

UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Biología Molecular

Área de Microbiología

INBIOTEC



Instituto de Biotecnología de León

TESIS DOCTORAL

Control de la biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus en *Streptomyces tsukubaensis*: obtención de cepas alteradas en genes del metabolismo del fosfato y de la fuente de carbono



MARÍA ORDÓÑEZ ROBLES

LEÓN, 2015

A mis padres

Agradecimientos

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas e instituciones que han hecho posible el desarrollo de esta tesis doctoral. Al Ministerio de Educación del Gobierno de España por la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU AP2009-4508; Orden EDU/2622/2010 de 1 de Octubre de 2010) bajo la cual se ha desarrollado la mayor parte de esta tesis. También a la Junta de Castilla y León por la adjudicación de una Ayuda para la contratación de Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria cofinanciada por el Fondo Social Europeo (Orden EDU/1064/2009 de 14 de Mayo de 2009), de la que disfruté durante los primeros meses de este trabajo. Gracias al Departamento de Biología Molecular (Área de Microbiología) de la Universidad de León y al Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC), por permitirme utilizar sus instalaciones y equipación a lo largo de estos años.

A mis directores de tesis, el Dr. Juan F. Martín y el Dr. Antonio Rodríguez García. A Juan por ofrecerme la oportunidad de realizar la tesis doctoral bajo su tutela y transmitirme siempre una sensación de protección y serenidad. A Antonio por el trato diario en el laboratorio y por sus enseñanzas tanto académicas como personales.

Quiero dar las gracias en general a todos los compañeros del laboratorio, que en una medida u otra han colaborado en el desarrollo de esta tesis, sin olvidar a los técnicos de laboratorio, Josefina y Berna, cuyo trabajo facilita enormemente el nuestro. Gracias también a Alcira y Andrea por su excelente trabajo administrativo.

No puedo expresar con palabras el lugar que ocupa en el desarrollo de esta tesis Fernando, compañero de laboratorio en un principio que se ha convertido en compañero de vida después. Gracias por tus consejos sinceros y desinteresados, por escucharme siempre que lo necesito, por estar siempre dispuesto a ayudarme, por buscar lo que es mejor para mí. Gracias por estar siempre ahí.

Por último, quiero agradecer a mis padres no sólo el desarrollo de esta tesis, sino cualquier logro que haya alcanzado en mi vida. Gracias por haberme inculcado los valores de la responsabilidad, el esfuerzo y la perseverancia y por haber creado un entorno perfecto para el desarrollo de mis estudios durante todos estos años. Gracias por haberme apoyado siempre en las decisiones que he tomado y por animarme constantemente a seguir adelante. Sois el mejor ejemplo de trabajo y superación que podría tener. Por todo ello este trabajo está dedicado a vosotros.

¡Cuán grande riqueza es, aun entre los pobres, el ser hijo de buen padre!

Juan Luis Vives

ÍNDICE

Abreviaturas, símbolos, siglas y acrónimos	13
I. Introducción	15
I.1. El género Streptomyces	17
I.1.1. Clasificación taxonómica y diversidad del filo Actinobacteria	17
I.1.2. Hábitats	20
I.1.3. Un ciclo de vida complejo	20
I.1.4. Características genéticas del género Streptomyces	28
I.1.5. Interés ecológico, industrial y farmacéutico	31
I.2. Regulación molecular de la producción de metabolitos secundarios en Streptomyce	es 33
I.2.1. Clasificación de los reguladores de la producción de antibióticos	34
I.2.2. Reguladores específicos de ruta	35
I.2.3. Reguladores pleiotrópicos	36
I.2.4. Otros elementos reguladores: ribonucleasas, ARN pequeños, proteasas y molé señalizadoras	culas 39
I.3. Regulación nutricional de la producción de antibióticos en Streptomyces	41
I.3.1. Regulación por fosfato: el regulón <i>pho</i>	42
I.3.2. Regulación por catabolito de carbono	48
I.3.3. Regulación por catabolito de carbono en Streptomyces	53
I.3.4. Regulación cruzada carbono-fosfato	58
I.4. Fosfofructoquinasas en Streptomyces	59
I.4.1. Introducción a las fosfofructoquinasas	59
I.4.2. Fosfofructoquinasas de Streptomyces coelicolor	61
I.5. Streptomyces tsukubaensis y producción de tacrolimus	66
I.5.1. Streptomyces tsukubaensis	66
I.5.2. Tacrolimus	68
I.5.3. Mejora de la producción de tacrolimus y búsqueda de análogos	78
I.6. Objetivos	84
II. Materiales y Métodos	85
II.1. Cepas utilizadas	87
II.1.1. Cepas de Escherichia coli	87
II.1.2. Cepas de Streptomyces	89
II.1.3. Cepas de otros microorganismos	90
II.2. Cultivo y conservación de microorganismos	90

II.2.1. Cultivo y conservación de cepas de Escherichia coli	90
II.2.2. Cultivo y conservación de cepas de Streptomyces	91
II.2.3. Cultivo y conservación de otros microorganismos	94
II.3. Medios de cultivo utilizados	94
II.3.1. Medios de cultivo para Escherichia coli	94
II.3.2. Medios de cultivo para Streptomyces	95
II.3.3. Medios de cultivo para otros microorganismos	99
II.3.4. Aditivos de los medios de cultivo	99
II.4. Equipamiento y reactivos	100
II.4.1. Equipamiento de laboratorio	100
II.4.2. Reactivos específicos para biología molecular	102
II.5. Vectores utilizados	107
II.6. Estudios en cultivos líquidos	109
II.6.1. Medida del crecimiento en cultivo líquido	109
II.6.2. Estimación de la concentración de fosfato inorgánico en el medio de cultivo Streptomyces	o de 109
II.6.3. Valoración de tacrolimus en los medios de cultivo de Streptomyces	110
II.6.4. Valoración de la actividad luciferasa en estudios de actividad promotora	112
II.7. Métodos de manipulación y análisis de ADN	113
II.7.1. Extracción de ADN plasmídico de Escherichia coli	113
II.7.2. Extracción de ADN total de Streptomyces	116
II.7.3. Limpieza y precipitación de ADN	117
II.7.4. Eliminación enzimática de ARN	119
II.7.5. Análisis de la pureza, concentración e integridad de la solución de ADN	119
II.7.6. Tratamientos enzimáticos del ADN	119
II.7.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	121
II.7.8. Electroforesis en gel de agarosa	123
II.7.9. Hibridación de ADN	124
II.7.10. Secuenciación del ADN	130
II.7.11. Introducción de ADN en cepas de Escherichia coli	130
II.7.12. Introducción de ADN en Streptomyces	133
II.7.13. Inactivación de genes mediante el sistema ReDirect [©]	135
II.8. Métodos de manipulación y análisis de ARN	139
II.8.1. Extracción de ARN total de Streptomyces	139

II.8.2. Análisis de la concentración, pureza e integridad del ARN	143
II.8.3. Estudios transcriptómicos mediante micromatrices	145
II.8.4. Realización de estudios transcripcionales mediante RT-qPCR	155
II.9. Recursos informáticos empleados	161
II.9.1. Programas informáticos	161
II.9.2. Herramientas en línea	161
III. Resultados y Discusión	
III.1. Regulación por catabolito de carbono en Streptomyces tsukubaensis	165
III.1.1. Identificación de fuentes de carbono represoras de la producción de tacr S. tsukubaensis	olimus en 165
III.1.2. Estudio transcriptómico del efecto de la adición de glucosa y glicerol en o S. tsukubaensis limitados en fosfato: diseño experimental y estrategia de anális	cultivos de is 169
III.1.3. Efecto de las adiciones sobre las rutas centrales del metabolismo del car	bono 173
III.1.4. Visión general de las respuestas a las adiciones de glucosa y glicerol	180
III.1.5. Respuesta a la adición de glucosa	182
III.1.6. Respuesta a la adición de glicerol	203
III.1.7. Estudio de la respuesta a la escasez de fosfato: activación de genes del re en <i>S. tsukubaensis</i>	egulón <i>pho</i> 213
III.1.8. Estudio de la agrupación biosintética de tacrolimus	218
III.1.9. Validación de los resultados transcriptómicos mediante RT-qPCR	224
III.2. Estudio transcriptómico de la adición de N-acetilglucosamina en S. tsukubaer	nsis 227
III.2.1. Diseño experimental	227
III.2.2. Caracterización del crecimiento y de las concentraciones de fosfato y de en los cultivos de la serie temporal de N-acetilglucosamina	tacrolimus 227
III.2.3. Procesamiento de las muestras, normalización y estadística	228
III.2.4. Validación de los resultados mediante RT-qPCR	
III.3. Efecto de la deleción de los genes codificantes de 6-fosfofructoquinasas enS. tsukubaensis	251
III.3.1. Identificación de genes que codifican PfkA en S. tsukubaensis	251
III.3.2. Localización de genes <i>pfkA</i> en una genoteca de <i>S. tsukubaensis</i> NRRL 184	88 252
III.3.3. Obtención del mutante <i>S. tsukubaensis ΔpfkA2</i> ::Am ^R mediante ReDirect [©]	⁹ 256
III.3.4. Obtención de los mutantes <i>S. tsukubaensis</i> Δ <i>pfkA1</i> ::Am ^R y Δ <i>pfkA3</i> ::Am ^R	260
III.3.5. Caracterización de los mutantes de <i>S. tsukubaensis</i> Δ <i>pfkA</i>	269
III.3.6. Análisis de los perfiles transcripcionales de los genes pfkA en los experim transcriptómicos	ientos 271
III.3.7. Sobreexpresión de <i>qlpX</i>	273

III.3.8. Expresión heteróloga de la agrupación de tacrolimus en S. coelicolor ΔpfkA2 279
III.3.9. Sinopsis sobre el estudio de los genes <i>pfkA</i> y el efecto de la sobreexpresión de <i>glpX</i> en <i>S. tsukubaensis</i>
III.4. Estudio transcriptómico de Streptomyces tsukubaensis ΔfkbN
III.4.1. Crecimiento y producción de tacrolimus en los cultivos de la serie temporal 292
III.4.2. Metodología empleada y análisis de los resultados transcriptómicos
IV. Anexo
IV.1. Expresión controlada de <i>phoP</i> de <i>S. tsukubaensis</i> en <i>S. coelicolor</i> M145 y <i>S. coelicolor</i> INB201 (Δ <i>phoP</i>)
IV.1.1. Diseño de la construcción del vector pTCP-2-phoP
IV.1.2. Expresión controlada de phoP en S. coelicolor (INB201)/pLUX-glpQ1
IV.1.3. Expresión controlada de phoP en S. coelicolor M145/pLUX-glpQ1
V. Discusión general309
VI. Conclusiones
VII. Referencias

Material Suplementario (CD anexo)

Abreviaturas, símbolos, siglas y acrónimos

ABC: casete de unión a ATP (<u>ATP-Binding</u> <u>Cassette</u>).

ACP: proteína transportadora de grupos acilo (<u>Acil Carrier Protein</u>).

ADNasa: desoxirribonucleasa.

ADNc: ADN complementario.

ADNg: ADN genómico.

Antibiótico^R: fenotipo resistente al antibiótico indicado.

Antibiótico^s: fenotipo sensible al antibiótico indicado.

ARNasa: ribonucleasa.

ARNm: ARN mensajero.

ARNr: ARN ribosómico.

ARNt: ARN transferente.

ATCC: colección americana de cultivos tipo (<u>American Type Culture Collection</u>).

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato.

β-ME: β-mercaptoetanol.

CCR: represión por catabolito de carbono (*Carbon Catabolite <u>R</u>epression*).

CDA: antibiótico dependiente de calcio (*Calcium-Dependent Antibiotic*).

CIA: cloroformo-alcohol isoamílico.

CoA: coenzima A.

cre: secuencia de unión de CcpA (<u>catabolite r</u>esponsive <u>el</u>ement).

ddNTP: didesoxinucleótido trifosfato.

DIG: digoxigenina.

DMSO: dimetilsulfóxido.

dNTP: desoxinucleótido trifosfato.

DO_x: densidad óptica a x nm.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

FDA: agencia de medicamentos de los Estados Unidos (*Food and Drug* <u>A</u>dministration).

FK506: tacrolimus.

FK520: ascomicina.

GES: gen estadísticamente significativo.

GF: gen filtrado.

GlcNAc: N-acetiglucosamina.

GlcP: permeasa de glucosa.

Glk: glucosa quinasa.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Cromatography*).

IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido.

 ${}^{x}M_{c} {}^{y-z}$: valor M_c de contraste comparativo entre las muestras de los tiempos Y y Z en la condición experimental X.

MES: ácido 2-(N-morfolin)etanosulfónico.

MFS: superfamilia facilitadora principal (*Major Facilitator Superfamily*).

MOPS: ácido 3-(N-morfolin)propanosulfónico.

NBT: sal de nitrotetrazolio azul.

NRPS: sintetasa de péptidos no ribosomales.

PAC: cromosoma artificial derivado del fago P1 (*phage <u>P</u>1-derived <u>A</u>rtificial <u>C</u>hromosome*).

 p_{FDR} : valor p de contraste corregido por el método de Benjamini-Hochberg.

PfkA: 6-fosfofructoquinasa de la familia A.

Pi: ortofosfato.

PIPES: ácido 1,4-piperazindietanosulfónico.

PKS: sintasa de policétidos.

PP (ruta): ruta de las pentosas fosfato.

(p)ppGpp: guanosina tetrafosfato o pentafosfato.

PPi: pirofosfato.

PTS: sistema fosfotransferasa (<u>phosphot</u>ransferase <u>s</u>ystem).

RIN: número de integridad del ARN (<u>*R*</u>NA <u>Integrity Number</u>).

RT-PCR: PCR acoplada a retrotranscripción.

RT-qPCR: PCR cuantitativa acoplada a retrotranscripción.

SDS: dodecil sulfato sódico.

SSC: citrato sódico salino.

TAE (tampón): Tris-acetato-EDTA.

TCA (ciclo): ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs.

Tm: temperatura de hibridación de los cebadores en la PCR.

Tris: hidroximetilaminometano.

ufc: unidades formadoras de colonias.

ULR: unidades de luz relativas por segundo.

I. INTRODUCCIÓN



I.1.1. Clasificación taxonómica y diversidad del filo Actinobacteria

I.1.1.1. Clasificación taxonómica

El género *Streptomyces*, formado por bacterias Gram positivas con alto contenido en GC, destaca por su complejo ciclo de vida y su capacidad para producir una amplia variedad de enzimas extracelulares y metabolitos secundarios con actividad biológica. Su posición filogenética dentro del dominio Bacteria ha experimentado variaciones en las últimas publicaciones del manual de Bergey que se recogen en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Comparación de la posición filogenética de *Streptomyces* en los volúmenes I y II (Garrity y Holt, 2001; Garrity y col., 2005) (A) y en el volumen V (Ludwig y col., 2012) (B) de la segunda edición del manual de Bergey. En el volumen V se han eliminado las categorías de subclase y suborden, que han sido elevadas a las de clase y orden, respectivamente. Como resultado, la familia *Streptomycetaceae* ha pasado de tener tres géneros a uno solo.

	А	В
Dominio	Bacteria	Bacteria
Filo	BXIV Actinobacteria	XXVI Actinobacteria
Clase	I Actinobacteria	l Actinobacteria
Subclase	V Actinobacteridae	-
Orden	I Actinomycetales	XIV Streptomycetales
Suborden	XIV Streptomycineae	-
Familia	Streptomycetaceae	Streptomycetaceae
Género	l Streptomyces	Streptomyces

La primera descripción de un miembro de este género data de 1875, con el nombre de *Streptothrix* (Cohn, 1875; citado en Hopwood, 2007), aunque el nombre *Streptomyces* no fue propuesto hasta 1943 por Waksman y Henrici. El género fue clasificado dentro de la familia *Streptomycetaceae* en función de su morfología y pared celular.

La taxonomía de este género ha experimentado importantes cambios a lo largo de la historia. El descubrimiento de antibióticos producidos por *Streptomyces* en la década de los 40 generó una intensa búsqueda de compuestos bioactivos y el registro de múltiples patentes de una misma especie. Para prevenir la sobreespeciación del género se inició en 1964 el *International Streptomyces Project* (ISP), que introdujo criterios estándar de identificación de especies (Shirling y Gottlieb 1968a; 1968b; 1969; 1972). De este modo se adscribieron al género más de 450 especies. La aplicación de las taxonomías numérica (Williams y col., 1983) y molecular supuso importantes modificaciones: por ejemplo, la primera redujo notablemente el número de especies adscritas al género en publicaciones sucesivas del manual de Bergey (de 463 en la edición de 1974 a 142 en la edición de 1989; Pridham y Tresner, 1974; Williams y col., 1989).

Aún hoy existe cierta confusión sobre la taxonomía del género *Streptomyces*, debido a su gran variabilidad tanto inter como intraespecífica, que hace necesaria la aplicación de

parámetros genotípicos y fenotípicos a la hora de delimitar este género (Anderson y Wellington, 2001). Hasta ahora se han descrito más de 770 especies y casi 40 subespecies (<u>http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesb.html</u>), aunque dos de ellas han recibido especial atención: *Streptomyces griseus*, por ser la primera utilizada en la producción industrial de estreptomicina, y *Streptomyces coelicolor* A3(2), utilizada como organismo modelo del género y cuya secuencia genómica fue la primera publicada (Hopwood, 2007; Bentley y col., 2002).

I.1.1.2. La diversidad del filo Actinobacteria

El filo Actinobacteria, en el cual se encuadra el género Streptomyces, es uno de los más importantes y antiguos del dominio Bacteria (Fox y col., 1980; Ventura y col., 2007). Aunque está formado por bacterias Gram positivas con alto contenido en GC que comparten como característica común una inserción de unos 100 nucleótidos entre las hélices 54 y 55 del ARNr 23S (Roller y col., 1992), presenta una gran variabilidad morfológica, fisiológica y metabólica (Atlas, 1997). En él podemos encontrar desde bacterias cocoides (Micrococcus) hasta miceliales (Streptomyces); patógenos humanos (Mycobacterium spp., Nocardia spp.), simbiontes fijadores de nitrógeno (Frankia spp.) o habitantes del tracto gastrointestinal (Bifidobacterium spp.). La enorme variabilidad fenotípica de las actinobacterias se refleja también en sus genomas, con tamaños desde 0.93 Mb (Tropheryma whipplei; Bentley y col., 2003) hasta casi 12 Mb (Streptomyces bingchenggensis; Wang y col., 2010) y contenidos en GC desde el 41.5 % (Gardnerella vaginalis ATCC 14019; Yeoman y col., 2010) al 74.2 % (Kineococcus radiotolerans SRS30216; Bagwell y col., 2008). Tiene un gran interés farmacéutico, industrial y ecológico debido a la producción de una gran variedad de enzimas extracelulares y de metabolitos secundarios (Schrempf, 2001); de hecho, son los principales productores de antibióticos de la industria farmacéutica y entre ellos destaca especialmente la familia Streptomycetaceae (Bentley y col., 2002). Se encuentran ampliamente distribuidos, tanto en ecosistemas marinos como en terrestres, pero especialmente en el suelo, donde tienen un papel fundamental en los ciclos de descomposición de la materia orgánica (Goodfellow y Williams, 1983).

La separación de las actinobacterias de otros grupos bacterianos es tan antigua que no es posible identificar el grupo filogenéticamente más cercano con seguridad (Embley y Stackebrandt, 1994). Los estudios filogenéticos realizados en los últimos años tienden a combinar los resultados basados en la secuenciación del ARNr 16S con la comparación de genomas completos, ya que la primera presenta ciertas limitaciones (Alam y col., 2010; Verma y col., 2013; Rokas y col., 2003). De este modo se ha podido obtener una visión más real de las relaciones filogenéticas dentro del filo (ver figura 1.1).



Figura 1.1. Árbol filogenético de 90 actinobacterias resultado de la combinación de datos de genes únicos y genomas completos. Modificado de Verma y col. (2013).

Los miembros del filo Actinobacteria que presentan crecimiento micelial se han clasificado comúnmente dentro del orden de los actinomicetales (Embley y Stackebrandt, 1994), en el que *Streptomyces* se diferencia del resto de géneros por presentar una pared celular de tipo I (caracterizada por la presencia de ácido LL-diaminopimélico y glicina) y la ausencia de un patrón de azúcares concreto (Lechevalier y Lechevalier, 1970). Se considera que el género *Streptomyces* apareció hace 440 millones de años, coincidiendo con la invasión de la tierra por las plantas y con un incremento rápido del oxígeno en la atmósfera (Heckman y col., 2001).

I.1.2. Hábitats

Streptomyces es un género ubicuo en la naturaleza, aunque se encuentra principalmente en el suelo, donde desarrolla un tipo de vida saprófito (Hopwood, 2007) gracias a su crecimiento micelial y a la producción de numerosas enzimas extracelulares.

Además de su presencia en el suelo, existen especies endofíticas que viven en los intersticios celulares de plantas (p. ej., *Streptomyces* NRRL 30562; Castillo y col., 2002); colonizadoras de la rizosfera que promueven el crecimiento de las plantas (p. ej., *Streptomyces lydicus* WYEC108; Tokala y col., 2002); especies asociadas simbióticamente en el intestino de termitas, a las que favorecen por su habilidad para degradar xilanos y materiales celulósicos (Pasti y col., 1990; Schäfer y col., 1996), pero también con hormigas (Kost y col., 2007) o esponjas marinas (Imamura y col., 1993; Zhang y col., 2008).

Algunas especies como *Streptomyces scabies* o *Streptomyces acidiscabies* son patógenas de plantas y producen lesiones en la superficie de varios tubérculos, especialmente la patata (p. ej., costra de la patata). En estos casos, la virulencia se produce principalmente por la secreción de toxinas que inhiben la síntesis de celulosa por parte de la planta (Bischoff y col., 2009; King y Calhoun, 2009), aunque algunas especies poseen genes relacionados con la necrosis (Joshi y col., 2007).

La implicación de los *Streptomyces* en enfermedades humanas es muy limitada, aunque especies como *Streptomyces somaliensis* y *Streptomyces sudanensis* causan una infección destructiva de la piel y del tejido subcutáneo denominada micetoma (Destombes y col., 1965; Quintana y col., 2008).

I.1.3. Un ciclo de vida complejo

I.1.3.1. Visión general

La fase de crecimiento vegetativa se inicia con la germinación de una espora cuando esta encuentra un ambiente favorable (ver figura 1.2). La germinación sincrónica de todas las esporas presentes en el medio se evita mediante la secreción de un inhibidor por parte de las esporas germinantes que mantiene el estado de latencia del resto (Hirsch y Ensign, 1978). Las esporas son células haploides, normalmente pigmentadas, con una actividad metabólica baja y resistentes a la sequedad, aunque no tanto a las altas temperaturas (Ensing, 1978). Emplean en la germinación sus reservas energéticas, entre las que destaca el disacárido trehalosa (Ensing, 1978), que puede suponer hasta el 25 % del peso seco de la espora (McBride y Ensing, 1987).

La germinación implica un abultamiento de la espora, seguido del establecimiento de la polaridad celular y del crecimiento apical, que da lugar al crecimiento de una, dos o incluso tres hifas desde la espora (Hopwood, 2007). Las hifas crecen por extensión desde su extremo y se ramifican. En esta fase de crecimiento la división celular es dispensable (McCormick y col., 1994; McCormick, 2009) y el resultado es la formación de un micelio sustrato compacto, poco tabicado y multinucleado, a partir del cual se formará el micelio aéreo. En cultivos en medio sólido, la erección del micelio aéreo se ve precedida por un estado de transición que

también se detecta en algunos cultivos líquidos y se manifiesta como una parada del crecimiento de corta duración. Los cambios metabólicos más importantes asociados a esta fase se relacionan con el almacenamiento del carbono en forma de glicógeno (Braña y col., 1982; 1986a), que se convertirá en trehalosa durante la maduración de las esporas (Schneider y col., 2000; Rueda y col., 2001), y con la formación de depósitos de polifosfatos, que podrían servir para formar ATP, aunque su función no se ha estudiado en profundidad (Chouayekh y Virolle, 2002; Chater, 2011).



Figura 1.2. Ciclo de vida de Streptomyces. Modificado de Flärdh y Buttner (2009).

La formación del micelio aéreo depende de la generación de una capa hidrofóbica equivalente a la que se presenta en las esporas. Inicialmente tiene la función de permitir la erección de las hifas aéreas sobre el agua, pero el hecho de que las proteínas que la forman se secreten incluso cuando las hifas ya han emergido del agua hace pensar que el espacio delimitado entre dicha capa y la pared celular interviene en el transporte de nutrientes desde la base de la colonia hacia los extremos de las hifas (Wösten y Willey, 2000; Chater y col., 2010).

La célula apical de una hifa aérea es la que da lugar a la cadena de esporas, por lo que recibe el nombre de célula esporogénica. Está separada del compartimento subapical por un septo basal, que se ha caracterizado en profundidad en *S. griseus* y que tiene propiedades diferentes a las de los septos vegetativos y de esporulación (Kwak y col., 2001a). Un proceso de muerte celular programada, que afecta al compartimento subapical, proporciona nutrientes para la esporulación. En este proceso interviene una cascada de proteasas extracelulares que es dependiente de los reguladores pleiotrópicos AdpA y BldA (Tomono y col., 2005; Kim y col., 2005a; 2005b).

De manera coordinada, la célula esporogénica se subdivide con septos de esporulación y las copias del genoma se segregan y reparten en preesporas. La maduración de las preesporas conlleva: 1) la formación de una pared desde el interior de la preespora

que supone la remodelación del peptidoglicano original (Wildermuth y Hopwood, 1970; Haiser y col., 2009); 2) la protección del nucleoide mediante la asociación de proteínas (Facey y col., 2009) y 3) la formación del pigmento, que en *S. coelicolor* es gris y que es sintetizado por las enzimas de la agrupación *whiE* (Davis y Chater, 1990).

I.1.3.2. Nuevos modelos de diferenciación basados en la muerte celular programada

En los últimos años se ha descrito un nuevo modelo de diferenciación compatible con el clásico que incorpora nuevas fases (Manteca y col., 2005a; 2005b; 2007; 2008; 2010; Yagüe y col., 2012). Según este modelo, tras la germinación de la espora se produce un micelio joven compartimentalizado denominado micelio I. El micelio I entra en un proceso de muerte celular programada temprano reflejado como una parada en el crecimiento. A partir de los fragmentos viables remanentes, se forma un segundo micelio multinucleado (el micelio II) que, en función de la ausencia o presencia de capas hidrofóbicas en medio sólido, se denomina temprano o tardío, respectivamente. El micelio II temprano y el micelio II tardío se corresponden con los micelios sustrato y aéreo del modelo clásico. Finalmente, el micelio II tardío experimenta una segunda fase de muerte celular que sostiene la formación de las esporas. Mientras que en medio sólido se presentan todas las fases anteriormente descritas, en medio líquido solo se generan el micelio I y el micelio II temprano.

La aportación más importante de este nuevo modelo reside en la interpretación del desarrollo en cultivos líquidos: mientras que el modelo clásico sostiene que el micelio sustrato comienza a formar metabolitos secundarios al alcanzar la fase estacionaria (ya que en cultivo líquido es infrecuente la diferenciación morfológica), el nuevo modelo considera que sí existe diferenciación morfológica (de micelio I a micelio II temprano) y que es el micelio II temprano el responsable de la producción de antibióticos. De este modo, las diferencias de los cultivos líquidos con respecto a los sólidos se basarían en la ausencia de una segunda ronda de muerte celular y de esporulación en los primeros. En efecto, la comparación del transcriptoma de *S. coelicolor* durante el crecimiento en cultivos sólidos y líquidos indica que el proceso de diferenciación es similar en ambas condiciones (Yagüe y col., 2014).

I.1.3.3. La adaptación a la vida en el suelo

El ciclo de vida de este género está muy adaptado a su hábitat principal. Las esporas son resistentes a la desecación y presentan una cobertura hidrófoba que les permite flotar y no ser arrastradas hacia las profundidades del suelo. Cuentan normalmente con pigmentos aromáticos que sirven probablemente para endurecer las paredes y hacerlas más resistentes al paso por el sistema digestivo de gusanos y otros animales. Así mismo, pueden contener proyecciones espinosas, verrugosas o pilosas que podrían estar implicadas en su adhesión a diferentes superficies (Chater, 2011).

El crecimiento ramificado favorece la adhesión y penetración a través de restos orgánicos de hongos, plantas y otros organismos. Este crecimiento es concomitante a la secreción de enzimas hidrolíticas (como quitinasas, celulasas, amilasas o pectato liasas) que les permiten obtener nutrientes asimilables a partir de las macromoléculas. De esta manera

el género interviene en los procesos de reciclado de materia orgánica (Chater y col., 2010; Schrempf, 2001; McCarthy y Williams, 1992). *S. coelicolor* cuenta con una amplia batería de proteínas secretadas (800 predichas, de las cuales 147 son hidrolasas; Bentley y col., 2002) y de sistemas de transporte para diversos tipos de moléculas (614 genes asociados a transporte anotados; Bentley y col., 2002).

El suelo es un hábitat muy cambiante (humedad, disponibilidad y composición nutricional, etc.), por lo que los estreptomicetos cuentan con múltiples sistemas de transducción de señal para adaptarse a las condiciones variables. En este sentido, tanto los factores sigma de función extracitoplasmática como los reguladores de respuesta de los sistemas de dos componentes regulan la transcripción en función de señales extracelulares que son percibidas por proteínas de membrana (factores antisigma o quinasas sensoras, respectivamente). En *S. coelicolor* se han identificado aproximadamente 50 factores sigma de función extracitoplasmática, más de 60 parejas de sistemas de dos componentes (además, posee quinasas sensoras adicionales y reguladores de respuesta huérfanos, es decir, aún no asociados a una pareja concreta) y decenas de sistemas serina/treonina quinasa (Bentley y col., 2002; Hutchings y col., 2004; Martín y col., 2012a).

Los *Streptomyces* son los principales responsables de la producción de geosminas, metabolitos sesquiterpenoides responsables del olor a tierra húmeda que también son producidos por algunas cianobacterias. Puesto que el aroma se libera en presencia de humedad, el profesor K. Chater (John Innes Centre, Norwich, UK) ha sugerido en una entrevista para *The Guardian* que la función de las geosminas podría ser la de atraer animales (p. ej., camellos) que actúan como vectores de dispersión de las esporas, papel semejante al que desempeñan en cactus (Chater, 2003; Kaiser y Tollsten, 1995).

Algunas especies son capaces de desarrollar un metabolismo anaeróbico facultativo basado en la respiración del nitrato (Kumon y col., 2002). De hecho, *S. coelicolor* es capaz de crecer en condiciones de estrés anaeróbico (van Keulen y col., 2007), lo que podría reflejar una adaptación más a las variaciones de los niveles de oxígeno en el suelo. El pH de crecimiento óptimo de *Streptomyces* se encuentra entre 6.5 y 8 (Crawford y col., 1993), aunque se han aislado especies acidófilas y alcalófilas (Flowers y Williams, 1978; Chaphalkar y Dey, 1998).

I.1.3.4. Determinantes genéticos del desarrollo morfológico en *Streptomyces*

En este apartado se enumeran los principales genes y proteínas implicados en la diferenciación morfológica en *Streptomyces* en el mismo orden utilizado para la descripción de su ciclo de vida. El último apartado se dedica a los reguladores implicados en este proceso.

• Germinación de la espora

Los miembros del género *Streptomyces* cuentan con hidrolasas secretadas que actúan sobre la pared celular (conocidas como Rpf, del inglés <u>resucitation-promoting factors</u>) e intervienen en la salida del estado de latencia de las esporas (Mukamolova y col., 1998; Sexton y col., 2015). La posición de los tubos germinativos está determinada por los lugares

donde se localiza SsgA (Noens y col., 2007), proteína esencial para la esporulación en *S. griseus* y *S. coelicolor* (Jiang y Kendrick, 2000; van Wezel y col., 2000). En el crecimiento polar de la hifa interviene DivIVA, que se localiza en su extremo y se asocia con el aparato de biosíntesis de pared celular (Flärdh, 2003). Su acumulación en ciertos puntos de la hifa determina también los puntos de ramificación (Hempel y col., 2008). Existen resultados que indican que en el crecimiento de las ramificaciones intervienen las hidrolasas SwIB y SwIC (Haiser y col., 2009).

• Septación

Al igual que en otras bacterias, FtsZ presenta un papel fundamental en *Streptomyces*: interviene en la formación de septos de las hifas vegetativas y de esporulación mediante la formación de anillos Z que actúan como soporte para el ensamblaje del divisoma (McCormick y col., 1994; Schwedock y col., 1997). Otras proteínas que se han relacionado con el control de la división celular son CrgA, que inhibe la formación de los anillos Z en *S. coelicolor* (Del Sol y col., 2006), y las proteínas SALP (del inglés <u>SsgA-like proteins</u>; revisado en Traag y van Wezel, 2008). En los últimos años se ha propuesto un modelo de división celular basado en la interacción de FtsZ con SsgA y su homólogo SsgB (Willemse y col., 2011).

• Segregación cromosómica

La segregación cromosómica en la hifa aérea se produce gracias al sistema ParAB, en el que ParA es una ATPasa que se distribuye a lo largo de la célula esporogénica y ParB forma complejos nucleoproteicos con secuencias *parS* del cromosoma denominados segregosomas (Jakimowicz y col., 2005; 2007). Más recientemente se ha demostrado el papel de ParJ como regulador de la actividad polimerizadora de ParA (Ditkowski y col., 2010). Otras proteínas relacionadas con el proceso de segregación cromosómica son Smc y FtsK (Dedrick y col., 2009; Kois y col., 2009) y las codificadas por el operón *smeA-sffA* (Ausmess y col., 2007).

