>S. coelicolor</i> M145					Valor <i>p S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> – valor <i>p S. coelicolor</i> M145				
			32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h
			SCO5884	hypothetical protein SC3F7.04c		0,178	-0,07	-2,49	-1,46	-1,03	0,993	0,933
SCO5885	putative membrane protein		0,180	0,025	-3,79	-1,83	-0,84	0,999	0,982	0	0,040	0,399
SCO5886	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II	<i>redR</i>	-0,05	0,077	-3,02	-1,68	-0,90	0,999	0,931	0	0,021	0,222
SCO5887	acyl carrier protein	<i>redQ</i>	-0,29	0,222	-2,96	-1,73	-0,54	0,961	0,798	0	0,021	0,594
SCO5888	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	<i>redP</i>	-0,49	-0,37	-2,77	-1,61	-0,62	0,730	0,577	0	0,012	0,392
SCO5889	hypothetical protein SC3F7.09	<i>redO</i>	0,558	-0,30	-4,31	-2,26	-0,37	0,908	0,815	0	0,047	0,868
SCO5890	putative 8-amino-7-oxononanoate synthase	<i>redN</i>	0,257	-0,36	-3,16	-1,67	-0,66	0,966	0,622	0	0,015	0,399
SCO5891	putative peptide synthase	<i>redM</i>	0,050	0,079	-3,15	-1,76	-0,81	0,999	0,919	0	0,005	0,204
SCO5892	polyketide synthase	<i>redL</i>	0,004	-0,09	-2,23	-1,40	-0,64	1,000	0,880	0	0,004	0,195
SCO5893	oxidoreductase	<i>redK</i>	-0,08	-0,01	-3,21	-1,68	-0,75	0,999	0,992	0	0,011	0,288
SCO5894	thioesterase	<i>redJ</i>	0,243	0,146	-2,77	-1,69	-0,81	0,961	0,847	0	0,008	0,206
SCO5895	putative methyltransferase	<i>redI</i>	0,252	0,109	-3,81	-1,78	-0,66	0,983	0,911	0	0,024	0,498
SCO5896	phosphoenolpyruvate-utilizing enzyme	<i>redH</i>	0,235	0,159	-3,17	-1,81	-0,76	0,969	0,832	0	0,004	0,247
SCO5897	putative oxidase	<i>redG</i>	0,174	0,049	-3,22	-1,95	-0,87	0,990	0,950	0	0,001	0,145
SCO5898	probable membrane protein	<i>redF</i>	0,268	0,798	-3,39	-2,30	-0,97	0,935	0,148	0	0	0,090
SCO5899	hypothetical protein	ζ <i>red?</i>	0,363	0,617	-2,73	-1,71	-0,86	0,746	0,183	0	0,001	0,070
SCO5982	putative regulator		-0,87	-1,38	-0,57	-0,68	-0,02	0,031	0	0,095	0,115	0,983
SCO6073	germacradienol/geosmin synthase	<i>geoA</i>	0,292	0,512	-0,58	-0,74	-1,94	0,624	0,088	0,044	0,026	0
SCO6272	putative secreted FAD-binding protein	<i>scF</i>	-1,81	-1,23	1,963	-0,24	1,908	0,030	0,101	0,009	0,881	0,011
SCO6273	putative type I polyketide synthase	<i>cpkC</i>	-0,93	-0,68	1,818	-0,01	1,294	0,198	0,237	0,002	0,992	0,021
SCO6274	putative type I polyketide synthase	<i>cpkB</i>	-1,32	-0,67	2,113	-0,04	1,652	0,083	0,326	0,002	0,983	0,011
SCO6275	putative type I polyketide synthase	<i>cpkA</i>	-1,35	-0,84	2,069	-0,07	1,653	0,131	0,271	0,005	0,970	0,025
SCO6276	putative secreted protein	<i>cpkD</i>	-6,89	-5,27	3,647	0,298	4,271	0,002	0,007	0,052	0,953	0,033

SCO	Producto	Nombre del gen	Mc <i>S. coelicolor</i> Δ argR – Mc <i>S. coelicolor</i> M145					Valor <i>p S. coelicolor</i> Δ argR – valor <i>p S. coelicolor</i> M145				
			32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h
SCO6277	putative epoxide hydrolase	<i>cpkE</i>	-4,54	-3,61	3,648	-0,14	3,576	0,010	0,022	0,020	0,974	0,029
SCO6278	putative integral membrane transport protein	<i>cpkF</i>	-4,58	-3,63	3,402	-0,03	3,239	0,004	0,011	0,018	0,993	0,029
SCO6279	putative diaminobutyrate-pyruvate aminotransferase	<i>cpkG</i>	-5,73	-4,45	3,616	-0,11	3,859	0,002	0,007	0,025	0,979	0,022
SCO6280	putative regulatory protein	<i>cpkO</i>	-3,84	-3,45	1,115	-0,10	1,280	0,001	0,001	0,257	0,970	0,273
SCO6282	putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	<i>cpkI</i>	-7,36	-6,21	1,849	-0,13	2,476	0,001	0,001	0,337	0,979	0,264
SCO6283	conserved hypothetical protein	<i>cpkJ</i>	-4,41	-3,83	1,995	-0,52	2,354	0,001	0,002	0,098	0,833	0,069
SCO6284	acetyl/propionyl CoA carboxylase, beta subunit	<i>cpkK</i>	-3,75	-2,69	2,04	-0,96	1,744	0,001	0,005	0,029	0,518	0,086
SCO6285	acetyl/propionyl CoA carboxylase epsilon subunit	<i>cpkL</i>	-1,47	-,156	2,150	-0,13	1,411	0,108	0,037	0,006	0,944	0,077
SCO6286	putative regulatory protein	<i>scbR2</i>	-3,69	-2,47	1,924	0,04	2,272	0,001	0,016	0,054	0,990	0,033
SCO6287	thioesterase II	<i>scoT</i>	-0,31	-0,63	1,132	-0,11	0,320	0,775	0,119	0,006	0,903	0,586
SCO6288	putative regulatory protein	<i>cpkN</i>	-1,99	-1,20	2,716	0,108	1,677	0,021	0,124	0,001	0,957	0,034
SCO7469	phenylacetate-CoA ligase	<i>paaK</i>	0,295	0,499	-0,08	0,089	-1,08	0,541	0,067	0,789	0,877	0
SCO7471	putative phenylacetic acid degradation protein PaaA	<i>paaA</i>	0,155	0,864	0,152	-0,01	-1,50	0,983	0,046	0,756	0,990	0,001
SCO7472	putative phenylacetic acid degradation protein PaaB	<i>paaB</i>	0,091	0,860	-0,15	-0,04	-1,56	0,999	0,076	0,788	0,976	0,002
SCO7473	putative phenylacetic acid degradation protein PaaC	<i>paaC</i>	-0,24	0,524	0,032	-0,11	-1,57	0,911	0,246	0,954	0,915	0,001
SCO7474	putative phenylacetic acid degradation protein PaaD	<i>paaD</i>	0,150	0,263	0,272	0,055	-0,94	0,961	0,507	0,449	0,952	0,009
SCO7475	putative phenylacetic acid degradation protein PaaE	<i>paaE</i>	-0,27	0,412	-0,07	-0,27	-1,18	0,856	0,363	0,895	0,709	0,006
(8) TCS y transportadores ABC												
SCO5403	probable two-component system response regulator	<i>rapA1</i>	0,936	0,876	1,103	0,582	0,727	0,005	0,004	0,001	0,111	0,019
SCO5653	Putative integral membrane protein		1,295	1,596	0,709	0,480	-0,16	0,001	0	0,037	0,326	0,826
SCO5654	ABC transporter ATP-binding protein		1,329	2,036	1,151	0,487	-0,15	0,001	0	0,003	0,359	0,855

SCO	Producto	Nombre del gen	Mc <i>S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> – Mc <i>S. coelicolor</i> M145					Valor <i>p S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> – valor <i>p S. coelicolor</i> M145				
			32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h
SCO6162	putative two-component system response regulator		0,426	2,574	0,943	0,414	0,222	0,650	0	0,031	0,557	0,797
SCO6163	putative sensor kinase		0,153	1,545	0,191	0,211	0,072	0,976	0	0,660	0,780	0,947
SCO6164	hypothetical protein SC1A9.28c		0,182	6,492	3,552	1,798	0,048	0,999	0	0	0,063	0,984
SCO6165	hypothetical protein		0,201	4,065	2,430	0,365	-0,21	0,999	0	0,003	0,811	0,911
SCO6166	hypothetical protein SC6C5.02		0,062	2,311	1,306	0,010	-0,14	0,999	0	0,016	0,995	0,916
SCO6421	putative two-component system sensor kinase	<i>ecrE1</i>	-0,16	-0,09	-0,53	-0,85	-0,88	0,891	0,789	0,044	0,005	0,002
SCO6422	putative two-component system regulatory protein	<i>ecrE2</i>	0,286	0,204	-0,11	-0,65	-0,67	0,456	0,437	0,664	0,014	0,006
(9) Proteínas secreción												
SCO0297	putative secreted protein		-0,69	-1,01	-1,25	-1,23	0,270	0,161	0,008	0,002	0,004	0,663
SCO0615	putative secreted protein		0,045	2,048	2,231	1,183	1,239	0,999	0	0	0,006	0,002
SCO0665	putative secreted protein		0,464	3,024	1,068	0,895	0,387	0,501	0	0,009	0,054	0,478
SCO2591	putative secreted protein		-1,53	-1,16	-0,90	-0,68	-0,33	0,005	0,018	0,060	0,325	0,686
SCO2704	putative secreted protein		1,063	3,960	1,489	0,62	0,674	0,136	0	0,010	0,473	0,336
SCO3097	putative secreted protein		-0,10	2,271	1,301	1,507	0,993	0,999	0	0,003	0,001	0,019
SCO3220	putative secreted protein		0,039	0,002	-1,57	-1,37	-2,07	0,999	0,998	0,005	0,023	0
SCO4251	putative secreted protein		-2,81	-2,17	-0,56	-0,29	0,128	0	0	0,098	0,614	0,868
SCO4902	putative secreted protein		2,056	2,358	0,501	0,557	0,423	0,001	0	0,348	0,493	0,592
SCO6375	putative secreted protein		0,268	3,302	3,297	2,668	1,899	0,785	0	0	0	0
SCO6934	putative secreted protein		0,455	-0,32	-1,28	-1,72	-4,10	0,668	0,577	0,010	0,002	0
SCO7717	putative secreted protein		-0,27	-0,09	-1,32	-1,46	-1,65	0,768	0,841	0	0	0

SCO	Producto	Nombre del gen	Mc <i>S. coelicolor</i> Δ argR – Mc <i>S. coelicolor</i> M145					Valor p <i>S. coelicolor</i> Δ argR – valor p <i>S. coelicolor</i> M145				
			32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h
(10) Proteínas de membrana												
SCO0853	putative membrane protein.		-0,25	2,076	3,422	3,126	3,585	0,908	0	0	0	0
SCO0973	putative integral membrane protein		-1,44	-0,67	-0,74	-1,26	-0,98	0,005	0,161	0,103	0,016	0,045
SCO2309	putative transmembrane transport protein		-1,30	-0,60	-0,20	-1,13	-0,78	0	0,039	0,520	0,001	0,010
SCO3786	putative integral membrane protein		0,055	2,486	2,815	1,517	0,879	0,999	0	0	0	0,009
SCO4174	putative integral membrane protein		-0,51	-0,98	-1,09	-0,86	-0,59	0,316	0,006	0,004	0,033	0,131
SCO4982	putative membrane protein		0,609	2,656	3,014	2,233	1,798	0,458	0	0	0	0,001
SCO6825	putative integral membrane protein.		3,407	3,204	1,891	2,036	1,372	0	0	0	0	0,002
(11) Reguladores y factores sigma												
SCO0762	protease inhibitor precursor	<i>sti1</i>	-2,20	-1,84	-0,27	-0,89	-0,22	0	0	0,610	0,140	0,831
SCO0895	RNA polymerase principal sigma factor HrdC.	<i>hrdC</i>	0,098	0,043	1,116	1,505	1,426	0,945	0,880	0	0	0
SCO2865	putative regulatory protein.		4,460	5,235	4,561	4,683	5,353	0	0	0	0	0
SCO3583	putative integral membrane regulator		0,359	2,278	1,185	0,625	0,164	0,705	0	0,005	0,261	0,852
SCO3857	putative regulatory protein		0,130	1,202	0,821	0,511	0,783	0,864	0	0	0,026	0
SCO4027	putative anti sigma factor antagonist		1,827	1,758	2,644	3,001	2,697	0	0	0	0	0
SCO4425	sigma-like protein	<i>afsS</i>	-1,44	-0,03	-0,52	0,025	1,704	0,054	0,975	0,431	0,989	0,010
SCO6265	gamma-butyrolactone binding protein	<i>scbR</i>	-2,81	-2,01	-0,11	-0,40	0,174	0	0,002	0,891	0,711	0,910
SCO6266	afsA homolog: gamma-butyrolactone synthesis	<i>scbA</i>	-2,33	-1,02	-0,52	0,074	-0,27	0,001	0,129	0,437	0,966	0,837
SCO6520	putative RNA polymerase sigma factor	<i>sigK</i>	1,035	1,651	1,556	0,861	0,559	0,006	0	0	0,025	0,132
SCO7314	probable RNA polymerase sigma factor	<i>sigM</i>	1,289	2,929	1,905	1,881	2,239	0,001	0	0	0	0

SCO	Producto	Nombre del gen	Mc <i>S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> –Mc <i>S. coelicolor</i> M145					Valor <i>p S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> – valor <i>p S. coelicolor</i> M145				
			32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h
SCO7341	putative RNA polymerase secondary sigma factor	<i>sigG</i>	0,054	1,187	1,434	0,506	0,077	0,999	0	0	0,070	0,888
(12) Genes no clasificados												
SCO0509	glycerol kinase 2 (ATP:glycerol 3-phosphotransferase)	<i>glpK2</i>	0,285	2,450	1,733	0,604	0,421	0,652	0	0	0,088	0,219
SCO0982	isocitrate lyase	<i>aceA</i>	0,120	1,011	2,538	3,104	1,313	0,999	0,026	0	0	0,005
SCO0983	malate synthase	<i>aceB2</i>	0,159	0,762	1,451	1,823	0,871	0,960	0,037	0	0	0,021
SCO1086	hypothetical protein		5,152	6,713	6,670	6,974	6,770	0	0	0	0	0
SCO1659	putative glycerol uptake facilitator protein	<i>glpF</i>	0,206	0,773	0,600	0,801	1,771	0,976	0,169	0,263	0,279	0,002
SCO1660	putative glycerol kinase	<i>glpK</i>	0,480	1,013	0,545	0,643	1,560	0,729	0,078	0,345	0,453	0,008
SCO1661	putative glycerol-3-phosphate dehydrogenase		-0,07	0,598	0,249	0,324	1,541	0,999	0,268	0,649	0,718	0,004
SCO1814	putative enoyl-(acyl-carrier-protein) reductase	<i>inhA</i>	-1,11	-1,25	-1,08	-1,17	-0,42	0,046	0,009	0,022	0,033	0,545
SCO1815	probable 3-oxacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	<i>fabG</i>	-1,06	-1,32	-0,44	-1,01	-0,02	0,057	0,006	0,360	0,070	0,986
SCO2390	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II	<i>fabF</i>	-0,59	-0,71	-0,20	-0,28	-0,13	0,071	0,010	0,481	0,510	0,822
SCO3244	putative secreted protein		-0,19	-0,22	-0,76	-1,21	-1,94	0,884	0,546	0,016	0,001	0
SCO3245	putative hexenoyl-CoA Monooxygenase	<i>hcmO</i>	-0,03	-0,09	-0,74	-0,63	-1,25	0,999	0,776	0,004	0,023	0
SCO3247	putative hexanoyl-CoA oxidase	<i>hxcO</i>	-0,04	-0,08	-0,57	-0,78	-1,75	0,999	0,878	0,106	0,067	0
SCO3248	putative 3-oxoacyl-[acyl carrier protein] synthase II	<i>fabF3</i>	-0,13	-0,01	-0,93	-0,80	-1,06	0,951	0,973	0,003	0,015	0,001
SCO3249	putative acyl carrier protein		-0,30	-0,11	-1,08	-1,29	-2,00	0,966	0,915	0,123	0,148	0,007
SCO4562	NuoA, NADH dehydrogenase subunit	<i>nuoA</i>	1,223	3,287	1,540	0,198	-0,70	0,083	0	0,010	0,874	0,335
SCO4563	NuoB, NADH dehydrogenase subunit	<i>nuoB</i>	0,788	2,154	1,145	0,294	-0,39	0,108	0	0,006	0,661	0,474
SCO4564	NuoC, NADH dehydrogenase subunit	<i>nuoC</i>	1,042	2,557	1,365	0,250	-0,44	0,022	0	0,002	0,729	0,397
SCO4565	NuoD, NADH dehydrogenase subunit	<i>nuoD</i>	1,217	2,762	1,331	0,062	-0,39	0,014	0	0,004	0,957	0,531