• Diferenciación de los compartimentos de la hifa aérea

El gen *sigF* (Potúcková y col., 1995) codifica un factor sigma que se expresa durante la diferenciación de las hifas aéreas, principalmente en la célula esporogénica (Kelemen y col., 1996; Sun y col., 1999). Bajo su control se encuentra *whiE* (Davis y Chater, 1990), encargado de la formación del pigmento asociado a las esporas, (Kelemen y col., 1998). Su transcripción depende completamente de WhiG, WhiA, WhiB y Whil y parcialmente de WhiH y WhiJ (Kelemen y col., 1996). Inmediatamente adyacente a *sigF* se encuentra *sigN*, que se activa en el compartimento subapical y codifica un factor sigma (Dalton y col., 2007). SigN regula la transcripción de *nepA*, que parece estar relacionado con el mantenimiento del estado de latencia de las esporas, de cuya pared forma parte (Dalton y col., 2007; de Jong y col., 2009).

• Proteínas que confieren hidrofobicidad a la espora y al micelio aéreo

Al menos tres tipos de proteínas intervienen en la formación de la capa hidrofóbica: el péptido SapB, las chaplinas y las rodlinas. El péptido SapB (Willey y col., 1991) se forma por procesamiento proteolítico y modificación postraduccional de la proteína RamS (Kodani y col., 2004). Mientras que SapB participa en la formación de micelio aéreo solo en ciertos medios (Capstick y col., 2007), las chaplinas se sintetizan siempre e intervienen en la hidrofobicidad y en la erección de las hifas en el aire (Claessen y col., 2003). En la organización de las chaplinas en la capa superficial intervienen las rodlinas (Claessen y col., 2004), pero no forman parte de ella ni son necesarias para la formación del micelio aéreo o para su hidrofobicidad (Sawyer y col., 2011); es más, algunas especies no presentan rodlinas (p. ej., *Streptomyces avermitilis*; Claessen y col., 2004).

• Maduración de las preesporas

En la formación de la pared de la espora interviene el complejo SSSC (del inglés <u>Streptomyces Spore wall Synthesizing Complex</u>), formado por las proteínas MreC, MreD, MreB, Mbl, Pbp2 y Sfr entre otras (Kleinschnitz y col., 2011).

S. coelicolor presenta tres genes *dps* cuyos productos intervienen en la condensación del cromosoma y en el posicionamiento de los septos de esporulación, y que se expresan en respuesta a ciertas condiciones de estrés (Facey y col., 2009; 2011). La proteína HupS, que presenta homología con histonas, interviene en la condensación de los cromosomas y es especialmente abundante en las esporas (Salerno y col., 2009). Como se comentó anteriormente, la formación del pigmento policétido asociado a las esporas está relacionado con el loci *whiE*.

Reguladores

El aislamiento de mutantes con defectos en el desarrollo ha permitido identificar genes implicados en las redes reguladoras de la diferenciación en *Streptomyces* (ver tabla 1.2). Inicialmente este tipo de mutantes se clasificó en dos grupos: Bld, del inglés *bald*, incapaces de formar micelio aéreo y, por lo tanto, formadores de colonias calvas (Hopwood y col., 1970; Merrick, 1976), y Whi, del inglés *white*, incapaces de formar esporas o el pigmento asociado a las esporas y, por lo tanto, formadores de colonias blancas (Hopwood y col., 1970; Chater, 1972). Los mutantes *whi* no se ven afectados en la producción de metabolitos secundarios; sin embargo, los *bld* sí, de manera que establecen una relación directa entre la diferenciación morfológica y la bioquímica. El efecto de las mutaciones *bld* sobre la producción de metabolitos secundarios es dependiente de la fuente de carbono presente en el medio (excepto en el caso de *bldB*), por lo que estos mutantes han sido objeto de estudio en la represión por catabolito de carbono en *Streptomyces* (ver capítulo I.3.3).

Se conoce más de una veintena de genes cuya inactivación genera un fenotipo *bld*. Entre ellos no solo se encuentran codificados reguladores, sino también genes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) como *citA*, que codifica una enzima citrato sintasa. El efecto de su mutación sobre el desarrollo se debe en parte a la acidificación del medio generada como consecuencia del bloqueo de esta ruta metabólica (Viollier y col., 2001). Pope y col. (1996) sugieren que los genes *bld* no están implicados *per se* en la diferenciación morfológica, sino en la captación de información nutricional y que los defectos morfológicos de los mutantes *bld* son en realidad un efecto secundario.

Los estudios de complementación de los mutantes han permitido determinar una cascada lineal de reguladores (*bldJ* \rightarrow *bldK*, *L* \rightarrow *bldA*/*bldH* \rightarrow *bldG* \rightarrow *bldC* \rightarrow *bldD*, *M*) que finaliza

con la expresión de las proteínas implicadas en la formación de la capa hidrofóbica del micelio aéreo (revisado en Chater y Chandra, 2006) y de diversos genes relacionados con el desarrollo (ver figura 1.3).

Tabla 1.2. Principales genes *bld* y *whi*. Los genes *bldM* y *bldN* aparecen evidenciados con un asterisco (*) y en ambas secciones de la tabla ya que ciertas mutaciones puntuales generan un fenotipo *whi*, mientras que las mutaciones que anulan la función del gen generan un fenotipo *bld*. Modificado de Chater (2001).

Gen	Producto	Referencia(s)	
	Genes <i>bld</i>		
bldA	ARNt Leu UUA	Champness, 2000	
bldB	Pequeña proteína de unión a ADN	Champness, 2000	
bldC	Putativo activador transcripcional de la	Champness, 2000; Hunt y col., 2005	
		Filiation Lauriale 1000, Filiation and 2001	
blaD	Proteina pequena de union a ADN	Elliot y Lewisk, 1999; Elliot y col., 2001	
blag	Probable factor antiantisigma	Bignell y col., 2000	
bidH	Homologo de AdpA	Champness, 2000	
bldl	Desconocido	Champness, 2000	
bldJ	Desconocido	Champness, 2000	
bldK	Transportador de oligopéptidos	Nodwell y col., 1996; Nodwell y Losick, 1998	
bldL	Desconocido	Nodwell y col., 1999	
bldM (whiK)*	Regulador de respuesta	Molle y Buttner, 2000	
bldN (whiN)*	Factor sigma de función extracitoplasmática	Bibb y col., 2000	
	Genes whi		
	Tempranos		
whiA	Función desconocida	Aínsa y col., 2000	
whiB	Probable proteína pequeña de unión a ADN	Molle y col., 2000; Chater, 2000	
whiG	Factor sigma	Chater, 2000; Tan y col., 1998	
whiH	Proteína reguladora	Ryding y col., 1998	
whil	Regulador de respuesta aberrante	Aínsa y col., 1999	
whiJ	Proteína pequeña	Gehring y col., 2000	
	Tardíos		
whiD	Tipo <i>whiB</i>	Nyström, 1999	
whiE	Síntesis pigmento asociado a esporas	Kelemen y col., 1998	
whiF	Alelo de <i>whiG</i>	CJ Bruton y NJ Ryding, citado en Chater, 2001	
whiL	Desconocido	Ryding v col., 1999	
whiM	Desconocido	Ryding y col., 1999	
whiO	Desconocido	Ryding v col., 1999	
Indeterminados			
hldM			
(whiK)*	Tipo regulador de respuesta	Molle y Buttner, 2000	
bldN (whiN)*	Factor sigma de función extracitoplasmática	Bibb y col., 2000	

BldA, BldB y BldD se describen en el apartado I.2.3.3 (pág. 37) por su implicación en la regulación de la producción de antibióticos. El gen *bldG* codifica un factor antiantisigma que regula la transcripción del factor de respuesta a estrés SigH en *S. coelicolor* y *S. griseus* (Sevciková y col., 2010; Takano y col., 2011). A su vez, SigH regula la expresión de *ssgB*,

homólogo del anteriormente mencionado *ssgA*, y de *dpsA*, que codifica una proteína asociada al nucleoide (Kormanec y Sevciková, 2002a; Facey y col., 2011). El gen *bldC* codifica una proteína pequeña de 68 aminoácidos cuyas dianas no se conocen actualmente, pero que es necesaria para maximizar la transcripción de los reguladores de la biosíntesis de actinorrodina y undecilprodigiosina en *S. coelicolor* (Hunt y col., 2005).

Anteriormente se han citado los loci *whi* como reguladores del desarrollo morfológico en *Streptomyces*. Siete de ellos (*whiA*, *whiB*, *whiD*, *whiE*, *whiG*, *whiH* y *whil*) han sido estudiados en profundidad y la mayoría codifican factores transcripcionales requeridos de modo incondicional para la formación de esporas (Chater y Chandra, 2006). El gen *whiG* codifica un factor sigma que se requiere en las primeras etapas de la formación de esporas (Chater y col., 1989). WhiG controla directamente a *whiH* y *whil*, que codifican reguladores transcripcionales relacionados con la septación y la condensación del cromosoma asociada a la esporulación (Ryding y col., 1998; Aínsa y col., 1999). Los genes *whiA* y *whiB* forman una ruta paralela convergente y codifican factores transcripcionales que se requieren para detener el crecimiento de las hifas aéreas (Flärdh y col., 1999; Aínsa y col., 2000).

Los principales ejemplos de interacción directa *whi-bld* son: 1) la represión de *whiG* por el regulador BldD en *S. coelicolor* (Elliot y col., 2001) y 2) la activación de la expresión de *whiB* por BldM y el control de la expresión de *whiE* mediante la formación de heterodímeros BldM-Whil en *Streptomyces venezuelae* (Al-Bassam y col., 2014).



Figura 1.3. Cascada de señalización extracelular dependiente de los genes *bld* implicada en la producción de proteínas de superficie del micelio aéreo en *S. coelicolor*. La señal desencadenante podría ser un oligopéptido transportado por BldK. Modificado de Chater y Chandra (2006).

Por último, existe un grupo de homólogos de *whiB*, conocidos como *wbl* (del inglés <u>*WhiB-like proteins*</u>) que se encuentran solamente en actinobacterias (Soliveri y col., 2000; Gao y col., 2006). Uno de ellos, WhiD, es necesario para la ubicación correcta de los septos y la maduración de las esporas en *S. coelicolor* (Molle y col., 2000). WbIA interviene en una fase temprana de la formación de las hifas aéreas en *S. coelicolor*, posiblemente facilita la

diferenciación entre los compartimentos apical y subapical (Fowler-Goldsworthy y col., 2011). Además, actúa como regulador negativo de la síntesis de antibióticos en *Streptomyces peucetius* (Kang y col., 2007; Noh y col., 2010).

I.1.4. Características genéticas del género Streptomyces

Una de las características genéticas más importantes de este género es su elevado contenido en GC (69 %-78 % mol; Goodfellow y col., 1992), que no varía sustancialmente entre el cromosoma y los plásmidos (Hopwood, 2007). Este hecho se ha interpretado como una adaptación evolutiva a favor del uso de codones poco favorables para ciertos bacteriófagos (Chater y Chandra, 2006).

I.1.4.1. El cromosoma lineal y la inestabilidad genética

El tamaño del cromosoma de *Streptomyces* se encuentra entre los más grandes de bacterias. Comprendido normalmente entre 8 y 10 Mb (Ventura y col., 2007), el mayor tamaño conocido hasta el momento es el de *S. bingchenggensis,* con casi 12 Mb (Wang y col., 2010). Este tamaño se traduce en un incremento del número de genes más que en un aumento de su tamaño promedio (Kirby y Chen, 2011). De hecho, la secuenciación del genoma de *S. coelicolor* (con 7825 genes predichos) reveló el caso de la primera bacteria en superar en número de genes a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (con 6203; Bentley y col., 2002).

El cromosoma de *Streptomyces* es una estructura lineal, hecho demostrado por primera vez en *Streptomyces lividans* 66 (Lin y col., 1993). Presenta proteínas unidas covalentemente en los extremos 5' (ver figura 1.4) que actúan como cebadores en la replicación bidireccional que tiene lugar desde el *oriC* (Musialowski y col., 1994).

La inestabilidad genética de *Streptomyces* se conoce desde hace décadas y se observó inicialmente como la pérdida de marcadores genéticos relacionados con la síntesis y resistencia a antibióticos o con la síntesis de arginina. Posteriormente se correlacionó con deleciones en los extremos de los cromosomas de hasta 2 Mb que solían acompañarse de la circularización del cromosoma (Lin y col., 1993; Redenbach y col., 1993). La inestabilidad del cromosoma de *Streptomyces* está relacionada con la presencia de repeticiones invertidas terminales (TIR, del inglés <u>Terminal Inverted Repeats</u>) que le predisponen a experimentar no solo deleciones, sino también amplificaciones. Las TIR son heterogéneas en cuanto a tamaño (de 24 a 600 kb según la especie) y secuencia, lo que refleja la naturaleza dinámica de los cromosomas de *Streptomyces* (revisado en Chen y col., 2002). Los sobrecruzamientos no se producen solo entre extremos del mismo cromosoma, sino que pueden darse entre cromosomas hermanos (Fischer y col., 1998) y con plásmidos lineales (Yamasaki y Kinashi, 2004). Estas reorganizaciones pueden producirse de forma espontánea con una frecuencia del 0.1 al 1 % (Hopwood, 2007).

La linealidad del cromosoma no es *per se* la causa de la inestabilidad, ya que cromosomas circularizados artificialmente son incluso más inestables (Fischer y col., 1997; Lin y Chen, 1997). Sin embargo, existen resultados que indican que la inestabilidad del cromosoma circularizado artificialmente se debe a la deleción de secuencias importantes

para su estabilidad y que el tamaño de las regiones dispensables está correlacionado con el tamaño total del cromosoma (Nindita y col., 2013). La caracterización de mutantes afectados en la pigmentación de las colonias obtenidos en diferentes fases del desarrollo en *Streptomyces ambofaciens* sugiere una correlación entre la inestabilidad genómica y el ciclo de desarrollo (Dary y col., 1999; 2000).

La estructura lineal del cromosoma podría suponer una ventaja para la segregación cromosómica en los micelios multinucleados (ya que las formas circulares pueden generar multímeros) y en la transferencia génica horizontal, ya que las recombinaciones simples entre el cromosoma lineal y un plásmido lineal conjugativo son suficientes para intercambiar grandes segmentos de información genética (Volff y Altenbuchner, 1998).



Figura 1.4. Cromosoma de *S. coelicolor* en el que se representa el origen de replicación (Ori) y las proteínas de los extremos 5' (círculos azules). En azul oscuro se representa la región nuclear y en azul claro los brazos del cromosoma. De fuera hacia dentro: los círculos 1 y 2 representan los genes de las cadenas reversa y directa, respectivamente (negro: metabolismo energético; rojo: transferencia de información y metabolismo secundario; verde oscuro: asociados a la superficie; cian: degradación de moléculas grandes; magenta: degradación de moléculas pequeñas; amarillo: metabolismo central o intermediario; azul pálido: reguladores; naranja: proteínas hipotéticas conservadas; marrón: pseudogenes; verde pálido: de función desconocida; gris: miscelánea); el círculo 3 representa los genes esenciales (mismo código de colores); el círculo 4 representa genes de contingencia (rojo: metabolismo secundario; azul pálido: exoenzimas; azul oscuro: conservón; verde: proteínas de vesículas de gas); el círculo 5 representa elementos móviles (marrón: transposasas; naranja: posibles genes transferidos horizontalmente); el círculo 6 representa el contenido en GC; el círculo 7 representa el sesgo GC (caqui: valores > 1 y púrpura valores < 1). Modificado de Bentley y col. (2002).

A partir de la comparación de los cromosomas de *S. griseus, S. coelicolor* y *S. avermitilis*, Ohnishi y col. (2008) establecieron una división del cromosoma en un núcleo de unas 6.4 Mb en el que se encuentran genes esenciales relativamente conservados, implicados en procesos de replicación, transcripción, traducción y metabolismo central; y

dos brazos de entre 1 y 2 Mb, que contienen genes más divergentes, transferidos horizontalmente. Entre especies de *Streptomyces* las regiones nucleares del cromosoma y ciertos segmentos de los brazos, denominados región específica izquierda y región específica derecha, están conservadas (la derecha en menor grado). En estas zonas se encuentran elementos característicos del género, ya que la región nuclear presenta un contenido génico y una conservación muy similar en otras actinobacterias (Kirby y Chen, 2011).

Desde la publicación de la secuencia genómica de *S. coelicolor* en 2002, 35 secuencias están disponibles públicamente y más de 180 se han publicado en estado de borrador permanente (https://gold.jgi.doe.gov/).

I.1.4.2. Elementos genéticos extracromosomales

La mayoría de las bacterias del género *Streptomyces* contienen plásmidos, que pueden ser lineales o circulares. Cuando son lineales tienen un tamaño de 10 kb a 600 kb y suelen compartir características estructurales con el cromosoma como son los TIR, las proteínas en el extremo 5' y la replicación bidireccional desde un origen de replicación interno (Hopwood, 2007; Chang y Cohen, 1994). Se ha descrito que en los plásmidos lineales de *S. coelicolor* las proteínas de los extremos interaccionan entre sí, lo que les dota de una estructura circular superenrollada. Además, esta interacción se puede producir también entre los distintos cromosomas y entre los extremos de un cromosoma y de un plásmido (Tsai y col., 2011).

Los plásmidos circulares a menudo contienen sistemas de integración y se encuentran integrados en el cromosoma. Los plásmidos no integrativos en forma circular covalentemente cerrada (CCC, del inglés <u>Covalently Closed Circular</u>) son también frecuentes y se presentan en un número de copias correlacionado de forma inversa con su tamaño.

Tanto los plásmidos lineales como los circulares suelen ser conjugativos, pero raramente presentan genes de resistencia o confieren alguna ventaja selectiva conocida (Hopwood y Kieser, 1993). Algunos plásmidos contienen una o más agrupaciones de metabolitos secundarios como, por ejemplo, SCP1 (Kirby y col., 1975), pSV1 (Aguilar y Hopwood, 1982) o pSLA2-L (Mochizuki y col., 2003). El megaplásmido pSCL4 de *Streptomyces clavuligerus* contiene un gran número de agrupaciones génicas para la producción de metabolitos secundarios (Medema y col., 2010; Álvarez-Álvarez y col., 2014).

En el género *Streptomyces* se encuentran también elementos integrativos con características intermedias entre las de los bacteriófagos y los plásmidos denominados AICE (del inglés <u>Actinomycete Integrative and Conjugative Elements</u>; revisado en te Poele y col., 2008). Estos elementos se integran en genes que codifican un ARNt y se mantienen a lo largo de generaciones en el cromosoma hasta que se transfieren mediante conjugación a otro hospedador diferente, en el que pueden comportarse como plásmidos replicativos. Están implicados en la adquisición de agrupaciones de metabolitos secundarios y de ADN en general vía transferencia génica horizontal, por lo que podrían intervenir también en la adquisición de resistencias por parte de bacterias patógenas.

Por último, se ha descrito un gran número de actinofagos capaces de infectar a *Streptomyces* que presentan material genético en forma de ADN de doble cadena (Kieser y

col. 2000). Estos plásmidos, elementos transponibles y actinofagos se han aplicado como herramientas para la manipulación genética de *Streptomyces* y de otras especies. Por ejemplo, el plásmido pSG5 de *Streptomyces ghanaensis* se utiliza como sistema de interrupción de genes por su replicación termodependiente y el fago ϕ C31 se aplica en la clonación de secuencias de ADN no solo en *Streptomyces*, sino también en eucariotas superiores como *Drosophila* o el pez cebra (Kieser y col., 2000; Groth y col., 2004; Lister, 2011).

I.1.4.3. Conservación génica entre especies de Streptomyces

La comparación de ocho genomas de *Streptomyces* por Kirby y Chen (2011) reveló que el número de genes que presentan ortólogos en todos ellos y que, en consecuencia, formarían el núcleo del genoma, se reduce a unos 2000, en contraposición a los 3566 determinados por Ventura y col. (2007) utilizando cuatro genomas secuenciados. Por el contrario, el "pan-genoma", o conjunto de genes de la especie, es mucho más grande y variado y se incrementa con una tasa de 2000-3000 genes por cada nuevo genoma secuenciado (Kirby y Chen, 2007).

Entre los genes que se encuentran muy representados en los genomas de *Streptomyces* destacan principalmente los sistemas de dos componentes (Hutchings y col., 2004; Wei y col., 2007) y las bombas de tipo MDR (del inglés <u>multidrug resistance</u>), que podrían utilizarse principalmente para excretar productos de desecho potencialmente tóxicos generados durante el crecimiento (Lee y col., 2007).

I.1.5. Interés ecológico, industrial y farmacéutico

El interés ecológico de *Streptomyces* radica en su intervención en los procesos de descomposición de la materia orgánica en el suelo y también en su uso potencial en biorremediación, del que ya existen ejemplos (Polti y col., 2009).

Por otro lado, especies no patógenas de *Streptomyces* como, por ejemplo, *Streptomyces griseoviridis* K61 (comercializada con el nombre de Mycostop[®]) se utilizan en el control de hongos que afectan a cultivos de invernadero, donde protegen a las plantas a través de la producción de antifúngicos o enzimas que destruyen la pared celular fúngica (Hopwood, 2007).

Desde el descubrimiento por Selman Waksman de la actinomicina D en 1940 y de la estreptomicina en 1943, primer medicamento eficaz en el tratamiento de la tuberculosis, los actinomicetos se han convertido en el foco de atención de muchos investigadores por su capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad biológica. Se trata de compuestos que no son esenciales para el crecimiento del organismo productor (al menos en las condiciones estudiadas) y que se producen normalmente en estadíos tardíos del crecimiento. Su rango de actividades biológicas es amplísimo, así como su estructura química y las agrupaciones de genes que codifican sus rutas biosintéticas. Debido al momento del ciclo vegetativo en el que se producen se ha considerado que su función es la de protección frente a competidores (Chater y Merrick, 1979). Sin embargo, en el suelo los antibióticos se encuentran en concentraciones subinhibitorias y, además, pueden ejercer efectos diversos

sobre otros microorganismos en función de su concentración (revisado en Raaijmakers y Mazzola, 2012). Este fenómeno sugiere que su función original es la de actuar como señalizadores y no como biocidas. Entre las actividades de los metabolitos producidos por Streptomyces podemos encontrar antifúngicos, antivirales, antihelmínticos, insecticidas, herbicidas, inmunoestimuladores, anticolesterolémicos, factores antitumorales. de crecimiento de plantas y animales, inductores de la diferenciación celular de eucariotas, inhibidores enzimáticos, pigmentos, aromas, enzimas, antihipertensivos e inmunosupresores. Más de 2/3 de los antibióticos de origen microbiano son producidos por actinomicetos y de éstos, aproximadamente un 80 % procede de Streptomyces (Hopwood, 2007).

Como se indicó anteriormente, la naturaleza saprófita del género *Streptomyces* se refleja en la producción de una amplia variedad de enzimas de interés industrial como son amilasas, proteasas, xilanasas, celulasas, etc. Debido a su crecimiento micelial, la mayoría de enzimas que se producen a nivel industrial se obtienen mediante expresión heteróloga en otros microorganismos (van Wezel y col., 2006). Dentro del género, *S. lividans* es la especie de elección para la expresión de proteínas debido a que carece del sistema de restricción y modificación que afecta a los vectores procedentes de *Escherichia coli* (MacNeil, 1988) y a que presenta niveles bajos de actividad proteasa extracelular (Kieser, 2000).

I.1.5.1. La necesidad de nuevos antibióticos: perspectivas

Durante los años 50 y 60 se descubrieron gran cantidad de antibióticos (ver figura 1.5); de hecho se denominó a esta época como la "Edad de Oro del descubrimiento de antibióticos" (Hopwood, 2007). A partir de los años 70, la tasa de descubrimiento ha ido decayendo paulatinamente, aunque se han descubierto algunos compuestos importantes como la avermectina, la rapamicina, el tacrolimus (FK506) o el bialafos. La industria ha recurrido a la modificación de antibióticos preexistentes y se han obtenido semisintéticos de nueva generación que a menudo son más caros e incluso tienen efectos tóxicos (Procópio y col., 2012).



Figura 1.5. Representación temporal de las edades de oro del descubrimiento de antibióticos y de la química farmacéutica. Entre 1962 y 2000 no se identificaron nuevas clases estructurales de antibióticos. Modificado de Walsh y Wencewicz (2014).

En 2009 se estimaba que se producían al año 100 000 toneladas de antibióticos (Nikaido, 2009). Su incorrecta utilización y la movilidad geográfica de las personas, que transportan cepas resistentes y las introducen en comunidades en las que el uso de antibióticos es muy limitado, contribuyen a la dispersión de resistencias en bacterias. Los pronósticos para las próximas décadas en cuanto al tratamiento de enfermedades infecciosas son bastante negativos, por tanto, es de vital importancia encontrar nuevos antibióticos y las bacterias del género *Streptomyces* son un reservorio prometedor.

I.1.5.2. La biología sintética como recurso para el descubrimiento de nuevos antibióticos

La secuenciación de genomas de Streptomyces ha evidenciado que su capacidad para producir metabolitos secundarios es mayor de la supuesta inicialmente: el número de agrupaciones detectadas varía entre 20 y 50 por genoma (Bentley y col., 2002; Ikeda y col., 2003; Medema y col., 2010; Ohnishi y col., 2008; Wang y col., 2010). Hasta el momento sólo hemos aprovechado una pequeña parte del potencial de estas bacterias y se estima que el género Streptomyces es capaz de producir más de 100 000 compuestos con actividad antimicrobiana (Watve y col., 2001). Uno de los principales problemas es que muchas agrupaciones son "crípticas", esto es, no se expresan en las condiciones de laboratorio y por tanto, sus productos son desconocidos. La biología sintética, que se presenta, en general, como ingeniería de sistemas biológicos (Wright, 2014), pretende diseñar y construir nuevos sistemas con propiedades de interés, lo que supone también la producción de nuevos productos naturales o precursores (Zhuo y col., 2014). Una aplicación de la biología sintética es activar agrupaciones crípticas por medio de la eliminación de la regulación natural de la agrupación y su sustitución por mecanismos reguladores conocidos y predecibles (p. ej., remodelado de promotores, de sitios de unión a ribosoma o del uso de codones; revisado en Medema y col., 2011a y en Martín y Liras, 2014).

I.2. Regulación molecular de la producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces*

La biosíntesis de antibióticos en *Streptomyces* es un proceso íntimamente ligado a la diferenciación morfológica (ver figura 1.6): comienza normalmente con el inicio de la fase estacionaria en cultivos líquidos y coincide con el inicio de la diferenciación morfológica en cultivos sólidos (Bibb, 2005). Una excepción es la producción de ácido clavulánico y cefamicina C en *S. clavuligerus* (Braña y col., 1986b; Bascarán y col., 1991). La producción de antibióticos se desencadena normalmente cuando no existe alternativa fisiológica para continuar con el crecimiento vegetativo, en respuesta a la escasez nutricional o a algún cambio medioambiental (p. ej., la presencia de ciertas fuentes de carbono, hormonas señalizadoras o competidores; ver más adelante).



Figura 1.6. Sección vertical de una colonia de *Streptomyces*. La producción de antibióticos se limita a una zona concreta entre el micelio sustrato y el aéreo, por lo que está íntimamente relacionada con el proceso de desarrollo. En el esquema se representan las células vivas en negro y las muertas en blanco. La formación del micelio aéreo es un fenómeno coordinado pero no es homogéneo: mientras que las células de la periferia de la colonia pueden continuar con su crecimiento vegetativo, en el centro de la colonia puede iniciarse la diferenciación y la producción de metabolitos secundarios. Modificado de Chater (2006).

I.2.1. Clasificación de los reguladores de la producción de antibióticos

En la tabla 1.3 se presenta un resumen de los reguladores de la producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces*. Dentro de los reguladores de la producción de antibióticos podemos distinguir los específicos de ruta y los pleiotrópicos. Los reguladores específicos de ruta, cuando existen, suelen estar agrupados con los genes biosintéticos, de secreción y de resistencia al antibiótico (Bibb, 1996). Pueden ejercer una regulación positiva o negativa sobre los elementos de la agrupación y desempeñan un papel fundamental. De hecho, para algunas agrupaciones son el único factor limitante que determina el inicio de la biosíntesis (Gramajo y col., 1993). Sin embargo, la capacidad de algunos reguladores "específicos de ruta" de extender su efecto a genes localizados fuera de su agrupación e incluso a reguladores pleiotrópicos (Huang y col., 2005) compromete el concepto de la especifidad de ruta.

Los reguladores pleiotrópicos, también conocidos como globales, no están asociados normalmente a las agrupaciones biosintéticas y transmiten diversos tipos de señales ambientales a los reguladores específicos de ruta, de manera que no solo afectan a la producción de metabolitos secundarios en determinadas condiciones de crecimiento sino también a otros procesos.

Aunque en algunos casos concretos existe una regulación piramidal que tiene como vértice un regulador global de alto rango, a medida que aumenta el conocimiento sobre la regulación se hace más evidente que la expresión de las agrupaciones de metabolitos secundarios está controlada por una densa red de reguladores que se interconectan, fenómeno denominado CTGR (del inglés <u>Cross-Talking Global Regulators</u>; Martín y Liras, 2010).

I.2.2. Reguladores específicos de ruta

En algunas agrupaciones se encuentran varios genes reguladores de este tipo, pero normalmente es solo uno de ellos el que activa la transcripción de los genes biosintéticos: por ejemplo, TylS de la agrupación de tilosina de *Streptomyces fradiae* (Bate y col., 2002) o Dnrl, de la agrupación de daunorubicina de *S. peucetius* (Stutzman-Engwall y col., 1992).

Existen varias clases de reguladores específicos de ruta como los SARP, LAL, LysR, TetR, etc. Los mejor caracterizados son los de tipo SARP (del inglés <u>Streptomyces Antibiotic</u> <u>Regulatory Proteins</u>), que actúan como activadores transcripcionales (van Wezel y col., 2009). Los reguladores de este tipo presentan un motivo wHTH (del inglés <u>winged Helix-</u><u>Turn-Helix</u>) cerca del extremo amino terminal que también se encuentra en la familia de proteínas OmpR (Wietzorrek y Bibb, 1997) seguido de un dominio de activación transcripcional. Pueden activar la transcripción de parte o de todos los genes del operón en que están localizados. Los ejemplos más representativos son *actII-orf4* y *redD* de *S. coelicolor*, que controlan la producción de actinorrodina y de undecilprodigiosina, respectivamente (Arias y col., 1999; Takano y col., 1992) y *ccaR* de *S. clavuligerus*, que controla la producción de cefamicina C y de ácido clavulánico (Pérez-Llarena y col., 1997). A diferencia de otros reguladores, los reguladores de tipo SARP solo se encuentran en actinomicetos y la mayoría se encuentran dentro del grupo de los estreptomicetos (Bibb, 2005).

Aunque la mayoría de reguladores SARP actúan como reguladores específicos de ruta, existe un regulador pleiotrópico con un dominio SARP, AfsR, que se describirá más adelante.

Dentro de los reguladores específicos de ruta existe otra familia de reguladores, los de tipo LAL (del inglés <u>Large ATP-binding regulators of the LuxR family</u>). Estos contienen un dominio de unión a nucleósido trifosfato en la zona amino terminal y un dominio HTH (del inglés <u>Helix-Turn-Helix</u>) en el extremo carboxilo terminal característico de la familia LuxR. Al igual que los SARP, parecen estar confinados a los actinomicetos (Bibb, 2005). Algunos ejemplos son PykD, regulador de la síntesis de picromicina en *S. venezuelae* (Wilson y col., 2001) o RapH, regulador de la síntesis de rapamicina en *Streptomyces hygroscopicus* (Kuščer y col., 2007). En *S. coelicolor* no existe ningún regulador específico de ruta de tipo LAL, pero existen 14 reguladores de este tipo descritos en el genoma, de los cuales dos afectan a la producción de antibióticos y a otros reguladores globales de la producción de antibióticos (Guerra y col., 2012).

Otras familias representadas dentro de los reguladores específicos de ruta son la familia LysR (p. ej., ClaR, regulador de la producción de ácido clavulánico en *S. clavuligerus*; Pérez-Redondo y col., 1998), TetR (p. ej., Gel19, implicado en la producción de geldanamicina en *S. hygroscopicus*; Kim y col., 2010) o AraC (p. ej., RapG, regulador de la producción de rapamicina en *S. hygroscopicus*; Kuščer y col., 2007).

I.2.3. Reguladores pleiotrópicos

Los estudios comparativos de genomas de *Streptomyces* secuenciados y otras actinobacterias indican que la mayoría de los reguladores globales son universales en todas ellas, a excepción de los contenidos en la agrupación de *whiJ* y en otras agrupaciones parálogas de esta (Chandra y Chater, 2014). En este grupo encontramos reguladores de respuesta de algunos sistemas de dos componentes, como, por ejemplo, PhoP (descrito en el apartado I.3.1; pág.42), AbsA2 o AfsR.

I.2.3.1. Sistema AfsK/AfsR/AfsS

AfsR es un factor transcripcional de la familia SARP que contiene, además, un dominio ATPasa que regula su unión al ADN. Parece estar presente en todos los estreptomicetos y regula positivamente la producción de diversos antibióticos (Horinouchi, 2003; Maharjan y col., 2009; Parajuli y col., 2005).

AfsR es fosforilado *in vitro* por AfsK, una de las 34 serina/treonina quinasas codificadas en el genoma de *S. coelicolor* (Matsumoto y col., 1994), aunque puede ser fosforilado por otras quinasas, lo que permite la integración de diversas señales (Sawai y col., 2004). AfsR actúa reclutando la ARN polimerasa en el promotor de *afsS* (Tanaka y col., 2007). Este último codifica una proteína de 63 aminoácidos que es considerada como un regulador positivo de la producción de antibióticos desde su descubrimiento (Vögtli y col., 1994; Lee y col., 2002). Los estudios transcriptómicos con mutantes en *afsS* han demostrado que, aunque entre los genes afectados hay factores transcripcionales, casi el 70 % de los genes expresados diferencialmente se relacionan con la respuesta a la limitación nutricional, especialmente de fosfato (Pi), nitrógeno y sulfato (Lian y col., 2008). Además de por AfsR, la expresión de *afsS* está regulada por PhoP (Santos-Beneit y col., 2009a).

Como ejemplo de la profunda conexión entre la producción de antibióticos y la diferenciación morfológica, AfsK es capaz de fosforilar a DivIVA (Hempel y col., 2012), de manera que interviene en el crecimiento polar y en la ramificación de las hifas.

I.2.3.2. Sistema AbsA: en el límite entre regulación específica de ruta y pleiotrópica

El sistema de dos componentes AbsA1-AbsA2 afecta a la producción de actinorrodina, undecilprodigiosina, metilenomicina y CDA (del inglés <u>calcium-dependent</u> <u>antibiotic</u>) de *S. coelicolor* (Adamidis y col., 1990). AbsA2 fosforilado actúa como regulador negativo de la biosíntesis de antibióticos: entre sus dianas se encuentran los activadores específicos de ruta actII-orf4, redZ y cdaR (McKenzie y Nodwell, 2007). Curiosamente, este sistema se localiza dentro de la agrupación biosintética de CDA (Anderson y col., 2001) y la regulación ejercida sobre el resto de agrupaciones biosintéticas podría ser un efecto indirecto o suponer el primer ejemplo de regulación cruzada entre agrupaciones biosintéticas (Bibb, 2005).
I.2.3.3. Otros reguladores pleiotrópicos

• AtrA

AtrA es una proteína de tipo TetR que actúa como activador esencial de los promotores de *actII-orf4* en *S. coelicolor* y de *strR* de *S. griseus,* regulador de la agrupación de estreptomicina (Uguru y col., 2005; Vujaklija y col., 1993). Existen ortólogos en todos los genomas de *Streptomyces* secuenciados actualmente (Liu y col., 2013). También activa *nagE2*, que codifica una permeasa de N-acetilglucosamina (Nothaft y col., 2010), y está regulado por el sistema PhoRP (Allenby y col., 2012), lo que supone la interconexión de la regulación nutricional por N-acetilglucosamina y por Pi.

AdpA

AdpA (del inglés <u>A</u>-factor <u>d</u>ependent <u>p</u>rotein) es un regulador transcripcional de la familia AraC/XyIS estudiado principalmente en *S. griseus*, en el cual fue descubierto (Ohnishi y col., 1999). Entre las dianas detectadas en *S. coelicolor* y *S. griseus* hay un gran número de genes implicados en el metabolismo secundario y la diferenciación morfológica, si bien el espectro de genes afectados no es totalmente coincidente entre ambas especies (Liu y col., 2013).

En *S. griseus,* el promotor de *adpA* es la única diana del represor ArpA, sensor de la y-butirolactona denominada factor A. Cuando se alcanza un umbral de concentración del factor A, ArpA se suelta del promotor de *adpA* y permite su transcripción (Ohnishi y col., 1999). La función de AdpA es reclutar la ARN polimerasa y activar la transcripción, aunque ciertas dianas como su propio gen se reprimen (Kato y col., 2005; Higo y col., 2012). Entre las dianas activadas destacan *strR* (Ohnishi y col., 1999), *wblA* (tanto en *S. griseus* como en *S. coelicolor*; Hara y col., 2009; Lee y col., 2013) o *adsA* (ortólogo de *bldN*), que codifica un factor sigma imprescindible para la formación de micelio aéreo en *S. coelicolor* y *S. griseus* (Yamazaki y col., 2000; Bibb y col., 2000).

Una diferencia fundamental de AdpA en *S. coelicolor* (codificado por *bldH*) es que no responde a γ -butirolactonas, ya que en esta especie las butirolactonas no funcionan como moléculas señalizadoras en la diferenciación morfológica (Takano E. y col., 2003; Takano, 2006). En *S. coelicolor* AdpA regula genes relacionados con la diferenciación morfológica, como los que codifican RamR o la proteasa ClpP1 (Wolanski y col., 2011).

El nivel proteico de AdpA presenta un máximo durante la formación de micelio aéreo y va disminuyendo a lo largo del desarrollo en *S. coelicolor* (Wolanski y col., 2011). Transcripcionalmente, *adpA* está autoregulado (aunque en modo opuesto en *S. coelicolor* y *S. griseus*; Wolanski y col., 2011; Kato y col., 2005), reprimido por el regulador pleiotrópico BldD (den Hengst y col., 2010) y su transcrito es procesado por la ARNasa III (Xu W. y col., 2010; ver más adelante). Respecto a la traducción, contiene un codón TTA en todas las especies de *Streptomyces* analizadas y está regulado por BldA (ver más adelante), con el que forma un bucle regulador (ya que AdpA activa la transcripción de *bldA*, Higo y col., 2011).

DasR

El regulador transcripcional DasR, que media la respuesta a N-acetilglucosamina descrita en el capítulo siguiente, pertenece a la familia de reguladores GntR (Rigali y col., 2004). Las secuencias a las que se une se denominan dre (del inglés DasR responsive <u>elements;</u> Colson y col., 2007). Entre sus dianas se encuentran genes del sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa (PTS, del inglés phosphoenolpyruvate <u>PhosphoTransferase System</u>) de N-acetilglucosamina, actII-orf4, redZ y genes que codifican quitinasas (Rigali y col., 2008; Nothaft y col., 2010; Rigali y col., 2006; Colson y col., 2007). En condiciones de escasez nutricional, la glucosamina-6-fosfato actúa como regulador alostérico de DasR y permite su liberación de las secuencias dre. Además, DasR interfiere con otros reguladores como Rok7b7 (ver apartado I.3.3.2; pág.55) o AtrA, que al activar el transporte de N-acetilglucosamina durante la fase estacionaria contribuye a la liberación de DasR de sus dianas (van Wezel y McDowall, 2011).

• RelA y la respuesta estricta

La respuesta estricta (o restrictiva), del inglés *stringent response*, es un mecanismo muy general que permite a las bacterias sobrevivir en periodos de limitación nutricional. Dicho mecanismo consiste en incrementar la transcripción de genes asociados a la fase estacionaria de crecimiento o de respuesta a estrés y reprimir la de genes implicados en el crecimiento activo (Hesketh y col., 2007). En este contexto, un ejemplo de regulador pleiotrópico es RelA de *S. coelicolor*, que interviene en la síntesis (e hidrólisis) de la molécula señalizadora (p)ppGpp: en condiciones de limitación de aminoácidos, la proteína asociada al ribosoma RelA sintetiza ppGpp como respuesta a la ocupación del sitio A del ribosoma por ARNt no cargados (Haseltine y Block, 1973; Martínez-Costa y col., 1998). En *S. coelicolor* la respuesta estricta afecta a la diferenciación morfológica y a la producción de antibióticos, aunque el efecto es más variable sobre la producción de undecilprodigiosina (Chakraburtty y Bibb, 1997; Hesketh y col., 2001; Martínez-Costa y col., 1996).

Mientras que RelA es necesario en condiciones de limitación de aminoácidos o glucosa, RshA, un homólogo que también tiene actividad sintetasa e hidrolasa, se requiere en condiciones de limitación de Pi (Ryu y col., 2007).

• Genes de desarrollo que afectan a la producción de antibióticos

El gen *bldA* codifica el ARNt capaz de reconocer el codón de leucina UUA, infrecuente en las secuencias de ARNm de *Streptomyces*. El codón TTA suele encontrarse en genes reguladores específicos de ruta (Chandra y Chater, 2008) y, en consecuencia, mutaciones en *bldA* afectan a la producción de metabolitos secundarios. Una excepción es el gen del regulador específico de ruta de cefamicina C y ácido clavulánico en *S. clavuligerus, ccaR*, que, aunque contiene un codón TTA, se transcribe eficientemente en un mutante en *bldA* gracias a un error durante su traducción (Trepanier y col., 2002). Ya que los mutantes en *bldA* son capaces de crecer, se considera que los genes que contienen este triplete no son esenciales. Por el contrario, en los mutantes en *bldA* sí se producen defectos en el desarrollo. El estudio de codones TTA en cuatro especies de *Streptomyces* determinó que solo existen tres genes que lo contengan en todas ellas; uno de ellos es *adpA* y, los otros dos, genes de función desconocida (Chater y Chandra, 2008). Los defectos en el desarrollo morfológico de los mutantes en *bldA* se atribuyen, al menos en parte, a la restricción de la traducción del ARNm de *adpA* (Takano E. y col., 2003; Nguyen y col., 2003). De acuerdo con su función, la abundancia de BldA en la célula incrementa cuando el crecimiento se ralentiza y es máxima durante la fase estacionaria (Leskiw y col., 1993).

BldD es un regulador transcripcional de la familia XRE (del inglés <u>Xenobiotic Response</u> <u>Element</u>) que se produce principalmente durante el crecimiento vegetativo (Elliot y col., 1998), fase en la que reprime genes del desarrollo, por lo que actúa como regulador del estado de transición (Elliot y col., 2001). Entre sus dianas, a parte de él mismo (Elliot y col., 1998; 2003), encontramos reguladores relacionados con el desarrollo (como *adpA*, *bldA*, *bldC*, *bldM*, *bldN*, *ssgA*, *ssgB*, *ftsZ*, *whiB*, *whiG*, *smeA-ssfA*) y/o con el metabolismo secundario (*nsdA*, *cvn9*, *bldA*, *bldC*, *leuA*; Elliot y col., 2001; den Hengst y col., 2010). Aunque normalmente BldD se une a la región promotora de los genes que regula, una excepción es *bldA*, al que se une en la región codificante (den Hengst y col., 2010).

Otros reguladores relacionados con el desarrollo que afectan a la producción de antibióticos son: BldB, cuyos mutantes presentan el fenotipo calvo más estricto y que seguramente interacciona con otra proteína para ejercer su función (Eccleston y col., 2006); WhiJ, que junto con los productos de SCO4542 y SCO4544 podría intervenir en la transducción de señales ambientales que influencian el desarrollo (Aínsa y col., 2010); AbaA (Fernández-Moreno y col., 1992) o WblA, que podría mediar en la conexión entre la producción de antibióticos y el desarrollo morfológico, ya que su interrupción incrementa la producción de antibióticos en varias especies de *Streptomyces* pero previene la esporulación (Fowler-Goldsworthy y col., 2011; Noh y col., 2010; Nah y col., 2012; Rabyk y col., 2011).

I.2.4. Otros elementos reguladores: ribonucleasas, ARN pequeños, proteasas y moléculas señalizadoras

En *S. coelicolor absB*, cuyo producto se identificó inicialmente como un regulador global de la síntesis de antibióticos, codifica una ARNasa III específica de moléculas de doble cadena (Chang y col., 2005). Esta ARNasa lleva a cabo un papel muy importante en la regulación de la biosíntesis de antibióticos en esta especie, ya que mutaciones en este gen elevan los niveles celulares de los ARNm de genes implicados en la esporulación y disminuyen los niveles de los ARNm de genes activadores de la biosíntesis de antibióticos y otros metabolitos secundarios (Aceti y Champness, 1998; Huang y col., 2005). Como se comentó anteriormente, una de sus dianas es el mensajero de *adpA* (Xu W. y col., 2010).

Gen	ID	Referencia		
Reguladores implicados directamente con agrupaciones biosintéticas				
strR	SGR5931	Vujaklija y col., 1993		
adpA	SGR4742	Ohnishi y col., 1999		
arpA	SGR3731	Onaka y Horinouchi, 1997		
afsA	SGR6889	Kato v col., 2007		

Tabla 1.3. Reguladores de la producción de antibióticos en *Streptomyces*. Modificado de van Wezel y McDowall (2011).

Gen	ID	Referencia
arfA	SCO3841	Xu y col., 2009
actII-orf4	SCO5085	Gramajo y col., 1993
redD	SCO5877	Feitelson y col., 1985
dasR	SCO5231	Rigali y col., 2008
atrA	SCO4118	Uguru y col., 2005
rok7b7	SCO6008	Park S. S. v col., 2009
absA1/2	SC03225-SC03226	Anderson v col., 2001
,	SCO0608	Yang v col., 2008
	SCO6808	Yang y col., 2008
red7	SC05881	Guthrie v col., 1998
cpkQ (kasQ)	SCO6280	Pawlik v col., 2007
schR	SC06265	Takano y col., 2001
schA	SC06265	Takano y col. 2001
ndaR	<u>SCO5552</u>	Vang v col 2009
relA	SC01513	Chakraburtty y col 1996
rchA	SCOE704	Sup v col 2001
rolk	SC04649	Ochi 1000
τρικ rpoB	SC04654	
гров	SC04654	
cprA	SC06071	Onaka y col., 1998
сргв	SC06312	Unaka y col., 1998
	SC03201	Xu D. y col., 2010
Reguladores	sin enlace conocido coi	n agrupaciones biosinteticas
afsS	SCO4425	Vogtli y col., 1994
afsR	SCO4426	Horinouchi y col., 1990
afsK	SCO4423	Matsumoto y col., 1994
kbpA	SCO4422	Umeyama y Horinouchi, 2001
pkaG	SCO4487	Sawai y col., 2004
afsL	SCO4377	Horinouchi, 2003
phoR	SCO4229	Sola-Landa y col., 2003
phoP	SCO4230	Sola-Landa y col., 2003
dmdR1/adm	SCO4394	Tunca y col., 2007
sigQ	SCO4908	Shu y col., 2009
afsQ1/2	SCO4907-SCO4906	Shu y col., 2009
rpoZ	SCO1478	Santos-Beneit y col., 2011a
bld		Ver tabla 1.2
Reg	uladores huérfanos o e	específicos de ruta
absB	SCO5572	Price y col., 1999
absC	SCO5405	Hesketh y col., 2009
absR1/2	SCO6992-SCO6993	Park y col., 2000
cdgA	SCO2817	Den Hengst y col., 2010
cutRS	SCO5862-SCO5863	Chang y col., 1996
earE1/2	SCO6421-SCO6422	Wang y col., 2007
eshA	SCO7699	Wang y col., 2007
nsdA	SCO5582	Li y col., 2006
nsdB	SCO7252	Zhang y col., 2007
rapA1/2	SCO5403-SCO5404	Lu y col., 2007
rrdA	SCO1104	Ou y col., 2009
ssaA	SCO3926	van Wezel v col 2000
wblA	SCO3579	Traag y van Wezel. 2008
	SCO1712	Lee v col 2010
cdaR	SCO3217	Ryding v col. 2002
mmvB	CAC36754	O'Rourke v col., 2009
mmfR	CAC36768	Corre v col 2008
	0, (0007,00	20110 / 2000

Los ARN no codificantes pequeños controlan una gran variedad de procesos celulares en bacterias, ya que modulan la estabilidad y/o traducción de mensajeros o modifican la actividad proteica (Swierzc y col., 2008). Una revisión reciente sobre el papel que ejercen en estreptomicetos es la publicada por Heueis y col. (2014). En *S. coelicolor,* la sobreexpresión de scr5239 disminuye la producción de actinorrodina mientras que la disminución de su transcripción, la incrementa (Vockenhuber y Suess, 2012). Así mismo, la sobreexpresión de un ARN antisentido del ARN pequeño cnc2198.1 (contenido en el gen *glnA*, que codifica la glutamina sintasa I), disminuye la producción de undecilprodigiosina (D'Alia y col., 2010).

Por último, las proteasas podrían tener un papel fundamental en la regulación de la producción de antibióticos al retirar reguladores transcripcionales o proteínas de respuesta una vez que han cumplido su función. En *S. coelicolor* y *S. lividans* la disrupción de *clp1* (que codifica la subunidad catalítica del complejo proteasa Clp) bloquea la diferenciación morfológica y la sobreproducción de ClpX (subunidad reguladora), acelera la producción de actinorrodina en *S. coelicolor* y la activa en *S. lividans* (de Crécy-Lagard y col., 1999).

Aunque se ha citado el factor A de *S. griseus,* no se ha profundizado en el papel de otras γ-butirolactonas, señalizadores extracelulares producidos por estreptomicetos y otros géneros de actinomicetos (revisados en Takano, 2006). En *S. coelicolor* existe un grupo de moléculas señalizadoras denominadas SCB (del inglés <u>S. coelicolor butanolides</u>), la mayoría de las cuales están implicadas en la regulación del metabolismo secundario pero no en la diferenciación morfológica (Bibb, 2005; Takano, 2006). La unión de las γ-butirolactonas a sus receptores induce cambios conformacionales en los mismos que impiden su unión a los promotores y permiten la expresión de sus genes diana (Natsume y col., 2004). Sin embargo, aunque en la mayoría de los casos la deleción del gen que codifica el receptor tiene un efecto positivo sobre la producción del antibiótico, existen casos en los que la retrasa o inhibe (Engel y col., 2001; Folcher y col., 2001). La mayoría de sistemas de butirolactonas descritos regulan de forma específica la producción de un antibiótico (Ohnishi y col., 1999; Folcher y col., 2001; Wang y Vining, 2003) y, además, muchos se localizan dentro de la agrupación génica del antibiótico regulado, por lo que se ha llegado a considerarlos reguladores específicos de ruta (Bibb, 2005).

Se han encontrado otras moléculas señalizadoras en *Streptomyces,* como son los furanos (Corre y col., 2008), avenólidos (relacionados con la producción de avermectina en *S. avermitilis*; Kitani y col., 2011) o el factor PI (del inglés <u>Pimaricin Inducer,</u> en *Streptomyces natalensis*; Recio y col., 2004).

I.3. Regulación nutricional de la producción de antibióticos en *Streptomyces*

En este apartado se describen algunas de las condiciones nutricionales que afectan a la producción de antibióticos, concretamente nos centraremos en la disponibilidad de Pi y la naturaleza de las fuentes de carbono presentes en el medio. Con respecto a la regulación por nitrógeno indicaremos solamente que, al igual que ocurre con la regulación por carbono, la presencia de fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables reprime la producción de antibióticos (Aharonowitz, 1980). El efecto podría estar mediado por un mayor consumo de carbono durante el crecimiento, que disminuye su disponibilidad para el metabolismo secundario (Martín, 2004; van Wezel y McDowall, 2011). También los micronutrientes como el zinc, el hierro o el manganeso afectan a la producción de antibióticos. Por ejemplo, la limitación de hierro tiene un efecto positivo sobre la producción de actinorrodina en *S. coelicolor*, especialmente en presencia de ciertas fuentes de nitrógeno (Coisne y col., 1999).

I.3.1. Regulación por fosfato: el regulón pho

La forma principal de asimilación de fósforo en bacterias es el ortofosfato (HPO₄²⁻ o PO₄³⁻, abreviado Pi) (Beever y Burns, 1980). En la mayoría de suelos, su presencia en bajas concentraciones y su baja biodisponibilidad lo hacen un factor limitante (Hinsinger, 2001). Para regular la captación de Pi y sobrevivir en condiciones de limitación, las bacterias cuentan con un mecanismo regulador global conocido como regulón *pho*, descrito por primera vez en *E. coli* y definido como el conjunto de genes directamente controlados por un sistema de dos componentes que responde a la escasez de Pi en el medio (Wanner, 1993).

La biosíntesis de muchos metabolitos se regula por la concentración de Pi en el medio y, aunque normalmente se ve reprimida por altas concentraciones (Martín y Demain, 1980; Martín, 2004), no todos los metabolitos son igualmente sensibles (Hobbs y col., 1990). El efecto negativo del Pi no se produce solo por medio de inhibición enzimática, sino que la transcripción de genes biosintéticos se ve reprimida. En 2003 se demostró que en el género *Streptomyces* el regulón *pho* interviene en el control de la producción de antibióticos (Sola-Landa y col., 2003), si bien su efecto depende del medio de cultivo, la especie y el metabolito en cuestión (ver más adelante).

Aparte de su implicación en la producción de antibióticos, el regulón *pho* también se ha relacionado con la patogenicidad microbiana en *Vibrio cholerae, Pseudomonas* spp. y en ciertas especies patógenas de *E. coli* (revisado en Chekabab y col., 2014). Recientemente se ha publicado una revisión sobre el regulón *pho* en bacterias, su papel en la regulación nutricional y en la producción de metabolitos secundarios (Santos-Beneit, 2015).

I.3.1.1. El sistema de dos componentes y la activación del regulón

El sistema de dos componentes que controla el regulón *pho* se ha caracterizado en varias especies de microorganismos, especialmente en los organismos modelo *E. coli* y *Bacillus subtilis* (Tommassen y Lugtenberg, 1982; Hulett y col., 1994). Está formado por una quinasa sensora y un regulador de respuesta (ver figura 1.7), que reciben los nombres de PhoR-PhoB en *E. coli* (Tommassen y col., 1982) y PhoR-PhoP en *B. subtilis* y *Streptomyces* (Seki y col., 1988; Sola-Landa y col., 2003).

La señal que desencadena su activación es la escasez de Pi extracelular, aunque en la levadura *S. cerevisiae* también participa la concentración intracelular (Auesukaree y col., 2004). La quinasa sensora se autofosforila en un residuo de histidina y fosforila al regulador

de respuesta, que incrementa su afinidad por las secuencias a las que se une. En *E. coli*, en condiciones de exceso de Pi, PhoR muestra actividad fosfatasa sobre PhoB (Carmany y col., 2003), por lo que evita su fosforilación por otras quinasas (Wanner y Wilmes-Riesenberg, 1992; McCleary y Stock, 1994) y, por tanto, la activación del sistema.



Figura 1.7. Representación del mecanismo de transducción de señal de un sistema de dos componentes.

En el modelo de *E. coli* descrito por Wanner (1998), participan en la transducción de la señal, a parte del sistema PhoR-PhoB, el transportador de tipo ABC Pst (del inglés <u>phosphate specific transport</u>) y una proteína de tipo chaperona (PhoU). El transportador está formado por la proteína periplásmica PstS, el transportador de membrana formado por PstC y PstA y la ATPasa PstB. El mecanismo de acción de PhoU se desconoce, pero el modelo sugiere que PhoU podría formar un complejo represor con Pst y PhoR en condiciones de exceso de Pi que desaparecería con la escasez. También se ha sugerido que podría intervenir en el metabolismo intracelular del Pi (Steed y Wanner, 1993) o controlar la actividad del sistema Pst (Rice y col., 2009).

En *B. subtilis* intervienen tres sistemas de dos componentes: PhoR-PhoP, ResE-ResD y SpoOB-SpoOA (Hulett, 1996; Sun y col., 1996). A diferencia de *E. coli*, *B. subtilis* no tiene un homólogo de *phoU*, no parece que el sistema Pst esté implicado y en la activación participa un regulador del estado de transición: AbrB (Takemaru y col., 1996; Qi y col., 1997; Hulett, 1996). La señal de escasez se propaga por dos vías paralelas: ResD y AbrB y, además, participan otros sistemas independientes del regulón *pho* (Antelmann y col., 2000; Pragài y Harwood, 2002). El papel de ResD es indirecto, ya que es esencial en la formación de oxidasas que oxidan quinonas reducidas inhibidoras de la autofosforilación de PhoR *in vitro* (Schau y col., 2004). El sistema Spo0 pone freno a la respuesta tras un período prolongado de escasez, ya que regula negativamente las rutas de ResD y AbrB e induce la esporulación (Hulett, 1996; Jensen y col., 1993; Strauch y col., 1990).

Los reguladores de respuesta PhoB y PhoP pertenecen a la familia OmpR y, aunque su fosforilación es siempre esencial, la causa de tal esencialidad varía entre microorganismos. En *E. coli* la fosforilación es necesaria para la dimerización y unión al ADN (Allen y col., 2001; Bachhawat y col., 2005), pero no para activar la transcripción (Makino y col., 1996). PhoB de *E. coli* forma dímeros tanto en estado desfosforilado como fosforilado; sin embargo, son estos últimos los únicos cuya conformación permite la unión al ADN (Bachhwat y col., 2005). En *B. subtilis* la fosforilación no es esencial para la dimerización y

unión al ADN de PhoP, que tiende a oligomerizar sobre el ADN independientemente de su estado de fosforilación (Chen y col., 2003; Birck y col., 2003). Sin embargo, la fosforilación es esencial para que se produzca activación de la transcripción y, además, aumenta más de 10 veces la afinidad de unión de PhoP al ADN (Liu y Hulett, 1997).

Las secuencias a las que se une el regulador de respuesta fueron definidas por primera vez en *E. coli* con el nombre de cajas PHO (Makino y col., 1986). En *E. coli* están formadas por 18 nt que contienen dos unidades directas repetidas (DRu) de 7 nt separadas por 4 nt (Torriani, 1990; Martín, 2004). En *B. subtilis* las cajas PHO están formadas por dos hexanucleótidos que se repiten en tándem separados por 3 nt-7 nt (Liu y Hulett, 1998) y la unión de PhoP al ADN puede activar o reprimir la transcripción (Liu y col., 1998). La represión no requiere que PhoP interaccione con la ARN polimerasa, sin embargo la activación sí. La transcripción de genes del regulón *pho* no depende solamente de la unión del regulador de respuesta al ADN, sino que se requiere la interacción con factores sigma (σ^{70} en *E. coli* y σ^{A} o σ^{E} en *B. subtilis*; Makino y col., 1993; Paul y col., 2004).

I.3.1.2. El regulón pho en Streptomyces

El sistema PhoR-PhoP se ha caracterizado en *S. lividans* (Sola-Landa y col., 2003); *S. coelicolor* (Sola-Landa y col., 2005); *S. natalensis* (Mendes y col., 2007) y *S. clavuligerus* (Salehghamari y col., 2013). En este género, *phoR* y *phoP* se encuentran agrupados con *phoU* (que también participa en la cascada de activación en *S. lividans*; Ghorbel y col., 2006), y con otros genes que podrían estar implicados en el estrés oxidativo (Darbon y col., 2012). Cabe destacar que, mientras que muchos reguladores de respuesta son fosforilados por quinasas sensoras de otros sistemas (lo que hace posible la integración de señales), PhoR parece ser específica de PhoP y su única quinasa (Fernández-Martínez y col., 2012).

Las cajas PHO de *S. coelicolor* están formadas por al menos dos DRu de 11 nt, de los cuales 7 están muy conservados (Sola-Landa y col., 2008). La secuencia consenso de la región más conservada presenta similitudes con la descrita en *B. subtilis* (Liu y Hulett, 1998). Las DRu se clasifican como C o E en función de que se encuentren formando el núcleo del operador o sean extensiones del núcleo, respectivamente. Según la estructura de DRu, los operadores se agrupan en tres clases (revisado en Martín y col., 2012b). La complejidad de los operadores (Sola-Landa y col., 2008) permite un control muy fino de la regulación de los genes; así algunos se reprimen, otros se activan, los que se activan lo hacen con diferente intensidad, etc. La represión de genes por PhoP en *S. coelicolor* responde a dos mecanismos diferentes: impedimento estérico de la transcripcional por el sitio de unión (p. ej., *afsS*; Santos-Beneit y col., 2009a). La identificación de cajas PHO en el promotor bidirecional *phoRP-phoU* indica que PhoP actúa como un autorregulador (Sola-Landa y col., 2005).

La respuesta a la escasez de Pi se puede dividir en dos fases fisiológicas: la respuesta primaria, que consiste en la inducción de enzimas extracelulares para captar Pi, la activación de transportadores y el almacenamiento del nutriente, y la respuesta secundaria, que engloba los procesos subsiguientes y afecta a la diferenciación morfológica y bioquímica (Rodríguez-García y col., 2007).

I.3.1.3. La respuesta primaria al agotamiento del fosfato

La respuesta inmediata al agotamiento del Pi comprende la estimulación de la captación de este nutriente, tanto de fuentes extracelulares como intracelulares. Entre las enzimas captadoras de Pi inducidas por la escasez, la fosfatasa alcalina es la más común en bacterias (Wanner, 1996). En *S. coelicolor* se ha demostrado la activación por PhoP de cuatro fosfatasas, entre ellas la fosfatasa alcalina codificada por *phoA* (Moura y col., 2001) y la fosfolipasa codificada por *phoD* (Sola-Landa y col., 2003; Apel y col., 2007). Otras enzimas activadas por PhoP son dos glicerofosfodiéster fosfodiesterasas (Rodríguez-García y col., 2007; Santos-Beneit y col., 2009b), una 5'-nucleotidasa (Rodríguez-García y col., 2007), una fitasa (Rodríguez-García y col., 2007; Sola-Landa y col., 2008) y dos transportadores de Pi: Pst (Sola-Landa y col., 2005) y PitH2 (Santos-Beneit y col., 2008). Las glicerofosfodiéster fosfodiesterasas en combinación con las fosfolipasas liberan Pi de los fosfolípidos; mientras que las fitasas lo liberan de las reservas de inositol-fosfato (fitatos) de plantas, que representan una gran proporción del fósforo orgánico del suelo (Rodríguez y Fraga, 1999).

La incorporación de Pi a las células de *S. coelicolor* se produce a través de dos tipos de sistemas principales: el de alta afinidad Pst y los sistemas de baja afinidad y alta velocidad de transporte PitH1 y PitH2 (del inglés <u>phosphate inorganic transport</u>) (Santos-Beneit y col., 2008). Ya que en *E. coli* la afinidad del sistema Pst por el Pi es 100 veces mayor que la del sistema Pit (Rosenberg y col., 1997), su utilización se asocia a condiciones de escasez y exceso de Pi, respectivamente.

Mientras que la transcripción de *pitH2* y del operón *pstSCAB* depende totalmente de PhoP, la de *pitH1* (que se transcribe bicistrónicamente con *pap*) es independiente (Santos-Beneit y col., 2008); por este motivo se considera que PitH1 actúa en condiciones de exceso de Pi, mientras que *pitH2* y *pst* se inducen en condiciones de escasez. En *E. coli* el sistema Pit transporta el Pi quelado con algún catión divalente, mientras que el sistema Pst lo transporta en forma monobásica o dibásica ($H_2PO_4^{-}/HPO_4^{2-}$) (van Veen y col., 1994; Russell y Rosenberg, 1979).

En *S. lividans*, especie genómicamente muy similar a *S. coelicolor*, se ha caracterizado la función de la enzima polifosfato quinasa (Ppk) en el almacenamiento del Pi incorporado en forma de polifosfatos. En la fase de desarrollo del micelio aéreo la Ppk, que es una enzima bifuncional, usaría las reservas de polifosfato para formar ATP (Chouayekh y Virolle, 2002).

Otra reserva posible de Pi son los ácidos teicoicos de la pared celular de las bacterias Gram positivas. En *B. subtilis*, en condiciones de escasez de Pi, los ácidos teicoicos se sustituyen por ácidos teicurónicos que no contienen Pi. Las agrupaciones biosintéticas de ácidos teicoicos y teicurónicos están reprimidas y activadas, respectivamente, por PhoP (Liu y col., 1998; Liu y Hulett, 1998). En *S. coelicolor* se han detectado genes activados por PhoP que podrían estar implicados en la síntesis de polímeros libres de Pi. En la agrupación SCO4872-SCO4882 existen varios promotores en los que se ha comprobado la unión de PhoP mediante EMSA, huella con ADNasa I y *chip-on-chip* (Rodríguez-García y col., 2007; Sola-Landa y col., 2008; Allenby y col., 2012). Otros muchos genes que codifican proteínas de función desconocida o no relacionada con el metabolismo del Pi intervienen también en la respuesta primaria a la escasez de Pi en *S. coelicolor* (Martín y col., 2012b). Por ejemplo, el agotamiento del Pi supone un cambio en el metabolismo energético dependiente de PhoP que se refleja en la regulación negativa de la respiración aeróbica en favor de la anaeróbica. Otros procesos que están afectados por el agotamiento del Pi son el transporte y biosíntesis de aminoácidos (p. ej., a través de la activación transcripcional dependiente de PhoP de *gluABCD*, que codifica un transportador de glutamato y de *ask*, que codifica una aspartoquinasa), el metabolismo de nucleótidos (p. ej., a través de la regulación negativa de genes del metabolismo de las purinas y las pirimidinas como *purE* o *pyrR*, respectivamente), la respuesta al estrés oxidativo (p. ej., a través de la activación transcripcional indirecta por PhoP de *catA*, que codifica una catalasa) o la detoxificación del hierro (p. ej., a través de la activación dependiente de PhoP de *bfr*, que codifica una bacterioferritina). La regulación positiva de genes relacionados con la excreción de hierro y la regulación negativa de genes relacionados con su captación se ha interpretado como una prevención de la formación de especies reactivas de oxígeno, ya que este elemento actúa como catalizador en dichas reacciones (Rodríguez-García y col., 2007).

Además de a la utilización del hierro, la respuesta primaria al agotamiento del Pi también afecta a la utilización de otros nutrientes: PhoP reduce la expresión de genes implicados en la utilización de nitrógeno (Rodríguez-García y col., 2007; 2009). Entre ellos se encuentran *glnA* y *glnII*, que codifican glutamina sintetasas, (Wray y Fisher, 1988; Weisschuh y col., 2000); *amtB*, que codifica un transportador de amonio, (Fink y col., 2002) y *glnR*, que codifica el principal regulador transcripcional del nitrógeno (Fink y col., 2002). En *S. coelicolor* PhoP regula la transcripción de *glnA* y *amtB* no solo mediante unión directa a su promotor sino también mediante competición por la unión con GlnR (Sola-Landa y col., 2013). El control del Pi sobre el nitrógeno es un fenómeno conservado en otros microorganismos como *E. coli* (VanBogelen y col., 1998) o *Shinorhizobium meliloti* (Krol y Becker, 2004) y permite mantener el equilibrio celular entre ambos elementos.

En resumen, la respuesta al agotamiento del Pi mediada por PhoP se extiende a genes implicados en funciones diversas y, en muchos casos, independientes del metabolismo del Pi, por lo que el regulón *pho* parece tener una función mucho más general que la de mantener la homeostasis de este nutriente.