SCO	Producto	Nombre del gen	Mc <i>S. coelicolor</i> Δ argR – Mc <i>S. coelicolor</i> M145					Valor p <i>S. coelicolor</i> Δ argR – valor p <i>S. coelicolor</i> M145				
			32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h
SCO4566	NuoE, NADH dehydrogenase subunit	<i>nuoE</i>	0,822	2,589	1,116	0,009	-0,52	0,139	0	0,013	0,995	0,342
SCO4567	NuoF, NADH dehydrogenase subunit	<i>nuoF</i>	0,588	2,505	0,732	-0,20	-0,27	0,420	0	0,102	0,831	0,734
SCO4568	NuoG, NADH dehydrogenase subunit	<i>nuoG</i>	0,590	1,991	0,935	-0,09	-0,52	0,198	0	0,009	0,914	0,186
SCO4569	NuoH, NADH dehydrogenase subunit	<i>nuoH</i>	0,963	2,778	1,325	0,130	-0,72	0,044	0	0,002	0,885	0,107
SCO4570	NuoI, NADH dehydrogenase subunit	<i>nuoI</i>	1,074	2,706	1,134	0,401	-0,34	0,013	0	0,005	0,504	0,530
SCO4571	NuoJ, NADH dehydrogenase subunit	<i>nuoJ</i>	1,082	2,558	1,168	0,264	-0,35	0,014	0	0,005	0,698	0,529
SCO4572	NuoK, NADH dehydrogenase subunit	<i>nuoK</i>	1,459	3,054	1,358	0,48	-0,52	0,003	0	0,003	0,480	0,337
SCO4573	NuoL, NADH dehydrogenase subunit	<i>nuoL</i>	0,592	2,019	1,108	0,29	-0,37	0,153	0	0,001	0,576	0,376
SCO4574	NuoM, NADH dehydrogenase subunit	<i>nuoM</i>	1,013	2,773	1,201	0,323	-0,56	0,018	0	0,003	0,599	0,196
SCO4575	NuoN, NADH dehydrogenase subunit	<i>nuoN</i>	0,460	1,729	0,644	0,180	-0,42	0,222	0	0,020	0,716	0,183
SCO4926	putative acetyl/propionyl CoA carboxylase, beta subunit	<i>pccB</i>	0,029	0,014	-0,14	0,332	0,875	0,999	0,968	0,582	0,338	0,001
SCO5399	probable acetoacetyl-coA thiolase	<i>thiL</i>	0,920	1,093	0,409	1,151	1,115	0,031	0,004	0,273	0,006	0,004
SCO5400	putative transport system kinase		0,553	0,530	0,154	0,966	0,722	0,189	0,107	0,660	0,008	0,031
SCO5535	acetyl/propionyl CoA carboxylase beta subunit	<i>accB</i>	-1,23	-1,11	-0,28	-1,03	-0,22	0,004	0,004	0,484	0,018	0,750
SCO6201	putative glyoxylate carboligase	<i>gcl</i>	1,001	1,474	2,049	2,131	2,226	0	0	0	0	0
SCO6205	putative dehydrogenase		0,844	1,193	1,238	1,407	1,455	0,003	0	0	0	0
SCO6206	putative oxidoreductase		1,375	2,419	2,192	2,440	2,256	0	0	0	0	0
SCO6496	putative dehydrogenase		-0,09	0,463	0,982	1,393	1,192	0,975	0,034	0	0	0
SCO6497	transketolase A	<i>tktA2</i>	0,221	1,081	1,113	1,388	1,811	0,673	0	0	0	0
SCO6498	conserved hypothetical protein SC1E6.07		0,177	0,122	0,812	1,079	0,894	0,801	0,672	0,002	0	0
SCO7011	putative membrane transport protein.		0,560	0,476	0,332	0,410	1,246	0,219	0,178	0,336	0,413	0,001
SCO7012	putative binding protein dependent transport protein		0,861	0,592	0,730	0,821	1,932	0,036	0,106	0,037	0,047	0
SCO7013	putative sugar-binding lipoprotein.		1,035	0,862	0,747	0,755	2,073	0,010	0,017	0,034	0,074	0

SCO	Producto	Nombre del gen	Mc <i>S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> – Mc <i>S. coelicolor</i> M145					Valor <i>p</i> <i>S. coelicolor</i> Δ <i>argR</i> – valor <i>p</i> <i>S. coelicolor</i> M145				
			32 h	42 h	49 h	56 h	66 h	32 h	42 h	49 h	56 h	66 h
SCO7236	ubiquinol-cytochrome C reductase cytochrome subunit B.	<i>qcrB3</i>	0,091	0,596	0,607	0,439	0,616	0,913	0,001	0,001	0,019	0,001
SCO7412	putative pyruvate dehydrogenase (pyruvate oxidase)		0,731	2,231	2,149	2,384	1,927	0,006	0	0	0	0
SCO7413	putative oxidoreductase.		0,168	0,775	1,380	1,083	0,919	0,948	0,032	0	0,007	0,013
SCO7590	catalase	<i>katA2</i>	0,391	2,818	2,226	2,339	2,260	0,411	0	0	0	0

Anexo 2. Genes diferencialmente expresados en el mutante *S. coelicolor* Δ *argR* vs *S. coelicolor* M145 a lo largo del tiempo con Mc y valor *p*. De los 1544 GES, en la tabla se incluyen solo aquellos con diferencias de expresión más marcadas. Los genes, cuyo producto aparece con la anotación original en inglés, se han clasificado de acuerdo a su funcionalidad en 12 grupos y dentro de cada uno aparecen ordenados por la posición que ocupan en el cromosoma. Así se destaca la coincidencia de perfiles en aquellos genes pertenecientes a la misma agrupación. Aquellos valores Mc positivos por encima de 0,5 aparecen resaltados en rojo, mientras que los valores Mc negativos por debajo de -0,5 se resaltan en verde. Los valores *p* por debajo de 0,01 (estadísticamente significativos) se indican en negrita y amarillo. Los genes validados en algún tiempo por Q-PCR están resaltados en fondo naranja.

6.3. Resumen de resultados de EMSAs con ArgR

Sonda	Promotor del gen	Función de los genes	Longitud 1	Cebadores para amplificar el fragmento	Longitud 2	Cebadores para obtener la sonda	Ri (bits)	Unión a Strep-ArgR
P_{absR1-2}	<i>absR1-absR2</i>	Regulador transcripcional	226 pb	ChIP3 y ChIP4	226 pb	ChIP3 y ChIP4	6,6	No
P_{afsR}	<i>afsR</i>	Regulador transcripcional	491 pb	CRP81 y CRP82	491 pb	CRP81 y CRP82	(3)	Sí
P_{afsS}	<i>afsS</i>	Regulador transcripcional	459 pb	CRP83 y CRP84	459 pb	CRP83 y CRP84	(3)	Sí
P_{amtB}	<i>amtB</i>	Metabolismo de nitrógeno	342 pb	(1)	560 pb	(2)	8,3	Sí
P_{arcB}	<i>arcB</i>	Biosíntesis aminoácidos	210 pb	CRP39 y CRP40	446 pb	(2)	10,9 9,5	Sí
P_{argC}	<i>argC</i>	Biosíntesis aminoácidos	305 pb	CRP35 y CRP36	541 pb	(2)	12,1 9,4 6,1	Sí
P_{argG}	<i>argG</i>	Biosíntesis aminoácidos	280 pb	CRP37 y CRP38	516 pb	(2)	8,1 16,7	Sí
P_{argH}	<i>argH</i>	Biosíntesis aminoácidos	166 pb	CRP13 y CRP14	402 pb	(2)	17,3 7,7	Sí
P_{argR}	<i>argR</i>	Regulador transcripcional	328 pb	CRP79 y CRP80	564 pb	(2)	(3)	Sí
P_{argS}	SCO3304	Estructura ribosoma	497 pb	ChIP5 y ChIP6	497 pb	ChIP5 y ChIP6	11,8	No
P_{malR}	<i>malE-malR</i>	Regulador transcripcional	318 pb	CRP41 y CRP42	554 pb	(2)	9,3 8,6	Sí
P_{nrDA}	<i>nrDX/nrdA</i>	Biosíntesis nucleótidos	508 pb	CRP17 y CRP18	744 pb	(2)	4,6 6,0	Sí
P_{pfkA3}	<i>pfkA3</i>	Metabolismo nitrógeno/carbono	506 pb	ChIP25 y ChIP26	506 pb	ChIP25 y ChIP26	3,2	No
P_{pyk1}	<i>pyk1</i> -SCO2015	Metabolismo nitrógeno/carbono	240 pb	CRP33 y CRP34	476 pb	(2)	8,2	Sí
P_{pyrA}	<i>pyrA</i>	Biosíntesis pirimidinas	355 pb	CRP27 y CRP28	591 pb	(2)	1,8	Sí
P_{pyrB}	<i>pyrB</i>	Biosíntesis pirimidinas	252 pb	CRP25 y CRP26	488 pb	(2)	7,1	Sí
P_{pyrR}	<i>pyrR</i>	Regulador biosíntesis pirimidinas	375 pb	CRP29 y CRP30	611 pb	(2)	7,7 5,1	Sí
P_{redD}	SCO5878	Metabolismo secundario	222 pb	ChIP19 y ChIP20	222 pb	ChIP19 y ChIP20	3,9	No
P_{rnhA}	<i>rnhA</i>	Replicación, recombinación y reparación	206 pb	ChIP1 y ChIP2	206 pb	ChIP1 y ChIP2	8,2	No
P_{rstP}	<i>rstP</i>	Biosíntesis nucleótidos	211 pb	CRP45 y CRP46	447 pb	(2)	9,2	Sí
P_{SCO0255}	SCO0255-SCO0256	Metabolismo de nitrógeno	347 pb	(1)	565 pb	(2)	(3)	Sí
P_{SCO0454}	SCO0454	Transporte	234 pb	ChIP15 y ChIP16	234 pb	ChIP15 y ChIP16	5,0	No
P_{SCO0800}	SCO0800-SCO0801	Regulador transcripcional	368 pb	CRP73 y CRP74	604 pb	(2)	4,1	(?)

<i>Sonda</i>	<i>Promotor del gen</i>	<i>Función de los genes</i>	<i>Longitud 1</i>	<i>Cebadores para amplificar el fragmento</i>	<i>Longitud 2</i>	<i>Cebadores para obtener la sonda</i>	<i>Ri (bits)</i>		<i>Unión a Strep-ArgR</i>
P_{SCO1086}	SCO1086	Transporte aminoácidos	196 pb	CRP19 y CRP20	432 pb	(2)	3,4	16,5	Sí
P_{SCO1220}	SCO1220-SCO1221	Regulador transcripcional	383 pb	CRP59 y CRP60	383 pb	CRP59 y CRP60	5,2	6,1	(?)
P_{SCO1417}	SCO1417-SCO1418	Regulador transcripcional	248 pb	ChIP17 y ChIP18	248 pb	ChIP17 y ChIP18	4,3		No
P_{SCO1863}	SCO1863-SCO1864	Metabolismo de nitrógeno	363 pb	(1)	581 pb	(2)	(3)		Sí
P_{SCO2055}	<i>hisD</i> -SCO2055	Biosíntesis aminoácidos	223 pb	CRP21 y CRP22	459 pb	(2)	5,7	4,4	Sí
P_{SCO2209}	SCO2209	Regulador transcripcional	375 pb	CRP51 y CRP52	375 pb	CRP51 y CRP52	5,3		No
P_{SCO2344}	SCO2344	Transporte	203 pb	ChIP7 y ChIP8	203 pb	ChIP7 y ChIP8	3,1		No
P_{SCO2529}	<i>leuA</i> -SCO2529	Biosíntesis aminoácidos	351 pb	CRP31 y CRP32	587 pb	(2)	10,4		Sí
P_{SCO2686}	SCO2686- <i>ribA1</i>	Regulador transcripcional	303 pb	CRP71 y CRP72	539 pb	(2)	12,8		Sí
P_{SCO3067}	SCO3067- <i>sig15</i>	Factor sigma o anti-sigma	325 pb	CRP69 y CRP70	561 pb	(2)	5,2		Sí
P_{SCO3769}	SCO3769	Regulador transcripcional	395 pb	CRP67 y CRP68	631 pb	(2)	4,5		No
P_{SCO3774}	SCO3774	Mecanismos de defensa	218 pb	ChIP13 y ChIP14	218 pb	ChIP13 y ChIP14	3,9		No
P_{SCO3979}	SCO3978-SCO3979	Regulador transcripcional	366 pb	CRP57 y CRP58	366 pb	CRP57 y CRP58	10,1		Sí
P_{SCO4159}	En <i>glnR</i>	Metabolismo de nitrógeno	308 pb	CRP55 y CRP56	308 pb	CRP55 y CRP56	7,4		Sí
P_{SCO4293}	SCO4292-SCO4293	Biosíntesis aminoácidos	348 pb	CRP47 y CRP48	584 pb	(2)	9,1		Sí
P_{SCO4301}	SCO4301-SCO4302	Transcripción	206 pb	ChIP23 y ChIP24	206 pb	ChIP23 y ChIP24	3,0		No
P_{SCO5864}	SCO5864	Proteína conservada	392 pb	CRP43 y CRP44	628 pb	(2)	7,0		Sí
P_{SCO6144}	SCO6144-SCO6145	Regulador transcripcional	199 pb	ChIP9 y ChIP10	199 pb	ChIP9 y ChIP10	3,2		No
P_{SCO7303}	SCO7302-SCO7303	Regulador transcripcional	300 pb	CRP53 y CRP54	300 pb	CRP53 y CRP54	7,4	4,6	(?)
P_{SCO7314}	SCO7314	Factor sigma o anti-sigma	401 pb	CRP65 y CRP66	637 pb	(2)	7,5		Sí
P_{ureA}	<i>ureA</i>	Metabolismo de nitrógeno	297 pb	(1)	515 pb	(2)	7,5		Sí
P_{whiB}	SCO3035- <i>whiB</i>	Regulador transcripcional	290 pb	CRP23 y CRP24	526 pb	(2)	6,0		Sí

Anexo 3. Listado en el que se indican las sondas con cajas ARG ensayadas, la región a la que corresponden dichas sondas, la función del gen, el tamaño del fragmento abarcado con la pareja de cebadores (longitud 1), los cebadores (listado del anexo 1) empleados para amplificar el fragmento, el tamaño de la sonda (longitud 2), los cebadores utilizados para amplificar la sonda, la puntuación *Ri* calculada con la matriz v1.2 de las cajas ARG (en casos hay 3 cajas en un mismo promotor) y si fueron o no retardadas por ArgR en EMSA.

(?) Indica un resultado dudoso; (1) Cedido por el Dr. A. Rodríguez-García (Sola-Landa *et al.*, 2013); (2) Cebadores universales 6FAM-DIRECTO y 6FAM-REVERSO; (3) posibles medias cajas ARG de 10 nt de las que no se indica la puntuación.

6.4. Alineamiento cajas ARG v1.3

Gen/Región intergénica	Sitio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Ri
<i>argH</i>	<i>argH</i> .O1	G	A	T	T	G	A	C	G	A	A	A	C	A	T	G	C	A	G	A	G	7,7
	<i>argH</i> .O1~	C	T	C	T	G	C	A	T	G	T	T	T	C	G	T	C	A	A	T	C	7,7
	<i>argH</i> .O2	T	T	C	T	G	C	A	T	A	C	T	C	A	T	G	C	A	T	G	A	17,3
	<i>argH</i> .O2~	T	C	A	T	G	C	A	T	G	A	G	T	A	T	G	C	A	G	A	A	17,3
<i>argC</i>	<i>argC</i> .O1	C	A	T	T	G	C	A	T	A	A	A	C	G	T	G	C	A	T	C	G	12,1
	<i>argC</i> .O1~	C	G	A	T	G	C	A	C	G	T	T	T	A	T	G	C	A	A	T	G	12,1
	<i>argC</i> .O2	G	C	A	C	G	T	A	T	A	G	T	C	A	T	G	C	T	C	T	C	9,4
	<i>argC</i> .O2~	G	A	G	A	G	C	A	T	G	A	C	T	A	T	A	C	G	T	G	C	9,4
<i>arcB</i>	<i>arcB</i> .O1	C	G	C	T	G	T	A	T	A	G	A	A	A	T	T	C	A	G	A	A	10,9
	<i>arcB</i> .O1~	T	T	C	T	G	A	A	T	T	T	C	T	A	T	A	C	A	G	C	G	10,9
	<i>arcB</i> .O2	G	T	T	C	G	T	A	T	A	G	A	C	T	T	C	C	A	G	A	A	9,5
	<i>arcB</i> .O2~	T	T	C	T	G	G	A	A	G	T	C	T	A	T	A	C	G	A	A	C	9,5
<i>argG</i>	<i>argG</i> .O1	C	T	T	T	G	C	A	T	G	G	T	C	A	T	G	C	G	T	A	A	16,7
	<i>argG</i> .O1~	T	T	A	C	G	C	A	T	G	A	C	C	A	T	G	C	A	A	A	G	16,7
	<i>argG</i> .O2	T	G	A	T	G	C	A	T	A	C	T	C	T	T	C	C	T	A	T	G	8,1
	<i>argG</i> .O2~	C	A	T	A	G	G	A	A	G	A	G	T	A	T	G	C	A	T	C	A	8,1
SCO1086	1086.O1	C	A	C	T	G	C	A	T	A	G	G	T	A	T	G	C	G	T	T	C	16,5
	1086.O1~	G	A	A	C	G	C	A	T	A	C	C	T	A	T	G	C	A	G	T	G	16,5
	1086.O2	A	C	C	T	G	A	A	A	A	G	T	C	A	T	T	G	A	C	T	G	3,4
	1086.O2~	C	A	G	T	C	A	A	T	G	A	C	T	T	T	T	C	A	G	G	T	3,4
<i>leuA</i> -SCO2529	SCO2529.O1	T	C	C	C	G	C	A	T	A	C	T	G	A	T	A	C	G	G	A	C	10,4
	SCO2529.O1~	G	T	C	C	G	T	A	T	C	A	G	T	A	T	G	C	G	G	G	A	10,4
<i>hisD</i> -SCO2055	SCO2055.O1	C	T	T	C	G	T	A	C	A	A	C	C	G	T	T	C	A	T	G	C	4,4
	SCO2055.O1~	G	C	A	T	G	A	A	C	G	G	T	T	G	T	A	C	G	A	A	G	4,4
	SCO2055.O2	C	A	C	T	G	C	G	T	G	A	C	C	G	T	C	C	G	A	A	C	5,7
	SCO2055.O2~	G	T	T	C	G	G	A	C	G	G	T	C	A	C	G	C	A	G	T	G	5,7
<i>amtB</i>	<i>amtB</i> .O1	C	C	A	T	G	C	C	A	G	G	T	C	A	T	T	C	G	G	A	G	8,3
	<i>amtB</i> .O1~	C	T	C	C	G	A	A	T	G	A	C	C	T	G	G	C	A	T	G	G	8,3
SCO1863	SCO1863.O1	C	G	C	C	G	G	A	T	G	G	G	G	T	T	A	C	G	A	A	T	1,0
	SCO1863.O1~	A	T	T	C	G	T	A	A	C	C	C	C	A	T	C	C	G	G	C	G	1,0
<i>ureA</i> -SCO1237	<i>ureA</i> .O1	G	A	C	T	G	C	A	T	C	G	G	T	A	A	T	C	A	A	T	C	7,5
	<i>ureA</i> .O1~	G	A	T	T	G	A	T	T	A	C	C	G	A	T	G	C	A	G	T	C	7,5
	<i>ureA</i> .O2	A	G	G	T	G	G	A	T	C	G	G	G	G	T	G	C	A	G	A	C	-1,5
	<i>ureA</i> .O2~	G	T	C	T	G	C	A	C	C	C	C	G	A	T	C	C	A	C	C	T	-1,5
SCO0255	SCO0255.O1	C	G	C	C	G	T	C	G	A	C	T	T	T	T	C	A	A	T	G	1,7	
	SCO0255.O1~	C	A	T	T	G	A	A	A	A	G	T	C	G	A	C	G	G	C	G	1,7	
<i>nrdX/nrdA</i>	<i>nrdA</i> .O1	A	G	A	T	G	T	A	T	G	C	T	C	A	T	G	C	T	C	G	C	6,0
	<i>nrdA</i> .O1~	G	C	G	A	G	C	A	T	G	A	G	C	A	T	A	C	A	T	C	T	6,0
	<i>nrdA</i> .O2	C	G	C	C	G	C	A	G	G	G	G	A	A	T	C	C	G	G	T	G	4,6
	<i>nrdA</i> .O2~	C	A	C	C	G	G	A	T	T	C	C	C	C	T	G	C	G	G	C	G	4,6
SCO3035- <i>whiB</i>	<i>whiB</i> .O1	T	A	C	T	G	C	A	T	G	G	G	C	T	T	G	G	T	T	C	C	6,0
	<i>whiB</i> .O1~	G	G	A	A	C	A	A	G	C	C	C	A	T	G	C	A	G	T	A	6,0	
<i>pyrB</i>	<i>pyrB</i> .O1	G	C	A	T	G	A	A	T	C	G	C	C	T	T	A	C	G	G	A	G	7,1
	<i>pyrB</i> .O1~	C	T	C	C	G	T	A	A	G	G	C	G	A	T	T	C	A	T	G	C	7,1
<i>pyrA</i>	<i>pyrA</i> .O1	A	A	G	C	G	C	A	C	C	G	A	T	A	T	C	C	A	G	T	C	1,8
	<i>pyrA</i> .O1~	G	A	C	T	G	G	A	T	A	T	C	G	G	T	G	C	G	C	T	T	1,8