I.3.1.4. La respuesta secundaria al agotamiento de fosfato

Antes de describir la regulación ejercida por PhoP sobre la diferenciación morfológica y bioquímica en *Streptomyces*, cabe destacar que el efecto sobre la producción de metabolitos secundarios es dependiente del medio de cultivo empleado. En medios complejos la producción de antibióticos aumenta en mutantes en *phoP* de *S. lividans*, *S. natalensis* y *S. coelicolor* (Sola-Landa y col., 2003; Mendes y col., 2007; Fernández-Martínez y col., 2012); sin embargo, en medios definidos con almidón el efecto sobre la producción en *S. coelicolor* es el opuesto (Santos-Beneit y col., 2009a).

El efecto del agotamiento del Pi sobre la diferenciación morfológica y el metabolismo secundario en *S. coelicolor* se ha abordado en los estudios transcriptómicos de Rodríguez-García y col. (2007) y Allenby y col. (2012). Los resultados de este último trabajo corroboran los obtenidos por Rodríguez-García y col. (2007) e identifican nuevos componentes del

regulón, además de presentar a PhoP como un represor transcripcional en la mayoría de los casos.

Respecto a la diferenciación morfológica, PhoP reprime genes implicados en dicho proceso como son *wblA*, *wblC* (Rodríguez-García y col., 2007), *bldA*, *bldC*, *bldD*, *bldK* y *bldM* (Allenby y col., 2012). El bloqueo de la diferenciación morfológica da la oportunidad de proseguir con el crecimiento en caso de captar Pi del medio.

Respecto a la producción de metabolitos secundarios, su producción aumenta en medios complejos en los mutantes en *phoP* de *S. lividans, S. natalensis* y *S. coelicolor* (Sola-Landa y col., 2003; Mendes y col., 2007; Fernández-Martínez y col., 2012). Sin embargo, no existen evidencias de una unión directa de PhoP a los promotores de los reguladores específicos de ruta de las agrupaciones de antibióticos pigmentados en *S. coelicolor* (Martín, 2004; Sola-Landa y col., 2005; Rodríguez-García y col., 2007; Allenby y col., 2012). El único caso conocido de regulación directa de un regulador específico de ruta por PhoP es la represión de *cdaR* (Allenby y col., 2012), que codifica el activador transcripcional de la agrupación de biosíntesis de CDA (Hopwood y Wright, 1983; Hojati y col., 2002). Cabe destacar que la influencia ejercida por PhoP con respecto a la producción también varía entre antibióticos de una misma especie: en *S. coelicolor* la producción de actinorrodina en medio MG parece correlacionarse completamente con la respuesta de PhoP a la escasez de Pi; mientras que en la producción de undecilprodigiosina no solo influye PhoP sino también la concentración de Pi en el medio, lo que indica que al menos otro mecanismo de control por Pi diferente interviene (Santos-Beneit y col., 2009a).

El efecto negativo de PhoP sobre la producción de antibióticos en S. coelicolor se produce a través de genes que codifican reguladores globales como son afsS (Santos-Beneit y col., 2009a; 2011b), atrA, bldA o scbR-scbA (Allenby y col., 2012). El de afsS fue el primer ejemplo de un mecanismo molecular que "encadena" el regulón pho con la biosíntesis de metabolitos secundarios, en el que PhoP actúa como activador transcripcional de afsS. Además, los sistemas PhoR-PhoP y AfsR-AfsS tienen una regulación cruzada: AfsS tiene un efecto global positivo sobre la transcripción de genes pho (Lian y col., 2008) y AfsR reprime los genes phoRP y pstS por unión directa a sus promotores (Santos-Beneit y col., 2009a). Como se describió en el apartado I.2.3.3 (pág. 37), AtrA actúa como activador transcripcional de actII-orf4 y BldA es un ARNt implicado en la traducción de codones UUA, que se encuentran en los ARNm de muchos reguladores específicos de agrupaciones de metabolitos secundarios. ScbA está implicado en la producción de butirolactonas que estimulan la producción de antibióticos (Takano y col., 2001; D'Alia y col., 2011), por lo que el aumento de la expresión de scbA explicaría, al menos en parte, el incremento de la producción de antibióticos pigmentados en los mutantes en phoP. Los genes scbR-scbA se sitúan adyacentes a la agrupación cpk, que es responsable de la síntesis de un policétido críptico y cuyo regulador principal es cpkO (Pawlik y col., 2007). ScbR reprime la transcripción de cpkO, aunque dicha regulación se pierde en presencia de butirolactonas. Otra diana regulada negativamente por PhoP es metK, que codifica una sintetasa de S-adenosilmetionina (Butler y col., 2001a). Su expresión aumenta en los mutantes en phoP, lo que también contribuiría al aumento de la producción de antibióticos.

I.3.2. Regulación por catabolito de carbono

I.3.2.1. Definición de la regulación por catabolito de carbono

Mientras que en la regulación por Pi la variable principal es la concentración existente en el medio, la regulación por catabolito de carbono implica, además, la naturaleza de la/s fuente/s. La mayoría de las bacterias pueden utilizar diversos compuestos como fuente de carbono y estos pueden ser metabolizados simultáneamente o de modo secuencial. En este último caso se utilizan en primer lugar aquellos que se asimilan más fácilmente y que permiten un crecimiento más rápido. El ejemplo inicial fue el crecimiento diáuxico de E. coli en presencia de glucosa y lactosa, observado por primera vez por Jacques Monod (Monod, 1942). Este mecanismo se conoce como represión por catabolito de carbono (abreviado CCR, del inglés <u>Carbon Catabolite Repression</u>; Magasanik, 1961) y se define actualmente como "un fenómeno regulador por el cual la expresión de funciones para la utilización de fuentes de carbono secundarias y la actividad de las enzimas correspondientes se reducen en presencia de fuentes de carbono preferidas" (Görke y Stülke, 2008). Normalmente, la glucosa es el efector principal de este tipo de regulación, pero no siempre ocurre así: por ejemplo, en Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium longum y Pseudomonas aeruginosa, la glucosa es una fuente de carbono secundaria, fenómeno conocido como CCR reversa (van den Bogaard y col., 2000; Parche y col., 2006; Collier y col., 1996). Cabe destacar que, aunque es un fenómeno extendido, no es un mecanismo universal. Hay bacterias patógenas como Chlamydia trachomatis que carecen de este mecanismo (Nicholson y col., 2004). Otro ejemplo es Corynebacterium glutamicum, microorganismo en el que la glucosa se metaboliza simultáneamente con otras fuentes de carbono como, por ejemplo, acetato o citrato (Wendisch y col., 2000; Brocker y col., 2009). Puesto que la producción de metabolitos secundarios está asociada a bajas tasas de crecimiento, en presencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables, poco o nada de antibiótico se sintetiza: "demasiado de algo bueno, puede ser malo" (Demain, 1989). Este fenómeno, que permite adaptarse a los ambientes nutricionales cambiantes, supone un cuello de botella en las fermentaciones industriales que combinan varias fuentes de carbono, además de complicar los procesos de purificación subsiguientes (Vinuselvi y col., 2012). Además, es un fenómeno relacionado con la patogenicidad de muchas bacterias, ya que la expresión de los genes de virulencia depende de elementos relacionados con la regulación por catabolito de carbono (revisado en Görke y Stülke, 2008).

La CCR opera mediante mecanismos bioquímicos, mediante la inhibición de enzimas o a través de la afinidad diferencial de los transportadores por ciertos azúcares. En *Zymomonas mobilis* encontramos ejemplos de ambos mecanismos que se traducen en la utilización preferencial de la glucosa en presencia de fructosa: por un lado la glucosa inhibe enzimáticamente la fructoquinasa, necesaria para la metabolización de la fructosa (Scopes y col., 1985); por otro lado, el transportador Glf, que es común para la glucosa y la fructosa, incorpora glucosa de forma preferente (Weisser y col., 1995; Parker y col., 1997). La CCR también opera a través de la regulación transcripcional, en la que participan tanto reguladores globales como específicos (ver más adelante). Se han descrito también mecanismos postranscripcionales que implican la acción de ARN pequeños (ver más adelante).

Los organismos modelo donde mejor y más en profundidad se ha estudiado la regulación por catabolito de carbono son E. coli y B. subtilis. Tanto en uno como en otro el sistema PTS desempeña un papel fundamental en la CCR. Se trata de un sistema de transporte de azúcares que son fosforilados en el interior celular, utilizando fosfoenolpiruvato como fuente de grupos Pi (Postma y col., 1993). Está formado por dos tipos de enzimas: las enzimas comunes EI y HPr, citoplasmáticas, y la permeasa específica de sustrato (EII). El componente EII presenta al menos tres dominios (EIIA, EIIB y EIIC) y en ocasiones un cuarto (EIID). Mientras que los dominios EIIA y EIIB son hidrofílicos, los dominios EIIC y EIID están unidos a la membrana. Dichos dominios pueden estar fusionados en una misma cadena polipeptídica o presentarse en cadenas independientes que interactúan. La cascada de fosforilación se inicia con la enzima El, que transfiere el grupo fosfato desde el fosfoenolpiruvato a HPr; HPr lo transfiere a EIIA, que lo utiliza para fosforilar el dominio intracelular de la permeasa EII (EIIB); y, finalmente, EIIB lo transfiere al azúcar transportado por medio de EIIC. Aunque cabría esperar que la misión principal del sistema PTS fuese el transporte de azúcares y que su papel regulador haya aparecido posteriormente en la historia evolutiva, los estudios comparativos sugieren lo contrario (Cases y col., 2007).

A continuación se describen de forma comparativa los modelos de *E. coli* y *B. subtilis,* en los que participan reguladores globales, y, finalmente, los diversos mecanismos implicados en *Streptomyces*.

I.3.2.2. Modelos de regulación por catabolito de carbono: Escherichia coli

En *E. coli*, la enzima II específica de glucosa, EIIA^{GIC}, tiene un papel regulador fundamental (ver figura 1.8): en su forma no fosforilada (es decir, en presencia de sustratos PTS, ya que el grupo Pi se transfiere continuamente al azúcar transportado) interviene en mecanismos de exclusión de inductor (*inducer exclusion*). Se denominan así porque el resultado final es la exclusión de otros sustratos inductores de operones de utilización de carbohidratos alternativos. Por ejemplo, inactiva alostéricamente la enzima glicerol quinasa (GlpK) y bloquea permeasas de lactosa, maltosa, melibiosa o rafinosa (revisado en Brückner y Titgemeyer, 2002). De esta manera, en presencia de sustratos PTS se inhibe el transporte de otras fuentes de carbono alternativas.

En su forma fosforilada (es decir, en ausencia de sustratos PTS, ya que el grupo Pi no se transfiere) ejerce una regulación transcripcional a través de la activación de la enzima adenilato ciclasa, que genera AMPc. El AMPc forma un complejo con el regulador global CRP (del inglés <u>cyclic AMP receptor protein</u>) que se une a ciertos promotores y activa su transcripción. Estos promotores suelen ser débiles y deben ser activados para poder unir la ARN polimerasa o para formar el complejo transcripcional (Malan y col., 1984; Tagami y Aiba, 1998; Busby y Ebright, 1999). En *E. coli*, el gen que codifica la EIIA^{Gic} se denomina *crr* (del inglés <u>carbon catabolite resistance</u>), ya que los mutantes en este gen son resistentes al mecanismo de CCR (Castro y col., 1976). Se puede considerar que la CCR ejercida por el complejo CRP-AMPc en este microorganismo se basa fundamentalmente en una activación de la transcripción, mientras que en *B. subtilis*, como se verá más adelante, la regulación ejercida por CcpA es mucho más compleja. El complejo CRP-AMPc también interviene en la regulación postranscripcional: reprime el gen *spf*, que codifica el ARN pequeño Spot 42. Este ARN, que es abundante en presencia de glucosa, interacciona con el transcrito de *galK* (que

codifica una galactoquinasa) y suprime así la expresión del operón de galactosa (Beisel y Storz, 2011).



Figura 1.8. Represión por catabolito de carbono en *E. coli*. En ausencia de sustratos PTS (glucosa en el ejemplo) predomina la forma fosforilada de EIIA^{Glc}, que activa la adenilato ciclasa (AC). El AMPc formado por la actividad de la AC forma un complejo con la proteína CRP que es capaz de activar la transcripción de genes que intervienen en el catabolismo de otras fuentes de carbono alternativas. En presencia de sustratos PTS predomina la forma no fosforilada de EIIA^{Glc}, que es capaz de inactivar enzimas metabólicas (p. ej., GlpK) y transportadores (p. ej., LacY) de fuentes de carbono alternativas. HPr también contribuye a la CCR: en ausencia de sustratos PTS predomina la forma fosforilada de HPr, que fosforila a BglG. BglG-P actúa como antiterminador de la transcripción del operón *bgl* de utilización de β -glucósido y así permite su transcripción. Un factor desconocido (factor X) se requiere para la activación de la adenilato ciclasa. Glu: glucosa; Glu-6-P: glucosa-6-fosfato. Modificado de Görke y Stülke (2008).

Puesto que la presencia de cualquier sustrato transportado por el sistema PTS favorece el estado no fosforilado de EIIA^{GIC} (ya que se estimula el flujo de grupos Pi hacia el azúcar transportado) ésta interviene en la CCR ejercida por otros sustratos diferentes a parte de glucosa. Además, EIIA^{GIC} también interviene en la CCR de sustratos que ni siquiera son transportados por el sistema PTS: en presencia de glucosa-6-fosfato se produce una desfosforilación de EIIA^{GIC} y la inactivación del transporte de lactosa (Hogema y col., 1998a). En este caso se demostró una gran correlación entre el estado de fosforilación de EIIA^{GIC} y la proporción fosfoenolpiruvato/piruvato en la célula (Hogema y col., 1998b), la cual disminuye cuando el flujo glucolítico es intenso (Bettenbrock y col., 2007).

Los niveles de AMPc no se correlacionan con los de EIIA^{GIC} fosforilada, como cabría esperar, lo que cuestiona que el modelo regulador sea tan simple (Hogema y col., 1998b). De hecho, el papel regulador del AMPc no se limita a la formación del complejo CRP-AMPc, sino que estudios recientes indican que coordina la expresión génica en función de las necesidades metabólicas, asegurando la producción de proteínas necesarias en cada ambiente nutricional (You y col., 2013).

I.3.2.3. Modelos de regulación por catabolito de carbono: Bacillus subtilis

En B. subtilis el sistema PTS cuenta con una proteína bifuncional, la quinasa/fosfatasa de HPr (HPrK/P), que, en presencia de metabolitos de la glucólisis (principalmente fructosa-1,6-bifosfato y glucosa-6-fosfato; Seidel y col., 2005; Schumacher y col., 2007), actúa como quinasa y fosforila a HPr en el residuo Ser46 (ver figura 1.9). HPr(Ser46)-P interacciona con el regulador pleiotrópico CcpA (Deutscher y col., 1995). El complejo formado se une a secuencias cre (del inglés catabolite-responsive elements; Miwa y col., 2000), cuya localización respecto del gen determina si el efecto sobre la transcripción es de activación, represión o terminación (revisado en Fujita, 2009). De esta manera, el estado nutricional se refleja en los niveles de intermediarios glucolíticos y se traduce en la formación de complejos reguladores de la transcripción. La fructosa-1,6-bifosfato es la molécula señal de la regulación por catabolito de carbono en Bacillus. La mayoría de genes regulados por CcpA están regulados negativamente. Algunos ejemplos están relacionados con la utilización de fuentes de carbono alternativas o con el ciclo TCA (Fujita y Miwa, 1994; Kraus y col., 1994; Kim y col., 2002). Entre los regulados positivamente destacan algunos genes relacionados con la excreción del exceso de carbono en forma de acetato (p. ej., ackA, que codifica una acetato quinasa; Grundy y col., 1993) o la glucólisis (p. ej., gapA, que codifica una deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato; Ludwig y col., 2002).

En situaciones de pobreza nutricional, como, por ejemplo, de escasez de Pi o de bajos niveles de ATP, prevalece la actividad fosforilasa de HPrK y por lo tanto, la forma no fosforilada de HPr (Kravanja y col., 1999; Mijakovic y col., 2002). HPr presenta un segundo residuo de fosforilación, His15, que recibe el grupo Pi del componente El y que es el que participa en su transferencia durante el transporte de sustratos PTS (Gassner y col., 1977). HPr(His15-P) también participa en la CCR, pero de manera independiente de CcpA: es capaz de fosforilar y, por tanto, activar a GlpK (Darbon y col., 2002) y a ciertos activadores transcripcionales que contienen dominios PRD (del inglés <u>PTS-r</u>egulatory <u>domains</u>) y que son responsables de la activación de sistemas PTS de sustratos alternativos. Por ejemplo, LicR activa el operón de transporte y degradación de β -glucósidos oligoméricos *licBCAH* y MtIR activa el transportador de manitol codificado por *mtlAF* (Tobisch y col., 1999; Joyet y col., 2010). La posibilidad de fosforilar HPr en dos residuos distintos facilita su papel dual en la CCR y en el transporte de sustratos: HPr(Ser46-P) interviene en la CCR mediada por CcpA, mientras que HPr(His15-P) interviene en el transporte y en la CCR independiente de CcpA.



Figura 1.9. Represión por catabolito de carbono en *B. subtilis* y firmicutes. La presencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables se refleja en elevadas concentraciones intracelulares de fructosa-1,6-bifosfato y ATP. En esta situación HPrK fosforila a HPr en el residuo Ser46. HPr(Ser46-P) interacciona con CcpA formando un complejo que se une a secuencias *cre* y que reprime la transcripción de genes catabólicos. La interacción entre HPr(Ser46-P) y CcpA se estimula en presencia de fructosa-1,6-bifosfato y glucosa-6-fosfato. En presencia de fuentes de carbono secundarias, que se traduce en bajos niveles de fructosa-1,6-bifosfato y de ATP, o de elevadas concentraciones de Pi en la célula, HprK desfosforila a HPr. La forma de HPr fosforilada en el residuo His15 también contribuye a la CCR: en ausencia de glucosa HPr(His15-P) fosforila la glicerol quinasa GlpK y a reguladores transcripcionales que contienen dominios PRD, lo que es necesario para su activación. Por lo tanto, en presencia de glucosa no se produce activación de la quinasa de glicerol ni activación transcripcional de operones catabólicos de otras fuentes de carbono alternativas. Glu: glucosa; Glu-6-P: glucosa-6-fosfato; FBP: fructosa-1,6-bifosfato. Modificado de Görke y Stülke (2008).

En *B. subtilis* existe una proteína adicional homóloga a HPr capaz de interaccionar con CcpA: Crh; sin embargo, su implicación en la CCR ha sido cuestionada ya que se expresa poco, su afinidad por CcpA es menor que la de HPr y la formación del complejo no se induce por intermediarios glucolíticos (Görke y col., 2004; Schumacher y col., 2006; Seidel y col., 2005). Algunos estudios indican que podría tener una función reguladora específica para el crecimiento sobre sustratos de tipo no carbohidrato como el succinato o el glutamato (Warner y Lolkema, 2003).

I.3.2.4. Otros reguladores que intervienen en la CCR

La CCR es un mecanismo complejo y no se reduce a lo descrito anteriormente: existen otros reguladores pleiotrópicos que intervienen, como, por ejemplo, Cra y Mlc en *E. coli*. Cra (antes FruR) reprime el operón PTS de fructosa y activa genes de la gluconeogénesis, del ciclo TCA y de la vía del glioxilato (Saier y Ramseier, 1996). Mlc regula a *malT* (que codifica el activador del regulón de la maltosa) y a permeasas PTS específicas de glucosa y manosa entre otros (Plumbridge y col., 2001). En *B. subtilis,* CcpB controla los

operones de gluconato y xilosa (Chauvaux y col., 1998); CcpC controla genes del ciclo TCA (Jourlin-Castelli y col., 2000) y CcpN regula genes de la gluconeogénesis (Servant y col., 2005). También otras proteínas del sistema PTS pueden intervenir en la CCR: por ejemplo, en *E. coli* EIIBC no fosforilado captura el represor Mlc de sus dianas, lo que favorece la transcripción de genes del metabolismo de la glucosa (Nam y col., 2001) y HPr-P fosforila el antiterminador BglG, que controla la expresión de los genes de utilización de β-glucósidos (Görke y Rak, 1999). Además, numerosas bacterias poseen activadores transcripcionales y antiterminadores con dominios PRD que pueden ser fosforilados por enzimas del sistema PTS, tanto generales (EI, HPr) como específicas de carbohidrato (EIIA, EIIB) (revisado en Joyet y col., 2013). Por ejemplo, en *B. subtilis* el antiterminador LicT regula la expresión del operón *bgIPH* implicado en la utilización de β-glucósidos. Contiene dos dominios PRD cuyo estado de fosforilación depende de las fuentes de carbono presentes en el medio (Lindner y col., 1999).

I.3.3. Regulación por catabolito de carbono en Streptomyces

Como se indicó anteriormente, en *Streptomyces* existe más de un sistema implicado en la regulación por catabolito de carbono: el sistema PTS interviene en la regulación ejercida por la fructosa y la N-acetilglucosamina, pero no por la glucosa, en la que toman parte varias proteínas como la glucosa quinasa, el producto de SCO2127 o Rok7B7.

I.3.3.1. El sistema PTS y la regulación por fructosa y N-acetilglucosamina

En *S. coelicolor* existen varias agrupaciones génicas que codifican componentes de transportadores PTS, de las cuales dos se han caracterizado en detalle y son responsables del transporte de D-fructosa y de N-acetilglucosamina, el monómero de la quitina (Titgemeyer y col., 1995; Butler M. J. y col., 1999; Parche y col., 1999; Nothaft y col., 2003a; 2003b). La primera prueba de que existe una correlación directa entre el sistema PTS y el control del desarrollo en *Streptomyces* es el fenotipo calvo (*bld*) de los mutantes de *S. coelicolor* en los genes *ptsH*, *ptsI* y *crr*, que codifican las fosfotransferasas generales HPr, El y EIIA^{Crr}, respectivamente (Nothaft y col., 2003a; Rigali y col., 2006). EIIA^{Crr} es la proteína homóloga de EIIA^{Glc} de *E. coli*.

El sistema PTS de transporte de N-acetilglucosamina está formado por El (*ptsl*), HPr (*ptsH*), IIA^{Crr} (*crr*) y los componentes específicos IIB (*nagF*) y IIC (*nagE2*) (Nothaft y col., 2010). En *S. coelicolor, ptsl* y *crr* forman un operón y *nagF* y *nagE2* se encuentran agrupados junto con *nagE1*, que no es capaz de transportar N-acetilglucosamina (Nothaft y col., 2003a; 2010). El efecto regulador de la N-acetilglucosamina depende de la composición del medio. En condiciones de escasez nutricional (medio mínimo) estimula la diferenciación morfológica y la producción de antibióticos, mientras que en abundancia (medio R2YE) lo bloquea (Rigali y col., 2006; 2008). Las concentraciones elevadas de N-acetilglucosamina (especialmente por encima de 20 mM, 0.5 % p/v), evitan que el sistema PTS transfiera grupos Pi a reguladores del desarrollo como WhiG o algún componente Bld (Rigali y col., 2006).

El mecanismo regulador a través del cual la N-acetilglucosamina estimula el desarrollo y el metabolismo secundario en condiciones de escasez nutricional es el siguiente (ver figura 1.10): la glucosamina-6-fosfato, producto del metabolismo de la N-acetilglucosamina, actúa como regulador alostérico del represor DasR. En presencia de

glucosamina-6-fosfato DasR reduce su afinidad por las secuencias *dre* y se disocia del ADN (Rigali y col., 2006; 2008). De este modo se activa la transcripción de genes del sistema PTS de N-acetilglucosamina y de los reguladores positivos de las agrupaciones de actinorrodina y undecilprodigiosina *actII-orf4* y *redZ*, entre otros (Nothaft y col., 2010; Rigali y col., 2008). Por otro lado, en condiciones de escasez nutricional la presencia de N-acetilglucosamina estimula su propio transporte y la producción de metabolitos secundarios. Por el contrario, el mecanismo regulador que actúa en condiciones de riqueza nutricional no se conoce actualmente (Swiatek y col., 2012a).

Según Nothaft y col. (2010), el papel pleiotrópico de la N-acetilglucosamina sobre el desarrollo y la producción de actinorrodina en *S. coelicolor* se entiende si consideramos que en la naturaleza las fuentes de N-acetilglucosamina son la pared celular bacteriana y la quitina. El origen de la N-acetilglucosamina se ve reflejado en su modo de transporte (ver figura 1.10): mientras que la pared celular genera directamente N-acetilglucosamina que es transportada por el sistema PTS, la quitina genera principalmente quitoologosacáridos como la quitobiosa, que utiliza otro sistema de transporte (DasABC; Saito y col., 2007). De esta manera el transporte de N-acetilglucosamina procedente de la pared bacteriana indica muerte celular, mientras que el transporte de N-acetilglucosamina procedente de la quitina indica presencia de exoesqueletos de artrópodos, lo que se interpreta como condiciones de escasez y abundancia nutricional, respectivamente.



Figura 1.10. Esquema del regulón DasR y su implicación en la regulación de antibióticos en *S. coelicolor*. NagA, NagB y NagK son enzimas que intervienen en el metabolismo de la N-acetilglucosamina (GlcNAc); Chi representa un sistema quitinolítico; Das representa el transportador de quitobiosa de tipo ABC; ScbR es un receptor de butirolactonas; CpkO es un regulador de la agrupación *cpk*, que codifica genes para la biosíntesis de un policétido críptico; CdaR, ActII-4 (ActII-orf4) y RedZ son reguladores específicos de ruta de las agrupaciones de biosíntesis de CDA, actinorrodina y undecilprodigiosina, respectivamente. (GlcNAc)₂: quitobiosa; GlcNAc-6-P: N-acetilglucosamina-6-fosfato; GlcN-6-P: glucosamina-6-fosfato. La unión de DasR a *actII-orf4* y *redZ* se ha comprobado experimentalmente, mientras que la unión a *scbR* y *cdaR* es especulativa. Modificado de van Wezel y McDowall (2011).

El sistema PTS no interviene en la represión por glucosa de las enzimas agarasa o galactoquinasa (Butler M. J. y col., 1999), por lo que existe al menos un mecanismo de represión adicional. El hecho de que la glucosa se transporte mediante una permeasa específica (GlcP) explicaría que el sistema PTS no esté implicado en este caso (van Wezel y col., 2005).

I.3.3.2. Regulación por glucosa

• Papel de la glucosa quinasa

La glucosa quinasa (EC 2.7.1.2), en adelante abreviada Glk, cataliza el primer paso de la glucólisis, que consiste en la fosforilación de la glucosa para obtener glucosa-6-fosfato. El descubrimiento de mutantes de S. coelicolor resistentes al análogo no metabolizable de la glucosa 2-desoxiglucosa (fenotipo Dog^R) que pueden utilizar glicerol, arabinosa, galactosa y fructosa en presencia de glucosa (Hodgson, 1982) apuntó hacia la glucosa quinasa codificada por SCO2126 (glkA) como efector principal de la represión. El hecho de que la complementación de estos mutantes con la glucosa quinasa de Z. mobilis restaure la actividad enzimática y la sensibilidad a 2-desoxiglucosa pero no la CCR por glucosa (Angell y col., 1994) indica que el papel de Glk no se ejerce a través de su actividad enzimática, sino a través de su estructura física. Del mismo modo, cuando se complementan mutantes de S. lividans con el gen glkA de S. coelicolor, la represión por glucosa de la quitinasa solo se recupera parcialmente (Saito y col., 1998), lo que refuerza la hipótesis de un papel físico de Glk. Por otro lado, Glk no solo participa en la CCR por glucosa, sino también por fuentes de carbono que no requieren de su actividad enzimática para ser metabolizadas: por ejemplo, el glicerol no causa CCR de la agarasa en mutantes en glkA mientras que si lo hace en la cepa silvestre (Kwakman y Postma, 1994).

Glk no presenta dominios de unión a ADN, por lo que no puede controlar de forma directa la transcripción, así que se propuso una interacción con factores transcripcionales (Angell y col., 1992). Se trató de probar dicha interacción con los reguladores MalR, GylR y BldB mediante diversos métodos pero no se obtuvieron resultados positivos (Mahr y col., 2000). Hasta el momento, la única interacción apuntada es la de Glk con la permeasa GlcP (van Wezel y col., 2007). En cultivos en medio mineral con glucosa existe Glk en la fracción asociada a la membrana, mientras que en cultivos con glicerol toda la Glk se encuentra en la fracción citoplasmática. Además, la sobreexpresión de GlcP incrementa la presencia de Glk en la fracción asociada a la membrana. GlcP está codificada por dos genes de idéntico producto, SCO5578 (*glcP1*) y SCO7153 (*glcP2*). Es *glcP1* el principal responsable de la actividad glucosa permeasa, ya que la deleción de *glcP2* no afecta prácticamente al crecimiento en glucosa y su transcripción es apenas detectable (van Wezel y col., 2005).

Debido a la ausencia de interacciones de Glk con reguladores transcripcionales se ha sugerido una posible activación postraduccional de la enzima en presencia de intermediarios fosforilados de la glucólisis que le permita ejercer su papel regulador (ver figura 1.11). Esta hipótesis se propuso a raíz de la observación de que la presencia de fosfoenolpiruvato y fructosa-1,6-bifosfato en el medio de cultivo de *S. peucetius* var. *caesius* reduce la producción de antraciclina en más de un 50 % tanto en la cepa silvestre como en cepas

resistentes a CCR. Las cepas resistentes a CCR se seleccionan por su capacidad de crecer en presencia de 2-desoxiglucosa, lo que resulta en un defecto parcial o completo de actividad Glk (Ramos y col., 2004). Además, en *S. fradiae* la producción de tilosina se ve afectada solo por análogos de la glucosa que tras internalizarse pueden ser fosforilados (la 2-desoxiglucosa), pero no por aquellos que tras internalizarse no se fosforilan (la 3-O-metilglucosa), lo que indica que la fosforilación de la glucosa es un requisito necesario para la CCR (Madry y col., 1979; Demain, 1989). En consonancia con la hipótesis de una regulación postranscripcional se han identificado isoformas de la Glk en cultivos de *S. coelicolor* en medio mínimo con glucosa, especialmente en las fases media y tardía de crecimiento, aunque se desconoce la naturaleza de dichas modificaciones (van Wezel y col., 2007).



Figura 1.11. Modelo de funcionamiento de Glk y papel estimulatorio de SCO2127 en *Streptomyces*. Los metabolitos generados en el catabolismo de la glucosa y otras fuentes de carbono desencadenan una modificación postraduccional de Glk de forma directa o indirecta (Glk*). Glk* interaccionaría con factores de transcripción (FT) para ejercer la CCR. CHP: permeasas específicas de carbohidrato. Modificado de Ruiz y col. (2010) y van Wezel y col. (2007).

La importancia de la Glk en la CCR de *Streptomyces* ha llevado a la realización de un estudio proteómico para diferenciar los mecanismos reguladores dependientes e independientes de Glk (Gubbens y col., 2012). Dentro de los genes que responden a glucosa de modo independiente de Glk podría tener un papel importante SCO2494, que codifica una piruvato diquinasa (PPDK), debido a la importancia de la reacción que cataliza (forma fosfoenolpiruvato a partir de piruvato) y a la intensidad de su represión.

Papel de SCO2127

SCO2127 se sitúa en posición anterior al gen de la glucosa quinasa *glkA* y codifica un producto cuya función es aún desconocida. Se expresa principalmente durante la fase de

crecimiento logarítmica en medios con glucosa y su concentración proteica se correlaciona con la disponibilidad de glucosa (Chávez y col., 2009). La complementación de los mutantes de S. coelicolor resistentes a CCR con su propio gen glkA restaura solo en parte la CCR (Ikeda y col., 1984; Angell y col., 1992). La restauración completa del fenotipo sensible a CCR requiere la introducción conjunta de *qlkA* y SCO2127 (Angell y col., 1992). Además, la complementación con solo SCO2127 es suficiente para revertir el fenotipo resistente a 2-desoxiglucosa en S. peucetius var. caesius (Guzmán y col., 2005a; 2005b). El incremento de la cantidad de ARNm de glkA en mutantes de S. peucetius var. caesius resistentes a CCR transformados con SCO2127 con respecto a la cepa silvestre y a la cepa mutante sin transformar indica que el producto de SCO2127 podría estimular la transcripción de *qlkA* (ver figura 1.11) aunque no se ha propuesto ningún mecanismo concreto (Guzmán y col., 2005a). El mismo grupo de investigación sugiere que SCO2127 podría estimular también la transcripción de glcP o incluso mediar la interacción entre Glk y GlcP (Chávez y col., 2009). Chávez y col. (2011) han demostrado que el producto de SCO2127 se une a la permeasa BldKB (SCO5113) y al producto de SCO2582, que codifica una proteína hipotética con un dominio metaloproteasa; sin embargo, no han detectado ninguna interacción con Glk o GlcP. La relación entre Glk y BldKB es muy interesante ya que se considera que la señal que desencadena la diferenciación morfológica es un oligopéptido transportado por el sistema BldK (Nodwell y Losick, 1998).

• Papel de Rok7B7

Las proteínas de la familia ROK, que engloba represores transcripcionales, quinasas de azúcares y otras proteínas hipotéticas aún no caracterizadas (Titgemeyer y col., 1994), pueden ejercer un papel regulador al interaccionar con factores de transcripción. *S. coelicolor* presenta 25 genes de la familia ROK (Bentley y col., 2002), de los cuales dos de ellos, *glkA* y SCO6008 (Rok7B7), intervienen en la CCR. Rok7B7 actúa como regulador transcripcional negativo del promotor de *redD* (Park S. S. y col., 2009). Por el contrario, su homólogo *rep*, que procede de una librería metagenómica, acelera la esporulación y aumenta la producción de antibióticos cuando se introduce en *S. lividans* (Martínez y col., 2005).

Los mutantes en *rok7B7* pierden la CCR de la agarasa, lo que implica a este regulador directamente en la regulación por catabolito de carbono (datos no publicados, indicados en Gubbens y col., 2012). También sobreexpresan la GlcP y el operón de xilosa *xyIFGH* (adyacente a *rok7B7* y que se considera regulado por el mismo). Además, subexpresan la PPDK, que como se indicó anteriormente, se ha relacionado con los mecanismos independientes de Glk (Gubbens y col. 2012). La glucosa induce la expresión de *rok7B7* y del operón *xyIFGH* de manera independiente de Glk (Gubbens y col., 2012).

DasR y Rok7B7 tienen efectos antagónicos: DasR reprime y Rok7B7 activa el sistema PTS de N-acetilglucosamina y la producción de actinorrodina en las mismas condiciones de crecimiento (van Wezel y McDowall, 2011).

Papel de SblA

SblA es una enzima bifuncional capaz de cortar y desfosforilar fosfolípidos cargados negativamente (fosfoinosítidos). En ausencia de *sblA, S. lividans* pierde la CCR por glucosa del gen que codifica la α -amilasa, lo que sugiere una participación directa de esta enzima en el proceso (Gagnat y col., 1999; Chouayekh y col., 2007). Ya que su actividad afecta a la composición de fosfolípidos de la membrana, se piensa que podría influir en la localización o actividad de las proteínas de membrana (van Wezel y McDowall, 2011).

• Mutantes bld

Como se indicó en el apartado I.2.3.3 (pág. 37) uno de los aspectos más interesantes de los mutantes *bld* es que el crecimiento en fuentes de carbono menos fáciles de asimilar, como el manitol, restaura parcialmente los defectos morfológicos y la producción de antibióticos (excepto en el caso de los mutantes en *bldB*).

I.3.4. Regulación cruzada carbono-fosfato

La interconexión entre mecanismos reguladores permite a los microorganismos aprovechar al máximo las condiciones ambientales. De la interacción carbono-fosfato existen varios ejemplos. En *E. coli,* el operón *ugp* (que codifica una glicerofosfodiéster fosfodiesterasa citosólica y un transportador ABC) presenta dos promotores, uno regulado por CRP-AMPc y otro por PhoB (Brzoska y Boos, 1988; Kasahara y col., 1991). En *B. subtilis,* CcpA actúa como represor de *phoPR* en condiciones de exceso de Pi y en presencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables (Blencke y col., 2003; Puri-Taneja y col., 2006). Se ha demostrado que CcpA se une directamente a la secuencia *cre* del promotor P_{A6} de *phoPR*, que es independiente de PhoP (Puri-Taneja y col., 2006). En *C. glutamicum,* el regulador transcripcional dependiente de AMPc GlxR activa la transcripción de *pstS* en condiciones de escasez de Pi de manera dependiente de la fuente de carbono (Panhorst y col., 2011).

Los estudios sobre la interacción del regulón pho con la regulación por fuentes de carbono en Streptomyces se limitan a los realizados por Díaz y col. (2005); Esteban y col. (2008) y Santos-Beneit y col. (2009b). En S. lividans, PstS se acumula extracelularmente en condiciones de escasez de Pi y en presencia de concentraciones elevadas de fructosa, galactosa o manosa, pero no de glucosa o fructosa y glucosa (Díaz y col., 2005). Dicha acumulación tampoco se produce en exceso de Pi (Díaz y col., 2005) y se sabe que solo participa activamente en el transporte de Pi la fracción de PstS anclada a la membrana (Esteban y col., 2008). En esta especie existe una transcripción basal de pstS independiente de PhoP de aproximadamente 1/10 de la actividad normal, ya que se detecta transcrito mediante RT-PCR en un mutante en phoP a las 60 horas de crecimiento en medio YE con fructosa al 5 % (Esteban y col., 2008). Se ha identificado una secuencia (ACTCACCCCGC) que se repite tres veces en el promotor de *pstS* de *S. coelicolor* y que además presenta ocho y seis repeticiones parcialmente conservadas en los promotores de S. lividans y S. coelicolor, respectivamente (Díaz y col., 2005). No se han encontrado secuencias de este tipo en los promotores de pstS de S. avermitilis y S. griseus (Díaz y col., 2005). La región que contiene dichas repeticiones podría actuar como sitio de unión para algún elemento de respuesta a

carbono ya que se ha comprobado que su deleción en *S. lividans* genera un aumento de la expresión del promotor de *pstS* (Esteban y col., 2008). Por el contrario, los resultados de Sola-Landa y col. (2005), Rodríguez-García y col. (2007) y Thomas y col. (2012) indican que la expresión del promotor de *pstS* en *S. coelicolor* depende de la activación por PhoP.

Otro ejemplo de regulación cruzada en este género son las glicerofosfodiéster fosfodiesterasas extracitoplasmáticas pertenecientes al regulón *pho* de *S. coelicolor, glpQ1* y *glpQ2*, que no solo se regulan por la concentración de Pi en el medio, sino por la concentración de diferentes fuentes de carbono (Santos-Beneit y col., 2009b), de manera equivalente a lo que ocurre en *E. coli*. La adición de maltosa reduce la actividad del promotor de *glpQ1* en un 45 %; mientras que la adición de glucosa, fructosa o glicerol duplica la actividad del promotor de *glpQ2* con respecto a la no adición o a la adición de maltosa. El efecto inductor de estos azúcares sobre el promotor de *glpQ2* no se produce en ausencia de PhoP.

Un ejemplo de regulación por Pi sobre el metabolismo del carbono en *S. coelicolor* es la regulación negativa de enzimas del catabolismo del glicógeno y de la glucólisis y la regulación positiva de algunas enzimas gluconeogénicas en un mutante en *phoP* (Thomas y col., 2012).

Como en el caso del nitrógeno, estos mecanismos reflejan una estrategia para mantener el balance entre nutrientes en el interior celular, de manera que el regulón *pho* no solo interviene en la adecuación del metabolismo en condiciones de escasez de Pi, sino también con respecto a la fuente de carbono.

I.4. Fosfofructoquinasas en Streptomyces

I.4.1. Introducción a las fosfofructoquinasas

I.4.1.1. Ubicación en la ruta glucolítica

Las fosfofructoquinasas (Pfk) catalizan el tercer paso de la ruta glucolítica (ver figura 1.12), es decir, la fosforilación de la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bifosfato, que continúa su metabolización a través de la glucólisis (Fothergill-Gilmore y Michels, 1993). Se encuentran distribuidas en los tres dominios de la vida y pueden utilizar como sustrato donador del grupo fosfato ATP (EC 2.7.1.11), pirofosfato (PPi) (EC 2.7.1.90) e incluso ADP (2.7.1.146). Este último caso está limitado a arqueas hipertermófilas (Ronimus y Morgan, 2001).

La importancia de estas enzimas radica en que, en la mayoría de organismos, son puntos de regulación del flujo glucolítico (Uyeda, 1979).



Figura 1.12. Glucólisis y ruta de las pentosas fosfato (PP). En púrpura se indican los metabolitos propios de la glucólisis, en azul los de la ruta PP y en caqui los metabolitos comunes.

I.4.1.2. Clasificación

Los análisis de secuencia de las Pfk conocidas han permitido clasificarlas en dos familias convergentes: la familia A y la superfamilia riboquinasa.

Las proteínas de la familia A se denominan PfkA (Wu y col., 1991). Esta familia incluye una amplia variedad de enzimas que está distribuida en los tres dominios de la vida. Entre ellas encontramos Pfk dependientes de ATP de eucariotas superiores, Pfk dependientes de ATP y PPi de bacterias, Pfk dependientes de PPi de plantas (Mertens y col., 1998; Michels y col., 1997) y la Pfk dependiente de PPi de la arquea *Thermoproteus tenax* (Siebers y col., 1998). Las Pfk de esta familia tienen un papel regulador en la ruta glucolítica (Ronimus y Morgan, 2001).

a) Las PfkA dependientes de ATP de eucariotas son normalmente homotetrámeros regulados por efectores como el citrato, la fructosa-2,6-bifosfato, la fructosa-1,6-bifosfato, el AMP, el ADP, el AMPc, el Pi, el fosfoenolpiruvato y el 3-fosfoglicerato (Uyeda, 1979). Su secuencia de aminoácidos es el doble de larga que la de las bacterianas, seguramente debido a un proceso de duplicación génica. Las ATP-PfkA bacterianas son tetrámeros de subunidades de 33 kDa-38 kDa, reguladas, pero con un menor número de efectores que en el caso de las eucariotas (Ronimus y col., 1999). Las ATP-PfkA de levaduras son octámeros con dos tipos de subunidades diferentes de 112 kDa y 118 kDa, resultado probablemente de una duplicación génica (Heinisch y col., 1989).

b) La primera PfkA dependiente de PPi se descubrió en *Entamoeba histolytica* (Reeves y col., 1974). Catalizan una reacción reversible (Reeves y col., 1974) y se distinguen dos grupos en función de su sensibilidad a fructosa-2,6-bifosfato y del tamaño de sus subunidades. Las de tipo I están formadas por un único tipo de subunidad (de entre 36 y

64 kDa) y no están reguladas por fructosa-2,6-bifosfato, mientras que las de tipo II son tetrámeros formados por dos tipos de subunidades (55 kDa-68 kDa) y se activan por fructosa-2,6-bifosfato (Mertens y col., 1998). Las de tipo II se encuentran en organismos fotosintéticos, plantas superiores y en el protista fostosintético *Euglena gracilis* (Enomoto y col., 1989; Mertens y col., 1998). Las PPi-PfkA de tipo I no coexisten con las ATP-PfkA mientras que las de tipo II si lo hacen (Mertens, 1993). La distribución de PPi-PfkA en los seres vivos parece relacionarse con el metabolismo anaerobio. Además, la utilización de PPi podría favorecer la conservación de ATP en organismos fermentadores obligados (Mertens, 1991).

El trabajo de Siebers y col. (1998) clasifica las PfkA en tres grupos monofiléticos: el grupo I (formado solo por ATP-PfkA bacterianas y eucariotas), el grupo II (solo formado por PPi-PfkA) y el grupo III (formado por ambos tipos de PfkA). En el grupo III se encuentran la ATP-PfkA de *S. coelicolor (pfkA2,* SCO5426) y las PPi-PfkA de *Amycolaptosis methanolica* y *T. tenax.* El grupo III se considera el más cercano al linaje ancestral de Pfk debido a su baja tasa evolutiva, escasa regulación y especificidad original por PPi. Los estudios filogenéticos realizados por Alves y col. (1996) sugieren que tanto las ATP- como las PPi-PfkAs habrían evolucionado a partir de un ancestro común de tipo PPi-Pfk.

• La superfamilia riboquinasa incluye las familias B y C:

a) La familia B está formada por quinasas implicadas en el catabolismo de carbohidratos y pirimidinas, dependientes de ATP y presentes en todos los dominios de la vida. Comprende fructoquinasas, riboquinasas y quinasas de adenosina. La ATP-Pfk minoritaria de *E. coli* (Pfk2) es la representante de las Pfk de esta familia.

b) La familia C incluye ADP-Pfk de arqueas, que carecen de regulación alostérica. La primera fue descubierta en *Pyrococcus furiosus* (Kengen y col., 1994).

I.4.2. Fosfofructoquinasas de Streptomyces coelicolor

I.4.2.1. Presencia de múltiples copias

Una característica común de los genomas de *Streptomyces* y otros actinomicetos es la presencia de múltiples copias que codifican genes homólogos o similares (Bentley y col., 2002; Ikeda y col., 2003). En general, los genes implicados en rutas del metabolismo primario en bacterias se agrupan en operones, lo que facilita su expresión coordinada; sin embargo, en *Streptomyces*, salvo algunas excepciones, se encuentran dispersos por el cromosoma (van Keulen y col., 2011).

La existencia de isoenzimas que catalizan una misma reacción metabólica podría indicar que canalizan un mismo sustrato hacia rutas metabólicas diferentes (Alves y col., 2001; Ureta, 1991) o un uso diferencial de las mismas en función de los nutrientes del medio. Existen varios ejemplos a favor de ambas hipótesis: en *E. coli* (que presenta dos Pfk) PfkA2 canaliza hacia la glucólisis de forma preferente la fructosa-6-fosfato generada en la ruta de las pentosas fosfato –ruta PP- (Cabrera y col., 2008); *A. methanolica* presenta una ATP-Pfk que es activa durante el crecimiento con sustratos de tipo C1 (como el metanol) e interviene

en el ciclo de la ribulosa monofosfato y una PPi-Pfk, que actúa durante el crecimiento en glucosa y participa en la ruta glucolítica (Alves y col., 1996; 2001).

En *S. coelicolor, S. avermitilis, S. scabies, S. lividans* y *S. clavuligerus* existen tres genes codificantes de Pfk, mientras que en *S. griseus* y *S. venezuelae* solo existen dos (correspondientes a los ortólogos de *pfkA2* y *pfkA3* de *S. coelicolor*). Precisamente la región en torno a una *pfkA* con mayor sintenia entre especies de *Streptomyces* es la de *pfkA1*, aunque esta última parece ser dispensable para la supervivencia de este género (Siebring, 2010). La región menos conservada es la que flanquea *pfkA3*, por lo que se ha propuesto que ésta podría ser la última adquirida en la evolución y tener un papel de soporte en ciertas condiciones de crecimiento (Siebring, 2010).

I.4.2.2. Características de las fosfofructoquinasas de S. coelicolor

S. coelicolor presenta tres genes codificantes de 6-fosfofructoquinasas (SCO2119*pfkA1*, SCO5426-*pfkA2* y SCO1214-*pfkA3*), cuyos productos tienen unos porcentajes de identidad y similitud entre sí que oscilan entre el 56 %-72 % y el 69 %-82 %, respectivamente. Las más similares entre sí son PfkA2 y PfkA3 (Borodina y col., 2008). Todas ellas pertenecen al grupo III de la familia A y el análisis de su secuencia indica que PfkA1 es dependiente de PPi (ya que el residuo aminoacídico de la posición 104 es aspártico) mientras que PfkA2 y PfkA3 son dependientes de ATP (ya que el residuo 104 es glicina; Siebring, 2010).

Los primeros estudios de purificación y caracterización de la proteína PfkA2 son los trabajos de Alves y col. (1997), que la identificaron inicialmente como PfkA1 y la relacionaron con el producto de SCO2119. Posteriormente, los análisis de la secuencia amino terminal realizados por Borodina y col. (2008) permitieron corregir este error de nomenclatura y la asociaron al producto de SCO5426. Su gran semejanza con la PPi-PfkA de *A. methanolica* (70 % de identidad aminoacídica) y su agrupación conjunta en una misma rama filogenética (Alves y col., 2001), hace pensar que procede de un ancestro PPi-dependiente que evolucionó recientemente a ATP-Pfk (Siebers y col., 1998).

La caracterización de las *pfkA* de *S. coelicolor* (resumidas en la tabla 1.4) se recoge en los trabajos de Siebring (2010) y de Borodina y col. (2008). El estudio de los genes vecinos no permite deducir una función específica de cada PfkA: se encuentran genes relacionados con el metabolismo primario del carbono no glucolíticos como *ldh* (SCO2118, lactato deshidrogenasa), *pta* (SCO5425, fosfato acetil transferasa) o *ackA* (SCO5424, acetato quinasa), genes de la glucólisis como *glkA* (SCO2126, glucosa quinasa) o *pyk2* (SCO5423, posible piruvato quinasa), proteínas de membrana y reguladores (Siebring, 2010).

La conclusión general de Siebring (2010) es que la expresión de estos genes no está acoplada a la diferenciación morfológica y que depende del medio de cultivo utilizado (mínimo definido o complejo) y de la fase de crecimiento, pero no de la fuente de carbono:

 a) En un medio mínimo definido con glucosa y limitación de Pi se detecta por RT-PCR un patrón de transcripción de los tres genes en función de la fase de cultivo. La transcripción de *pfkA3* se detecta tanto a mitad de la fase exponencial de crecimiento como en la fase estacionaria. Por el contrario, el transcrito de *pfkA2* solo se detecta en la fase de crecimiento exponencial y el de *pfkA1* en la fase estacionaria. La transcripción de *pfkA3* y *pfkA2* en la fase exponencial se corrobora con los resultados proteómicos obtenidos por Hesketh y col. (2002).

- b) En medios ricos como YEME o R2YE solo se detecta transcripción de *pfkA2* en las fases exponencial y estacionaria de crecimiento.
- c) Puesto que la deleción de *pfkA2* supone que no se detecte actividad Pfk en extractos celulares, se considera que es la principal responsable de esta actividad en *S. coelicolor*.
- d) La ausencia de PfkA2 no bloquea totalmente el flujo a través de la glucólisis en medio mínimo definido y de hecho, *pfkA3* continúa transcribiéndose (Borodina y col., 2008).
- e) En medio mínimo definido se detecta un incremento de la transcripción de *pfkA3* que se considera una respuesta a la deleción (Borodina y col., 2008); sin embargo, en medio YEME no se induce la transcripción de los otros genes *pfkA* (Siebring, 2010).

El perfil transcripcional de *pfkA1*, cuya expresión coincide con la producción de antibióticos en medio mínimo definido limitado en Pi, apoyaría la idoneidad de las PPi-Pfk en condiciones de baja disponibilidad de ATP (tras la escasez de Pi) y su posible participación en la gluconeogénesis, ya que la reacción catalizada es reversible. Durante el crecimiento en medios ricos en los que se genera suficiente ATP, no se requeriría dicha actividad y por este motivo, no se detectaría transcripción de *pfkA1* en YEME o R2YE (Siebring, 2010).

En la región promotora de *pfkA1* se ha detectado una caja *dre* con una puntuación *score* de 8.39 (Rigali y col., 2008), pero los estudios de RT-PCR tras la adición de N-acetilglucosamina como inductor a mitad de la fase exponencial de crecimiento descartan una posible regulación por DasR (Siebring, 2010). Hay que tener en cuenta que dichos estudios se han realizado en medio YEME, en el que este grupo no detecta transcripción de *pfkA1* ni de *pfkA3*, y que un incremento de la transcripción de *pfkA1* como resultado de la liberación de DasR sería esperable si la adición se realiza en condiciones de escasez nutricional, pero no en la fase de crecimiento exponencial (ver apartado I.3.3.1; pág. 53).

Tabla 1.4. Resumen de las propiedades de las PfkA de *S. coelicolor*. MM: medio mínimo definido con glucosa y limitado en Pi; MR: medios ricos (YEME o R2YE); Est: fase estacionaria; Exp: fase exponencial.

	PfkA1	PfkA2	PfkA3
Ortólogos en otras especies	no	si	si
Sintenia de la región	alta	media	baja
Donador Pi	PPi	ATP	ATP
Expresión en MM	Est	Exp	Exp y Est
Expresión en MR	-	Exp y Est	-

I.4.2.3. Efecto de la deleción de los genes codificantes de fosfofructoquinasas en la producción de antibióticos en *S. coelicolor*

El crecimiento y el desarrollo morfológico de *S. coelicolor* en medios con diversas fuentes de carbono no se ven afectados por la inactivación de ninguno de los genes *pfkA*. Curiosamente, las cepas $\Delta pfkA2$ y $\Delta pfkA3$ crecen el doble que la cepa $\Delta pfkA1$ y la cepa silvestre en presencia de ácido itacónico como fuente de carbono única (Siebring, 2010).

En medio rico R2YE, la inactivación de *pfkA1* o *pfkA3* no altera la producción de antibióticos, mientras que la deleción de *pfkA2* (que es la única que se transcribe en estos medios) incrementa la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina. Los estudios de RT-qPCR indican que la transcripción de *actll-orf4* y *actlll* se duplica, mientras que la de *redD* y *redQ* no se ve afectada (Borodina y col., 2008).

En medio mínimo definido limitado en Pi, en el que las tres PfkA se expresan en algún momento, la inactivación de *pfkA2* triplica la producción de ambos antibióticos, la de *pfkA1* duplica la producción de actinorrodina y la de *pfkA3* incrementa un 50 % la producción de undecilprodigiosina (Siebring, 2010). Además, en este medio la producción de biomasa de la cepa $\Delta pfkA2$ se reduce aproximadamente un 20 % (Borodina y col., 2008).

El efecto positivo de la deleción de *pfkA2* sobre la producción de antibióticos se ha reconfirmado posteriormente en el trabajo de Kim y col. (2011). En él se consigue incrementar la producción de actinorrodina en un doble mutante de *S. coelicolor* $\Delta wblA$ Δ SCO1712 a través de la deleción de *pfkA2*. Tanto *wblA* como SCO1712, que codifica un regulador transcripcional de tipo TetR, se conocen como reguladores negativos de la producción de antibióticos.

A nivel metabólico, en medio mínimo definido, la deleción de *pfkA2* supone un incremento de los niveles intracelulares de fructosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfato, que tanto en la cepa mutante como en la silvestre se mantienen en una proporción 1:3.6 (Borodina y col., 2008). También en *S. cerevisiae* se ha comprobado que la deleción de genes de una o dos subunidades de Pfk da lugar a la acumulación de hexosas monofosfato (Heinisch, 1986). En el mutante de *S. coelicolor* se incrementa el flujo a través de la ruta PP y los niveles de NADPH (Borodina y col., 2008); de hecho, el modelo metabólico de estos autores predice que la cantidad de glucosa que entra en dicha ruta pasa de un 7 % en la cepa silvestre a un 50 % en la cepa mutante.

Los análisis transcriptómicos con micromatrices de *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$ y su cepa parental cultivadas en medio mínimo definido, revelaron diferencias significativas en 588 genes (menos del 10 % del genoma), entre los que se encuentran genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos, genes que codifican proteínas de membrana, reguladores transcripcionales, etc (Borodina y col., 2008). Entre los reguladores, CprB (SCO6071), que codifica una proteína homóloga del receptor del factor A de *S. griseus* y tiene un efecto negativo sobre el metabolismo secundario y la esporulación (Onaka y col., 1998), se encuentra subexpresado en esta cepa (Borodina y col., 2008).

Los estudios de transcripción de los genes *pfkA* se realizaron con la aplicación de un método optimizado de aislamiento de ARN, RT-PCR y digestión enzimática específica del

producto, debido a la extrema hibridación cruzada que hace imposible distinguir, según estos autores, los transcritos mediante hibridación *Northern*, micromatrices o RT-PCR (Borodina y col., 2008). De hecho, en los resultados transcriptómicos de Borodina y col. (2008) los niveles de transcrito de *pfkA2* en el mutante son comparables a los de la cepa silvestre.

I.4.2.4. Relación entre el metabolismo primario y secundario e importancia de la ruta de las pentosas fosfato

Los precursores que intervienen en la biosíntesis de metabolitos secundarios proceden del metabolismo primario (Olano y col., 2008), motivo por el cual la alteración de rutas metabólicas centrales es una estrategia empleada en la mejora de la producción de muchos antibióticos. Por ejemplo, la sobreexpresión de *acc* (que codifica una acetil-CoA carboxilasa) en *S. coelicolor* aumenta la disponibilidad de malonil-CoA y la producción de actinorrodina (Ryu y col., 2006); la deleción de *gap1* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) en *S. clavuligerus* incrementa la disponibilidad de gliceraldehído-3-fosfato y la producción de ácido clavulánico (Li y Townsend, 2006) y la inactivación de *ccr* (crotonil-CoA reductasa) en *S. cinnamonensis* reduce los niveles de metilmalonil-CoA y la producción de monensina en medios de base oleosa (Li y col., 2004).

La distribución de los flujos metabólicos varía entre especies del género *Streptomyces*. Mientras que en *S. coelicolor* la transición entre la fase de crecimiento y la fase de producción se acompaña de un cambio de flujos metabólicos de la glucólisis hacia la ruta PP (Siebring, 2010), en *Streptomyces antibioticus* la ruta principal durante el crecimiento exponencial es la PP (Salas y col., 1984). De la misma manera, aunque existe una correlación positiva entre la producción de metabolitos secundarios y la disponibilidad de NADPH, no siempre se correlaciona igualmente con el flujo a través de la ruta PP. En *S. coelicolor*, la correlación entre la ruta PP y la producción de metilenomicina y antibióticos pigmentados es positiva (Obanye y col., 1996; Borodina y col., 2008); por el contrario, en *Streptomyces noursei* la disponibilidad de NADPH supera los requerimientos para la producción de nistatina y la estimulación de la ruta PP disminuye la producción (Jonsbu y col., 2001). Además, los niveles de NADPH requeridos para la biosíntesis de diferentes macrólidos puede variar en función del grado de reducción de los mismos (Butler y col., 2002).

El efecto de la remodelación de los flujos metabólicos es difícil de calibrar: en cepas de *S. lividans* que sobreexpresan los activadores transcripcionales específicos de ruta de actinorrodina y undecilprodigiosina, la inactivación de los dos genes del primer paso de la ruta PP (*zwf* y *zwf2*) reduce la producción de antibióticos; sin embargo la inactivación de solo uno de estos genes tiene un efecto positivo sobre la producción. Posiblemente en estas condiciones los niveles de NADPH no son limitantes para la producción y la redistribución de los flujos metabólicos tiene un efecto positivo (Butler y col., 2002).

En *S. tsukubaensis* existen pruebas de que la estimulación de la ruta PP tiene un efecto positivo sobre la producción de tacrolimus que se describen en el apartado I.5.3.2 (pág. 80) (Huang y col., 2013a; Xia y col., 2013).

I.5. *Streptomyces tsukubaensis* y producción de tacrolimus

I.5.1. Streptomyces tsukubaensis

El microorganismo utilizado en el desarrollo de esta tesis doctoral es *S. tsukubaensis*, por ser el productor principal del macrólido tacrolimus. En los siguientes apartados se describe la especie, el metabolito secundario y las estrategias aplicadas en la mejora de su producción a lo largo de los últimos años.

I.5.1.1. Reseña histórica

S. tsukubaensis fue descubierto en 1984 como resultado de la búsqueda de nuevos compuestos inmunosupresores por parte de la compañía farmacéutica Fujisawa Pharmaceutical Co. (desde 2004 Astellas Pharma) (Barreiro y Martínez-Castro, 2014). La bacteria se aisló de una muestra de suelo de Tsukuba, en Japón (Kino y col., 1987a), y se patentó como *S. tsukubaensis* No. 9993 (Okuhara y col., 1990). Posteriormente se depositó en el *Fermentation Research Institute* de Japón con número FERM BP-927. La cepa con la que se ha desarrollado esta tesis doctoral, *S. tsukubaensis* NRRL 18488, procede del *Agricultural Research Culture Collection International Depository* de Estados Unidos, en el que se depositó en 1989 (Baumann y Emmer, 1999). Ésta es la cepa parental de la mayoría de cepas utilizadas industrialmente en la producción de tacrolimus (Kosec y col., 2012).

I.5.1.2. Caracterización fenotípica y genotípica

La primera descripción morfológica de *S. tsukubaensis* 9993 indicó que presenta un micelio de color grisáceo, no cromogénico, con cadenas rectas y flexibles de esporas de superficie lisa y una capacidad limitada de utilización de carbohidratos (Kino y Goto, 1993). Los estudios de asimilación de fuentes únicas de carbono y de nitrógeno en la cepa NRRL 18488 revelan una cierta asimilación de D-glucosa, D-xilosa y D-inositol y de L-asparragina y L-fenilalanina (Martínez-Castro y col., 2013).

S. tsukubaensis NRRL 18488 presenta un cromosoma de 7.62 Mb (71.52 % en GC) y dos plásmidos circulares, pSTS1 (70.05 % en GC) y pSTS2 (71.13 % en GC), de 24.7 kb y 31.1 kb, respectivamente. Los resultados de la anotación del genoma predicen 6623 genes codificantes de proteínas, 6 operones de ARNr (18 genes), 68 ARNt y 52 factores sigma (Barreiro y col., 2012). La especie más cercana filogenéticamente de entre las estudiadas (*S. clavuligerus* ATCC 27064^T, *Streptomyces amakusaensis* DSM 40219^T y *Streptomyces inusitatus* DSM 41441^T) es *S. clavuligerus*, con un 98.4 % de similitud entre las secuencias del ARNr 16S, aunque el valor de identidad ADN/ADN obtenido mediante estudios de renaturalización es de sólo el 10.1 % (Martínez-Castro y col., 2013).

I.5.1.3. Producción de metabolitos secundarios

• Metabolitos principales

Además de tacrolimus, *S. tsukubaensis* produce otros metabolitos en menor proporción (ver figura 1.13). Dos de ellos, ascomicina (FK520) y FK525, también presentan actividad inmunosupresora. Mientras que la ascomicina se diferencia del tacrolimus por presentar un radical etilo en el C21 en vez de un radical alilo, FK525 se diferencia por presentar un residuo de prolina en lugar de ácido piperidin-2-carboxílico (Hatanaka y col., 1989). Otro compuesto estructuralmente relacionado es FR900523, una variante con un radical metilo en el C21.





Junto con la ascomicina, la producción del análogo FK506D (37,38-dihidro-FK506), en cuyo caso el radical del C21 es un grupo propilo, es un obstáculo importante en la producción industrial de tacrolimus (ver apartado I.5.3; pág. 78). Estos "subproductos" se generan como consecuencia de la similitud de sus rutas biosintéticas y de la participación de precursores comunes.

Predicción de otras agrupaciones biosintéticas

La mayoría de los genomas de *Streptomyces* codifican varias agrupaciones modulares (Bentley y col., 2002; Ikeda y col., 2003; Nett y col., 2009) y el genoma de *S. tsukubaensis* no es una excepción: presenta 4 agrupaciones para sintasas de policétido de tipo I (una de ellas la de tacrolimus), 3 agrupaciones de sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS), 3 agrupaciones híbridas sintasa de policétido-NRPS, 2 agrupaciones de sintasas de policétido de tipo II, una agrupación de sintasa de policétido de tipo III, 8 agrupaciones de terpenos, 6 agrupaciones de lantibióticos y 3 de sideróforos (Barreiro y col., 2012). En un trabajo de secuenciación masiva paralelo se detectaron 10 agrupaciones modulares que en total corroboran estos resultados (Blazic y col., 2012).

Uno de los metabolitos generados por una de estas agrupaciones de sintasas de policétido de tipo I podría ser similar a bafilomicina (Werner y col., 1984), mientras que otra de ellas presenta cierta relación filogenética con la agrupación de nigericina (Harvey y col.,

2007). Una de las agrupaciones de tipo NRPS presenta cierta similitud con la agrupación biosintética de enduracidina (Yin y Zabriskie., 2006).

I.5.2. Tacrolimus

I.5.2.1. Reseña histórica y aplicaciones médicas

El tacrolimus es un macrólido policétido compuesto por 23 átomos de carbono (822 Da). Fue aislado por primera vez en 1984, a partir de los caldos de cultivo de *S. tsukubaensis* (Kino y col., 1987a) y se convirtió en el primer inmunosupresor de tipo macrólido descubierto. Inicialmente se denominó FR900506, pero a lo largo de la historia también ha recibido los identificativos de FK506 y fujimicina. En 1992 se le dio el nombre de tacrolimus en referencia a "<u>T</u>sukuba M<u>acroli</u>de Im<u>mu</u>no<u>s</u>uppressant" (Wallemacq y Reding, 1993).

La primera referencia sobre el tacrolimus la realiza Ochiai en el undécimo Congreso Internacional de la Sociedad de Trasplantes, celebrado en Helsinki en 1986, pero las primeras publicaciones no aparecen hasta el año siguiente (Kino y col. 1987a; 1987b). En 1989 comienzan los ensayos clínicos sobre su uso en trasplantes de hígado en la universidad de Pittsburgh y en 1991 se celebra en la misma ciudad el primer congreso internacional sobre tacrolimus (Wallemacq y Reding, 1993).

Desde que fue aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*), para su aplicación en el tratamiento de pacientes con trasplante hepático, su utilización se ha extendido al tratamiento de trasplantes de médula ósea subsiguientes a un trasplante hepático (Trede y col., 1997), de riñón (Meier-Kriesche y col., 2006) y de corazón (McCormack y Keating, 2006) y al tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel, como la dermatitis atópica (Ingram y col., 2009; Remitz y Reitamo, 2009).

Además se ha estudiado su aplicación en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (Akimoto y col., 2008), la colitis ulcerativa o enfermedad de Crohn (Benson y col., 2008) y se han publicado trabajos sobre su actividad antiviral contra ortopoxvirus (Reis y col., 2006), HIV (Karpas y col., 1992; Briggs y col., 1999), virus de inmunodeficiencia felina (Mortola y col., 1998); capacidades de estimulación del crecimiento del pelo (Yamamoto y col., 1994); de sensibilización de líneas celulares resistentes a fármacos antitumorales (Epand y Epand, 1991). También se utiliza en las cánulas o estents implantadas en arterias coronarias (Romano y col., 2010).

En los últimos años está ganando atención por sus posibles propiedades neuroprotectoras y neuroregenerativas (Klettner y Herdegen, 2003; Sierra-Paredes y Sierra-Marcuño, 2008) y su posible aplicación en cáncer (Periyasami y col., 2007).

I.5.2.2. Mecanismo de acción e impacto en la industria farmacéutica

Actúa como un inmunosupresor inhibidor de la calcineurina y presenta un mecanismo de acción similar al de la ciclosporina (Liu y col., 1991). El tacrolimus interacciona con receptores citosólicos, principalmente con FKBP12 (*FK506-binding protein* <u>12</u> kDa) (Harding y col., 1989). El complejo formado inhibe la actividad serina/treonina fosfatasa

dependiente de calmodulina de la calcineurina (ver figura 1.14). El resultado final es el bloqueo de la proliferación de las células T, que quedan detenidas en el estadío G_0 - G_1 en mamíferos (Tocci y col., 1989), aunque también tiene efectos negativos en el crecimiento de ciertos hongos, lo que le confiere actividad antifúngica (Foor y col., 1992; Kunz y Hall, 1993).