<i>pyrR</i>	pyrR.O1	T	T	T	C	G	T	A	T	G	G	A	C	A	A	G	C	A	A	C	A	7,7
	pyrR.O1~	T	G	T	T	G	C	T	T	G	T	C	C	A	T	A	C	G	A	A	A	7,7
	pyrR.O2	C	A	C	T	G	T	G	A	G	G	T	T	A	C	G	C	A	G	C	G	5,1
	pyrR.O2~	C	G	C	T	G	C	G	T	A	A	C	C	T	C	A	C	A	G	T	G	5,1
<i>pyk1-SCO2015</i>	pyk1.O1	C	C	A	C	G	C	A	T	G	A	C	C	A	C	T	C	A	A	C	A	8,2
	pyk1.O1~	T	G	T	T	G	A	G	T	G	G	T	C	A	T	G	C	G	T	G	G	8,2
<i>malE-malR</i>	malR.O1	T	G	C	T	G	C	A	A	A	A	A	T	G	T	G	C	A	A	G	A	9,3
	malR.O1~	T	C	T	T	G	C	A	C	A	T	T	T	T	T	G	C	A	G	C	A	9,3
	malR.O2	T	T	G	T	G	C	A	A	G	A	C	T	C	T	G	C	A	A	G	C	8,6
	malR.O2~	G	C	T	T	G	C	A	G	A	G	T	C	T	T	G	C	A	C	A	A	8,6
SCO5864	SCO5864.O1	C	T	C	T	C	C	G	T	G	A	T	C	A	T	G	C	A	C	C	C	7,0
	SCO5864.O1~	G	G	G	T	G	C	A	T	G	A	T	C	A	C	G	G	A	G	A	G	7,0
<i>rstP</i>	rstP.O1	T	T	C	T	G	C	A	A	G	A	T	C	A	T	T	A	A	T	G	C	9,2
	rstP.O1~	G	C	A	T	T	A	A	T	G	A	T	C	T	T	G	C	A	G	A	A	9,2
SCO4292-SCO4293	SCO4293.O1	G	C	C	T	C	C	A	T	G	G	C	T	G	T	G	C	A	G	A	C	9,1
	SCO4293.O1~	G	T	C	T	G	C	A	C	A	G	C	C	A	T	G	G	A	G	G	C	9,1
<i>glnR</i>	glnR.O1	C	C	T	T	G	G	A	T	G	A	C	C	T	T	G	C	G	C	C	C	7,4
	glnR.O1~	G	G	G	C	G	C	A	A	G	G	T	C	A	T	C	C	A	A	G	G	7,4
SCO3978-SCO3979	SCO3979.O1	T	A	A	C	G	G	A	T	A	G	C	T	T	T	T	C	A	T	A	A	10,1
	SCO3979.O1~	T	T	A	T	G	A	A	A	A	G	C	T	A	T	C	C	G	T	T	A	10,1
SCO7314	SCO7314.O1	A	T	C	C	G	C	A	T	G	C	T	C	A	T	A	G	A	A	A	C	7,5
	SCO7314.O1~	G	T	T	T	C	T	A	T	G	A	G	C	A	T	G	C	G	G	A	T	7,5
SCO3067- <i>sig15</i>	SCO3067.O1	C	A	C	A	G	A	A	C	A	C	A	C	T	T	G	C	G	G	T	C	5,2
	SCO3067.O1~	G	A	C	C	G	C	A	A	G	T	G	T	G	T	T	C	T	G	T	G	5,2
SCO2686- <i>ribA1</i>	SCO2686.O1	C	A	A	T	G	C	A	T	G	A	T	C	A	T	G	C	C	A	C	A	12,8
	SCO2686.O1~	T	G	T	G	G	C	A	T	G	A	T	C	A	T	G	C	A	T	T	G	12,8
<i>argR</i>	argR.O1	G	C	C	T	G	G	T	C	A	A	G	G	A	T	G	C	C	G	G	G	-1,5
	argR.O1~	C	C	C	G	G	C	A	T	C	C	T	T	G	C	C	A	G	G	C		-1,5
<i>afsR</i>	afsR.O1	G	G	T	C	C	A	C	C	G	T	C	C	A	T	G	C	C	G	T	C	-4,4
	afsR.O1~	G	A	C	G	G	C	A	T	G	G	A	C	G	G	T	G	G	A	C	C	-4,4
	afsR.O2	G	T	C	C	C	C	C	T	A	G	A	C	A	T	C	C	T	G	A	G	3,0
	afsR.O2~	C	T	C	A	G	G	A	T	G	T	C	T	A	G	G	G	G	G	A	C	3,0
	afsR.O3	T	T	T	G	C	C	T	T	G	T	T	C	A	T	G	C	C	G	A	C	0,7
<i>afsS</i>	afsS.O1	G	T	C	T	G	C	C	C	C	C	C	G	A	T	G	C	G	A	C	G	-0,2
	afsS.O1~	C	G	T	C	G	C	A	T	C	G	G	G	G	G	C	A	G	A	C		-0,2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	6	22	16	6	0	15	68	15	27	27	11	2	53	4	12	1	46	21	27	19
C	28	17	38	27	8	46	6	12	10	16	30	45	4	6	11	75	5	9	18	31
G	31	18	9	5	75	11	6	4	45	30	16	10	12	6	46	8	27	38	17	28
T	19	27	21	46	1	12	4	53	2	11	27	27	15	68	15	0	6	16	22	6
	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84	84

Anexo 4. Matriz v1.3. a) Alineamiento de las cajas ARG encontradas en los genes que dieron positivo en EMSA. Con fondo amarillo tenue se representan las 4 posiciones más conservadas de las cajas ARG. Resaltado con fondo rojo, aquellos nucleótidos que difieren del consenso en las 4 posiciones más conservadas. Se representa cada caja y su complementaria (~). La última columna es la puntuación en bits de la caja según la matriz v1.2. b) Matriz de frecuencias de las cajas ARG, donde se muestra el número de veces que aparece el nucleótido A, C, G o T en la posición correspondiente, bajo la cual aparece el número de nt alineados (suma).

6.5. Matriz de puntuación v1.3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	-1,8	0,04	-0,4	-1,8	-4,5	-0,5	1,69	-0,5	0,39	0,34	-1	-3,4	1,31	-2,4	-0,8	-3,4	1,07	-0,1	0,34	-0,2
C	0,34	-0,3	0,83	0,28	-1,4	1,11	-2,1	-1	-1,2	-0,3	0,44	1,07	-2,1	-1,8	-1	1,79	-1,6	-1,1	-0,2	0,58
G	0,58	-0,2	-1,1	-1,6	1,79	-1	-1,8	-2,1	1,07	0,44	-0,3	-1,2	-1	-2,1	1,11	-1,4	0,28	0,83	-0,3	0,34
T	-0,2	0,34	-0,1	1,07	-3,4	-0,8	-2,4	1,31	-3,4	-1	0,34	0,39	-0,5	1,69	-0,5	-4,5	-1,8	-0,4	0,04	-1,8

Anexo 5. Matriz de puntuación obtenida a partir del alineamiento del anexo 4.

6.6. Resumen resultados de regulación por ArgR

SCO	Nombre gen regulado	Técnica de análisis				
		RT-PCR	EMSA	Luciferasa	Q-PCR	GES en micromatrices
SCO0255-SCO0256			X			
SCO0464					X	X
SCO0509	<i>glpK2</i>				X	X
SCO0524					X	X
SCO0800-SCO0801			?			
SCO0870					X	X
SCO1086			X	X		X
SCO1220-SCO1221	<i>recX-SCO1221</i>		?			
SCO1236	<i>ureA</i>		X			
SCO1483	<i>pyrA</i>	X	X			X
SCO1485	<i>pyr1485</i>	X				X
SCO1487	<i>pyrB</i>		X	X		X
SCO1488	<i>pyrR</i>	X	X	X		X
SCO1570	<i>argH</i>	X	X	X		X
SCO1576	<i>argR</i>	X	X			X
SCO1580	<i>argC</i>	X	X			X
SCO1581		X				X
SCO1674	<i>chpC</i>	X				X
SCO1800	<i>chpE</i>	X				X
SCO1814	<i>inhA</i>				X	X
SCO1863-SCO1864			X			
SCO1865	<i>ectB</i>				X	X
SCO2014	<i>pyk1</i>		X	X		
SCO2054	<i>hisD</i>		X	X		
SCO2198	<i>glnA</i>	X				X
SCO2210	<i>glnII</i>	X				X
SCO2231-SCO2232	<i>malE-malR</i>		X			X
SCO2528-SCO2529	<i>leuA-SCO2529</i>		X	X		
SCO2686-SCO2687	<i>SCO2686-ribA1</i>		X			
SCO2716	<i>chpA</i>				X	X
SCO2718	<i>rdlA</i>	X				X
SCO3034	<i>whiB</i>	X	X	X		
SCO3067-SCO3068	<i>SCO3067-sig15</i>		X			
SCO3943	<i>rstP</i>		X			
SCO3978-SCO3979			X			
SCO4159 (interno)	<i>glnR</i>		X			
SCO4292-SCO4293			X			
SCO4425	<i>afsS</i>	X	X			X
SCO4426	<i>afsR</i>		X			

SCO5076	<i>actVA1</i>				X	X
SCO5224	<i>nrdS</i>	X				
SCO5226	<i>nrdA</i>		X	X		
	<i>riboswitch</i>	X				
SCO5316	<i>whiE ORF V</i>				X	X
SCO5583	<i>amtB</i>		X			X
SCO5584	<i>glnK</i>	X				X
SCO5658					X	X
SCO5803	<i>lexA</i>				X	X
SCO5864			X			
SCO5879	<i>redW</i>				X	X
SCO5976	<i>arcB</i>		X	X		X
SCO6201	<i>gcl</i>				X	X
SCO6265	<i>scbR</i>	X				X
SCO6282	<i>cpkI</i>	X				X
SCO6283	<i>cpkJ</i>	X				X
SCO6473	<i>ccr</i>				X	X
SCO6497	<i>tktA2</i>				X	X
SCO6501	<i>gvpF</i>				X	X
SCO7036	<i>argG</i>	X	X			X
SCO7302-SCO7303			?			X
SCO7314	<i>sigM</i>		X		X	X
SCO7336	<i>pepA</i>				X	X
SCO7412					X	X
SCO7590	<i>katA2</i>				X	X

Anexo 6. Tabla resumen de los genes analizados por RT-PCR, EMSA, luminiscencia y Q-PCR. En la última columna se indican cuáles de ellos son GES. Únicamente se marcan aquellos experimentos para un gen dado (o un promotor de gen) cuyo resultado confirma la regulación por ArgR (X). El símbolo de interrogación (?) implica un resultado dudoso.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aharonowitz, Y. y Demain, A. L. (1978). Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* **14**: 159-164.
- Ahmed, S., Craney, A., Pimentel-Elardo, S. M. y Nodwell, J. R. (2013). A synthetic, species-specific activator of secondary metabolism and sporulation in *Streptomyces coelicolor*. *Chembiochem* **14**: 83-91.
- Aínsa, J. A., Ryding, N. J., Hartley, N., Findlay, K. C., Bruton, C. J. y Chater, K. F. (2000). WhiA, a protein of unknown function conserved among gram-positive bacteria, is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **182**: 5470-5478.
- Akopiants, K., Florova, G., Li, C. y Reynolds, K. A. (2006). Multiple pathways for acetate assimilation in *Streptomyces cinnamonensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**: 141-150.
- Alam, M. T., Merlo, M. E., Hodgson, D. A., Wellington, E. M., Takano, E. y Breitling, R. (2010). Metabolic modeling and analysis of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Genomics* **11**: 202.
- Allan, E. J. y Prosser, J. I. (1983). Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor* A3(2) on solid medium. *J Gen Microbiol*: 2029-2036.
- Allenby, N. E., Laing, E., Bucca, G., Kierzek, A. M. y Smith, C. P. (2012). Diverse control of metabolism and other cellular processes in *Streptomyces coelicolor* by the PhoP transcription factor: genome-wide identification of in vivo targets. *Nucleic Acids Res* **40**: 9543-9556.
- Alonso, E. y Rubio, V. (1989). Participation of ornithine aminotransferase in the synthesis and catabolism of ornithine in mice. Studies using gabaculine and arginine deprivation. *Biochem J* **259**: 131-138.
- Amar, N., Messenguy, F., El Bakkoury, M. y Dubois, E. (2000). ArgRII, a component of the ArgR-Mcml complex involved in the control of arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, is the sensor of arginine. *Mol Cell Biol* **20**: 2087-2097.
- Aminov, R. I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol* **11**: 2970-2988.
- Anderson, A. S. y Wellington, E. M. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 797-814.
- Anderson, T. B., Brian, P. y Champness, W. C. (2001). Genetic and transcriptional analysis of *absA*, an antibiotic gene cluster-linked two-component system that regulates multiple antibiotics in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **39**: 553-566.
- Antón, N., Santos-Aberturas, J., Mendes, M. V., Guerra, S. M., Martín, J. F. y Aparicio, J. F. (2007). PimM, a PAS domain positive regulator of pimarcin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *Microbiology* **153**: 3174-3183.
- Baetens, M., Legrain, C., Boyen, A. y Glansdorff, N. (1998). Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in the extreme thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *Microbiology* **144** (Pt 2): 479-492.
- Baltz, R. H., McHenney, M. A., Cantwell, C. A., Queener, S. W. y Solenberg, P. J. (1997). Applications of transposition mutagenesis in antibiotic producing streptomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**: 179-187.
- Barcelona-Andrés, B., Marina, A. y Rubio, V. (2002). Gene structure, organization, expression, and potential regulatory mechanisms of arginine catabolism in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **184**: 6289-6300.
- Barile, M. F., Schimke, R. T. y Riggs, D. B. (1966). Presence of the arginine dihydrolase pathway in *Mycoplasma*. *J Bacteriol* **91**: 189-192.

- Barreiro, C., Prieto, C., Sola-Landa, A., Solera, E., Martínez-Castro, M., Pérez-Redondo, R. *et al.* (2012) Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the producer of the clinically important immunosuppressant tacrolimus (FK506). *J Bacteriol* **194**: 3756-3757.
- Bascarán, V., Hardisson, C., y Braña, A. F. (1989). Regulation of nitrogen catabolic enzymes in *Streptomyces clavuligerus*. *J Gen Microbiol* **135**: 2465-2474.
- Bascarán, V., Sánchez, L., Hardisson, C. y Braña, A. F. (1991). Stringent response and initiation of secondary metabolism in *Streptomyces clavuligerus*. *J Gen Microbiol* **137**: 1625-1634.
- Bentley, S. D., Brown, S., Murphy, L. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Parkhill, J. *et al.* (2004). SCP1, a 356,023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **51**: 1615-1628.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D. *et al.* (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.
- Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* **58**: 1-26.
- Bibb, M. (1996). 1995 Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **142**: 1335-1344.
- Bibb, M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* **8**: 208-215.
- Bibb, M. J., Bibb, M. J., Ward, J. M. y Cohen, S. N. (1985). Nucleotide sequences encoding and promoting expression of three antibiotic resistance genes indigenous to *Streptomyces*. *Mol Gen Genet* **199**: 26-36.
- Bibb, M. J., Domonkos, A., Chandra, G. y Buttner, M. J. (2012). Expression of the chaplin and rodlin hydrophobic sheath proteins in *Streptomyces venezuelae* is controlled by sigma(BldN) and a cognate anti-sigma factor, RsbN. *Mol Microbiol* **84**: 1033-1049.
- Bibb, M.J., Ward, J.M., Kieser, T., Cohen, S.N., and Hopwood, D.A. (1981) Excision of chromosomal DNA sequences from *Streptomyces coelicolor* forms a novel family of plasmids detectable in *Streptomyces lividans*. *Mol Gen Genet* **184**: 230-240.
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E. T., Rao, R. N. y Schoner, B. E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* **116**: 43-49.
- Billheimer, J. T., Carnevale, H. N., Leisinger, T., Eckhardt, T. y Jones, E. E. (1976). Ornithine delta-transaminase activity in *Escherichia coli*: its identity with acetylornithine delta-transaminase. *J Bacteriol* **127**: 1315-1323.
- Birch, A., Hausler, A. y Hutter, R. (1990). Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp. *J Bacteriol* **172**: 4138-4142.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J. *et al.* (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* **11**: 731-753.
- Borovok, I., Gorovitz, B., Schreiber, R., Aharonowitz, Y. y Cohen, G. (2006). Coenzyme B12 controls transcription of the *Streptomyces* class Ia ribonucleotide reductase *nrdABS* operon via a riboswitch mechanism. *J Bacteriol* **188**: 2512-2520.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braeken, K., Moris, M., Daniels, R., Vanderleyden, J. y Michiels, J. (2006). New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. *Trends Microbiol* **14**: 45-54.

- Braña, A. F., Manzanal, M. B. y Hardisson, C. (1982). Characterization of intracellular polysaccharides of *Streptomyces*. *Can J Microbiol* **28**: 1320-1323.
- Brekasis, D. y Paget, M. S. (2003). A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J* **22**: 4856-4865.
- Brennan, R. G. (1993). The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff. *Cell* **74**: 773-776.
- Bringel, F., Frey, L., Boivin, S. y Hubert, J. C. (1997). Arginine biosynthesis and regulation in *Lactobacillus plantarum*: the *carA* gene and the *argCJBDF* cluster are divergently transcribed. *J Bacteriol* **179**: 2697-2706.
- Brockmann, H. y Hieronymus, E. (1955). Über Actinomycetenfarbstoff, V. Mitteil.: zur Konstitution des Actinorhodins, III. Mitteil Chem. Berlin: pp. 1379-1390.
- Broman, K., Lauwers, N., Stalon, V. y Wiame, J. M. (1978). Oxygen and nitrate in utilization by *Bacillus licheniformis* of the arginase and arginine deiminase routes of arginine catabolism and other factors affecting their syntheses. *J Bacteriol* **135**: 920-927.
- Bucca, G., Laing, E., Mersinias, V., Allenby, N., Hurd, D., Holdstock, J. *et al.* (2009). Development and application of versatile high density microarrays for genome-wide analysis of *Streptomyces coelicolor*: characterization of the HspR regulon. *Genome Biol* **10**: R5.
- Burke, M., Merican, A. F. y Sherratt, D. J. (1994). Mutant *Escherichia coli* arginine repressor proteins that fail to bind L-arginine, yet retain the ability to bind their normal DNA-binding sites. *Mol Microbiol* **13**: 609-618.
- Burton, K. (1956). A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J* **62**: 315-323.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**: 169-193.
- Bussey, L. B. y Ingraham, J. L. (1982). A regulatory gene (*use*) affecting the expression of *pyrA* and certain other pyrimidine genes. *Journal of Bacteriology*, **151**, 144-152.
- Butala, M., Sonjak, S., Kamensek, S., Hodosecek, M., Browning, D. F., Zgur-Bertok, D. y Busby, S. J. (2012). Double locking of an *Escherichia coli* promoter by two repressors prevents premature colicin expression and cell lysis. *Mol Microbiol* **86**: 129-139.
- Buttner, M. J., Chater, K. F. y Bibb, M. J. (1990). Cloning, disruption, and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **172**: 3367-3378.
- Buttner, M. J., Smith, A. M. y Bibb, M. J. (1988). At least three different RNA polymerase holoenzymes direct transcription of the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Cell* **52**: 599-607.
- Bystrykh, L. V., Fernández-Moreno, M. A., Herrema, J. K., Malpartida, F., Hopwood, D. A. y Dijkhuizen, L. (1996). Production of actinorhodin-related "blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **178**: 2238-2244.
- Caldara, M., Charlier, D. y Cunin, R. (2006). The arginine regulon of *Escherichia coli*: whole-system transcriptome analysis discovers new genes and provides an integrated view of arginine regulation. *Microbiology* **152**: 3343-3354.
- Caldara, M., Minh, P. N., Bostoen, S., Massant, J. y Charlier, D. (2007). ArgR-dependent repression of arginine and histidine transport genes in *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* **373**: 251-267.

- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B. *et al.* (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**: 1327-1333.
- Cashel, M. y Kabalcher, B. (1970). The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*: 2309-2318.
- Castro-Melchor, M., Charaniya, S., Karypis, G., Takano, E. y Hu, W. S. (2010). Genome-wide inference of regulatory networks in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Genomics* **11**: 578.
- Cattoir, V. (2004). [Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria]. *Pathol Biol (Paris)* **52**: 607-616.
- Celis, T. F. (1977). Properties of an *Escherichia coli* K-12 mutant defective in the transport of arginine and ornithine. *J Bacteriol* **130**: 1234-1243.
- Challis, G. L. y Hopwood, D. A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 2**: 14555-14561.
- Chaphalkar, S. R. y Dey, S. (1998). Thermostable alkaline metalloprotease from newly isolated alkalophilic *Streptomyces diastaticus* strain SS1. *Indian J Biochem Biophys* **35**: 34-40.
- Charaniya, S., Mehra, S., Lian, W., Jayapal, K. P., Karypis, G. y Hu, W. S. (2007) Transcriptome dynamics-based operon prediction and verification in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res* **35**: 7222-7236.
- Charlier, D. (2004). Arginine regulation in *Thermotoga neapolitana* and *Thermotoga maritima*. *Biochem Soc Trans* **32**: 310-313.
- Charlier, D. y Glansdorff, N. (2004). Biosynthesis of arginine and polyamines. *www.ecosaLorg* **Section 3.6.1.10**.
- Charlier, D., Roovers, M., Van Vliet, F., Boyen, A., Cunin, R., Nakamura, Y. *et al.* (1992). Arginine regulon of *Escherichia coli* K-12. A study of repressor-operator interactions and of in vitro binding affinities versus in vivo repression. *J Mol Biol* **226**: 367-386.
- Chater, K. F. (2001). Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Curr Opin Microbiol* **4**: 667-673.
- Chater, K. F. y Bibb, M. J. (1997). Regulation of bacterial antibiotic production. In *Products of secondary metabolism*, Biotechnology. Kleinkauf, H., and von Döhren, H. (eds). Weinheim, Germany: pp. 59-105.
- Chater, K. F., Bruton, C. J., Foster, S. G. y Tobek, I. (1985). Physical and genetic analysis of IS110, a transposable element of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Gen Genet* **200**: 235-239.
- Chater, K. F., Bruton, C. J., Plaskitt, K. A., Buttner, M. J., Méndez, C. y Helmann, J. D. (1989). The developmental fate of *S. coelicolor* hyphae depends upon a gene product homologous with the motility sigma factor of *B. subtilis*. *Cell* **59**: 133-143.
- Chater, K. F. y Chandra, G. (2006). The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 651-672.
- Chater, K. F. y 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**: 1-11.
- Chater, K. F. y Hopwood, D. A. (1993). *Streptomyces*. In *Bacillus subtilis* and other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R. (eds). Washington, DC: pp. 83-99.

- Chater, K. F., Hopwood, D. A., Kieser, T. y Thompson, C. J. (1992). Gene cloning in *Streptomyces*. *Curr Top Microbiol Immunol* **96**: 69-95.
- Chen, C.W. (1996). Complications and implications of linear bacterial chromosomes. *Trends Genet* **12**: 192-196.
- Chen, C. W., Huang, C. H., Lee, H. H., Tsai, H. H. y Kirby, R. (2002). Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. *Trends Genet* **18**: 522-529.
- Chen, C. W., Yu, T. W., Chung, H. M. y Chou, C. F. (1992). Discovery and characterization of a new transposable element, Tn4811, in *Streptomyces lividans* 66. *J Bacteriol* **174**: 7762-7769.
- Chen, S. H., Merican, A. F. y Sherratt, D. J. (1997). DNA binding of *Escherichia coli* arginine repressor mutants altered in oligomeric state. *Mol Microbiol* **24**: 1143-1156.
- Chen, Y., Minasov, G., Roth, T. A., Prati, F. y Shoichet, B. K. (2006). The deacylation mechanism of AmpC beta-lactamase at ultrahigh resolution. *J Am Chem Soc* **128**: 2970-2976.
- Cheng, Y. R., Fang, A. y Demain, A. L. (1995). Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**: 1096-1098.
- Cherney, L. T., Cherney, M. M., Garen, C. R. y James, M. N. (2010). Crystal structure of the intermediate complex of the arginine repressor from *Mycobacterium tuberculosis* bound with its DNA operator reveals detailed mechanism of arginine repression. *J Mol Biol* **399**: 240-254.
- Cherney, L. T., Cherney, M. M., Garen, C. R., Lu, G. J. y James, M. N. (2008a). Crystal structure of the arginine repressor protein in complex with the DNA operator from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol* **384**: 1330-1340.
- Cherney, L. T., Cherney, M. M., Garen, C. R., Lu, G. J. y James, M. N. (2008b). Structure of the C-terminal domain of the arginine repressor protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **64**: 950-956.
- Cho, S., Hoang, A., Sinha, R., Zhong, X. Y., Fu, X. D., Krainer, A. R. y Ghosh, G. (2011). Interaction between the RNA binding domains of Ser-Arg splicing factor 1 and U1-70K snRNP protein determines early spliceosome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 8233-8238.
- Chou, H. T., Hegazy, M. y Lu, C. D. (2010). L-lysine catabolism is controlled by L-arginine and ArgR in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **192**: 5874-5880.
- Choulet, F., Aigle, B., Gallois, A., Mangenot, S., Gerbaud, C., Truong, C. *et al.* (2006). Evolution of the terminal regions of the *Streptomyces* linear chromosome. *Mol Biol Evol* **23**: 2361-2369.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. y Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2172-2175.
- Chung, S. T. (1987). Tn4556, a 6.8-kilobase-pair transposable element of *Streptomyces fradiae*. *J Bacteriol* **169**: 4436-4441.
- Claessen, D., de Jong, W., Dijkhuizen, L. y Wosten, H. A. (2006). Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends Microbiol* **14**: 313-319.
- Claessen, D., Stokroos, I., Deelstra, H. J., Penninga, N. A., Bormann, C., Salas, J. A., Dijkhuizen, L. y Wösten, H. A. (2004). The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlines and chaplains. *MolMicrobiol* **53**:433-443.
- Cohn, F. (2005). The development history of genus *Volvox*. 1875. *Protist* **156**: 358-373.

- Colloms, S. D., Alen, C. y Sherratt, D. J. (1998). The ArcA/ArcB two-component regulatory system of *Escherichia coli* is essential for Xer site-specific recombination at *psi*. *Mol Microbiol* **28**: 521-530.
- Conesa, A., Nueda, M. J., Ferrer, A. y Talon, M. (2006). maSigPro: a method to identify significantly differential expression profiles in time-course microarray experiments. *Bioinformatics* **22**: 1096-1102.
- Cornet, F., Mortier, I., Patte, J. y Louarn, J. M. (1994). Plasmid pSC101 harbors a recombination site, *psi*, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site *dif*. *J Bacteriol* **176**: 3188-3195.
- Crabeel, M., Abadjieva, A., Hilven, P., Desimpelaere, J. y Soetens, O. (1997). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ARG7 gene encoding ornithine acetyltransferase, an enzyme also endowed with acetylglutamate synthase activity. *Eur J Biochem* **250**: 232-241.
- Craney, A., Ozimok, C., Pimentel-Elardo, S. M., Capretta, A. y Nodwell, J. R. (2012). Chemical perturbation of secondary metabolism demonstrates important links to primary metabolism. *Chem Biol* **19**: 1020-1027.
- Cullum, J., Altenbuchner, J., Flett, F. y Piendl, W. (1986). DNA amplification and genetic instability in *Streptomyces*. *Biotechnol Genet Eng Rev* **4**: 59-78.
- Cundliffe, E. (1989). How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu Rev Microbiol* **43**: 207-233.
- Cunin, R., Eckhardt, T., Piette, J., Boyen, A., Pierard, A. y Glansdorff, N. (1983). Molecular basis for modulated regulation of gene expression in the arginine regulon of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* **11**: 5007-5019.
- Cunin, R., Glansdorff, N., Pierard, A. y Stalon, V. (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev* **50**: 314-352.
- Czaplewski, L. G., North, A. K., Smith, M. C., Baumberg, S. y Stockley, P. G. (1992). Purification and initial characterization of AhrC: the regulator of arginine metabolism genes in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **6**: 267-275.
- D'Alia, D., Eggle, D., Nieselt, K., Hu, W. S., Breitling, R. y Takano, E. (2011). Deletion of the signalling molecule synthase ScbA has pleiotropic effects on secondary metabolite biosynthesis, morphological differentiation and primary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microb Biotechnol* **4**: 239-251.
- Dary, A., Martín, P., Wenner, T., Decaris, B. y Leblond, P. (2000). DNA rearrangements at the extremities of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome: evidence for developmental control. *Biochimie* **82**: 29-34.
- Davis, N. K. y Chater, K. F. (1992). The *Streptomyces coelicolor* *whiB* gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation. *Mol Gen Genet* **232**: 351-358.
- Davis, R. H. (1986). Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **50**: 280-313.
- De Hauwer, G., Lavalle, R. y Wiame, J. M. (1964). Studies of pyrroline dehydrogenase and of catabolism regulation of arginine and proline in *Bacillus subtilis*. *Elsevier* **81**: 257-269.
- de la Fuente, A., Martín, J. F., Rodríguez-García, A. y Liras, P. (2004). Two proteins with ornithine acetyltransferase activity show different functions in *Streptomyces clavuligerus*: Oat2 modulates clavulanic acid biosynthesis in response to arginine. *J Bacteriol* **186**: 6501-6507.
- de la Fuente, J. L., Martín, J. F. y Liras, P. (1996). New type of hexameric ornithine carbamoyltransferase with arginase activity in the cephamycin producers *Streptomyces clavuligerus* and *Nocardia lactamdurans*. *Biochem J* **320** (Pt 1): 173-179.

- De Schrijver, A. y De Mot, R. (1999). A subfamily of MalT-related ATP-dependent regulators in the LuxR family. *Microbiology* **145**: 1287-1288.
- de Vos, A. M., Ultsch, M. H., Kelley, R. F., Padmanabhan, K., Tulinsky, A., Westbrook, M. L. y Kossiakoff, A. A. (1992). Crystal structure of the kringle 2 domain of tissue plasminogen activator at 2.4-Å resolution. *Biochemistry* **31**: 270-279.
- Degryse, E., Glansdorff, N. y Pierard, A. (1976). Arginine biosynthesis and degradation in an extreme thermophile, strain Z05. *Arch Int Physiol Biochim* **84**: 599-601.
- Demain, A. L. y Fang, A. (1995). Emerging Concepts of Secondary Metabolism in Actinomycetes. *Actinomycetologica* **9**, 98-117.
- den Hengst, C. D., Tran, N. T., Bibb, M. J., Chandra, G., Leskiw, B. K. y Buttner, M. J. (2010). Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. *Mol Microbiol* **78**: 361-379.
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R. y Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**: 680-686.
- Derouaux, A., Halici, S., Nothaft, H., Neutelings, T., Moutzourelis, G., Dusart, J. *et al.* (2004). Deletion of a cyclic AMP receptor protein homologue diminishes germination and affects morphological development of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **186**: 1893-1897.
- Dessaux, Y., Petit, A., Tempe, J., Demarez, M., Legrain, C. y Wiame, J. M. (1986). Arginine catabolism in *Agrobacterium* strains: role of the Ti plasmid. *J Bacteriol* **166**: 44-50.
- Devroede, N., Thia-Toong, T. L., Gigot, D., Maes, D. y Charlier, D. (2004). Purine and pyrimidine-specific repression of the *Escherichia coli* *carAB* operon are functionally and structurally coupled. *J Mol Biol* **336**: 25-42.
- Diacovich, L., Mitchell, D. L., Pham, H., Gago, G., Melgar, M. M., Khosla, C. *et al.* (2004). Crystal structure of the beta-subunit of acyl-CoA carboxylase: structure-based engineering of substrate specificity. *Biochemistry* **43**: 14027-14036.
- Dimova, D., Weigel, P., Takahashi, M., Marc, F., Van Duyne, G. D. y Sakanyan, V. (2000). Thermostability, oligomerization and DNA-binding properties of the regulatory protein ArgR from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana*. *Mol Gen Genet* **263**: 119-130.
- Dion, M., Charlier, D., Wang, H., Gigot, D., Savchenko, A., Hallet, J. N. *et al.* (1997). The highly thermostable arginine repressor of *Bacillus stearothermophilus*: gene cloning and repressor-operator interactions. *Mol Microbiol* **25**: 385-398.
- Distler, J. y Piepersberg, W. (1985). Cloning and characterization of a gene from *Streptomyces griseus* coding for a streptomycin-phosphorylating activity. *Elsevier* **28**: 113-117.
- Dong, H. J., Tao, S. M., Li, Y. Q., Chan, S. H., Shen, X. L., Wang, C. X. y Guan, W. J. (2006). Analysis of the GTPase activity and active sites of the NG domains of FtsY and Ffh from *Streptomyces coelicolor*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **38**: 467-476.
- Doull, J. L. y Vining, L. C. (1981). Nutrient utilization in actinomycetes. Induction of α -glucosidases in *Streptomyces venezuelae*. *Can J Microbiol* **27**: 639-645.
- Doull, J. L. y Vining, L. C. (1989). Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl Microbiol Biotechnol* **32**: 449-454.
- Dubois, E., Grenson, M. y Wiame, J. M. (1974). [Proceedings: Catabolic repression by nitrogen of arginase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*]. *Arch Int Physiol Biochim* **82**: 798.