Figura 1.14. Mecanismo de acción del tacrolimus en una célula T. Cuando la calcineurina está activada, desfosforila ciertos sustratos como los FNTA (<u>Factor N</u>uclear de células <u>T</u> <u>A</u>ctivadas), factores transcripcionales que acceden al núcleo desfosforilados y controlan la transcripción de genes implicados en la proliferación de las células T (p. ej., citoquinas). FNATc y FNATn: fracciones citoplasmática y nuclear de los FNTA. Modificado de Dutta y Ahmad (2011).

Entre los compuestos inmunosupresores disponibles en el mercado (ciclosporina, rapamicina, micofenolato, etc.), el tacrolimus es uno de los más efectivos en el tratamiento contra el rechazo de un órgano trasplantado (Meier-Kriesche y col., 2006). De hecho, su utilización ha desplazado a la de la ciclosporina, con respecto a la cual es de 10 a 100 veces más potente (Pirsch y col., 1997; Jiang y Kobayashi, 1999).

El tacrolimus genera unos beneficios anuales muy elevados: en 2011 de 1886 millones de dólares, lo que representó un 27.6 % de las ventas anuales del mercado de los inmunosupresores (Martínez-Castro y col., 2013; <u>http://evaluatepharma.com</u>). La revisión anual de Astellas Pharma Inc. correspondiente al año 2013 presentó unas ventas de Prograf[®] y Advagraf[®]/Graceptor[®] (nueva formulación de uso diario) de 1635 millones de dólares (Barreiro y Martínez-Castro, 2014). La expiración de la patente para la comercialización de tacrolimus por Astellas Pharma ha permitido que otras compañías farmacéuticas lo comercialicen, como, por ejemplo, Sandoz, Normon, Accord, Mylan o Stada. La última

autorización se ha producido en Julio de 2014, para la comercialización de Envarsus[®] por Chiesi Pharmaceutici S.p.A (<u>http://www.emea.europa.eu</u>).

I.5.2.3. Agrupación y ruta biosintética de tacrolimus en S. tsukubaensis

Las macrolactonas como el tacrolimus, la ascomicina o la rapamicina pertenecen a un grupo más amplio de compuestos, los policétidos, cuya biosíntesis comparte mecanismos químicos y precursores con la biosíntesis de ácidos grasos (Hutchinson, 1983; Hertweck, 2009). Los policétidos se sintetizan mediante sintasas de policétidos o complejos híbridos sintasa de policétido-NRPS, en los que la primera genera un esqueleto carbonado (mediante incorporación de unidades extendedoras derivadas de ácidos carboxílicos activadas en forma de ésteres de coenzima A) y la NRPS incorpora aminoácidos poco frecuentes o análogos de aminoácidos (Koglin y Walsh, 2009).

La naturaleza modular de las sintasas de policétidos permite predecir la estructura del compuesto que generan (Starcevic y col., 2008). Cada módulo, que interviene en un ciclo de extensión del policétido, consta de dominios cetoacilsintasa (KS), aciltransferasa (AT) y proteína transportadora de grupos acilo (ACP). Opcionalmente pueden presentar dominios deshidratasa (DH), enoilreductasa (ER) y cetoreductasa (KR).

Las primeras descripciones sobre la ruta biosintética de tacrolimus datan de los años 1996 y 1998, procedentes de estudios realizados por investigadores de los laboratorios Merck (trabajos de Motamedi y Shafiee, 1998; Motamedi y col., 1996; 1997; Shafiee y col., 1994). Posteriormente se han realizado estudios sobre las reacciones de modificación y se han identificado los grupos de genes implicados en la formación de las unidades extendedoras inusuales.

Para mayor claridad, la ruta biosintética (representada en la figura 1.17) se ha dividido en subapartados y las reacciones y genes implicados (resumidos en la tabla 1.5) se describen simultáneamente. La agrupación de biosíntesis de tacrolimus en *S. tsukubaensis* se representa en la figura 1.15.



Figura 1.15. Agrupación biosintética de tacrolimus en *S. tsukubaensis* NRRL 18488 y funciones de los productos codificados. Modificado de Jones y col. (2013).

Tabla 1.5. Genes de la agrupación de tacrolimus de *S. tsukubaensis* NRRL 18488. Se indica la función de cada gen o subagrupación y su código STSU en la anotación del genoma utilizada en este trabajo. Modificada de Barreiro y col. (2012) y corregida por Rodríguez-García (comunicación personal).

Gen(es)	STSU	Función
allAKRD	STSU_32090-STSU_32075	Formación de alilmalonil-CoA
allMPOS	STSU_32070, STSU_32060-STSU_32050	Función desconocida
allN	STSU_32065	Regulador de la familia AsnC
fkbGHIJK	STSU_32045-STSU_32025	Formación de metoximalonil-ACP
fkbL	STSU_32020	Ciclación y desaminación de la lisina
fkbC	STSU_32015	Sintasa de policétido de tipo I
fkbB	STSU_32005m	Sintasa de policétido de tipo I
fkbO	STSU_32000	Formación de la unidad iniciadora
fkbP	STSU_31995	Ciclación del macrólido
fkbA	STSU_31990m	Sintasa de policétido de tipo I
fkbMD	STSU_31975-STSU_31980	Reacciones de modificación
fkbN	STSU_31970m	Regulador de la familia LAL
fkbQ	STSU_31965	Tioesterasa
fkbR	STSU_31960	Regulador de la familia LysR

• Formación del esqueleto carbonado

El primer paso de la ruta biosintética es la formación de un esqueleto carbonado a partir de un fragmento derivado de una vía aromática. La hidrólisis del corismato (procedente de la ruta del siquimato) genera la unidad iniciadora: ácido (4R, 5R)-4,5-dihidroxiciclohex-1-enecarboxílico (abreviado DHCHC). Esta reacción está catalizada por una corismatasa codificada por *fkbO* (Andexer y col., 2011). En la estructura final del tacrolimus, el DHCHC da lugar al anillo ciclohexano, que es la diana más tolerante para realizar modificaciones estructurales sin afectar a la actividad inmunosupresora (Goulet y col., 1994).

Las tres sintasas de policétidos de tipo I implicadas, codificadas por *fkbA*, *fkbB* y *fkbC*, catalizan 10 ciclos de elongación sucesivos sobre la unidad iniciadora y utilizan como unidades extendedoras de dos átomos de carbono dos moléculas de malonil-CoA, cinco moléculas de metilmalonil-CoA, dos de metoximalonil-ACP y una de alilmalonil-CoA. Aunque la incorporación de malonil-CoA y de metilmalonil-CoA es habitual en la biosíntesis de policétidos, las unidades extendedoras metoximalonil-ACP y alilmalonil-CoA son infrecuentes. Su participación en la síntesis de tacrolimus se traduce en los grupos metoxilo de C13 y C15 y el radical alilo de C21, respectivamente (Mo y col., 2011; Carroll y col., 2002; Kato y col., 2002; Goranovič y col., 2012).

• Formación de unidades extendedoras

Las enzimas implicadas en la formación de metoximalonil-ACP están codificadas en la agrupación *fkbGHIJK*. Las reacciones han sido clarificadas en los trabajos de Carroll y col. (2002) y Kato y col. (2002).

FkbH es una aciltransferasa/fosfatasa que carga 1,3-bifosfoglicerato sobre FkbJ (ACP). Se genera gliceril-ACP, que por acción de las deshidrogenasas FkbK y FkbI y la O-metiltransferasa FkbG da lugar a metoximalonil-ACP (Chen y col., 2013; Wu y col., 2000).

La incorporación de alilmalonil-CoA es lo único que diferencia el tacrolimus de su análogo ascomicina, en cuya biosíntesis, en vez de alilmalonil-CoA, interviene etilmalonil-CoA. Su biosíntesis en *S. tsukubaensis* NRRL 18488 implica a la subagrupación *all* (de alilo), descrita por Goranovič y col. (2010). Los genes *allA* y *allK*, que forman una unidad transcripcional, codifican un sistema sintasa de policétido con una arquitectura inusual, ya que se asemeja tanto a sintasas de policétido de tipo I como de tipo II.

AllK (con dos dominios KS) carga propionil-CoA y cataliza la condensación con el malonato cargado sobre AllA (con dominios AT y ACP). El producto generado se transforma en trans-2-pentenil-ACP por medio de cetoreductasas y deshidratasas no codificadas en la agrupación que podrían ser compartidas con las sintasas de ácidos grasos (Mo y col., 2011). Sin embrago, Goranovič y col. sugieren que la primera reducción podría estar catalizada por el producto de *allS*, debido a su homología con reductasas de 3-oxoacil-ACP y de acetoacil-CoA.

El trans-2-pentenil-ACP se carboxila (y genera propilmalonil-ACP) y deshidrogena para formar alilmalonil-ACP en las reacciones catalizadas por los productos de *allR* y *allD*, respectivamente. En la agrupación biosintética no se ha encontrado ninguna transacilasa de ACP-COA que catalice la última reacción que forma alilmalonil-COA (Mo y col., 2011), el cual se carga finalmente sobre el dominio AT del módulo 4 de la sintasa de policétido (ver figura 1.16).
Síntesis de Metoximalonil-ACP



Figura 1.16. Biosíntesis de las unidades extendedoras implicadas en la formación de tacrolimus. 1,3-BPG: 1,3-bifosfoglicerato; ACP: proteína transportadora de grupos acilo; KS: dominio cetoacilsintasa; AT: dominio aciltransferasa; FAS: sintasa de ácidos grasos. Modificado de Barreiro y col. (2014).

• Ciclación del macrólido

La ciclación se produce gracias a la incorporación de L-pipecolato catalizada por la NRPS codificada por *fkbP* (Motamedi y Shafiee, 1998), que genera 9-desoxo-31-O-desmetil-FK506 por lactonización intramolecular (Gatto y col., 2005; 2006). El L-pipecolato proviene de la α -desaminación y ciclación de la lisina, en la que interviene el producto de *fkbL* (Byrne y col., 1993).

• Reacciones de modificación tardía

Se producen dos reacciones de modificación posteriores que son esenciales para la actividad biológica del tacrolimus, como demostraron los trabajos de Shafiee y col. (1994; 1997) y de Motamedi y col. (1996): una metilación del grupo hidroxilo localizado en el C31 y una oxidación del C9. Estudios cristalográficos previos ya habían determinado que ambos grupos son importantes para la unión del tacrolimus a FKBP12 (van Duyne y col., 1991; Becker y col., 1993).

La metilación está catalizada por la O-metiltransferasa regioespecífica dependiente de S-adenosilmetionina codificada por *fkbM* y la oxidación del carbono C9, por la citocromo P450-oxidoreductasa codificada por *fkbD* (Motamedi y col., 1996; Shafiee y col., 1997). Ambos genes se transcriben conjuntamente y forman parte de un mismo operón (Motamedi y col., 1996). Estas reacciones, que son comunes a la biosíntesis de ascomicina y rapamicina, pueden darse en cualquier orden (Chen y col., 2013; Ban y col., 2013a). FkbD puede oxidar con la misma eficiencia el 9-desoxo-31-O-desmetil-FK506 (ya metilado por FkbM) y el 9-desoxo-FK506 (no metilado por FkbM). Del mismo modo, FkbM acepta como sustratos

tanto el 9-desoxo-31-O-desmetil-FK506 (ya oxidado por FkbD) como el 31-O-desmetil-FK506 (no oxidado por FkbD). FkbD realiza una oxidación en dos pasos que implica cuatro transferencias de electrones y la formación de un intermediario tipo alcohol (9-hidroxil-FK506), como demostraron los trabajos de Chen y col. (2013). Hasta la publicación de dicho trabajo, este tipo de oxidaciones dobles se había descrito en rutas de biosíntesis de terpenoides, pero no de policétidos.

• Genes reguladores

Los estudios sobre reguladores específicos de la agrupación de tacrolimus en *S. tsukubaensis* NRRL 18488 han sido desarrollados principalmente por Goranovič y col. (2012).

Los primeros análisis bioinformáticos realizados identificaron tres genes con función potencialmente reguladora: *allN*, *fkbR* y *fkbN*, que pertenecen a las familias AsnC, LysR y LAL, respectivamente. Los estudios de inactivación y de sobreexpresión de dichos genes permitieron concluir que *fkbN* y *fkbR* son reguladores positivos, mientras que *allN* parece no tener influencia ninguna sobre la producción.

A diferencia de *fkbR* (que se transcribe de forma continuada a lo largo del cultivo), *fkbN* (que se transcribe en la fase de producción) es indispensable para la producción de tacrolimus, ya que su inactivación bloquea completamente la producción en esta cepa. Curiosamente, ni la inactivación de *fkbR* ni la de *fkbN* bloquean la transcripción de ciertos genes de la agrupación (p. ej., *fkbG* y *fkbB*; Goranovič y col., 2012), que alcanza niveles suficientes como para permitir la producción de tacrolimus. Los autores sugieren mecanismos reguladores postranscripcionales para *fkbN*, por ejemplo a nivel traduccional, ya que su transcrito presenta un codón UUA que podría ser dependiente de BldA (Chandra y Chater, 2008).

Entre *fkbN* y *fkbR* se localiza *fkbQ*, homólogo de las tioesterasas de tipo II (Wu y col., 2000). Se ha sugerido que estas tioesterasas podrían presentar una actividad "correctora", ya que liberarían los productos aberrantes formados sobre las sintasas de policétido y permitirían la acumulación del metabolito final (Butler A. R. y col., 1999).



Figura 1.17. Ruta biosintética de tacrolimus. Modificado de Barreiro y col. (2014).

• Formación de ascomicina en S. tsukubaensis NRRL 18488

Como se ha indicado anteriormente, la estructura del tacrolimus y de la ascomicina difieren únicamente en el grupo localizado en el C21. Las cepas mejoradas genéticamente para la producción de tacrolimus (tanto en genes del metabolismo primario como del metabolismo secundario) no solo incrementan la producción de tacrolimus, sino también la de ascomicina y FK506D (Chen y col., 2012; Huang y col., 2013a; Huang y col., 2013b; Du y col., 2014), lo que es razonable si se tiene en cuenta que los precursores son comunes y las rutas biosintéticas, muy similares. Existen dos puntos clave que favorecen la formación de ascomicina como subproducto:

-La tolerancia de sustrato del dominio AT del módulo cuatro (AT4) de la sintasa de policétido. Es la implicada en la selección de los grupos que se incorporarán al C21 y acepta unidades extendedoras tanto de 4 como de 5 átomos de carbono (Kosec y col., 2012).

-AllR: es el nexo de unión entre las rutas de síntesis de tacrolimus y ascomicina, ya que participa tanto en la formación de etilmalonil-CoA (que se incorpora directamente a la cadena policetídica de la ascomicina) como de propilmalonil-ACP (que requiere pasos adicionales hasta convertirse en alilmalonil-CoA). Aunque la inactivación de *allR* combinada con la adición de un precursor de alilmalonil-CoA suprime la producción de ascomicina en esta cepa (Kosec y col., 2012), la producción de tacrolimus se reduce un 50 %, por lo que no es una estrategia eficaz.

Hasta el momento la adición de precursores específicos parece ser la estrategia más adecuada para disminuir la proporción de subproductos con respecto a la de tacrolimus (Huang y col., 2013b; Xia y col., 2013; Du y col., 2014).

I.5.2.4. Comparación de la agrupación génica de tacrolimus entre especies del género *Streptomyces* productoras

En la actualidad se conocen 17 especies del género *Streptomyces* productoras de tacrolimus (ver tabla 1.6) y, aunque comparten la capacidad de producir el mismo metabolito, no son cercanas desde un punto de vista filogenético (Garrity y col., 1993; Muramatsu y col., 2005).

Especie	Referencia
Streptomyces clavuligerus CKD1119	Kim y Park, 2008
Streptomyces clavuligerus KCTC 10561BP	Park J. W. y col., 2009
Streptomyces glaucescens MTCC 5115	Kumar y col. 2007
Streptomyces kanamyceticus KCC S-0433T (=KCTC 9225)	Mo y col., 2011; Muramatsu y col., 2005

Tabla 1.6. Especies productoras de tacrolimus. Modificado de Barreiro y Martínez-Castro (2014).

Especie	Referencia
Streptomyces sp.	Mishra y Verma, 2012
Streptomyces sp. 6260	Muramatsu y col., 2005
Streptomyces sp. 49A	Muramatsu y col., 2005
Streptomyces sp. 94128	Muramatsu y col., 2005
Streptomyces sp. ATCC 53770 (MA 6548)	Garrity y col., 1993
Streptomyces sp. KCTC 11604BP	Mo y col., 2011
Streptomyces sp. KCCM 11116P	Mo y col., 2012
Streptomyces sp. MA 6949	Sigmund y col., 2003
Streptomyces sp. MA6858 B3178	Singh y Behera, 2009
Streptomyces sp. TST8	Jung y col., 2009
Streptomyces sp. TST10 (derivada de Streptomyces sp. TST8)	Jung y col., 2009; 2011
Streptomyces tacrolimicus ATCC 55098T (=CECT 7664 ^T) [antes Streptomyces sp. ATCC 55098 (MA 6858)]	Garrity y col., 1993; Martínez- Castro y col., 2011
Streptomyces tsukubaensis 9993 NRRL18488	Kino y col., 1987a; Martínez-Castro y col., 2013; Muramatsu y Nagai, 2013

La comparación de las agrupaciones de varias especies productoras ha evidenciado importantes diferencias que algunos autores atribuyen a mecanismos de transferencia horizontal (Muramatsu y col., 2005). Goranovič y col. (2012) distinguen dos grupos claros:

-Las agrupaciones de *S. tsukubaensis* NRRL 18488 (Barreiro y col., 2012) y de *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP (Mo y col., 2011) forman parte del primer grupo. Tienen una secuencia nucleotídica y una organización génica muy similar. Presentan una subagrupación específica para la formación de la unidad extendedora alilmalonil-CoA (*allAKRD* y *tcsABCD*, respectivamente), cinco genes de función desconocida en la zona 5' (*allMNPOS* y *tcs12345*, respectivamente) y uno o dos genes en la región 3' (*fkbR* y *tcs6-tcs7*, respectivamente). Estas dos son las únicas agrupaciones que presentan homólogos de *fkbR* y *allN* (Mo y col., 2011).

-El segundo grupo comprende las agrupaciones de menor tamaño de *S. tacrolimicus* (antes *Streptomyces* MA6548 ATCC55098; Martínez-Castro y col., 2011) y *S. kanamyceticus* KCTC 9225 (Mo y col., 2011; Goranovič y col., 2010).

Cabe destacar que además, existen diferencias importantes entre las agrupaciones biosintéticas del primer grupo a pesar de tener secuencias semejantes: por ejemplo, *tcs7* actúa como regulador negativo en *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP (Mo y col., 2012), mientras que su ortólogo en *S. tsukubaensis* NRRL 18488 (*fkbR*) actúa como regulador positivo (Goranovič y col., 2012); la inactivación del regulador positivo *fkbN* anula la transcripción de la agrupación en *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP (Mo y col., 2012), pero no en *S. tsukubaensis* NRRL 18488; *tcsC* está implicado exclusivamente en la síntesis de alilmalonil-CoA en *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP, mientras que en *S. tsukubaensis* NRRL 18488 (*allR*) también interviene en la formación de etilmalonil-CoA y, por tanto, en la formación de ascomicina (Kosec y col., 2012).

FkbR y sus ortólogos presentan mayor variación en su función. La sobreexpresión de *fkbR* en una cepa de *S. coelicolor* M1146 que expresa heterólogamente la agrupación biosintética de tacrolimus de *S. tsukubaensis* NRRL 18488 tiene un efecto negativo, al contrario que en el hospedador natural (Jones y col., 2013). La explicación más razonable para estas diferencias es la diferente regulación global entre microorganismos (Jones y col., 2013), aunque también podrían ejercer un papel importante las diferencias en el metabolismo central (Goranovič y col., 2012).

El ejemplo contrario es *fkbN*, cuya sobreexpresión tiene siempre un efecto positivo sobre la producción, tanto en *S. tsukubaensis* NRRL 18488 (Goranovič y col., 2012), *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP (Mo y col., 2012) como en la cepa de *S. coelicolor* M1146 que expresa heterólogamente la agrupación (Jones y col., 2013).

I.5.3. Mejora de la producción de tacrolimus y búsqueda de análogos

Aunque la aplicación de tacrolimus es muy eficaz tanto a corto como a largo plazo, su utilización en la terapia postrasplante es costosa, principalmente debido a la baja productividad de las cepas empleadas. Los estudios indican que la razón principal es la baja disponibilidad de unidades extendedoras (alilmalonil-CoA y en menor medida metoximalonil-CoA; Mo y col., 2009; Chen y col., 2012) así como de unidades iniciadoras y de L-pipecolato (especialmente FkbO y FkbP no proveerían de precursores suficientes; Huang y col., 2013b). La disponibilidad de siguimato también es un factor limitante de la producción que se puede llegar a alcanzar (Xia y col., 2013).

A la baja productividad se añade el problema de la formación de subproductos como FK520 o FK506D, que dificultan la extracción y purificación de tacrolimus de los caldos de cultivo (Kosec y col., 2012). Por ejemplo, en *S. tsukubaensis* NRRL 18488 la producción de ascomicina puede llegar a suponer más de un 20 % de la producción de tacrolimus (Kosec y col., 2012) y en *S. clavuligerus* KCTC 10561BP, en torno a un 8 % (Park J. W. y col., 2009). Para incrementar la pureza en los procesos industriales se han desarrollado estrategias que implican la extracción repetitiva con solventes orgánicos o la separación cromatográfica (Cabri y col., 2006; Cvak y col., 2007). En los últimos años se han propuesto soluciones alternativas de cristalización y extracción a bajas presiones o de uso de resinas de adsorción (Choi y col., 2013; Jung y col., 2011). Sin embargo, estos procesos incrementan el coste final del producto y no han resultado ser una solución al problema a nivel industrial.

Aunque su síntesis química se describió ya en 1990 (Nakatsuka y col., 1990; Ireland y col., 1996) su aplicación no ha sido efectiva debido a su baja eficacia y a los costes que conlleva. Los grupos de investigación se han centrado en los últimos años en incrementar la producción mediante la optimización de los medios de cultivo y la ingeniería genética.

I.5.3.1. Optimización de los medios de cultivo: desarrollo de medios de cultivo definidos, adición de precursores y de agentes estresantes

El desarrollo de medios de cultivo definidos es esencial para estudiar los efectos estimulatorios o inhibitorios de un nutriente sobre el crecimiento y la producción. En los

primeros estudios de este tipo, realizados por Yoon y Choi (1997) con *Streptomyces* sp. MA6858 (ATCC 55098), se formuló un medio definido con leucina como fuente de nitrógeno sobre el que se valoró el efecto de diversos nutrientes. La producción de tacrolimus se vio afectada por altas concentraciones de amonio (que incrementó las tasas de crecimiento y de consumo de glucosa y Pi) pero no por altas concentraciones de glucosa o de Pi. El lactato potenció la producción en todas las condiciones ensayadas. Cabe destacar que la glucosa, hasta una concentración final de 166.5 mM, no ejerció represión sobre la producción. Sin embargo, el efecto de un nutriente sobre el crecimiento y la producción depende del resto de nutrientes del medio. Por ejemplo, el efecto represor del Pi fue más evidente cuando la fuente única de nitrógeno era sulfato amónico que cuando era leucina. Además, la adición de valina tuvo un efecto negativo sobre la producción, al contrario de lo observado en trabajos posteriores (Huang y col., 2013b; Xia y col., 2013; Du y col., 2014).

Martínez-Castro y col. (2013) evaluaron dos medios de cultivo semidefinidos para su aplicación en estudios fisiológicos y bioquímicos: MGm-2.5 e ISPz. El primero de ellos utiliza almidón como fuente principal de carbono y el segundo, glucosa y dextrinas de maíz. Cuando las dextrinas de maíz se sustituyen por lactosa, tanto el crecimiento como la producción de tacrolimus disminuyen drásticamente. La mejor fuente de nitrógeno en el medio basal es el sulfato amónico, ya que las peptonas, el extracto de levadura y el nitrato potásico reducen la producción.

Ya que la disponibilidad de precursores es un factor limitante para la producción de metabolitos secundarios (Reeves y col., 2004), su adición es uno de los primeros recursos explotados en la mejora de la producción (ver tabla 1.7). Cabe destacar que: 1) el efecto de la adición de un compuesto depende de su concentración (p. ej., el aceite de soja a una concentración superior a 20 g/l reprime el crecimiento y reduce la producción; Huang y col., 2013b), 2) la combinación de adiciones no siempre tiene un efecto positivo aditivo (Huang y col., 2013b) y 3) el efecto positivo sobre la producción puede ejercerse a través de la promoción del crecimiento (p. ej., ácido nicotínico), estar relacionada únicamente con la producción (p. ej., ácidos pipecólico y picolínico) o ambas (p. ej., nicotinamida; Turlo y col., 2012).

Precursor	Especies	Referencia
Aceite de soja	Streptomyces sp. MA6858 B3178 S. tsukubaensis TJ-04 S. tsukubaensis D852	Singh y Behera, 2009 Mishra y Verma, 2012 Xia y col., 2013 Huang y col., 2013b Du y col., 2014
L-lisina	Streptomyces sp. MA6858 B3178 S. tsukubaensis D852	Singh y Behera, 2009 Mishra y Verma, 2012 Martínez-Castro y col., 2013 Huang y col.,2013b Du y col., 2014
Metil-oleato	S. clavuligerus CKD1119	Mo y col., 2009 Mishra y Verma, 2012

Tabla 1.7. Precursores utilizados para la mejora de la producción de tacrolimus en diferentes especies productoras y sus referencias bibliográficas.

Precursor	Especies	Referencia
Ácido pipecólico	S. tsukubaensis NRRL18488	Turlo y col.,2012 Huang y col., 2013b
	S. tsukubaensis D852	Du y col., 2014
Ácido picolínico	S. tsukubaensis NRRL18488	Turlo y col.,2012
Nicotinamida	S. tsukubaensis NRRL18488	Turlo y col.,2012
Ácido nicotínico	S. tsukubaensis NRRL18488	Turlo y col.,2012
Corismoto	S taukubaansis D8E2	Huang y col., 2013b;
Constituto	3. ISUKUDUEIISIS D832	Du y col., 2014
	S tsukuhaansis D852	Huang y col., 2013b
Siquimato	S. tsukubaensis DOSZ	Du y col., 2014
	5. ISUKUBUEIISIS 13-04	Xia y col., 2013
	S tsukuhannsis D852	Huang y col., 2013b
Lactato	Strentomyces sp. MA6858	Du y col., 2014
		Yon y Choi,1997
	S tsukuhaensis D852	Huang y col., 2013b
Succinato	S. tsukubaensis D052	Du y col., 2014
	5. ISUKUBUCHSIS 13 04	Xia y col., 2013
Isoleucina	S tsukuhaensis D852	Huang y col., 2013b
	5. ISUKUBUCHSIS DOS2	Du y col., 2014
	S tsukuhaensis D852	Huang y col., 2013b
Valina	S. tsukubaensis TI-04	Du y col., 2014
	5. ISUKUBUCHSIS 13 04	Xia y col., 2013
Prolina	S. tsukubaensis TJ-04	Xia y col., 2013
Leucina	S. tsukubaensis TJ-04	Xia y col., 2013
Treonina	S. tsukubaensis TJ-04	Xia y col., 2013
Propilenglicol	S. tsukubaensis FERM BP-927	Gajzlerska y col., 2014
Propanol	S. tsukubaensis FERM BP-927	Gajzlerska y col., 2014
Ácido propiónico	S. tsukubaensis FERM BP-927	Gajzlerska y col., 2014

La adición de dimetilsulfóxido (DMSO) o tiosulfato sódico a mitad de la fase exponencial de crecimiento incrementa la producción de tacrolimus en *S. tsukubaensis* NRRL 18488 sin afectar al crecimiento (Martínez-Castro y col., 2013). En particular, la adición de DMSO al 1.5 % (v/v) duplica la producción. Aunque no se conoce el mecanismo de acción, se sabe que el DMSO estimula la biosíntesis de policétidos (Chen y col., 2000; Butler y Cundliffe, 2001).

I.5.3.2. Mejora genética

• Aumento de la disponibilidad de precursores biosintéticos

La adición de precursores al medio de cultivo puede no ser una estrategia económicamente beneficiosa: el siquimato, el corismato y el pipecolato son compuestos caros y, por lo tanto, no son adecuados para su aplicación en procesos fermentativos a escala industrial (Zhu y col., 2010). Una estrategia alternativa es la modificación de la dosis de genes biosintéticos. Por ejemplo, la sobreexpresión de la metilmalonil-CoA mutasa en *S. clavuligerus* CKD1119 (principal ruta proveedora de metilmalonil-CoA en esta especie) añadida a la adición de metiloleato al medio, incrementa la disponibilidad de metilmalonil-CoA y, por consiguiente, la producción de tacrolimus en aproximadamente un 300 % (Mo y col., 2009). Otro ejemplo es la sobreexpresión de los genes implicados en la formación de las unidades extendedoras metoximalonil-ACP y alilmalonil-CoA en

S. tsukubaensis ZJU01, que incrementa la producción de tacrolimus un 30 % y un 100 %, respectivamente (Chen y col., 2012).

• Estudios metabólicos

Los estudios metabólicos permiten ganar información sobre la fisiología del microorganismo y detectar dianas de manipulación. Ya que la inactivación o sobreexpresión de un gen puede afectar a otras rutas metabólicas y al crecimiento del microorganismo, muchos investigadores apuestan por los estudios a nivel global. En *S. tsukubaensis* se han realizado dos estudios de este tipo: en uno de ellos se generó un modelo metabólico con ayuda de la anotación del genoma y se comprobó el efecto de las dianas predichas (Huang y col., 2013a; 2013b) y en el segundo se realizó un seguimiento de varios metabolitos en medios de cultivo de alta y baja producción para identificar aquellos que presentan una mejor correlación con la producción de tacrolimus (Xia y col., 2013). Ambos trabajos, que se describen a continuación, coinciden en que la estimulación de la ruta PP y del ciclo TCA se correlaciona positivamente con la producción de tacrolimus.

a) Construcción de modelos metabólicos a escala genómica

El modelo realizado en S. tsukubaensis D852 incluye 865 reacciones químicas y 621 metabolitos (Huang y col., 2013a). Como dianas de sobreexpresión o inactivación que no afectan al crecimiento se eligieron gdhA y ppc y pntAB, zwf2, dahp y accA2, respectivamente (ver figura 1.18). La predicción fue acertada en todos los casos y el incremento de la producción de tacrolimus se relacionó con: 1) un incremento de los niveles intracelulares de eritrosa-4-fosfato (mediante la sobreexpresión de zwf2), 2) la acumulación de α -cetoglutarato, fumarato y succinato (mediante la inactivación de *qdhA*), 3) la acumulación intracelular de piruvato y fosfoenolpiruvato (debido a la inactivación de ppc), 3) la generación de poder reductor en forma de NADPH (mediante la sobreexpresión de pntAB y zwf2 y la inactivación de gdhA), 4) la formación de corismato (mediante la sobreexpresión de dahp) y 5) la estimulación de la acumulación intracelular de malonil-CoA (resultado de la sobreexpresión de accA2). Las dianas propias de la ruta biosintética identificadas fueron *fkbO, fkbL, fkbP, fkbM* y *fkbD*, implicados en la formación de la unidad iniciadora DHCHC, de pipecolato y en reacciones de modificación. Todas ejercieron un efecto positivo sobre la producción, si bien la sobreexpresión de *fkbL* y *fkbP* redujo el crecimiento debido al desvío de la lisina hacia la producción en detrimento de la formación de biomasa.

Al igual que ocurre con la adición de precursores, la combinación de sobreexpresiones y/o inactivaciones puede tener efectos negativos sobre la producción, lo que evidencia que el conocimiento de las interacciones entre rutas o mecanismos reguladores es clave para la mejora de la producción.

b) Estudios metabolómicos

Los estudios metabolómicos permiten determinar qué metabolitos se acumulan y cuales son limitantes a lo largo del cultivo, con la finalidad de diseñar estrategias para incrementar la producción del compuesto de interés (Dietmair y col., 2012). La comparación

de las concentraciones de metabolitos en medios de cultivo de composición similar pero de diferente productividad en *S. tsukubaensis* TJ-04, indicó que el más correlacionado con la producción es el metilmalonil-CoA y que existe una correlación positiva entre el consumo de lactato y piruvato del medio y la producción de tacrolimus y también con los niveles intracelulares de ácidos del ciclo TCA (oxalacetato, citrato, 2-cetoglutarato y, especialmente, succinil-CoA y acetil-CoA; Xia y col., 2013).

En el medio de alta producción existe una mayor concentración de metabolitos de la glucólisis en el caldo de cultivo (a excepción del lactato y del piruvato), mientras que los niveles intracelulares de metabolitos de la ruta PP son más bajos que en el medio de baja producción. Los niveles intracelulares de aminoácidos son mayores en el medio de alta producción (excepto los aromáticos) y se reducen drásticamente durante la producción de tacrolimus, ya que el catabolismo aminoacídico es una fuente precursora de ácidos grasos (Tang y col., 1994).

• Adaptación secuencial a concentraciones altas de tacrolimus

La cepa productora de tacrolimus de mayor producción obtenida desde el inicio de los estudios de mejora hasta la actualidad se ha obtenido por este método (972 mg/l con respecto a los 10 mg/l indicados por Kino y col. en 1987). Consiste en la realización de rondas de adaptación a medios de cultivo que contienen concentraciones de tacrolimus crecientes (Jung y col., 2009).