- Dundas, I. E. y Halvorson, H. O. (1966). Arginine metabolism in *Halobacterium salinarium*, an obligately halophilic bacterium. *J Bacteriol* **91**: 113-119.
- El Bakkoury, M., Dubois, E. y Messenguy, F. (2000). Recruitment of the yeast MADS-box proteins, ArgRI and Mcm1 by the pleiotropic factor ArgRIII is required for their stability. *Mol Microbiol* **35**: 15-31.
- Ensign, J. C. (1978). Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annu Rev Microbiol* **32**: 185-219.
- Errey, J. C. y Blanchard, J. S. (2005). Functional characterization of a novel ArgA from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **187**: 3039-3044.
- Fernández-Moreno, M. A., Caballero, J. L., Hopwood, D. A. y Malpartida, F. (1991). The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* **66**: 769-780.
- Fink, D., Falke, D., Wohlleben, W. y Engels, A. (1999). Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2): modification of glutamine synthetase I by an adenylyltransferase. *Microbiology* **145**: 2313-2322.
- Fink, D., Weissschuh, N., Reuther, J., Wohlleben, W. y 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. y 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**: 4553-4558.
- Fischer, G., Kyriacou, A., Decaris, B. y Leblond, P. (1997b). Genetic instability and its possible evolutionary implications on the chromosomal structure of *Streptomyces*. *Biochimie* **79**: 555-558.
- Fischer, M., Alderson, J., van Keulen, G., White, J. y Sawers, R. G. (2010). The obligate aerobic *Streptomyces coelicolor* A3(2) synthesizes three active respiratory nitrate reductases. *Microbiology* **156**: 3166-3179.
- Fischer, M., Schmidt, C., Falke, D. y Sawers, R. G. (2012). Terminal reduction reactions of nitrate and sulfate assimilation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of genes encoding nitrite and sulfite reductases. *Res Microbiol* **163**: 340-348.
- Fisher, S. H. y Wray, L. V. Jr. (1989). Regulation of glutamine synthetase in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **171**: 2378-2383.
- Flardh, K. (2003). Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* **6**: 564-571.
- Flint, H. J. y Kemp, B. F. (1981). General control of arginine biosynthetic enzymes in *Neurospora crassa*. *J Gen Microbiol* **124**: 129-140.
- Floriano, B. y Bibb, M. (1996). *afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **21**: 385-396.
- Floriano, B., Herrero, A. y Flores, E. (1994). Analysis of expression of the *argC* and *argD* genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **176**: 6397-6401.
- Florova, G., Kazanina, G. y Reynolds, K. A. (2002). Enzymes involved in fatty acid and polyketide biosynthesis in *Streptomyces glaucescens*: role of FabH and FabD and their acyl carrier protein specificity. *Biochemistry* **41**: 10462-10471.
- Flowers, T. H. y Williams, S. T. (1978). The influence of pH on the growth rate and viability of neutrophilic and acidophilic streptomycetes. *Microbios* **18**: 223-228.

- Folcher, M., Gaillard, H., Nguyen, L. T., Nguyen, K. T., Lacroix, P., Bamas-Jacques, N. *et al.* (2001). Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase. *J Biol Chem* **276**: 44297-44306.
- Fried, M. y Crothers, D. M. (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **9**: 6505-6525.
- Friedrich, B. y Magasanik, B. (1978). Utilization of arginine by *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* **133**: 680-685.
- Fujiwara, K., Tsubouchi, T., Kuzuyama, T. y Nishiyama, M. (2006). Involvement of the arginine repressor in lysine biosynthesis of *Thermus thermophilus*. *Microbiology* **152**: 3585-3594.
- Fulde, M., Willenborg, J., de Greeff, A., Benga, L., Smith, H. E., Valentin-Weigand, P. y Goethe, R. (2011). ArgR is an essential local transcriptional regulator of the *arcABC* operon in *Streptococcus suis* and is crucial for biological fitness in an acidic environment. *Microbiology* **157**: 572-582.
- Galperin, M. Y. (2006) Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* **188**: 4169-4182.
- Gao, C., Hindra, Mulder, D., Yin, C. y Elliot, M. A. (2012). Crp is a global regulator of antibiotic production in *Streptomyces*. *MBio* **3**.
- Garner, M. M. y Revzin, A. (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* **9**: 3047-3060.
- Garnett, J. A., Baumberg, S., Stockley, P. G. y Phillips, S. E. (2007). A high-resolution structure of the DNA-binding domain of AhrC, the arginine repressor/activator protein from *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **63**: 914-917.
- Garnett, J. A., Marincs, F., Baumberg, S., Stockley, P. G. y Phillips, S. E. (2008). Structure and function of the arginine repressor-operator complex from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **379**: 284-298.
- Garrity, G., Bell, J. y Lilburn, T. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Boone, D.R., Castenholz, R.W., and Garrity, G.M. (eds). Springer-Verlag, New York.
- Gause, G. G., Preobrazhenskaya, T. P., Kudrina, E. S., Blinov, N. O., Ryabova, I. D. y Sveshnikova, M. A. (1957). Problems in the classification of Antagonistic Actinomycetes Moscow (Russia): State Publishing House of Medical Literature. Medzig.
- Gerber, N. N. y Lechevalier, H. A. (1965). Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Appl Microbiol* **13**: 935-938.
- Ghochikyan, A., Karaivanova, I. M., Lecocq, M., Vusio, P., Arnaud, M. C., Snapyan, M. *et al.* (2002). Arginine operator binding by heterologous and chimeric ArgR repressors from *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol* **184**: 6602-6614.
- Giles, K. W. y Myers, A. (1965). An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* **206**: 93.
- Glansdorff, N. (1996). Biosynthesis of arginine and polyamines. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C., and other authors (eds). Washington DC: American Society for Microbiology: pp. 408-433.
- Glansdorff, N. y Xu, Y. (2007). Microbial Arginine Biosynthesis: Pathway, Regulation and Industrial Production. In *Amino Acid Biosynthesis ~ Pathways, Regulation and Metabolic Engineering*. Wendisch, V. (ed). Springer Berlin Heidelberg, pp. 219-257.

- Gómez-Escribano, J. P., Martín, J. F., Hesketh, A., Bibb, M. J. y Liras, P. (2008). *Streptomyces clavuligerus relA*-null mutants overproduce clavulanic acid and cephamycin C: negative regulation of secondary metabolism by (p)ppGpp. *Microbiology* **154**: 744-755.
- Goodfellow, M. (1989). Suprageneric classification of actinomycetes. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams, S.T., Sharpe, M.E., and Holt, J.G. (eds). Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 2333-2339.
- Goodfellow, M. (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In *The Actinobacteria*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Whitman, W.B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., and Ludwig, W. (eds). New York: Springer: pp. 33-2028.
- Goodfellow, M. y Williams, S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* **37**: 189-216.
- Gottelt, M., Hesketh, A., Bunet, R., Puri, P. y Takano, E. (2012). Characterisation of a natural variant of the gamma-butyrolactone signalling receptor. *BMC Res Notes* **5**: 379.
- Gottelt, M., Kol, S., Gómez-Escribano, J. P., Bibb, M. y Takano, E. (2010). Deletion of a regulatory gene within the *cpk* gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **156**:2343-2353.
- Gourlay, S. C. y Colloms, S. D. (2004). Control of Cre recombination by regulatory elements from Xer recombination systems. *Mol Microbiol* **52**: 53-65.
- Grandori, R., Lavoie, T. A., Pflumm, M., Tian, G., Niersbach, H., Maas, W. K. *et al.* (1995). The DNA-binding domain of the hexameric arginine repressor. *J Mol Biol* **254**: 150-162.
- Gregory, M. A., Till, R. y Smith, M. C. (2003). Integration site for *Streptomyces* phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors. *J Bacteriol* **185**: 5320-5323.
- Grodberg, J. y Dunn, J. J. (1988). *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* **170**: 1245-1253.
- Guerra, S. M., Rodríguez-García, A., Santos-Aberturas, J., Vicente, C. M., Payero, T. D., Martín, J. F. y Aparicio, J. F. (2012). LAL regulators SCO0877 and SCO7173 as pleiotropic modulators of phosphate starvation response and actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* **7**: e31475.
- Guirard, B. M. y Snell, E. E. (1980). Purification and properties of ornithine decarboxylase from *Lactobacillus* sp. 30a. *J Biol Chem* **255**: 5960-5964.
- Gupta, M. y Carr, N. G. (1981). Detection of glutamate synthase in heterocysts of *Anabaena* sp. strain 7120. *J Bacteriol* **148**: 980-982.
- Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T. y Chater, K. F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1541-1546.
- Gyan, S., Shiohira, Y., Sato, I., Takeuchi, M. y Sato, T. (2006). Regulatory loop between redox sensing of the NADH/NAD(+) ratio by Rex (YdiH) and oxidation of NADH by NADH dehydrogenase Ndh in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**: 7062-7071.
- Haas, D., Holloway, B. W., Schambeck, A. y Leisinger, T. (1977). The genetic organization of arginine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* **154**: 7-22.
- Haas, D., Kurer, V. y Leisinger, T. (1972). N-acetylglutamate synthetase of *Pseudomonas aeruginosa*. An assay in vitro and feedback inhibition by arginine. *Eur J Biochem* **31**: 290-295.
- Haas, D. y Leisinger, T. (1975). N-acetylglutamate 5-phosphotransferase of *Pseudomonas aeruginosa*. Catalytic and regulatory properties. *Eur J Biochem* **52**: 377-393.

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Haneishi, T., Kitahara, N., Takiguchi, Y., Arai, M. y Sugawara, S. (1974a). New antibiotics, methylenomycins A and B. I. Producing organism, fermentation and isolation, biological activities and physical and chemical properties. *J Antibiot (Tokyo)* **27**: 386-392.
- Haneishi, T., Terahara, A., Arai, M., Hata, T. y Tamura, C. (1974b). New antibiotics, methylenomycins A and B. II. Structures of methylenomycins A and B. *J Antibiot (Tokyo)* **27**: 393-399.
- Haneishi, T., Terahara, A., Hamano, K. y Arai, M. (1974c). New antibiotics, methylenomycins A and B. 3. Chemical modifications of methylenomycin A and structure-activity correlations in methylenomycins. *J Antibiot (Tokyo)* **27**: 400-407.
- Hara, O. y Beppu, T. (1982). Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus*-the role of A-factor. *J Antibiot (Tokyo)* **35**: 349-358.
- Hardisson, C. y Manzanal, M. B. (1976). Ultrastructural studies of sporulation in *Streptomyces*. *J Bacteriol* **127**: 1443-1454.
- Hardisson, C., Manzanal, M. B., Salas, J. A. y Suarez, J. E. (1978). Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *J Gen Microbiol* **105**: 203-214.
- He, W., Lei, J., Liu, Y. y Wang, Y. (2008). [Regulatory genes of geldanamycin biosynthesis]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **24**: 717-722.
- Heichlinger, A., Ammelburg, M., Kleinschnitz, E. M., Latus, A., Maldener, I., Flardh, K. *et al.* (2011). The MreB-like protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis. *J Bacteriol* **193**: 1533-1542.
- Henderson, D. J., Brolle, D. F., Kieser, T., Melton, R. E. y Hopwood, D. A. (1990). Transposition of IS117 (the *Streptomyces coelicolor* A3 (2) mini-circle) to and from a cloned target site and into secondary chromosomal sites. *Mol Gen Genet* **224**: 65-71.
- Hesketh, A., Chen, W. J., Ryding, J., Chang, S. y Bibb, M. (2007b). The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genome Biol* **8**: R161.
- Higgins, C. E., Hamill, R. L., Sands, T. H., Hoehn, M. M. y Davis, N. E. (1974). Letter: The occurrence of deacetoxycephalosporin C in fungi and streptomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* **27**: 298-300.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. y Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* **11**: 1026-1030.
- Hindle, Z., Callis, R., Dowden, S., Rudd, B. A. y Baumberg, S. (1994). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Streptomyces coelicolor* A3(2) *argCJB* gene cluster. *Microbiology* **140** (Pt 2): 311-320.
- Hindra, Pak, P. y Elliot, M. A. (2010). Regulation of a novel gene cluster involved in secondary metabolite production in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **192**: 4973-4982.
- Ho, T. F., Ma, C. J., Lu, C. H., Tsai, Y. T., Wei, Y. H., Chang, J. S. *et al.* (2007). Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53. *Toxicol Appl Pharmacol* **225**: 318-328.
- Hobbs, G., Frazer, C. M., Gardner, D. C. J., Cullum, J. A. y Oliver, S. G. (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol* **31**: 272-277.
- Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**: 165-170.

- Hoffmann, T., Frankenberg, N., Marino, M. y Jahn, D. (1998). Ammonification in *Bacillus subtilis* utilizing dissimilatory nitrite reductase is dependent on *resDE*. *J Bacteriol* **180**: 186-189.
- Holmes, D. S. y Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**: 193-197.
- Hong, H. J., Paget, M. S. y Buttner, M. J. (2002). A signal transduction system in *Streptomyces coelicolor* that activates the expression of a putative cell wall glycan operon in response to vancomycin and other cell wall-specific antibiotics. *Mol Microbiol* **44**: 1199-1211.
- Hopwood, D. A. (1999). Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology* **145** (Pt 9): 2183-2202.
- Hopwood, D. A. (2006). Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annu Rev Genet* **40**: 1-23.
- Hopwood, D. A. (2007). *Streptomyces* in nature and medicine Oxford University Press. Inc.
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F. y Kieser, T. (1987). Plasmid and phage vectors for gene cloning and analysis in *Streptomyces*. *Methods Enzymol* **153**: 116-166.
- Hopwood, D. A., Hintermann, G., Kieser, T. y Wright, H. M. (1984). Integrated DNA sequences in three streptomycetes form related autonomous plasmids after transfer to *Streptomyces lividans*. *Plasmid* **11**: 1-16.
- Hopwood, D. A. y Kieser, T. (1993). Conjugative plasmids in *Streptomyces*. In Bacterial Conjugation. Clewel, D.B. (ed). Plenum Press, New York.: pp. 293-312.
- 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**: 462-467.
- Horinouchi, S., Ohnishi, Y. y Kang, D. K. (2001). The A-factor regulatory cascade and cAMP in the regulation of physiological and morphological development in *Streptomyces griseus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**: 177-182.
- Hovel-Miner, G., Faucher, S. P., Charpentier, X. y Shuman, H. A. (2010). ArgR-regulated genes are derepressed in the *Legionella*-containing vacuole. *J Bacteriol* **192**: 4504-4516.
- Huang, J., Lih, C. J., Pan, K. H. y Cohen, S. N. (2001). Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays. *Genes Dev* **15**: 3183-3192.
- Hutchings, M. I., Hoskisson, P. A., Chandra, G. y Buttner, M. J. (2004). Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **150**: 2795-2806.
- Igwebe, E. C. K. y Thomas, C. (1978). Occurrence of enzymes of arginine dihydrolase pathway in *Spiroplasma citri*. *J Gen Appl Microbiol* **84**: 261-269.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T. *et al.* (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* **21**: 526-531.
- Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Ishihara, H., Nakano, M. M. y Ogawara, H. (1985). Cloning of a gene from *Streptomyces* species complementing argG mutations. *J Antibiot (Tokyo)* **38**: 787-794.