• Barajado genómico

Esta técnica se ha aplicado satisfactoriamente en *S. tsukubaensis* TJ-01 pero no ha sido efectiva en *S. tsukubaensis* D852 (Du y col., 2014). El estudio comienza a partir de mutantes generados mediante radiación ultravioleta o exposición a NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) que son seleccionados por resistencia a los precursores de tacrolimus malonato disódico y metilmalonato disódico. El proceso de barajado genómico consiste en la fusión de protoplastos de las cepas de mayor producción. Las colonias resultantes se seleccionan por resistencia a tacrolimus en el medio de cultivo y aquellas que incrementan la producción se someten a una nueva ronda de barajado genómico. De este modo, partiendo de una cepa que produce 30.5 mg/l se alcanzaron los 366 mg/l.

Los análisis transcriptómicos en esta cepa superproductora indicaron un aumento de la transcripción de todos los genes estructurales de la agrupación, especialmente de *fkbC*, lo que sugiere un papel crítico de la sintasa de policétido FkbC en la producción. También se sobreexpresan los reguladores *fkbN* y *fkbR* (a lo largo de todo el cultivo) y el regulador *afsR* (4-5 veces más). Además *fkbABC* y *fkbP* presentan una activación temprana.



Figura 1.18. Origen de los precursores de tacrolimus y de sus análogos estructurales en el metabolismo primario. Modificado de Huang y col. (2013a).

I.5.3.3. Búsqueda de nuevos antibióticos análogos de tacrolimus

La producción de variantes de tacrolimus es importante por dos razones: aumentar su potencia y reducir sus efectos secundarios, como es, por ejemplo, la posibilidad de desarrollar cáncer como consecuencia de tratamientos tópicos prolongados (Kim y col., 2013). Las estrategias desarrolladas se basan en la combinación de la inactivación de genes con la adición de nuevos precursores al medio de cultivo, o bien en la incorporación de subagrupaciones para la síntesis de nuevas unidades extendedoras.

Un análogo importante es el 36-metil-FK506, que promueve el crecimiento de las neuritas aunque presenta menor actividad inmunosupresora (Mo y col., 2011). Se obtuvo por primera vez mediante la inactivación de *tcsB* y la adición de 4-metilpentanoato (Mo y col., 2011). Posteriormente se ha conseguido producirlo sin necesidad de realizar adiciones al sustituir la agrupación de alilmalonil-CoA de *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP por un operón de biosíntesis de isobutirilmalonil-CoA que procede de una especie marina de *Streptomyces* productora de ansalactama A (Lechner y col., 2012). Otros ejemplos son el 31-desmetoxi-FK506, obtenido mediante la inactivación de *fkbO* y la adición de ácido trans-4-hidroxiciclohexanocarboxílico (Kim y col., 2013) o el 32-deshidroxi-FK506, obtenido mediante la inactivación de ácido 3-ciclohexan-1-carboxílico (Ban y col., 2013b). Este último no presenta actividad inmunosupresora pero si neuroregenerativa.

I.6. Objetivos

1- Determinar qué fuentes de carbono producen represión por catabolito de carbono de la producción de tacrolimus en *Streptomyces tsukubaensis*.

2- Analizar la respuesta transcripcional a la adición de dichas fuentes de carbono.

3- Determinar el efecto transcripcional de la adición de N-acetilglucosamina en medios de cultivo ricos.

4- Identificar genes codificantes de 6-fosfofructoquinasas en *S. tsukubaensis* y estudiar el efecto de su deleción sobre la producción de tacrolimus.

5- Estudiar el efecto de la inactivación del regulador *fkbN* sobre el transcriptoma de *S. tsukubaensis*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS



II.1. Cepas utilizadas

II.1.1. Cepas de Escherichia coli

Clonación	
DH5α (Hanahan, 1983)	Esta cepa se utilizó en clonaciones habituales, ya que presenta una gran eficiencia de transformación (hasta 5 · 10 ⁸ ufc/µg ADN plasmídico), bajas tasas de recombinación genética (gen <i>recA</i>) y permite obtener preparaciones de plásmidos de gran calidad al ser deficiente en actividad endonucleasa (gen <i>endA</i>). La mutación <i>hsdR17</i> evita la digestión del ADN clonado por el sistema endonucleasa <i>EcoK</i> . Además, la deleción en el gen <i>lacZ</i> (β-galactosidasa) permite seleccionar por color las colonias transformantes siempre que se utilice un vector que complemente dicha mutación y se añada a las placas el análogo de la lactosa X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido). <i>F</i> ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 thi-1 recA1 relA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r_{κ}^{-} , m_{κ}^{+}) gyrA96 supE44 λ^{-} phoA
XL1-Blue [®] , Stratagene (Bullock y col., 1987)	Esta es la cepa hospedadora de la genoteca en SuperCos1 de S. tsukubaensis NRRL 18488. Se utilizó en clonaciones habituales, con una eficiencia de transformación $\geq 1 \cdot 10^8$ ufc/µg de ADN plasmídico. Como la anterior, presenta bajas tasas de recombinación genética, deficiencia en actividad endonucleasa y permite la selección de colonias transformantes por color. <i>lac [F' proAB lacl^qZAM15 Tn10(Tet^R)] thi-1 recA1 relA1 endA1</i> <i>hsdR17 gyrA96 supE44</i>
XL10-Gold® Ultracompetent cells, Stratagene	Esta cepa de gran eficiencia de transformación ($\geq 5 \cdot 10^9$ ufc/µg ADN plasmídico según el fabricante), es especialmente útil para la clonación de plásmidos de gran tamaño, gracias al fenotipo Hte. Es deficiente en todos los sistemas de restricción conocidos, en actividad endonucleasa y en sistemas de recombinación. Además es compatible con el sistema de selección de colonias por color. Tet ^R Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacl ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^R)
	Tet ^R Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi- recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F´ proAB lacl ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^R Amy Cam ^R]

Cepa de gran eficiencia de transformación [(1-3) · 10⁹ ufc/μg pUC19] utilizada en la clonación de plásmidos de gran tamaño y cromosomas artificiales. Permite la transformación con ADN metilado o no y la selección de colonias por color. Es deficiente en las actividades endonucleasa y recombinasa y en sistemas de restricción. Además es resistente al fago T1 (gen *fhuA*).

> Δ (ara-leu) 7697 araD139 fhuA Δ lacX74 galK16 galE15 e14- ϕ 80dlacZ Δ M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)

Cepas relacionadas con el ReDirect[©] y la conjugación intergenérica

Esta cepa se utilizó en el sistema ReDirect[®] ya que permite la transformación con ADN lineal (imposible en otras bacterias debido al sistema exonucleasa *recBCD*). El casete de resistencia en forma de ADN lineal y el cósmido que contiene el gen objeto de la mutación se introducen por electroporación (ver apartado II.7.13.4; pág. 137). El plásmido pIJ790 (que contiene el gen de resistencia a cloranfenicol *cat*) incorpora la tecnología λ RED (genes *gam, bet, exo*) que se induce en presencia de L-arabinosa y promueve la recombinación entre el ADN lineal y el cósmido. Además, presenta un origen de replicación termosensible que facilita su pérdida mediante incubación de las células portadoras a 37 °C.

 $lacl^{q} rrnB_{T14} \Delta lacZ_{WJ16} hsdR514 \Delta araBAD_{AH33} \Delta rhaBAD_{LD78}$

Esta cepa se utilizó como donadora de ADN en los procesos de conjugación intergenérica *Escherichia-Streptomyces*, ya que carece de un sistema de metilación funcional (*dam⁻*, *dcm⁻*, *hsd*). Así, se evita la acción de los sistemas de restricción específicos de ADN metilado de *Streptomyces* sobre el ADN transferido. El vector pUZ8002 (Sia y col., 1996; Paget y col., 1999), no movilizable, actúa en *trans* facilitando la transferencia desde *E. coli* a *Streptomyces* de un vector que contenga *oriT*. La cepa se cultiva en presencia de cloranfenicol y de kanamicina para mantener la mutación *dam⁻* y el plásmido pUZ8002, respectivamente.

F dam 13::Tn9 dcm 6 hsdM hsdR recF143 zjj-201::Tn10 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtli glnV44

BW25113/pIJ790 (Datsenko y Wanner, 2000) Esta cepa se utilizó para transferir la agrupación biosintética de tacrolimus (FK506) contenida en el cromosoma artificial de 130 kb PAC20N a *S. coelicolor*. PAC20N confiere resistencia a tioestreptona (gen *tsr*), kanamicina (gen *kan*) y ampicilina (gen *bla*) y el plásmido guía pR9406 confiere resistencia a carbenicilina.

II.1.2. Cepas de Streptomyces

Streptomyces tsukubaensis NRRL 18488 (Kino y col., 1987a)	Cepa silvestre procedente del Agricultural Research Culture Collection International Depository de Estados Unidos. Fue aislada en 1986 por la compañía Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., (Japón) y en sus caldos de cultivo se detectó por primera vez el tacrolimus (FK506). Es la cepa parental de la mayoría de las cepas utilizadas industrialmente para la producción de este inmunosupresor.
Streptomyces tsukubaensis ΔfkbN (Goranovic γ col., 2012)	Mutante obtenido a partir de <i>S. tsukubaensis</i> NRRL 18488 en el que una amplia región del gen del regulador positivo específico de la agrupación de tacrolimus <i>fkbN</i> se ha sustituido por un casete de resistencia a kanamicina. En este trabajo se utilizó para realizar un estudio transcriptómico comparativo respecto a la cepa silvestre.
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145 (Kieser y col., 2000)	Cepa utilizada en el estudio de la expresión heteróloga de la agrupación biosintética de tacrolimus de <i>S. tsukubaensis</i> , procede de <i>S. coelicolor</i> A3(2) y carece de los plásmidos SCP1 y SCP2, por lo que no sintetiza metilenomicina. Produce los antibióticos pigmentados actinorrodina y undecilprodigiosina y el péptido no pigmentado CDA.
Streptomyces coelicolor M145/pLUX-glpQ1 (Santos-Beneit y col., 2009b)	Cepa utilizada en el estudio de expresión controlada de PhoP, procede de <i>S. coelicolor</i> M145 y presenta integrada la construcción pLUX- <i>glpQ1</i> , que permite valorar la actividad del promotor de <i>glpQ1</i> mediante el sistema testigo <i>luxAB</i> .

Streptomyces
coelicolor INB201/
pLUX-glpQ1 (Santos-
Beneit y col., 2009b)Cepa utilizada en el estudio de expresión controlada de PhoP.
Procede de S. coelicolor INB201 (cepa M145 donde phoP ha sido
sustituido por un casete de resistencia a apramicina; Santos-Beneit y
col., 2009a) y presenta integrada la construcción pLUX-glpQ1, que
permite valorar la actividad del promotor de glpQ1 mediante el
sistema testigo luxAB.Cepa utilizada en los estudios de expresión heteróloga de la

Streptomyces coelicolor ∆pfkA2 (Borodina y col., 2008) agrupación biosintética de tacrolimus de *S. tsukubaensis*. Deriva de *S. coelicolor* M145 donde *pfkA2* ha sido reemplazado por un casete de resistencia a apramicina. El gen *pfkA2* codifica la enzima 6-fosfofructoquinasa principal de *S. coelicolor* y su deleción incrementa el flujo metabólico a través de la ruta de las pentosas fosfato (PP) y la biosíntesis de antibióticos pigmentados (Borodina y col., 2008).

II.1.3. Cepas de otros microorganismos

Saccharomyces cerevisiae TB23 (Breuder y col., 1994; Arndt y col., 1999) Esta cepa se utilizó en la valoración semicuantitativa de tacrolimus por bioensayo, pues es sensible a tacrolimus (también a ciclosporina A, CsA).

MATα p° ilv5 ura3 leu2 :: hisG (CsA^s FK506^s)

II.2. Cultivo y conservación de microorganismos

En este apartado se presentan condiciones generales de cultivo. En función de las cepas y protocolos desarrollados, se añadieron a los medios de cultivo antibióticos u otros aditivos. Por lo general, el volumen de medio de cultivo no excedió 1/5 del volumen del matraz para asegurar una buena aireación.

II.2.1. Cultivo y conservación de cepas de Escherichia coli

Cultivo en medio líquido. Las distintas cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB a 37 °C (excepto *E. coli* BW25113/pIJ790, que se cultivó a 30 °C) durante aproximadamente 16 horas. Se utilizaron matraces lisos y agitación orbital a 250 r.p.m.

Cultivo en medio sólido. Se utilizaron placas de LA (agar al 2 % p/v) y se incubaron a 37 °C de un día para otro.

Conservación. para períodos cortos de tiempo (2-3 semanas) las cepas se mantuvieron en placas protegidas con *parafilm* a 4 °C, mientras que la conservación a largo

plazo se realizó en forma de suspensiones en glicerol al 20 % (v/v) congeladas a -80 $^{\circ}$ C o -20 $^{\circ}$ C.

II.2.2. Cultivo y conservación de cepas de Streptomyces

II.2.2.1. Cultivo de Streptomyces

Cultivo en medio líquido. Cuando la finalidad del cultivo fue obtener micelio (por ejemplo, para la extracción de ADN total) se utilizó TSB. Con este medio se alcanzó un crecimiento adecuado a las 24 horas en el caso de *S. coelicolor* y a las 48 horas en el de *S. tsukubaensis*.

Como medio de producción de tacrolimus se utilizó siempre MGm-2.5. Los cultivos de *S. tsukubaensis* se inocularon con esporas a una concentración final de 10^7 /ml y se incubaron durante 240 horas; mientras que en el caso de *S. coelicolor*, los cultivos se inocularon con una concentración final de esporas de 10^6 /ml y se incubaron durante 120 horas. En los cultivos de *S. coelicolor* no destinados a la producción heteróloga de tacrolimus se utilizó MG-3.2, que se diferencia de MGm-2.5 en que el almidón es de marca Scharlau en vez de Difco[™]. En todo caso el volumen de cultivo utilizado fue de 100 ml.

Los cultivos de *S. tsukubaensis* se realizaron en matraces lisos de 0.5 l y tapón metálico, a 28 °C y 220 r.p.m., en incubadores agitadores de 25 mm de órbita. Los cultivos de *S. coelicolor* se realizaron a 30 °C y 300 r.p.m. en los mismos incubadores, pero en matraces con hendiduras (también con tapón metálico y de la misma capacidad) para mejorar la oxigenación del cultivo y evitar que el micelio forme grumos.

Cultivo en medio sólido. Se realizó a 28 ºC o a 30 ºC según se tratase de *S. tsukubaensis* o de *S. coelicolor*, respectivamente. Para obtener micelio o sembrar diluciones seriadas (para la titulación de esporas) se utilizó TSA, ya que el crecimiento es óptimo en 48 horas en ambas especies.

Como medios de esporulación se utilizaron ISP4 (*S. tsukubaensis*) o TBO (*S. coelicolor*). En el caso de *S. coelicolor* INB201/pLUX-*glpQ1* la esporulación se llevó a cabo en medio TBO al que se adicionó una solución de Pi 1 M de manera que la concentración final de Pi fuese de 30 mM (ver formulación en el apartado II.3.2; pág. 95).

II.2.2.2. Conservación de Streptomyces

Las placas sembradas (TSA, ISP4 o TBO) se almacenaron selladas con *parafilm* a 4 °C por un período máximo de 2 semanas.

La conservación de las cepas a largo plazo se realizó en forma de suspensión de esporas en glicerol al 20 % (v/v). Los viales se almacenaron a -20 °C para conservarlos durante algunos meses y a -80 °C para su conservación a largo plazo o cuando se necesitaba mantener la viabilidad de las esporas al máximo; por ejemplo, cuando éstas se utilizaron como inóculo de una fermentación.

La manipulación de los viales de esporas se realizó siempre en hielo para no romper la cadena de frío y evitar así la germinación de las esporas.

• Preparación de suspensiones de esporas

Siempre se partió de una colonia aislada para obtener suspensiones de esporas, especialmente en el caso de *S. tsukubaensis*, que presenta una gran inestabilidad genética. Cuando se sembraron colonias aisladas de esta cepa en ISP4 aparecieron siempre colonias blancas (~ 5 %-10 %) e incluso colonias calvas. Ya que estos fenotipos podían reflejar mutaciones no deseadas, se seleccionaron siempre colonias de morfología gris (consideradas de fenotipo silvestre) para preparar las suspensiones de esporas.



Figura 2.1. Heterogeneidad morfológica de *S. tsukubaensis* NRRL 18448 en ISP4. A) Colonias calvas (rojizas), blancas y grises. B) Siembra por agotamiento tras varias rondas de aislamiento de una colonia gris. Como se puede observar siempre aparece una pequeña proporción de colonias blancas.

En el caso de *S. tsukubaensis*, la colonia elegida se sembró en una placa de TSA (se empleó toda la superficie) y se incubó a 28 °C durante 48 horas. El micelio obtenido se recogió con un bastoncillo y se sembró en ISP4. La relación micelio/superficie de ISP4 sembrada y su distribución homogénea resultaron ser factores clave para obtener un buen césped de esporulación. Por lo general, con las esporas de cada placa de TSA se sembraron 9 placas de ISP4.

En el caso de *S. coelicolor*, las colonias se sembraron en un área de 4 cm² en TSA y se incubaron a 30 °C durante 48 horas. El crecimiento no fue continuo como en el caso de *S. tsukubaensis*, sino que se produjo en forma de colonias independientes incrustadas en el agar. Éstas se recogieron y se sembraron en 3 placas de TBO (dependiendo de la cantidad de colonias obtenidas) tras disgregarlas con el bastoncillo.

Cuando las placas presentaron un césped de esporas (11-13 días para *S. tsukubaensis* y 5-7 días para *S. coelicolor*), se recogieron de acuerdo al protocolo presentado a continuación (adaptado de Kieser y col., 2000). El proceso se realizó en campana de flujo laminar, con material estéril y sin romper la cadena de frío.

Protocolo:

Colocar una punta de pipeta de 5 ml que contenga algodón hidrófobo sobre un tubo de 10 ml, encastrando una punta de una pipeta de 1 ml como sujeción. El tubo de 10 ml sobre el que se eluye la suspensión de esporas debe mantenerse en hielo.

- 2. Verter 1-3 ml de agua estéril sobre la placa y raspar con un bastoncillo la superficie, evitando arrastrar restos de agar y micelio.
- 3. Recoger la suspensión de esporas y filtrarla a través del algodón hidrófobo contenido en la punta de 5 ml para eliminar fragmentos de micelio o agar.
- 4. Centrifugar la solución eluida durante 5 min a 4 ºC y 2300 × g.
- 5. Retirar el sobrenadante rápidamente para evitar que las esporas se resuspendan. Este paso permite eliminar restos de componentes del medio, factores de crecimiento, etc.
- 6. Añadir glicerol al 20 % (v/v) y agitar con vortex para resuspender el precipitado de esporas. Una concentración final de esporas de 10⁹/ml es adecuada si se desea utilizar la preparación para iniciar una fermentación con resultados reproducibles. En caso de que las esporas se vayan a utilizar inmediatamente se pueden resuspender en agua estéril.
- 7. Almacenar a -20 °C o -80 °C.
- Titulación de las suspensiones de esporas

La titulación de las esporas se realizó mediante siembra de diluciones seriadas (p. ej., de 10^{-5} /ml a 10^{-9} /ml) en TSA (en presencia de antibióticos en su caso). Las diluciones se realizaron en agua ya que las esporas son muy resistentes al estrés osmótico. Las placas se incubaron durante 48 horas a 28 °C (*S. tsukubaensis*) o 30 °C (*S. coelicolor*).

Cuando la estimación del título se realizó de forma aproximada, se utilizó el valor DO_{450} para *S. tsukubaensis* o DO_{640} para *S. coelicolor* (figura 2.2). La relación entre DO_x y ufc/ml fue determinada experimentalmente a partir de diluciones seriadas de viales de esporas de título conocido (Dr. Antonio Rodríguez García, comunicación personal).

- Para S. tsukubaensis: $1 \text{ DO}_{450} = 3.17 \cdot 10^8 \text{ ufc/ml}$
- Para S. coelicolor: $1 DO_{640} = 1.67 \cdot 10^8 ufc/ml$



Figura 2.2. Representación del título de esporas frente a la DO_{450} (*S. tsukubaensis*) o DO_{640} (*S. coelicolor*). Deben utilizarse diluciones cuyo valor de DO no supere 1.2, ya que a partir de este valor se pierde la relación de linealidad entre variables.

II.2.3. Cultivo y conservación de otros microorganismos

S. cerevisiae TB23 se cultivó en medio YPD (sólido o líquido) a 30 °C y de un día para otro. Los cultivos en medio líquido se incubaron a 250 r.p.m. en matraces lisos durante 16 horas.

Para su conservación se prepararon suspensiones de glicerol al 20 % (v/v) que se almacenaron a -20 °C o a -80 °C. Esta cepa es muy frágil y los viales almacenados a -20 °C pierden toda su viabilidad en 3-4 meses, por lo que se hacía necesario refrescarlos con frecuencia.

II.3. Medios de cultivo utilizados

Todos los medios de cultivo descritos se prepararon con agua destilada de grado I (Milli-Q, para medios MG) o de grado II (resto de medios). Las cantidades de cada componente vienen referidas a la preparación de un litro de medio.

Los medios se esterilizaron en autoclave o en olla a presión (120 ºC durante 20 minutos) en función de la termosensibilidad de sus componentes.

II.3.1. Medios de cultivo para Escherichia coli

LB (Luria-Bertani; Miller, 1972): medio genérico para el crecimiento de *E. coli*. La composición está modificada a partir de la presentada por Sambrook y Russell (2001), donde el pH se ajusta a 7. Para preparar su versión sólida (LA) se añaden 20 g de agar por litro (2 % p/v).

Triptona 10 g
NaCl 10 g
Extracto de levadura 5 g
Ajustar el pH a 7.5 con NaOH 1N

TB (Terrific Broth; Tartoff y Hobbs, 1987): medio líquido para el crecimiento de *E. coli.* El crecimiento es mayor que en medio LB, por lo que se aplicó especialmente a los cultivos cuya finalidad fue la obtención de ADN plasmídico por minipreparación. La composición aquí indicada se ha tomado de Sambrook y Russell (2001).

Extracto de levadura 24 g	
Triptona12 g	
Glicerol 4 ml	
Añadir agua hasta 900 ml y esterilizar en autoclave	
Cuando se ha enfriado (60 ºC o menos), añadir 100 ml de una s	solución
K ₂ HPO ₄ 720 mM y KH ₂ PO ₄ 170 mM	

Soluciones:

 K_2HPO_4 **720 mM y KH_2PO_4 170 mM** (100 ml): 12.54 g de K_2HPO_4 y 2.31 g de KH_2PO_4 en agua. Esterilizada por autoclavado.

SOB (Hanahan, 1983): medio líquido utilizado para la preparación y transformación de células competentes de *E. coli*. La formulación es una adaptación de la descrita por Sambrook y Russell (2001) que difiere en la utilización de KOH 5 M en vez de NaOH 5 M para el ajuste del pH.

Triptona20 g Extracto de levadura......5 g NaCl.....0.5 g Agitar hasta que se disuelva y añadir 10 ml de KCl 250 mM. Ajustar el pH a 7 con KOH 5 M y enrasar con agua hasta 1 litro. Esterilizar y añadir 5 ml de una solución de MgCl₂ 2 M.

Soluciones:

KCl 250 mM (100 ml): 1.86 g de KCl en agua.

MgCl₂ 2 M (100 ml): 19 g de MgCl₂ en agua. Esterilizar en autoclave.

Para preparar medio SOC, se deja enfriar el medio una vez esterilizado y se añaden 10 ml de una solución de glucosa 2 M esterilizada por filtración.

II.3.2. Medios de cultivo para Streptomyces

TSB (Tryptone Soya Broth; Kieser y col., 2000): medio genérico para el crecimiento rápido de *Streptomyces*. Adaptado de Kieser y col. (2001).

Triptona soja agar	30 g
Ajustar el pH a 7.2.	

Para su utilización como medio sólido (TSA) se añaden 20 g/l de agar (2 % p/v).

TBO (Tomato Broth Oat; Higgens y col., 1974): medio sólido utilizado para la esporulación de *S. coelicolor*.

Concentrado de tomate	.20 g
Copos de avena	.20 g
Agar	.25 g
Ajustar el pH a 6.5 con NaOH 1 N.	

ISP4 (International *Streptomyces* Project Medium 4; Shirling y Gottlieb, 1966): medio sólido comercial (Difco[™]) utilizado para la esporulación y la conjugación intergenérica de *S. tsukubaensis.*

Se prepara diluyendo 37 g de medio en un litro de agua. El pH queda comprendido en un intervalo de 7.2 \pm 0.2. Puesto que los azúcares se caramelizan con facilidad, este medio se esteriliza en olla a presión durante 15 minutos tras los que se retira la olla del hornillo

eléctrico a la poyata para asegurar un descenso rápido de la temperatura. A continuación se detalla su composición:

Almidón soluble	10 g
Na ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄	1 g
NaCl	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
CaCO ₃	2 g
Agar	20 g
FeSO ₄	0.001 g
MnCl ₂	0.001 g
ZnSO ₄	0.001 g

2×TY (Sambrook y Russell, 2001): aunque originalmente se trata de un medio de cultivo de *E. coli*, se utiliza para la germinación de las esporas de *Streptomyces* mediante choque térmico en el protocolo de conjugación.

Triptona	16 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g
Ajustar el pH a 7.2 con KOH 1 N.	

Agar nutritivo (American Public Health Association, 1917): medio comercial genérico para el cultivo de microorganismos. En nuestro caso se utilizó el de Difco^M (DNA) para comprobar el fenotipo de los exconjugantes sembrados en R2 sin sacarosa tras la conjugación intergenérica para la introducción de la agrupación biosintética de tacrolimus en las cepas de *S. coelicolor* M145 y $\Delta pfkA2$.

El medio se prepara disolviendo 23 g de preparado en un litro de agua. A continuación se detalla la composición aproximada según el fabricante:

Extracto de carne 3 g	
Peptona5 g	
Agar 15 g	

Harina de soja-manitol (MS; Hobbs y col., 1989): medio sólido utilizado en el protocolo de conjugación intergenérica de *E. coli* con *S. coelicolor*.

Manitol	20 g
Harina de soja	20 g
Agar	20 g
	20 8

Debe disolverse en primer lugar el manitol y posteriormente, añadir los otros componentes. Se recomienda autoclavar dos veces, agitando vigorosamente entre las dos rondas (Kieser y col., 2000). Antes de verter el medio fundido en las placas se adiciona MgCl₂ a una concentración final de 10 mM.

R2 sin sacarosa (Okanishi y col., 1974; Hopwood y Wright, 1978): medio utilizado para sembrar los exconjugantes obtenidos tras la conjugación intergenérica para la introducción de la agrupación biosintética de tacrolimus en *S. coelicolor* M145 y Δ*pfkA2*.

K₂SO₄0.25 g	
MgCl ₂ · 6H ₂ O10.12 g	
Glucosa10 g	
Casaminoácidos (Difco™)0.1 g	
Enrasar con agua hasta 800 ml	
Hacer alícuotas de 80 ml, agregar 2.2 g de agar y autoclavar	

Antes de que se solidifique el medio (o antes de utilizarlo, previamente fundido) se añade a cada alícuota de 80 ml las siguientes soluciones esterilizadas en el siguiente orden:

KH ₂ PO ₄ (0.5 %)	1 ml
CaCl ₂ · 2H ₂ O (3.68 %)	8 ml
L-prolina (20 %)	1.5 ml
Tampón TES	10 ml
Solución de elementos traza	0.2 ml
NaOH 1N	0.5 ml

Soluciones:

Tampón TES: preparado al 5.73 %, pH 7.2.

Solución de elementos traza (por litro): 40 mg de ZnCl₂; 200 mg de FeCl₃· 6H₂O; 10 mg de CuCl₂· 2H₂O; 10 mg de MnCl₂· 4H₂O; 10 mg de Na₂B₄O₇· 10H₂O y 10 mg de (NH₄)₆Mo₇O₂₄· 4H₂O en agua.

MGm-2.5 (Martínez-Castro y col., 2013): es el medio utilizado para las fermentaciones de estudio de la producción de tacrolimus. La composición básica de este medio fue desarrollada por Doull y Vining (1989) con el nombre de MG, aunque los autores probaron varias formulaciones del medio con distintas fuentes de carbono y nitrógeno. El grupo del Dr. Martín adoptó este medio con la formulación almidón-glutámico para los análisis de transcriptómica y proteómica de la regulación por fosfato en *S. coelicolor* (Rodríguez-García y col., 2007). En posteriores trabajos del grupo se establecieron dos formulaciones del Contenido de fosfato, una que fuese limitante y otra que resultase en un exceso. Ambas formulaciones del MG contienen almidón de la marca Scharlau. En 2013, Martínez-Castro y colaboradores comprobaron que el almidón de la casa Difco™ confiere una mayor producción de tacrolimus en los cultivos de *S. tsukubaensis*. La denominación MGm-2.5 indica, por una parte, que es la formulación modificada con almidón Difco™ y, por otra, que contiene una concentración final del Pi añadido de 2.5 mM (limitante del crecimiento).

Disolver 50 g de almidón Difco[™] lentamente en 500 ml de agua muy caliente antes de añadir el resto de los componentes:

MgSO ₄ · 7H ₂ O0.2	2 g
CaCl ₂ 9 mM	L ml
NaCl 17 mM	1 ml
MOPS ácido (grado titration)22	lg

Elementos traza 10 ×	0.45 ml
Ácido glutámico	8.83 g
КОН 5 М	2.5 ml
Dejar enfriar hasta 25 ºC y ajustar	el pH a 6.5 con NaOH 10 M (> 6 ml).
Hacer alícuotas de 100 ml y esteri	lizar en olla 15 minutos a 121 ºC.

La concentración del ión K⁺ en el medio debe ser de 15 mM, de manera que cuando se va a añadir Pi a una concentración final de 2.5 mM, el pH se ajusta con KOH para que haya una concentración final de K⁺ de 12.5 mM en la base. Por el contrario, si se desea añadir una concentración de Pi de 15 mM, no se añade KOH en la base.

Soluciones:

CaCl₂ 9 mM (100 ml): 0.18 ml de una solución CaCl₂ 5 M y 99.82 ml de agua.

MOPS y ácido glutámico de Sigma.

Solución de elementos traza: se prepara concentrada 100 veces (100 ×) respecto de la concentración de elementos en el medio, se filtra y se diluye en agua 10 veces para lograr la concentración en la que se adiciona (10 ×). A continuación se detallan los componentes para preparar 10 ml de solución de elementos traza 100 ×:

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.039 g
H ₃ BO ₃	0.0057 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.0037 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.0061 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.885 g

Antes de inocular el medio de cultivo añadir:

FeSO ₄ 32 mM 0.1 ml	
Solución de Pi 1M 0.25 ml	

Soluciones:

FeSO₄ 32 mM (10 ml): 0.089 g de FeSO₄ en agua. Esterilizar por filtración.

Solución de Pi 1 M -KH₂PO₄ 0.68 M y K₂HPO₄ 0.32 M- (100 ml): 9.25 g de KH₂PO₄ y 5.57 g de K₂HPO₄ en agua. Esterilizar en autoclave.

Debido a la importancia de este medio de cultivo en el desarrollo de esta tesis doctoral la concentración final de los principales componentes se muestra en la tabla 2.1.

	Componente	Concentración Fin
_	MgSO ₄	0.8 mM
_	CaCl ₂	9 μM
_	NaCl	17 µM
_	MOPS ácido	100 mM
_	Almidón	5 %
_	Ácido glutámico	60 mM
_	NaOH	Según ajuste pH
_	КОН	12.5 mM
_	FeSO ₄	32 μM
	KH ₂ PO ₄ +K ₂ HPO ₄	2.5 mM

Та

Componente Concentración Fir				
Elementos traza				
CuSO ₄	0.7 μM			
H ₃ BO ₃	0.4 μM			
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.013 μM			
MnSO ₄	0.163 μM			
ZnSO ₄	14 µM			

II.3.3. Medios de cultivo para otros microorganismos

YPD (Lodder, 1970): medio utilizado para el crecimiento de *S. cerevisiae* TB23 tanto en cultivo líquido como en sólido. Para obtener medio sólido se añaden 20 g/l de agar (2 % p/v).

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

II.3.4. Aditivos de los medios de cultivo

II.3.4.1. Antibióticos

Las suspensiones de antibióticos (tabla 2.2) se esterilizaron con filtros de diámetro de poro 0.22 μ m, a excepción de aquellos preparados en solventes orgánicos que no se esterilizaron. Se almacenaron a -20 °C.

Tabla 2.2. Antibióticos utilizados, solventes empleados, concentraciones iniciales de las soluciones madre, concentraciones finales de uso para selección y casa comercial proveedora.

Antibiótico	Solvente	Conc. inicial	Conc. final	Casa comercial
A. nalidíxico	NaOH 0.15 M	25 mg/ml	25 μg/ml	Sigma
Apramicina	Agua Milli-Q	50 mg/ml	50 μg/ml	Sigma
Kanamicina	Agua Milli-Q	100 mg/ml	50 μg/ml	Sigma
Cloranfenicol	Etanol	25 mg/ml	25 μg/ml	Aldrich
Neomicina	Agua Milli-Q	100 mg/ml	60 µg/ml	Sigma
Ampicilina ¹	Agua Milli-Q	200 mg/ml	100 µg/ml	Reig Jofre
Tioestreptona	DMSO	50 mg/ml	60 µl/ml	Calbiochem
Carbenicilina	Agua Milli-Q	50 mg/ml	50 μg/ml	Sigma
Anhidrotetraciclina	DMSO	10 mg/ml	1 µg/ml	Acros organics
Tacrolimus ²	Metanol 50 %	5 mg/ml		

¹La ampicilina fue adquirida en forma de preparado farmacéutico Britapen[®]. ²El tacrolimus fue cedido por Antibióticos S.A.