- Itikawa, H., Baumberg, S. y Vogel, H. J. (1968). Enzymic basis for a genetic suppression: accumulation and deacylation of N-acetylglutamic gamma-semialdehyde in enterobacterial mutants. *Biochim Biophys Acta* **159**: 547-550.
- Iyer, V. R., Horak, C. E., Scafe, C. S., Botstein, D., Snyder, M. y Brown, P. O. (2001). Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature* **409**: 533-538.
- Jakimowicz, D., Majka, J., Messer, W., Speck, C., Fernández, M., Martín, M. C. *et al.* (1998). Structural elements of the *Streptomyces oriC* region and their interactions with the DnaA protein. *Microbiology* **144** (Pt 5): 1281-1290.
- Janssen, G. R. y Bibb, M. J. (1990). Tandem promoters, *tsrp1* and *tsrp2*, direct transcription of the thiostrepton resistance gene (*tsr*) of *Streptomyces azureus*: transcriptional initiation from *tsrp2* occurs after deletion of the -35 region. *Mol Gen Genet* **221**: 339-346.
- Kaltenpoth, M. (2009). Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? *Trends Microbiol* **17**: 529-535.
- Karaivanova, I. M., Weigel, P., Takahashi, M., Fort, C., Versavaud, A., Van, D. G. *et al.* (1999). Mutational analysis of the thermostable arginine repressor from *Bacillus stearothermophilus*: dissecting residues involved in DNA binding properties. *J Mol Biol* **291**: 843-855.
- Kato, J. Y., Hirano, S., Ohnishi, Y. y Horinouchi, S. (2005). The *Streptomyces* subtilisin inhibitor (SSI) gene in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 1624-1629.
- Keatinge-Clay, A. T., Shelat, A. A., Savage, D. F., Tsai, S. C., Miercke, L. J., O'Connell, J. D., III *et al.* (2003). Catalysis, specificity, and ACP docking site of *Streptomyces coelicolor* malonyl-CoA:ACP transacylase. *Structure* **11**: 147-154.
- Kempter, C., Kaiser, D., Haag, S., Nicholson, G., Gnau, V., Walk, T. *et al.* (1997). CDA: calcium-dependent peptide antibiotics from *Streptomyces coelicolor* A3(2) containing unusual residues. *Angew Chem Int Ed Engl* **36**: 498-501.
- Khaleel, T., Younger, E., McEwan, A. R., Varghese, A. S. y Smith, M. C. (2011). A phage protein that binds phiC31 integrase to switch its directionality. *Mol Microbiol* **80**: 1450-1463.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. y Hopwood, D. A. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics Norwich, UK: The John Innes Foundation.
- Kieser, T. y Melton, R. E. (1988). Plasmid pIJ699, a multi-copy positive-selection vector for *Streptomyces*. *Gene* **65**: 83-91.
- Kim, D. y Forst, S. (2001). Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology* **147**: 1197-1212.
- Kim, D. J., Huh, J. H., Yang, Y. Y., Kang, C. M., Lee, I. H., Hyun, C. G. *et al.* (2003). Accumulation of S-adenosyl-L-methionine enhances production of actinorhodin but inhibits sporulation in *Streptomyces lividans* TK23. *J Bacteriol* **185**: 592-600.
- Kim, E. S., Hong, H. J., Choi, C. Y. y Cohen, S. N. (2001). Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of *afsR2* gene transcription. *Journal of Bacteriology*, **183**(7), 2198-2203. doi:10.1128/JB.183.7.2198-2204.2001
- Kim, W., Lee, J. J., Paik, S. G. y Hong, Y. S. (2010). Identification of three positive regulators in the geldanamycin PKS gene cluster of *Streptomyces hygroscopicus* JCM4427. *J Microbiol Biotechnol* **20**: 1484-1490.
- Kinashi, H. y Shimaji-Murayama, M. (1991). Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **173**: 1523-1529.

- Kirby, R. (2011). Chromosome diversity and similarity within the Actinomycetales. *FEMS Microbiol Lett* **319**: 1-10.
- Kirby, R. y Hopwood, D. A. (1977). Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* **98**: 239-252.
- Klingel, U., Miller, C. M., North, A. K., Stockley, P. G. y Baumberg, S. (1995). A binding site for activation by the *Bacillus subtilis* AhrC protein, a repressor/activator of arginine metabolism. *Mol Gen Genet* **248**: 329-340.
- Kloosterman, T. G. y Kuipers, O. P. (2011). Regulation of arginine acquisition and virulence gene expression in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae* by transcription regulators ArgR1 and AhrC. *J Biol Chem* **286**: 44594-44605.
- Komatsu, M., Takano, H., Hiratsuka, T., Ishigaki, Y., Shimada, K., Beppu, T. y Ueda, K. (2006). Proteins encoded by the conservon of *Streptomyces coelicolor* A3(2) comprise a membrane-associated heterocomplex that resembles eukaryotic G protein-coupled regulatory system. *Mol Microbiol* **62**: 1534-1546.
- Koo, B. S., Hyun, H. H., Kim, S. Y., Kim, C. H. y Lee, H. C. (2011). Enhancement of thymidine production in *E. coli* by eliminating repressors regulating the carbamoyl phosphate synthetase operon. *Biotechnol Lett* **33**: 71-78.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V. *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.
- Kuscer, E., Coates, N., Challis, I., Gregory, M., Wilkinson, B., Sheridan, R. y Petkovic, H. (2007). Roles of *rapH* and *rapG* in positive regulation of rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *J Bacteriol* **189**: 4756-4763.
- Kwon, Y. J., Sohn, M. J., Oh, T., Cho, S. N., Kim, C. J. y Kim, W. G. (2013). Panosialins, inhibitors of enoyl-ACP reductase from *Streptomyces* sp. AN1761. *J Microbiol Biotechnol* **23**: 184-188.
- Lahey, J. H., Lea, E. J., Rudd, B. A., Wright, H. M. y Hopwood, D. A. (1983). A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity. *J Gen Microbiol* **129**: 3565-3573.
- Lane, D., Prentki, P. y Chandler, M. (1992). Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol Rev* **56**: 509-528.
- Larsen, R., Buist, G., Kuipers, O. P. y Kok, J. (2004). ArgR and AhrC are both required for regulation of arginine metabolism in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **186**: 1147-1157.
- Larsen, R., Kok, J. y Kuipers, O. P. (2005). Interaction between ArgR and AhrC controls regulation of arginine metabolism in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* **280**: 19319-19330.
- Larsen, R., van Hijum, S. A., Martínussen, J., Kuipers, O. P. y Kok, J. (2008). Transcriptome analysis of the *Lactococcus lactis* ArgR and AhrC regulons. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4768-4771.
- Law, A. y Boulanger, M. J. (2011). Defining a structural and kinetic rationale for paralogous copies of phenylacetate-CoA ligases from the cystic fibrosis pathogen *Burkholderia cenocepacia* J2315. *J Biol Chem* **286**: 15577-15585.
- Lee, E. J., Karoonuthaisiri, N., Kim, H. S., Park, J. H., Cha, C. J., Kao, C. M. y Roe, J. H. (2005). A master regulator sigmaB governs osmotic and oxidative response as well as differentiation via a network of sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **57**: 1252-1264.
- Lee, S. Y., Kim, Y. H. y Min, J. (2009). The effect of ArgR-DNA binding affinity on ornithine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Curr Microbiol* **59**: 483-488.

- Lee, S. Y., Kim, Y. H. y Min, J. (2010). Conversion of phenol to glutamate and proline in *Corynebacterium glutamicum* is regulated by transcriptional regulator ArgR. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**: 713-720.
- Lee, T. I., Johnstone, S. E. y Young, R. A. (2006). Chromatin immunoprecipitation and microarray-based analysis of protein location. *Nat Protoc* **1**: 729-748.
- Lee, T. I., Rinaldi, N. J., Robert, F., Odom, D. T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G. K. *et al.* (2002). Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **298**: 799-804.
- Lee, Y. J., Kitani, S., Kinoshita, H. y Nihira, T. (2008). Identification by gene deletion analysis of *bars2*, a gene involved in the biosynthesis of gamma-butyrolactone autoregulator in *Streptomyces virginiae*. *Arch Microbiol* **189**: 367-374.
- Lehninger, A. L. (1976). Curso breve de Bioquímica Barcelona: Omega, pp. 1-448.
- Lerat, S., Simao-Beauvoir, A. M. y Beaulieu, C. (2009). Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Mol Plant Pathol* **10**: 579-585.
- Leskiw, B. K., Lawlor, E. J., Fernández-Abalos, J. M. y Chater, K. F. (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**: 2461-2465.
- Li, Y. Q., Chen, P. L., Chen, S. F., Wu, D. y Zheng, J. (2004). A pair of two-component regulatory genes *ecrA1/A2* in *S. coelicolor*. *J Zhejiang Univ Sci* **5**: 173-179.
- Lian, W., Jayapal, K. P., Charaniya, S., Mehra, S., Glod, F., Kyung, Y. S. *et al.* (2008). Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *BMC Genomics* **9**: 56.
- Lieb, J. D., Liu, X., Botstein, D. y Brown, P. O. (2001). Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat Genet* **28**: 327-334.
- Lim, D. B., Oppenheim, J. D., Eckhardt, T. y Maas, W. K. (1987). Nucleotide sequence of the *argR* gene of *Escherichia coli* K-12 and isolation of its product, the arginine repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6697-6701.
- Limauro, D., Avitabile, A., Puglia, A. M. y Bruni, C. B. (1992). Further characterization of the histidine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): nucleotide sequence and transcriptional analysis of *hisD*. *Res Microbiol* **143**: 683-693.
- Lin, Y. S., Kieser, H. M., Hopwood, D. A. y Chen, C. W. (1994). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol* **14**: 1103.
- Liras, P. y Martín, J. F. (2006). Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? *Int Microbiol* **9**: 9-19.
- Little, J. W. y Mount, D. W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell* **29**: 11-22.
- Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G. y Tan, H. (2013). Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 112-143.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Loutit, J. S. (1952). Studies on nutritionally deficient strains of *Pseudomonas aeruginosa*. I. The production by x-rays and the isolation of nutritionally deficient strains. *Aust J Exp Biol Med Sci* **30**: 287-294.
- Lu, C. D., Houghton, J. E. y Abdelal, A. T. (1992). Characterization of the arginine repressor from *Salmonella typhimurium* and its interactions with the *carAB* operator. *J Mol Biol* **225**: 11-24.

- Lu, C. D., Kilstrup, M., Neuhard, J. y Abdelal, A. (1989). Pyrimidine regulation of tandem promoters for *carAB* in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **171**: 5436-5442.
- Lu, C. D., Yang, Z. y Li, W. (2004). Transcriptome analysis of the ArgR regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **186**: 3855-3861.
- Lu, G. J., Garen, C. R., Cherney, M. M., Cherney, L. T., Lee, C. y James, M. N. (2007). Expression, purification and preliminary X-ray analysis of the C-terminal domain of an arginine repressor protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **63**: 936-939.
- Ludovice, M., Martín, J. F., Carrachas, P. y Liras, P. (1992). Characterization of the *Streptomyces clavuligerus argC* gene encoding N-acetylglutamyl-phosphate reductase: expression in *Streptomyces lividans* and effect on clavulanic acid production. *J Bacteriol* **174**: 4606-4613.
- Maas, W. K. (1994). The arginine repressor of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**: 631-640.
- Maas, W. K. y Clark, A. J. (1964). Studies on the mechanism of repression of arginine biosynthesis in *E. coli*. *J Mol Biol* **8**: 365-370.
- MacDonald, A. I., Lu, Y., Kilbride, E. A., Akopian, A. y Colloms, S. D. (2008). PepA and ArgR do not regulate Cre recombination at the bacteriophage P1 *loxP* site. *Plasmid* **59**: 119-126.
- Maghnooj, A., de Sousa Cabral, T. F., Stalon, V. y Vander, W. C. (1998). The *arcABDC* gene cluster, encoding the arginine deiminase pathway of *Bacillus licheniformis*, and its activation by the arginine repressor *argR*. *J Bacteriol* **180**: 6468-6475.
- Makarova, K. S., Aravind, L. y Koonin, E. V. (1999). A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases. *Protein Sci* **8**: 1714-1719.
- Makarova, K. S., Mironov, A. A. y Gelfand, M. S. (2001). Conservation of the binding site for the arginine repressor in all bacterial lineages. *Genome Biol* **2**: RESEARCH0013.
- Manteca, A., Álvarez, R., Salazar, N., Yagüe, P. y Sánchez, J. (2008). Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 3877-3886.
- Manteca, A., Claessen, D., López-Iglesias, C. y Sánchez, J. (2007). Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiol Lett* **274**: 118-125.
- Manteca, A. y Sánchez, J. (2009). *Streptomyces* development in colonies and soils. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2920-2924.
- Mao, X. M., Sun, Z. H., Liang, B. R., Wang, Z. B., Feng, W. H., Huang, F. L. y Li, Y. Q. (2013). Positive Feedback Regulation of *stgR* Expression for Secondary Metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **195**: 2072-2078.
- Mao, X. M., Zhou, Z., Hou, X. P., Guan, W. J. y Li, Y. Q. (2009). Reciprocal regulation between SigK and differentiation programs in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **191**: 6473-6481.
- Mark, B. L., Wasney, G. A., Salo, T. J., Khan, A. R., Cao, Z., Robbins, P. W. *et al.* (1998). Structural and functional characterization of *Streptomyces plicatus* beta-N-acetylhexosaminidase by comparative molecular modeling and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **273**: 19618-19624.
- Martín, J. F. (2004). Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: an unfinished story. *J Bacteriol* **186**: 5197-5201.
- Martín, J. F. y Demain, A. L. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol Rev* **44**: 230-251.

- Martín, J. F. y Liras, P. (1989). Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol* **43**: 173-206.
- Martín, J. F., Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., Sola-Landa, A., Smith, M. C., Ellingsen, T. E. *et al.* (2012). Transcriptomic studies of phosphate control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* **95**: 61-75.
- Martín, J. F., Sola-Landa, A., Santos-Beneit, F., Fernández-Martínez, L. T., Prieto, C. y Rodríguez-García, A. (2011). Cross-talk of global nutritional regulators in the control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Microb Biotechnol* **4**: 165-174.
- Martín, P. R. y Mulks, M. H. (1992). Sequence analysis and complementation studies of the *argJ* gene encoding ornithine acetyltransferase from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **174**: 2694-2701.
- Massant, J., Peeters, E., Charlier, D. y Maes, D. (2006). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the arginine repressor of the hyperthermophile *Thermotoga neapolitana*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **62**: 26-28.
- Matsumoto, H., Hosogaya, S., Suzuki, K. y Tazaki, T. (1975). Arginine gene cluster of *Serratia marcescens*. *Jpn J Microbiol* **19**: 35-44.
- McCarthy, A. J. y Williams, S. T. (1992). Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment--a review. *Gene* **115**: 189-192.
- McCulloch, R., Coggins, L. W., Colloms, S. D. y Sherratt, D. J. (1994). Xer-mediated site-specific recombination at *cer* generates Holliday junctions in vivo. *EMBO J* **13**: 1844-1855.
- Mead, G. C. (1971). The amino acid-fermenting clostridia. *J Gen Microbiol* **67**: 47-56.
- Medema, M. H., Trefzer, A., Kovalchuk, A., van den Berg, M., Muller, U., Heijne, W. *et al.* (2010). The sequence of a 1.8-mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol Evol* **2**: 212-224.
- Mehra, S., Charaniya, S., Takano, E. y Hu, W. S. (2008). A bistable gene switch for antibiotic biosynthesis: The butyrolactone regulon in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS ONE*, **3**(7), e2724. doi:10.1371/journal.pone.0002724
- Meile, L. y Leisinger, T. (1984). Enzymes of arginine biosynthesis in methanogenic bacteria. *Experientia* **40**: 899-900.
- Mendes, M. V., Tunca, S., Antón, N., Recio, E., Sola-Landa, A., Aparicio, J. F. y Martín, J. F. (2007). The two-component *phoR-phoP* system of *Streptomyces natalensis*: Inactivation or deletion of *phoP* reduces the negative phosphate regulation of pimarcin biosynthesis. *Metab Eng* **9**: 217-227.
- Méndez, C., Braña, A. F., Manzanal, M. B. y Hardisson, C. (1985). Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Can J Microbiol* **31**: 446-450.
- Meng, L., Yang, S. H., Kim, T. J. y Suh, J. W. (2012). Effects of two putative LacI-family Transcriptional Regulators, SCO4158 and SCO7554, on antibiotic pigment production of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces lividans*. *J Korean Soc Appl Biol Chem*: 737-741.
- Merrick, M. J. (1976). A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol* **96**: 299-315.
- Merrick, M. J. y Edwards, R. A. (1995). Nitrogen control in bacteria. *Microbiol Rev* **59**: 604-622.
- Miguélez, E. M., Martín, C., Manzanal, M. B. y Hardisson, C. (1992). Growth and morphogenesis in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett* **79**: 351-359.

- Miller, C. M., Baumberg, S. y Stockley, P. G. (1997). Operator interactions by the *Bacillus subtilis* arginine repressor/activator, AhrC: novel positioning and DNA-mediated assembly of a transcriptional activator at catabolic sites. *Mol Microbiol* **26**: 37-48.
- Miller, D. L. y Rodwell, V. W. (1971a). Metabolism of basic amino acids in *Pseudomonas putida*. Catabolism of lysine by cyclic and acyclic intermediates. *J Biol Chem* **246**: 2758-2764.
- Miller, D. L. y Rodwell, V. W. (1971b). Metabolism of basic amino acids in *Pseudomonas putida*. Intermediates in L-arginine catabolism. *J Biol Chem* **246**: 5053-5058.
- Miller, D. L. y Rodwell, V. W. (1971c). Metabolism of basic amino acids in *Pseudomonas putida*. Properties of the inducible lysine transport system. *J Biol Chem* **246**: 1765-1771.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press, pp. 352-355.
- Mitruka, B. M. y Costilow, R. N. (1967). Arginine and ornithine catabolism by *Clostridium botulinum*. *J Bacteriol* **93**: 295-301.
- Monahan, L. G., and Harry, E. J. (2013). Identifying how bacterial cells find their middle: a new perspective. *Mol Microbiol* **87**: 231-234.
- Morin, A., Huysveld, N., Braun, F., Dimova, D., Sakanyan, V. y Charlier, D. (2003). Hyperthermophilic *Thermotoga* arginine repressor binding to full-length cognate and heterologous arginine operators and to half-site targets. *J Mol Biol* **332**: 537-553.
- Mountain, A., McChesney, J., Smith, M. C. y Baumberg, S. (1986). Gene sequence encoding early enzymes of arginine synthesis within a cluster in *Bacillus subtilis*, as revealed by cloning in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **165**: 1026-1028.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Narva, K. E. y Feitelson, J. S. (1990). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *redD* locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **172**: 326-333.
- Natsume, R., Ohnishi, Y., Senda, T. y Horinouchi, S. (2004). Crystal structure of a gamma-butyrolactone autoregulator receptor protein in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Mol Biol* **336**: 409-419.
- Ni, J., Sakanyan, V., Charlier, D., Glansdorff, N. y Van Duyne, G. D. (1999). Structure of the arginine repressor from *Bacillus stearothermophilus*. *Nat Struct Biol* **6**: 427-432.
- Nicoloff, H., Arsene-Ploetze, F., Malandain, C., Kleerebezem, M. y Bringel, F. (2004). Two arginine repressors regulate arginine biosynthesis in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* **186**: 6059-6069.
- Nishijyo, T., Park, S. M., Lu, C. D., Itoh, Y. y Abdelal, A. T. (1998). Molecular characterization and regulation of an operon encoding a system for transport of arginine and ornithine and the ArgR regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**: 5559-5566.
- Nodwell, J. R., Yang, M., Kuo, D. y Losick, R. (1999). Extracellular complementation and the identification of additional genes involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genetics* **151**: 569-584.
- North, A. K., Smith, M. C. y Baumberg, S. (1989). Nucleotide sequence of a *Bacillus subtilis* arginine regulatory gene and homology of its product to the *Escherichia coli* arginine repressor. *Gene* **80**: 29-38.
- O'Reilly, M. y Devine, K. M. (1994). Sequence and analysis of the citrulline biosynthetic operon *argC-F* from *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **140 (Pt 5)**: 1023-1025.

- Ochs, M. M., McCusker, M. P., Bains, M. y Hancock, R. E. (1999). Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1085-1090.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H. *et al.* (2008). Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol* **190**: 4050-4060.
- Ohnishi, Y., Kameyama, S., Onaka, H. y Horinouchi, S. (1999). The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol Microbiol* **34**: 102-111.
- Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Kato, J. Y., Tomono, A. y Horinouchi, S. (2005). AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 431-439.
- Olano, C., Abdelfattah, M. S., Gullón, S., Braña, A. F., Rohr, J., Méndez, C. y Salas, J. A. (2008). Glycosylated derivatives of steffimycin: insights into the role of the sugar moieties for the biological activity. *Chembiochem* **9**: 624-633.
- Onaka, H. y Horinouchi, S. (1997). DNA-binding activity of the A-factor receptor protein and its recognition DNA sequences. *Mol Microbiol* **24**: 991-1000.
- Owen, G. A., Pascoe, B., Kallifidas, D. y Paget, M. S. (2007). Zinc-responsive regulation of alternative ribosomal protein genes in *Streptomyces coelicolor* involves zur and sigmaR. *J Bacteriol* **189**: 4078-4086.
- Paget, M. S., Chamberlin, L., Atrih, A., Foster, S. J. y Buttner, M. J. (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.
- Paget, M. S., Molle, V., Cohen, G., Aharonowitz, Y. y Buttner, M. J. (2001). Defining the disulphide stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of the sigmaR regulon. *Mol Microbiol* **42**: 1007-1020.
- Palleroni, N. J., Kunisawa, R., Contopoulou, R. y Doudoroff, M. (1974). Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **23**: 333-339.
- Park, S. M., Lu, C. D. y Abdelal, A. T. (1997a). Cloning and characterization of *argR*, a gene that participates in regulation of arginine biosynthesis and catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **179**: 5300-5308.
- Park, S. M., Lu, C. D. y Abdelal, A. T. (1997b). Purification and characterization of an arginine regulatory protein, ArgR, from *Pseudomonas aeruginosa* and its interactions with the control regions for the *car*, *argF*, and *aru* operons. *J Bacteriol* **179**: 5309-5317.
- Park, S. S., Yang, Y. H., Song, E., Kim, E. J., Kim, W. S., Sohng, J. K. *et al.* (2009). Mass spectrometric screening of transcriptional regulators involved in antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**: 1073-1083.
- Paul, L., Mishra, P. K., Blumenthal, R. M. y Matthews, R. G. (2007). Integration of regulatory signals through involvement of multiple global regulators: control of the *Escherichia coli* *gltBDF* operon by Lrp, IHF, Crp, and ArgR. *BMC Microbiol* **7**: 2.
- Paul, S. y Summers, D. (2004). ArgR and PepA, accessory proteins for XerCD-mediated resolution of ColE1 dimers, are also required for stable maintenance of the P1 prophage. *Plasmid* **52**: 63-68.
- Paulus, T. J. y Switzer, R. L. (1979). Characterization of pyrimidine-repressible and arginine-repressible carbamyl phosphate synthetases from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **137**: 82-91.

- Pérez-Llarena, F. J., Liras, P., Rodríguez-García, A. y Martín, J. F. (1997). A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in overproduction of both beta-lactam compounds. *J Bacteriol* **179**: 2053-2059.
- Pérez-Redondo, R., Rodríguez-García, A., Botas, A., Santamarta, I., Martín, J. F. y Liras, P. (2012). ArgR of *Streptomyces coelicolor* is a versatile regulator. *PLoS One* **7**: e32697.
- Pérez-Redondo, R., Rodríguez-García, A., Martín, J. F. y Liras, P. (1998). The *claR* gene of *Streptomyces clavuligerus*, encoding a LysR-type regulatory protein controlling clavulanic acid biosynthesis, is linked to the clavulanate-9-aldehyde reductase (*car*) gene. *Gene* **211**: 311-321.
- Pérez-Redondo, R., Santamarta, I., Bovenberg, R., Martín, J. F. y Liras, P. (2010). The enigmatic lack of glucose utilization in *Streptomyces clavuligerus* is due to inefficient expression of the glucose permease gene. *Microbiology* **156**: 1527-1537.
- Pérez-Rueda, E., Gralla, J. D. y Collado-Vides, J. (1998). Genomic position analyses and the transcription machinery. *J Mol Biol* **275**: 165-170.
- Petrickova, K. y Petricek, M. (2003). Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*: variations on a common theme. *Microbiology* **149**: 1609-1621.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Picard, F. J. y Dillon, J. R. (1989). Cloning and organization of seven arginine biosynthesis genes from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **171**: 1644-1651.
- Pierard, A., Glansdorff, N., Mergeay, M. y Wiame, J. M. (1965). Control of the biosynthesis of carbamoyl phosphate in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **14**: 23-36.
- Pimentel-Elardo, S. M., Kozytska, S., Bugni, T. S., Ireland, C. M., Moll, H. y Hentschel, U. (2010). Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. *Mar Drugs* **8**: 373-380.
- Piret, J. M. y Chater, K. F. (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.
- Pistorius, E. K. y Voss, H. (1980). Some properties of a basic L-amino-acid oxidase from *Anacystis nidulans*. *Biochim Biophys Acta* **611**: 227-240.
- Pistorius, E. K. y Voss, H. (1982). Presence of an amino acid oxidase in photosystem II of *Anacystis nidulans*. *Eur J Biochem* **126**: 203-209.
- Polman, J. K. y Larkin, J. M. (1989). Purification of DNA from agarose gels. *Biotechnology techniques* **3**: 329-332.
- Polti, M. A., García, R. O., Amoroso, M. J. y Abate, C. M. (2009). Bioremediation of chromium(VI) contaminated soil by *Streptomyces* sp. MC1. *J Basic Microbiol* **49**: 285-292.
- Ponzielli, R., Boutros, P. C., Katz, S., Stojanova, A., Hanley, A. P., Khosravi, F. *et al.* (2008). Optimization of experimental design parameters for high-throughput chromatin immunoprecipitation studies. *Nucleic Acids Res* **36**: e144.
- Pospiech, A. y Neumann, B. (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet* **11**: 217-218.
- Prozesky, O. W., Grabow, W. O., van der Merwe, S. y Coetzee, J. N. (1973). Arginine gene clusters in the *Proteus-Providence* group. *J Gen Microbiol* **77**: 237-240.

- Pullan, S. T., Chandra, G., Bibb, M. J. y Merrick, M. (2011). Genome-wide analysis of the role of GlnR in *Streptomyces venezuelae* provides new insights into global nitrogen regulation in actinomycetes. *BMC Genomics* **12**: 175.
- Quintana, E. T., Wierzbicka, K., Mackiewicz, P., Osman, A., Fahal, A. H., Hamid, M. E. *et al.* (2008). *Streptomyces sudanensis* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma. *Antonie Van Leeuwenhoek* **93**: 305-313.
- Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. y Hopwood, D. A. (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.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, J. J., Aparicio, O., Jennings, E. G., Simón, I. *et al.* (2000). Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* **290**: 2306-2309.
- Reuther, J. y Wohlleben, W. (2007). Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: transcriptional and post-translational regulation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**: 139-146.
- Rigali, S., Titgemeyer, F., Barends, S., Mulder, S., Thomae, A. W., Hopwood, D. A. y van Wezel, G. P. (2008). Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep* **9**: 670-675.
- Riordan, J. F., McElvany, K. D. y Borders, C. L. Jr. (1977). Arginyl residues: anion recognition sites in enzymes. *Science* **195**: 884-886.
- Rodríguez-García, A., de la Fuente, A., Pérez-Redondo, R., Martín, J. F. y Liras, P. (2000). Characterization and expression of the arginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces clavuligerus*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**: 543-550.
- Rodríguez-García, A., Ludovice, M., Martín, J. F. y Liras, P. (1997). Arginine boxes and the *argR* gene in *Streptomyces clavuligerus*: evidence for a clear regulation of the arginine pathway. *Mol Microbiol* **25**: 219-228.
- Rodríguez-García, A., Martín, J. F. y Liras, P. (1995). The *argG* gene of *Streptomyces clavuligerus* has low homology to unstable *argG* from other actinomycetes: effect of amplification on clavulanic acid biosynthesis. *Gene* **167**: 9-15.
- Rodríguez-García, A., Sola-Landa, A., Apel, K., Santos-Beneit, F. y Martín, J. F. (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**: 3230-3242.
- Rodríguez, E., Banchio, C., Diacovich, L., Bibb, M. J. y Gramajo, H. (2001). Role of an essential acyl coenzyme A carboxylase in the primary and secondary metabolism of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Appl Environ Microbiol* **67**: 4166-4176.
- Rosen, B. P. (1971). Basic amino acid transport in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **246**: 3653-3662.
- Rozas, D., Gullón, S. y Mellado, R. P. (2012). A novel two-component system involved in the transition to secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* **7**: e31760.
- Rudd, B. A. y Hopwood, D. A. (1980). A pigmented mycelial antibiotic in *Streptomyces coelicolor*: control by a chromosomal gene cluster. *J Gen Microbiol* **119**: 333-340.
- Ryan, S., Begley, M., Gahan, C. G. y Hill, C. (2009). Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environ Microbiol* **11**: 432-445.
- Ryding, N. J., Anderson, T. B. y Champness, W. C. (2002). Regulation of the *Streptomyces coelicolor* calcium-dependent antibiotic by *absA*, encoding a cluster-linked two-component system. *J Bacteriol* **184**: 794-805.

- Ryding, N. J., Bibb, M. J., Molle, V., Findlay, K. C., Chater, K. F. y Buttner, M. J. (1999). New sporulation loci in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **181**: 5419-5425.
- Sadowski, P. (1986). Site-specific recombinases: changing partners and doing the twist. *J Bacteriol* **165**: 341-347.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. y Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Saito, N., Xu, J., Hosaka, T., Okamoto, S., Aoki, H., Bibb, M. J. y Ochi, K. (2006). EshA accentuates ppGpp accumulation and is conditionally required for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **188**: 4952-4961.
- Sakanyan, V., Charlier, D., Legrain, C., Kochikyan, A., Mett, I., Pierard, A. y Glansdorff, N. (1993). Primary structure, partial purification and regulation of key enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Bacillus stearothermophilus*: dual function of ornithine acetyltransferase. *J Gen Microbiol* **139**: 393-402.
- Sakanyan, V., Petrosyan, P., Lecocq, M., Boyen, A., Legrain, C., Demarez, M. *et al.* (1996). Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway. *Microbiology* **142** (Pt 1): 99-108.
- Sambrook, J. y Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, L. y Braña, A. F. (1996). Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* **142** (Pt 5): 1209-1220.
- Sanderson, K. E. (1970). Current linkage map of *Salmonella typhimurium*. *Bacteriol Rev* **34**: 176-193.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Santos-Aberturas, J., Vicente, C. M., Guerra, S. M., Payero, T. D., Martín, J. F. y Aparicio, J. F. (2011). Molecular control of polyene macrolide biosynthesis: direct binding of the regulator PimM to eight promoters of pimarinic genes and identification of binding boxes. *J Biol Chem* **286**: 9150-9161.
- Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., Franco-Domínguez, E. y Martín, J. F. (2008). Phosphate-dependent regulation of the low- and high-affinity transport systems in the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* **154**: 2356-2370.
- Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A. y Martín, J. F. (2011). Complex transcriptional control of the antibiotic regulator *afsS* in *Streptomyces*: PhoP and AfsR are overlapping, competitive activators. *J Bacteriol* **193**: 2242-2251.
- Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A. y Martín, J. F. (2012). Overlapping binding of PhoP and AfsR to the promoter region of *glnR* in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiol Res* **167**: 532-535.
- Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., Sola-Landa, A. y Martín, J. F. (2009). Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. *Mol Microbiol* **72**: 53-68.
- Sassetti, C. M., Boyd, D. H. y Rubin, E. J. (2003). Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* **48**: 77-84.
- Savchenko, A., Charlier, D., Dion, M., Weigel, P., Hallet, J. N., Holtham, C. *et al.* (1996). The arginine operon of *Bacillus stearothermophilus*: characterization of the control region and its interaction with the heterologous *B. subtilis* arginine repressor. *Mol Gen Genet* **252**: 69-78.

- Sawai, R., Suzuki, A., Takano, Y., Lee, P. C. y Horinouchi, S. (2004). Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **334**: 53-61.
- Schaumburg, C. S. y Tan, M. (2006). Arginine-dependent gene regulation via the ArgR repressor is species specific in *Chlamydia*. *J Bacteriol* **188**: 919-927.
- Scherer, P. y Kneiffel, H. (1983). Distribution of polyamines in methanogenic bacteria. *J Bacteriol* **154**: 1315-1322.
- Schneider, D., Bruton, C. J. y Chater, K. F. (2000). Duplicated gene clusters suggest an interplay of glycogen and trehalose metabolism during sequential stages of aerial mycelium development in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Gen Genet* **263**: 543-553.
- Schneider, B. L., Kiupakis, A. K. y Reitzer, L. J. (1998). Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 4278-4286.
- Schrempf, H. (2001). Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**: 285-289.
- Sénéchal, H., Delesques, J. y Szatmari, G. (2010). *Escherichia coli* ArgR mutants defective in *cer/Xer* recombination, but not in DNA binding. *FEMS Microbiol Lett* **305**: 162-169.
- Sevcikova, B., Mazurakova, V., y Kormanec, J. (2005). Characterization of the alternative sigma factor sigmaG in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Folia Microbiol (Praha)* **50**: 47-58.
- Shapiro, A. L., Viñuela, E. y Maizel, J. V., Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* **28**: 815-820.
- Sharma, C. M. y Vogel, J. (2009). Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA. *Curr Opin Microbiol* **12**: 536-546.
- Sharma, U. K. y Chatterji, D. (2010). Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of sigma activity. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 646-657.
- Sherratt, D. J., Arciszewska, L. K., Blakely, G., Colloms, S., Grant, K., Leslie, N. y McCulloch, R. (1995). Site-specific recombination and circular chromosome segregation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **347**: 37-42.
- Shinners, E. N. y Catlin, B. W. (1978). Arginine biosynthesis in *Neisseria gonorrhoeae*: enzymes catalyzing the formation of ornithine and citrulline. *J Bacteriol* **136**: 131-135.
- Shirling, S. B. y Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* **16**: 313-340.
- Shirling, S. B. y Gottlieb, D. (1972). Cooperative Description of Type Strains of *Streptomyces*. *Int J Syst Bacteriol* **22(4)**: 265-394.
- Slocum, R. D. (2005). Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiol Biochem* **43**: 729-745.
- Smith, M. C., Czaplewski, L., North, A. K., Baumberg, S. y Stockley, P. G. (1989). Sequences required for regulation of arginine biosynthesis promoters are conserved between *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **3**: 23-28.
- Sola-Landa, A., Moura, R. S. y Martín, J. F. (2003). The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6133-6138.

- Sola-Landa, A., Rodríguez-García, A., Amin, R., Wohlleben, W. y Martín, J. F. (2013). Competition between the GlnR and PhoP regulators for the *glnA* and *amtB* promoters in *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Res* **41**: 1767-1782.
- Sola-Landa, A., Rodríguez-García, A., Franco-Domínguez, E. y Martín, J. F. (2005). Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Mol Microbiol* **56**: 1373-1385.
- Soliveri, J. A., Gomez, J., Bishai, W. R., and Chater, K. F. (2000). Multiple paralogous genes related to the *Streptomyces coelicolor* developmental regulatory gene *whiB* are present in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Microbiology* **146** (Pt 2): 333-343.
- Song, E., Rajesh, T., Lee, B. R., Kim, E. J., Jeon, J. M., Park, S. H. *et al.* (2013). Deletion of an architectural unit, leucyl aminopeptidase (SCO2179), in *Streptomyces coelicolor* increases actinorhodin production and sporulation. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Song, H., Wang, H., Gigot, D., Dimova, D., Sakanyan, V., Glansdorff, N. y Charlier, D. (2002). Transcription regulation in thermophilic bacteria: high resolution contact probing of *Bacillus stearothermophilus* and *Thermotoga neapolitana* arginine repressor-operator interactions. *J Mol Biol* **315**: 255-274.
- Soutar, A. y Baumberg, S. (1996). Implication of a repression system, homologous to those of other bacteria, in the control of arginine biosynthesis genes in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Gen Genet* **251**: 245-251.
- Speranza, A. y Bagni, N. (1977). Putrescine biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens* and in normal and crown gall tissues of *Scorzonera hispanica*. *Pflanzenphysiol* **81**: S226-S233.
- Stach, J. E. y Bull, A. T. (2005). Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **87**: 3-9.
- Stalon, V. y Mercenier, A. (1984). L-arginine utilization by *Pseudomonas* species. *J Gen Microbiol* **130**: 69-76.
- Stalon, V., Simón, J. P. y Mercenier, A. (1982). Enzymes of arginine utilization and their formation in *Aeromonas formicans* NCIB 9232. *Arch Microbiol* **133**: 295-299.
- Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. y van, S. D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr Opin Biotechnol* **16**: 198-203.
- Stirling, C. J., Szatmari, G., Stewart, G., Smith, M. C. y Sherratt, D. J. (1988) The arginine repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the ColE1 *cer* locus. *EMBO J* **7**: 4389-4395.
- Stock, A. M., Robinson, V. L. y Goudreau, P. N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183-215.
- Strakova, E., Bobek, J., Zikova, A., Rehulka, P., Benada, O., Rehulkova, H. *et al.* (2013). Systems insight into the spore germination of *Streptomyces coelicolor*. *J Proteome Res* **12**: 525-536.
- Strawn, R., Melicherik, M., Green, M., Stockner, T., Carey, J. y Etrich, R. (2010). Symmetric allosteric mechanism of hexameric *Escherichia coli* arginine repressor exploits competition between L-arginine ligands and resident arginine residues. *PLoS Comput Biol* **6**: e1000801.
- Strohl, W. R. (1992). Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res* **20**: 961-974.
- Studier, F. W. y Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**: 113-130.

- Summers, D. K. y Sherratt, D. J. (1984). Multimerization of high copy number plasmids causes instability: CoIE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* **36**: 1097-1103.
- Sunnerhagen, M., Nilges, M., Otting, G. y Carey, J. (1997). Solution structure of the DNA-binding domain and model for the complex of multifunctional hexameric arginine repressor with DNA. *Nat Struct Biol* **4**: 819-826.
- Susstrunk, U., Pidoux, J., Taubert, S., Ullmann, A. y Thompson, C. J. (1998). Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **30**: 33-46.
- Suzuki, K. I., Suzuki, M., Sasaki, J., Park, Y. H. y Komagata, K. K. (1999). *Leifsonia* gen. nov., a genus for 2,4-diaminobutyric acid-containing actinomycetes to accommodate "*Corynebacterium aquaticum*" Leifson 1962 and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* Davis et al. 1984. *J Gen Appl Microbiol* **45**: 253-262.
- Szwajkajzer, D., Dai, L., Fukayama, J. W., Abramczyk, B., Fairman, R. y Carey, J. (2001). Quantitative analysis of DNA binding by the *Escherichia coli* arginine repressor. *J Mol Biol* **312**: 949-962.
- Tabor, C. W. y Tabor, H. (1985). Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev* **49**: 81-99.
- Tahlan, K., Anders, C., Wong, A., Mosher, R. H., Beatty, P. H., Brumlik, M. J. et al. (2007). 5S clavam biosynthetic genes are located in both the clavam and paralog gene clusters in *Streptomyces clavuligerus*. *Chem Biol* **14**: 131-142.
- Takano, E. (2006). Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr Opin Microbiol* **9**: 287-294.
- Takano, E., Chakraborty, R., Nihira, T., Yamada, Y. y Bibb, M. J. (2001). A complex role for the gamma-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **41**: 1015-1028.
- Takano, E., Kinoshita, H., Mersinias, V., Bucca, G., Hotchkiss, G., Nihira, T. et al. (2005). A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiology*, **56**(2), 465-479.
- Takano, H., Hashimoto, K., Yamamoto, Y., Beppu, T. y Ueda, K. (2011). Pleiotropic effect of a null mutation in the *cvn1* conserved of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **477**: 12-18.
- Tanaka, A., Takano, Y., Ohnishi, Y. y Horinouchi, S. (2007). AfsR recruits RNA polymerase to the *afsS* promoter: a model for transcriptional activation by SARPs. *J Mol Biol* **369**: 322-333.
- Tang, Y., Lee, H. Y., Tang, Y., Kim, C. Y., Mathews, I. y Khosla, C. (2006). Structural and functional studies on SCO1815: a beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemistry* **45**: 14085-14093.
- Tartof, K. D. y Hobbs, C. A. (1987). Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res Lab Focus* **9**: 12-14.
- te Poele, E. M., Bolhuis, H. y Dijkhuizen, L. (2008). Actinomycete integrative and conjugative elements. *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**: 127-143.
- Terahara, A., Haneishi, T. y Arai, M. (1979). Methylenomycin A, an antibiotic with chemically versatile functions. *heterocycles* **13**: 353-371.
- Thompson, C. J., Fink, D. y Nguyen, L. D. (2002). Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biol* **3**: REVIEWS1020.
- Tian, G., Lim, D., Carey, J. y Maas, W. K. (1992). Binding of the arginine repressor of *Escherichia coli* K12 to its operator sites. *J Mol Biol* **226**: 387-397.

- Tian, G. y Maas, W. K. (1994). Mutational analysis of the arginine repressor of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **13**: 599-608.
- Tiffert, Y., Franz-Wachtel, M., Fladerer, C., Nordheim, A., Reuther, J., Wohlleben, W. y Mast, Y. (2011). Proteomic analysis of the GlnR-mediated response to nitrogen limitation in *Streptomyces coelicolor* M145. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**: 1149-1159.
- Tiffert, Y., Supra, P., Wurm, R., Wohlleben, W., Wagner, R. y 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.
- Tochikura, T., Sugiyana, K., Bunno, M., Matsubara, T. y Tachiki, T. (1980). Degradation of arginine via a-keto-d-guanidinovalerate and a-keto-d-aminovalerate in arginine-grown *Arthrobacter simplex*. *Agric Biol Chem* **44**: 1778.
- Torriani, A. (1990). From cell membrane to nucleotides: the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Bioessays* **12**: 371-376.
- Traag, B. A., Kelemen, G. H., and Van Wezel, G. P. (2004). Transcription of the sporulation gene *ssgA* is activated by the IclR-type regulator SsgR in a whi-independent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **53**: 985-1000.
- Tricot, C., Pierard, A. y Stalon, V. (1990). Comparative studies on the degradation of guanidino and ureido compounds by *Pseudomonas*. *J Gen Microbiol* **136**: 2307-2317.
- Tsai, H. H., Huang, C. H., Tessmer, I., Erie, D. A. y Chen, C. W. (2011). Linear *Streptomyces* plasmids form superhelical circles through interactions between their terminal proteins. *Nucleic Acids Res* **39**: 2165-2174.
- Tsao, S. W., Rudd, B. A., He, X. G., Chang, C. J. y Floss, H. G. (1985). Identification of a red pigment from *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives. *J Antibiot (Tokyo)* **38**: 128-131.
- Turnbough, C. L. Jr y Switzer, R. L. (2008). Regulation of pyrimidine biosynthetic gene expression in bacteria: repression without repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**:266-300.
- Turner, W. B. (1973). Secondary metabolism with special reference to Actinomycetales. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **2**: 209-217.
- Udaka, S. (1966). Pathway-specific pattern of control of arginine biosynthesis in bacteria. *J Bacteriol* **91**: 617-621.
- Udaka, S. y Kinoshita, S. (1958). Studies on L-ornithine fermentation. I. The biosynthetic pathway of L-ornithine in *Micrococcus glutamicus*. *J Gen Appl Microbiol* **4**: 283-288.
- Umeyama, T., Lee, P. C. y Horinouchi, S. (2002). Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 419-425.
- Van Duyne, G. D., Ghosh, G., Maas, W. K. y Sigler, P. B. (1996). Structure of the oligomerization and L-arginine binding domain of the arginine repressor of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **256**: 377-391.
- van Keulen, G., Alderson, J., White, J. y Sawers, R. G. (2005a). Nitrate respiration in the actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Biochem Soc Trans* **33**: 210-212.
- van Keulen, G., Hopwood, D. A., Dijkhuizen, L. y Sawers, R. G. (2005b). Gas vesicles in actinomycetes: old buoys in novel habitats? *Trends Microbiol* **13**: 350-354.
- van Keulen, G., Alderson, J., White, J. y Sawers, R. G. (2007). The obligate aerobic actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) survives extended periods of anaerobic stress. *Environ Microbiol* **9**: 3143-3149.

- Van-Thuoc, D., Hashim, S. O., Hatti-Kaul, R. y Mamo, G. (2012). Ectoine-mediated protection of enzyme from the effect of pH and temperature stress: a study using *Bacillus halodurans* xylanase as a model. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Vara, J., Malpartida, F., Hopwood, D. A. y Jiménez, A. (1985). Cloning and expression of a puromycin N-acetyl transferase gene from *Streptomyces alboniger* in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Gene* **33**: 197-206.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F. y van Sinderen, D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 495-548.
- Vierling, S., Weber, T., Wohlleben, W. y Muth, G. (2000). Transcriptional and mutational analyses of the *Streptomyces lividans* *recX* gene and its interference with RecA activity. *J Bacteriol* **182**: 4005-4011.
- Vilches, C., Hernández, C., Méndez, C. y Salas, J. A. (1992). Role of glycosylation and deglycosylation in biosynthesis of and resistance to oleandomycin in the producer organism, *Streptomyces antibioticus*. *J Bacteriol* **174**: 161-165.
- Vining, L. C. (1992). Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity--a review. *Gene* **115**: 135-140.
- Vockenhuber, M. P., Sharma, C. M., Statt, M. G., Schmidt, D., Xu, Z., Dietrich, S. *et al.* (2011). Deep sequencing-based identification of small non-coding RNAs in *Streptomyces coelicolor*. *RNA Biol* **8**: 468-477.
- Volff, J. N. y Altenbuchner, J. (1998). Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Mol Microbiol* **27**: 239-246.
- Volff, J. N. y Altenbuchner, J. (2000). A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 143-150.
- Vyas, S. y Maas, W. K. (1963). Feedback inhibition of acetylglutamate synthetase by arginine in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **100**: 542-546.
- Waksman, S. A. (1961). Classification, Identification and Description of Genera and Species. In *The Actinomycetes*. Baltimore: Williams and Wilkins Co.
- Waksman, S. A. y Henrici, A. T. (1943). The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes. *J Bacteriol* **46**: 337-341.
- Waldvogel, E., Herbig, A., Battke, F., Amin, R., Nentwich, M., Nieselt, K. *et al.* (2011). The PII protein GlnK is a pleiotropic regulator for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* **92**: 1219-1236.
- Walsby, A. E. y Dunton, P. G. (2006). Gas vesicles in actinomycetes? *Trends Microbiol* **14**: 99-100.
- Wang, C., Ge, H., Dong, H., Zhu, C., Li, Y., Zheng, J. y Cen, P. (2007). A novel pair of two-component signal transduction system *ecrE₁/ecrE₂* regulating antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. In *Biologia*, pp. 511-516.
- Wang, C. M. y Cane, D. E. (2008). Biochemistry and molecular genetics of the biosynthesis of the earthy odorant methylisoborneol in *Streptomyces coelicolor*. *J Am Chem Soc* **130**: 8908-8909.
- Wang, H. A., Qin, L., Lu, P., Pang, Z. X., Deng, Z. X. y Zhao, G. P. (2006). *cvhA* gene of *Streptomyces hygrosopicus* 10-22 encodes a negative regulator for mycelia development. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **38**: 271-280.

- Wang, L. y Vining, L. C. (2003). Control of growth, secondary metabolism and sporulation in *Streptomyces venezuelae* ISP5230 by jadW(1), a member of the *afsA* family of gamma-butyrolactone regulatory genes. *Microbiology* **149**: 1991-2004.
- Wang, Y., Cen, X. F., Zhao, G. P. y Wang, J. (2012). Characterization of a new GlnR binding box in the promoter of *amtB* in *Streptomyces coelicolor* inferred a PhoP/GlnR competitive binding mechanism for transcriptional regulation of *amtB*. *J Bacteriol* **194**: 5237-5244.
- Waters, L. S. y Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**: 615-628.
- Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M. y Bhole, B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* **176**: 386-390.
- Wauven, C. y Stalon, V. (1985). Occurrence of succinyl derivatives in the catabolism of arginine in *Pseudomonas cepacia*. *J Bacteriol* **164**: 882-886.
- Wayne, L. G. y Hayes, L. G. (1998). Nitrate reduction as a marker for hypoxic shutdown of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* **79**: 127-132.
- Weathers, P. J., Chee, H. L. y Allen, M. M. (1978). Arginine catabolism in *Aphanocapsa* 6308. *Arch Microbiol* **118**: 1-6.
- Weber, T., Welzel, K., Pelzer, S., Vente, A. y Wohlleben, W. (2003). Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes. *J Biotechnol* **106**: 221-232.
- Wietzorrek, A. y Bibb, M. (1997). A novel family of proteins that regulates antibiotic production in streptomycetes appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol Microbiol* **25**: 1181-1184.
- Willemse, J., Borst, J. W., de Waal, E., Bisseling, T. y van Wezel, G. P. (2011). Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces*. *Genes Dev* **25**: 89-99.
- Willey, J., Schwedock, J. y Losick, R. (1993). Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Genes Dev* **7**: 895-903.
- Williams, R. P., Gott, C. L., Qadri, S. M. y Scott, R. H. (1971). Influence of temperature of incubation and type of growth medium on pigmentation in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **106**: 438-443.
- Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M., Sneath, P. H. y Sackin, M. J. (1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol* **129**: 1743-1813.
- Williamson, N. R., Fineran, P. C., Gristwood, T., Chawrai, S. R., Leeper, F. J. y Salmond, G. P. (2007). Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines. *Future Microbiol* **2**: 605-618.
- Wissenbach, U., Six, S., Bongaerts, J., Ternes, D., Steinwachs, S. y Uden, G. (1995). A third periplasmic transport system for L-arginine in *Escherichia coli*: molecular characterization of the *artPIQMJ* genes, arginine binding and transport. *Mol Microbiol* **17**: 675-686.
- Wright, F. y Bibb, M. J. (1992). Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* **113**: 55-65.
- Wright, L. F. y Hopwood, D. A. (1976a). Actinorhodin is a chromosomally-determined antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* **96**: 289-297.
- Wright, L. F. y Hopwood, D. A. (1976b). Identification of the antibiotic determined by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* **95**: 96-106.
- Xie, P., Zeng, A., Lv, X., Cheng, Q. y Qin, Z. (2013). A putative transglycosylase encoded by SCO4132 influences morphological differentiation and actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **45**: 296-302.

- Xu, Y., Labedan, B. y Glansdorff, N. (2007). Surprising arginine biosynthesis: a reappraisal of the enzymology and evolution of the pathway in microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 36-47.
- Xu, Y., Sun, Y., Huysveld, N., Gigot, D., Glansdorff, N. y Charlier, D. (2003). Regulation of arginine biosynthesis in the psychrophilic bacterium *Moritella profunda*: in vivo repressibility and in vitro repressor-operator contact probing. *J Mol Biol* **326**: 353-369.
- Xu, Y., Willems, A., Au-Yeung, C., Tahlan, K. y Nodwell, J. R. (2012). A two-step mechanism for the activation of actinorhodin export and resistance in *Streptomyces coelicolor*. *MBio* **3**: e00191-12.
- Yagüe, P., Manteca, A., Simón, A., Díaz-García, M. E. y Sánchez, J. (2010). New method for monitoring programmed cell death and differentiation in submerged *Streptomyces* cultures. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3401-3404.
- Yeo, M. y Chater, K. (2005). The interplay of glycogen metabolism and differentiation provides an insight into the developmental biology of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* **151**: 855-861.
- Yim, S. H., Jung, S., Lee, S. K., Cheon, C. I., Song, E., Lee, S. S. *et al.* (2011). Purification and characterization of an arginine regulatory protein, ArgR, in *Corynebacterium glutamicum*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**: 1911-1920.
- Yim, S. H., Kim, S. H., Park, M. Y., Jung, S. I., Lee, H. S., Cheon, C. I. *et al.* (2008). Analysis of gene expression in arginine biosynthetic gene cluster of *C. glutamicum*. *Genes Genomics*: 30-261.
- Yu, Z., Zhu, H., Dang, F., Zhang, W., Qin, Z., Yang, S. *et al.* (2012). Differential regulation of antibiotic biosynthesis by DraR-K, a novel two-component system in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **85**: 535-556.
- Zeller, E. A., Van Orden, L. S. y Kirchheimer, W. F. (1954a). Enzymology of mycobacteria. VI. Enzymic degradation of guanidine derivatives. *J Bacteriol* **67**: 153-158.
- Zeller, E. A., Van Orden, L. S. y Vogtli, W. (1954b). Enzymology of mycobacteria. VII. Degradation of guanidine derivatives. *J Biol Chem* **209**: 429-435.
- Zhang, C. C. (1996). Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. *Mol Microbiol* **20**: 9-15.
- Zhang, H., Zhan, J., Su, K. y Zhang, Y. (2006). A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*. Characteristics of blue pigment and identification of a novel compound, 1-actinorhodin. *Elsevier* **95**: 186-192.
- Zhou, P., Florova, G. y Reynolds, K. A. (1999). Polyketide synthase acyl carrier protein (ACP) as a substrate and a catalyst for malonyl ACP biosynthesis. *Chem Biol* **6**: 577-584.
- Zúñiga, M., Miralles Md, M. C. y Pérez-Martínez, G. (2002a). The Product of *arcR*, the sixth gene of the *arc* operon of *Lactobacillus sakei*, is essential for expression of the arginine deiminase pathway. *Appl Environ Microbiol* **68**: 6051-6058.
- Zúñiga, M., Pérez, G. y González-Candelas, F. (2002b). Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. *Mol Phylogenet Evol* **25**: 429-444.