II.3.4.2. Fuentes de carbono

En la tabla 2.3 se detallan las fuentes de carbono utilizadas en los estudios de regulación de la producción de tacrolimus en *S. tsukubaensis*. Todas ellas se prepararon en agua destilada previamente calentada y se esterilizaron en olla durante 15 minutos exactos

para evitar su caramelización, a excepción de la N-acetilglucosamina que se esterilizó por filtración.

Tabla 2.3. Fuentes de carbono empleadas y casa comercial proveedora. GlcNAc: N-acetilglucosamina.

Fuente de Carbono	Casa comercial
D-Fructosa	Merck
Glicerol	Prolabo
Manitol	Prolabo
Maltosa monohidratada	SAFC (Sigma)
Glucosa monohidratada	LAISA
Sacarosa	NormaPUR
Lactosa monohidratada	Rectapur
Xilosa	Sigma
GlcNAc	Sigma

II.4. Equipamiento y reactivos

En este apartado se detallan los equipos (tabla 2.4), materiales y reactivos utilizados en el desarrollo de este trabajo así como las casas comerciales de procedencia.

II.4.1. Equipamiento de laboratorio

Centrífugas	Aplicación
5415R (refrigerada) y 5415D (Eppendorf)	Microtubos de 0.2, 1.5 o 2 ml
RC 5B Plus (Sorvall)	Tubos GSA y GS3
Allegra [®] X-22R y Allegra [®] 21R (Beckman	Tubos de 50 ml
Coulter). Rotor SX4250.	
GS-15 R (Beckman Coulter). Rotor S4180.	Tubos de 10 ml
Arcones orbitales	Aplicación
G25 Incubator Shaker (New Brunswick	Cultivos de El coli
Scientific Co. Inc)	
C25KC Incubator Shaker (New Brunswick	Cultivos de S. coelicolor y de S. cerevisiae TB23
Scientific Co. Inc)	
Refrigerated Forma™ Orbital Shaker (modelo	Cultivos de S. tsukuhaensis
480-481) (Thermo Scientific)	
-	
Estufas	Aplicación
Estufas	Aplicación Incubación de cultivos en medio sólido
P-Selecta	Aplicación Incubación de cultivos en medio sólido Desecación de muestras para medida del peso
P-Selecta	Aplicación Incubación de cultivos en medio sólido Desecación de muestras para medida del peso seco
Estufas P-Selecta Equipos HPLC	Aplicación Incubación de cultivos en medio sólido Desecación de muestras para medida del peso seco Aplicación
Estufas P-Selecta Equipos HPLC Sistema Agilent (columna Zorbax SB-C18	Aplicación Incubación de cultivos en medio sólido Desecación de muestras para medida del peso seco Aplicación
Estufas P-Selecta Equipos HPLC Sistema Agilent (columna Zorbax SB-C18 3.5 μm)	Aplicación Incubación de cultivos en medio sólido Desecación de muestras para medida del peso seco Aplicación Cuantificación de tacrolimus
Estufas P-Selecta Equipos HPLC Sistema Agilent (columna Zorbax SB-C18 3.5 μm) Espectrofotómetros	Aplicación Incubación de cultivos en medio sólido Desecación de muestras para medida del peso seco Aplicación Cuantificación de tacrolimus Aplicación
Estufas P-Selecta Equipos HPLC Sistema Agilent (columna Zorbax SB-C18 3.5 μm) Espectrofotómetros	Aplicación Incubación de cultivos en medio sólido Desecación de muestras para medida del peso seco Aplicación Cuantificación de tacrolimus Aplicación Concentración y pureza de soluciones de ADN
Estufas P-Selecta Equipos HPLC Sistema Agilent (columna Zorbax SB-C18 3.5 μm) Espectrofotómetros NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific)	Aplicación Incubación de cultivos en medio sólido Desecación de muestras para medida del peso seco Aplicación Cuantificación de tacrolimus Aplicación Concentración y pureza de soluciones de ADN y ARN
Estufas P-Selecta Equipos HPLC Sistema Agilent (columna Zorbax SB-C18 3.5 μm) Espectrofotómetros NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific)	Aplicación Incubación de cultivos en medio sólido Desecación de muestras para medida del peso seco Aplicación Cuantificación de tacrolimus Aplicación Concentración y pureza de soluciones de ADN y ARN Crecimiento de cultivos de <i>E. coli</i>
Estufas P-Selecta Equipos HPLC Sistema Agilent (columna Zorbax SB-C18 3.5 μm) Espectrofotómetros NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) HITACHI U-2900	Aplicación Incubación de cultivos en medio sólido Desecación de muestras para medida del peso seco Aplicación Cuantificación de tacrolimus Aplicación Concentración y pureza de soluciones de ADN y ARN Crecimiento de cultivos de <i>E. coli</i> Titulación de esporas de Streptomyces

Tabla 2.4. Equipamiento de laboratorio y usos principales.

Equipos utilizados en estudios	Anlicación		
transcriptómicos	Aplication		
Agitador FastPrep [®] FP220A (MP Biomedicals)	Rotura mecánica del micelio		
Equipo Bioanalyzer 2100 con kit RNA Nano 6000 Agitador IKA con adaptador para chips (Agilent)	Integridad de muestras de ARN		
Termobloque Serie QB (Grant)	Incubación a altas temperaturas		
Horno de hibridación HIR 10M (Grant Boekel)	Hibridación de micromatrices		
Escáner de micromatrices G2565BA (Agilent)	Lectura de micromatrices		
Equipo MxPro-Mx3005P (Agilent) Centrífuga 5804R (Eppendorf)	RT-qPCR		
Otros dispositivos	Aplicación		
Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis Systems y fuente de alimentación PowerPac™ 300 (Bio-Rad)	Electroforesis de ADN en gel de agarosa		
VacuGene™ Pump y VacuGene™ XL Blotting Unit (GE Healthcare)	Transferencia de ADN de geles de agarosa a membranas de nitrocelulosa		
Stratalinker [®] UV Crosslinker 2400 (Stratagene [®])	Fijación del ADN a membranas de nitrocelulosa		
Cubetas de electroforesis y fuentes de alimentación	Electroforesis en gen de agarosa		
Gene Pulser® II Electroporation System y cubeta ShockPod™ (Bio-Rad)	Electroporación de células de E. coli		
ABI PRISM [®] 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)	Secuenciación de ADN		
Termosicladores Taradient (Piemetra)	PCR		
	Incubación en microtubos de 0.2 ml		
Termobloque Thermomixer [®] 5436 (Eppendorf)	Incubación en microtubos de 1.5 ml-2 ml		
Agitador horizontal PROMAX 1020 y vibrador Reax-Top (Heidolph)	Incubación en agitación/mezcla		
Luminómetro Sirius V4.2 (Berthold Technologies)	Medida actividad luciferasa		
SpeedVac™ SC110 (Savant)	Concentración de muestras		
Baño Ultrasons (Selecta)	Tratamiento de diluciones de esporas		
Baño con equipo termostático Tectron Bio	Transformación química de E. coli		
(Selecta)	Tratamiento por calor		
Transiluminador ECX-26M (Vilber Lourmat) y cámara fotográfica TM-300 (Pulnix)	Revelado de electroforesis en gel de agarosa tratado con bromuro de etidio		
Agitador magnético ATE (VELP Scientifica) Medidor de pH 537 (WTW)	Preparación de medios de cultivo y aditivos		

II.4.2. Reactivos específicos para biología molecular

II.4.2.1. Enzimas

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron adquiridas a las casas comerciales New England BioLabs, MBI Fermentas y Takara. Otras enzimas de utilización general fueron las siguientes:

- Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E. coli (Roche)
- ADN polimerasa del fago T4 (Fermentas)
- ADN ligasa del fago T4 (Roche)
- Fosfatasa antártica (New England BioLabs)
- Lisozima (Fluka)
- Ribonucleasa A de páncreas bovino libre de ADNasas (ARNasa, Sigma)
- Proteinasa K (Merck)
- ADN polimerasa GoTaq[®] (Promega)
- ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion[®] (New England BioLabs)
- ADN polimerasa de alta fidelidad Hybrid[®] (EURx)
- ADN polimerasa de alta fidelidad Q5[®] (New England BioLabs)
- Retrotranscriptasa del sistema comercial AffinityScript[™] QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent)
- Retrotranscriptasa SuperScript[®] III (Invitrogen)
- ADN polimerasa SureStart[™] Taq incluida en el sistema comercial Brilliant II SYBR[®] Green QPCR Master Mix (Agilent)
- Fragmento Exo-Klenow incluido en el kit BioPrime[®] Array CGH Genomic Labeling Module (Invitrogen)
- ADNasa I del sistema comercial TURBO DNA-free[™] (Ambion)
- ADNasa I del sistema comercial RNase-Free DNase Set (Qiagen)

II.4.2.2. Marcadores de peso molecular

Por lo general, se utilizó el marcador 1 kb Plus DNA Ladder^M (Invitrogen), que presenta fragmentos de ADN de 100 pb a 12 kb. Se diluyó en tampón TE (ver apartado II.7.1.1; pág. 113) a una concentración final de 50 ng/µl, de manera que al cargar 7 µl en un gel, la banda de 1650 pb presenta una cantidad de aproximadamente 30 ng de ADN.

En el protocolo de hibridación *Southern* se utilizó un marcador comercial marcado con digoxigenina, el DNA Molecular Weight Marker II Digoxigenin-labeled (Roche). Presenta fragmentos de ADN de 125 pb a 23 kb, correspondientes al ADN del fago λ digerido con HindIII. Se utilizaron 10 µl por gel (100 ng de ADN).

II.4.2.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo (tabla 2.5) fueron proporcionados por la casa comercial Sigma-Aldrich, excepto en el caso de los cebadores empleados en el sistema ReDirect[©], que se encargaron a Bonsai Technologies. Para el diseño de cebadores con los que amplificar ADN de *Streptomyces* se utilizó el programa VectorNTi[®] Advance 10.3.0 (Life Technologies) atendiendo a las siguientes directrices en la medida de lo posible:

- Tamaño mínimo de 18 nt.
- Diferencia de Tm ≤ 5 °C entre los componentes de la pareja y, en el caso de oligonucleótidos utilizados para secuenciar, que estuviera en el rango de 45 °C-50 °C.
- Presencia de 2 o 3 A/T en el pentámero 3' y que el último nucleótido fuese G/C.
- Pentámero 5' rico en G/C.
- Idealmente se eligieron parejas de cebadores que no formasen horquillas internas o hibridaciones dentro de y entre ellos y se descartaron aquellos en los que se daba alguna de estas estructuras con una energía libre inferior a -5 kcal/mol.

Cuando fue necesario incorporar puntos de corte para enzimas de restricción se siguieron las directrices de la casa comercial New England BioLabs en cuanto a la eficiencia de corte en el extremo de moléculas lineales.

El diseño de cebadores específicos para RT-qPCR se detalla en el apartado II.8.4.2 (pág. 156).

Para obtener diluciones de los cebadores de concentración conocida, tras resuspender el contenido del vial en agua Milli-Q, se determinó la absorbancia a 260 nm y se aplicó la siguiente fórmula:

Concentración (
$$\mu$$
M) = A_{260nm} · E · 1000/PM

En esta fórmula E representa el coeficiente de extinción molar, que viene indicado, al igual que el peso molecular (PM), por la casa fabricante.

Tabla 2.5. Oligonucleótidos utilizados: secuencia, Tm, puntos de restricción y uso. Las Tm son las indicadas por la casa fabricante. En el caso en que se haya incorporado un sitio de restricción se indica su secuencia subrayada y el nombre de la enzima.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm	Cortes	Uso
CMOA1F	CGGGACGGTGTGGAACTGGC	61.9	-	Rastreo <i>pfkA3</i>
CMOA1R	CGTTGGAGAGCTGGCGGG	58.8	-	Rastreo <i>pfkA3</i>
CMOA2F	CGAGGGCTCCATGGACTACC	55.7	-	Rastreo <i>pfkA2</i>
CMOA2R	CCTCGTTCATCCGGTCCG	55.9	-	Rastreo <i>pfkA2</i>
CMOA3R	ACCACCTCGCCGTCCTT	52.4	-	Rastreo <i>pfkA1</i>
CMOA3F	CCGCCGTATCAAGGACAACC	56.6	-	Rastreo <i>pfkA1</i>
CMOA4F	ACGGGCCGGGCAAGAGTAGG	64.5	-	Comprobación <i>pfkA2::</i> Am ^R
CMOA4R	ACGATACCTCCGTCGGTGCGCTAAG	64	-	Comprobación <i>pfkA2::</i> Am ^R
CMOA5F	TCGCCGATCTGCTGCTGAAG	60	-	Comprobación Δ <i>pfkA3</i>
CMOA5R	ACATCGCCAGCAGTACGGTCAG	61.4	-	Comprobación Δ <i>pfkA3</i>

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm	Cortes	Uso
CMOA6F	TCACGATTAGCGTGACGGTCCTAGG	61.7	-	Comprobación Δ <i>pfkA1</i>
CMOA6R	CACACGCGGCTTCGAGTTCC	61.3	-	Comprobación Δ <i>pfkA1</i>
RDpfkA2R	GGGCCCCGGTCGGGGGGGTACGGTCGGGCGGGCGAG GTCATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	94.9	-	ReDirect [©]
RDpfkA2F	TCAAACGTCCCATTGACGAGCAGGAGACACAGCGCG ATGATTCCGGGATCCGTCGACC	91	-	ReDirect [©]
RDpfkA1R	CCCGACCACCCGTAGCCGTCAGGCCCCTCGCGCCGT CATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	93.7	-	ReDirect [©]
RDpfkA1F	GGTCCTAGGGCTCATCTGGCGAAGGGATTTCTTCTCA TGATTCCGGGATCCGTCGACC	87.2	-	ReDirect [©]
RDpfkA3R	CTGCGGCCGGGGGGGGGGGTTCAGGGTGCGCGTACGG GCTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC	93.6	-	ReDirect [©]
RDpfkA3F	CGGGAGTCGGCCCACGTTGCAAAGGTAATTCGGGCA ATGATTCCGGGATCCGTCGACC	91.1	-	ReDirect [©]
CMO36	CGAAAGGGGGATGTGCTG	56.2	-	Secuenciación pUC19
CMO54	TATA <u>GAATTCATGTACA</u> GGGGCAGGGCACGGAAGTC	65.4	EcoRI, BsrGI	Síntesis F1 pfkA1
CM055	GATT <u>GGTACC</u> CTGGATGCCGAGCGGAAC	65.9	Kpnl	Síntesis F1 pfkA1
CMO56	TATA <u>GGTACC</u> CACGCCATCGACGCCGTAC	65.7	Kpnl	Síntesis F2 pfkA1
CM057	GGAG <u>TCTAGA</u> GCAACGGAGTACGGGGAG	64.3	Xbal	Síntesis F2 pfkA1
CM058	GCTA <u>GGATCC</u> GTGGAGACGCTCAAGACC	65	BamHI	Síntesis F1 pfkA3
CM059	GTCA <u>TCTAGA</u> GCCACCGCCATCGTCACC	65.4	Xbal	Síntesis F1 pfkA3
CM060	GATT <u>GGATCC</u> GTGGAAGCCGATGACCTC	64	BamHI	Síntesis F2 pfkA3
CM061	CTAT <u>GAATTC</u> G <u>TGTACA</u> ACATCGTGGCTGTGGGAC	63.9	EcoRI, BsrGI	Síntesis F2 pfkA3
CMO80	GCAC <u>TCTAGA</u> CCCACTGCTCATTCTGTC	61.9	Xbal	Amplificación <i>glpX</i> para plB139
CM081	TATT <u>GAATTC</u> CGCCGAGGAGAAGAAGAC	59.9	EcoRI	Amplificación <i>glpX</i> para pIB139
CMO83	GGCGTCCAGGTCTGCAAG	59	-	Comprobación Δ <i>pfkA1</i>
CMO84	GAAGGCGAGGATCTCCATG	55.1	-	Comprobación Δ <i>pfkA1</i>
CM085	TCGAAGCCGAAGGTGTAGTC	56.6	-	Comprobación Δ <i>pfkA1</i>
CMO86	GCCAGATAGGCGTTGTAC	53	-	Comprobación Δ <i>pfkA3</i>
CM087	GAGAACCGAGAAAGGCTAC	52.5	-	Comprobación Δ <i>pfkA3</i>
CMO88	TCGTTGTCGATGGTCTTC	51.9	-	Comprobación Δ <i>pfkA3</i>
DIRECTO	GTAAAACGACGGCCAGT	47.6	-	Secuenciación pUC19

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm	Cortes	Uso
REVERSO	GGAAACAGCTATGACCATG	47.1	-	Secuenciación pUC19
T3-cos	CCCGCAATTAACCCTCACTAAAG	55.9	-	Secuenciación SuperCosl
T7-cos	CATAATACGACTCACTATAGGGA	45.4	-	Secuenciación SuperCosl
CMOq40	TCAACGCCGTCAGCGGAATC	60.4	-	qPCR pfkA2
CMOq41	TGGATCTCGCCGCAGTTCTC	59.6	-	qPCR <i>pfkA2</i>
CMOq42	TCTCCTACATGCTCCGCAAAGAG	58.7	-	qPCR phoP
CMOq43	ATCAGGTCGAGAAGGACGAGATC	57.7	-	qPCR phoP
CMOq44	GCAACCTCGCCCTCGAACTC	60.8	-	qPCR <i>glpX</i>
CMOq45	TCCGCGCCGTTCTTGTCTC	60.4	-	qPCR <i>glpX</i>
CMOq89	GGTTCCTCGCGCACCAATC	59.3	-	qPCR <i>pfkA1</i>
CMOq90	GTGTCGAAGCCGAAGGTGTAG	57.8	-	qPCR <i>pfkA1</i>
CMOq91	CCGGTCTGAACGCCGTCATC	60.7	-	qPCR <i>pfkA3</i>
CMOq92	CCAGGTCGAGCTTGCGGTAATC	60.1	-	qPCR <i>pfkA3</i>
CMOq93	CTCGCCACCACGACCAAATC	58.8	-	qPCR <i>crp</i>
CMOq94	CCGTCGCCCACGGTGTAG	61.1	-	qPCR <i>crp</i>
CMOq95	GGACCGGCCCGTTCTGATAG	60	-	qPCR <i>fkbN</i>
CMOq96	CGGTCAGCACGATGGAGATAC	57.4	-	qPCR <i>fkbN</i>
CMOq97	GCTGTTCGCCGAGGAGAAAC	58.7	-	qPCR <i>hrdA</i>
CMOq98	AGACCACGAGCCGCAGATTC	59.8	-	qPCR <i>hrdA</i>
CMOq99	AACACCGGCTTCCTGCTCATC	60	-	qPCR amtB
CMOq100	GGACCATGCCTCCGTAGAAGAAG	59.2	-	qPCR amtB
CMOq101	CCACACCGTCGCGGTCTAC	60.7	-	qPCR <i>gltD</i>
CMOq102	GCGGTTGATGTGCACCTTCTC	58.9	-	qPCR <i>gltD</i>
CMOq103	CCGCAATATGATCGGCCAGTAC	58	-	qPCR <i>metF</i>
CMOq104	GCGACACCGACGCAGAAG	59.2	-	qPCR <i>metF</i>
CMOq105	CGGTGAGCGTGGGCTTCATC	61.1	-	qPCR <i>gyrB</i>
CMOq106	GCCGTCGGCGAGGATAGTC	60.3	-	qPCR <i>gyrB</i>
				Amplificación
CAR106	AGGT <u>TCTAGA</u> GTGACCCGAGTGCTCGTCGTC	68.6	Xbal	<i>phoP</i> para
				pTCP-2-phoP
	ΤΤΑGACTAGTATGCATCCGTACGAACGCAGAGCGAA			Amplificación
CAR108	G	70.6	Spel	<i>phoP</i> para
	.			pTCP-2-phoP

II.4.2.4. Sistemas y formulaciones comerciales

En el desarrollo de este trabajo se emplearon los sistemas y reactivos comerciales indicados en la tabla 2.6.

Tabla 2.6. Sistemas comerciales empleados en esta tesis y su aplicación en el trabajo.

Purificación de fragmentos de ADN	Aplicación
Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)	Extracción de fragmentos de ADN de hasta 10 kb de geles de agarosa Purificación de digestiones enzimáticas
QIAEX [®] II Gel Extraction Kit (Qiagen)	Extracción de fragmentos de ADN de gran tamaño (40 pb-50 kb) de geles de agarosa

MinElute [®] PCR Purification Kit (Qiagen)	Purificación de fragmentos de ADN de 70 pb-4 kb Purificación de reacciones enzimáticas, en especial marcajes de ADNg y ADNc con Cy™-5 y Cy™-3 utilizados en transcriptómica
Purificación de plásmidos de <i>E. coli</i>	Aplicación
	Extracción de plásmidos de ciertas cepas de
	<i>E. coli</i> en las que no se obtiene una buena
NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel)	preparación de plásmido mediante lisis
	alcalina, como la ET12567/pUZ8002
Illustra™ PlasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare)	Extracción de ADN plasmídico de E. coli
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit (Qiagen)	Extracción de cósmidos de <i>E. coli</i> XL1-Blue®
Marcaje de fragmentos de ADN con digoxigenina	Aplicación
DIG DNA Labeling Kit (Roche)	Marcaje de sondas de ADN con digoxigenina
DNA Molecular Weight Marker II Digoxigenin- labeled (Roche)	Marcador de pesos moleculares marcado con digoxigenina
Experimentos con micromatrices	Aplicación
Solución RNaseZap [®] (Ambion)	Limpieza de superficies y material destinado a ARN
RNAprotect [®] Bacteria Reagent (Qiagen)	Estabilización de ARN
RNase-Free DNase Set (Qiagen) RNeasy® Mini Kit (Qiagen)	Purificación de ARN a partir de micelio
Lysing Matrix B (MP Biochemicals)	Ruptura mecánica del micelio
Aquaphenol™ (MP Biomedicals)	Prepurificación del lisado de micelio
SuperScript [®] III Reverse Transcriptase	
(Invitrogen) Random primers (Invitrogen) Deoxynucleotide (dNTP) Solution Set (New England BioLabs) Cy [™] -3-dCTP (GE)	Retrotranscripción del ARN para formar ADNc marcado con Cy [™] -3
NaOH 1.0 N y HCl 1.0 N (Sigma)	Hidrólisis del ARN tras la retrotranscripción
BioPrime® Array CGH Genomic Labeling Module (Invitrogen) Cy [™] -5-dCTP (GE)	Marcaje de ADNg con Cy [™] -5
RNA 6000 Nano Kit y RNA Nano Chip (Agilent)	Análisis de la integridad de las muestras de ARN
Micromatrices en formato 8 × 15 K Cubres con gomas (Hybridization Gasket Slide Kit - 8 microarrays per slide format) Microarray Hybridization Chamber Kit Gene Expression Wash Buffer Kit Stabilization & drying solution (Agilent)	Hibridación, lavado, estabilización y secado de las micromatrices
Experimentos RT-qPCR	Aplicación
TURBO DNA-free [™] Kit (Ambion)	Digestión del ADN de muestras de ARN
AffinityScript™ QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent)	Síntesis de ADNc
Brilliant II SYBR [®] Green QPCR Master Mix (Agilent)	Amplificación por PCR e incorporación del fluoróforo para cuantificación

Aplicación
Limpieza de soluciones de ácidos nucleicos por
fenolización
Secuenciación de ADN

II.5. Vectores utilizados

pUC19 (Yanisch-Perron y col., 1985): se utilizó para la clonación habitual de fragmentos de ADN. Es un plásmido de 2.7 kb, con origen de replicación en *E. coli* (*colE1*) que se presenta en multicopia. Contiene una parte del gen *lacZ* que codifica un fragmento amino terminal de la β-galactosidasa y que, además, incluye un sitio de clonación múltiple con 11 puntos de corte únicos. Esto permite la selección por color de colonias transformantes en las cepas de *E. coli* que contengan la mutación *lacZ*Δ*M15* si se añade a las placas de cultivo IPTG (inductor del promotor de *lacZ*) y X-Gal (análogo de la lactosa). Las colonias que no presentan inserto experimentan la α-complementación del gen *lacZ* y aparecen azules, ya que en la hidrólisis de X-Gal se libera un compuesto que al oxidarse genera un precipitado de color azul. Por el contrario, aquellas colonias que presentan inserto son blancas, ya que no se da la α-complementación y el gen *lacZ* no es funcional. Cabe destacar que en caso de que el inserto sea de pequeño tamaño y se introduzca respetando el marco de lectura, pueden aparecer colonias positivas de color azul.

SuperCos-1 (Evans y col., 1989): es el vector en el que se construyó la genoteca de *S. tsukubaensis* NRRL 18488 (Martínez Castro, 2011). Tiene un tamaño de 7.9 kb y presenta el origen de replicación *colE1*. Se caracteriza por permitir la inserción de fragmentos de ADN de 30 a 42 kb, gracias a la presencia de secuencias *cos*. Contiene los genes *bla* y *neo* (de resistencia a neomicina y kanamicina) y las secuencias promotoras de los bacteriófagos T3 y T7 flanquean el sitio único de clonación BamHI.

pIJ774 (Khodakaramian y col., 2006): es el vector del que se extrajo el casete de resistencia a apramicina utilizado en el sistema ReDirect[©]. Dicho casete incluye el origen de transferencia (*oriT*) y el gen de resistencia a apramicina (*aac(3)IV*) flanqueados por secuencias *loxP*. Las secuencias *loxP* son dianas de la recombinasa Cre que permiten eliminar el casete de resistencia en un paso posterior. Tiene un tamaño de 4.3 kb, origen de replicación *colE1* y gen *bla*.

pMP301 (Dubeau y col., 2009): este vector de selección negativa se utilizó como estrategia alternativa al ReDirect[®] para obtener mutantes en *S. tsukubaensis*. Es un vector conjugativo de 3.6 kb que presenta origen de transferencia (*oriT*), gen de resistencia a kanamicina (*neoA*) y *codA(s)*, que codifica una citosina desaminasa. Esta enzima (EC 3.5.4.1) desamina la citosina para convertirla en uracilo como parte de la ruta de rescate de pirimidinas. Sin embargo, también transforma la 5-fluorocitosina en 5-fluorouracilo, compuesto tóxico para la célula. De este modo, los recombinantes simples no pueden crecer en presencia de 5-fluorocitosina, pero sí pueden hacerlo las cepas recombinantes dobles y las cepas silvestres.

pMG201m (Dubeau y col., 2009): este vector no conjugativo se utilizó para extraer la versión mejorada del gen de la citosina desaminasa que contiene y clonarla en pMP301. El gen *codA(sm)* presenta una mutación puntual (D314A) que permite reducir las concentraciones efectivas de 5-fluorocitosina en el medio de selección.

pKC1139 (Bierman y col., 1992): este vector conjugativo se utilizó como estrategia alternativa al ReDirect[©] para la obtención de mutantes en *S. tsukubaensis.* Tiene un tamaño de aproximadamente 6.7 kb, *oriT*, gen *aac(3)IV*, un origen de replicación termosensible derivado de pSG5 y es compatible con el sistema de selección por color de *lacZ*.

pAV11b (Jyothikumar y col., 2012): este vector se utilizó en la construcción de vectores de sobreexpresión controlada por anhidrotetraciclina. Se trata de un plásmido conjugativo de 7 kb que contiene el promotor sintético controlable por tetraciclina *tcp830*, el gen *tetRiS* (codifica el represor TetR con el uso de codones adaptado para *Streptomyces*), el gen de resistencia a higromicina *hyg* y la integrasa y el sitio *attP* de *qBT1*. El promotor inducible *tcp830* permite la expresión controlada del gen de interés mediante la adición al cultivo de anhidrotetraciclina, análogo de la tetraciclina con una mínima actividad antibiótica (Rodríguez-García y col., 2005).

pMB1neo (Vicente y col., 2009): vector utilizado para extraer el gen de resistencia a kanamicina del transposón Tn5 (*aphII*) para la construcción de vectores de expresión controlada. Tiene un tamaño de 2.6 kb y presenta el origen de replicación de *E. coli* pMB1. Deriva del vector pTC192-Km (Rodríguez-García y col., 2006) al que se ha eliminado el gen *bla*. Éste a su vez se obtuvo a partir de pTC192 (De La Fuente y col., 1994), que es básicamente un pUC19 con el sitio de clonación modificado, al que se introdujo dicho gen de resistencia a kanamicina procedente del vector pULVK2 (Kumar y col., 1996).

pIB139 (Wilkinson y col., 2002): este vector se utilizó en la sobreexpresión de *glpX* en *S. tsukubaensis*. Se trata de un vector integrativo de 5.8 kb resultado de la clonación del promotor fuerte constitutivo *ermE** (derivado del promotor de *ermE* de *Saccharopolyspora erythraea*) en el vector pSET-152. Como derivado de pSET-152 presenta el sistema de integración ϕ C31, el origen de replicación de pUC18, el *oriT* de RK2 (plásmido no movilizable) y el gen *aac(3)IV*.

pLUX-glpQ1 (Santos-Beneit y col., 2009b): este vector, contenido en las cepas de *S. coelicolor* M145/pLUX-glpQ1 e INB201/pLUX-glpQ1, permitió comprobar la expresión controlada de *phoP* por anhidrotetraciclina en el vector pTCP-2-phoP. Es un vector de 9.7 kb integrativo en *Streptomyces* (ϕ C31) y replicativo en *E. coli*. Contiene los genes de resistencia *neo* y *aac*(3)/V y el promotor de glpQ1 de *S. coelicolor* M145 acoplado al sistema testigo *luxAB*.
II.6.1. Medida del crecimiento en cultivo líquido

II.6.1.1. Medida del crecimiento en cultivos de E. coli

La valoración del crecimiento se realizó mediante determinación de la DO_{600} del cultivo. Aunque la relación entre la DO_{600} y la cantidad de células viables por mililitro de cultivo varía entre cepas, se consideró en general que 0.4 unidades de DO_{600} equivalen a 10^8 células/ml (Sambrook y Rusell, 2001).

II.6.1.2. Medida del crecimiento en cultivos de Streptomyces

El crecimiento se valoró como peso seco correspondiente a un mililitro de cultivo. La recogida de la muestra se realizó con puntas de pipeta cortadas con un diámetro de orificio de 1.5 mm. Esto resultó fundamental para obtener una muestra representativa de los cultivos de esta bacteria micelial, sobre todo en el caso de *S. coelicolor*, que tiende a formar más agregados que *S. tsukubaensis*.

Para ello se recogieron 1 ml-2 ml de cultivo en tubos previamente tarados, se recogió el precipitado mediante centrifugación durante 10 minutos a velocidad máxima (13 200 r.p.m.) y se lavó con agua destilada dos veces (resuspensión mediante agitación en *vortex*). Tras desecar el precipitado en estufa a 80 °C durante 3 días, se pesaron los tubos en balanza de precisión. El peso seco se indicó en mg/ml de cultivo.

II.6.2. Estimación de la concentración de fosfato inorgánico en el medio de cultivo de *Streptomyces*

El protocolo seguido es un método modificado del descrito por Lanzetta y col. (1979). Se basa en la formación de un complejo entre el molibdato de amonio y el ortofosfato (Pi) presente en la muestra en presencia de ácido sulfúrico. A su vez, la interacción fosfomolibdato-verde malaquita genera un compuesto cuya máxima absorbancia se da a 660 nm. La adición de citrato en el protocolo evita la formación de nuevo complejo fosfomolibdato-verde malaquita a partir del Pi liberado con posterioridad, lo que estabiliza la reacción y por tanto, aumenta la reproducibilidad de la medida.

La concentración de Pi en la muestra problema se determinó con ayuda de una recta patrón realizada con concentraciones de entre 0 y 15 μ M de KH₂PO₄.

^{1.} Mezclar las soluciones de verde malaquita y molibdato de amonio en proporción 3:1 y dejar en agitación 30 min a temperatura ambiente.

^{2.} Centrifugar 10 min a 6000 r.p.m. y filtrar con filtros de diámetro de poro 0.2 $\mu m.$

^{3.} Anadir 1 μ l de Tween 20 al 10 % (p/v) por cada ml de la mezcla anterior justo antes de usarla.

^{4.} Añadir 400 μl de la solución anterior a 50 μl de muestra, mezclar y dejar 1 min (si las muestras presentan un precipitado blanquecino deben calentarse previamente en baño a 56 ºC hasta que desaparezca).

- 5. Añadir 50 μl de la solución de citrato de sodio al 34 %. Mezclar y dejar 30 min a temperatura ambiente.
- 6. Medir la absorbancia a 660 nm.

Soluciones:

Verde malaquita: 0.045 % de verde malaquita en agua.

Molibdato de amonio: molibdato de amonio al 4.2 % en HCl 4 N. Preparación de HCl 4 N (100 ml): 33.12 ml de HCl 37 % en 66.88 ml de agua.

Citrato de sodio al 34 % (100 ml): 38.74 g de citrato de trisodio dihidrato $[HOC(COONa)(CH_2COONa)_2 \cdot 2H_2O]$ en agua.

Tween 20 al 10 % p/v (100 ml): 10 g de Tween 20 en agua.

II.6.3. Valoración de tacrolimus en los medios de cultivo de *Streptomyces*

La valoración de la producción de tacrolimus se realizó mediante dos métodos diferentes en función de la precisión requerida: el bioensayo con *S. cerevisiae* TB23 se utilizó en la detección cualitativa, mientras que la cuantificación precisa se realizó mediante cromatografía HPLC. En ambos casos el paso previo fue la extracción del tacrolimus del caldo de cultivo con metanol.

II.6.3.1. Extracción de tacrolimus con metanol

Protocolo:

- Recoger 1 ml-2 ml de cultivo en un tubo de 10 ml y añadir un volumen de metanol de grado HPLC.
- 2. Agitar horizontalmente durante 1 h a 140 r.p.m.
- 3. Centrifugar durante 10 min a velocidad máxima y 4 ºC para precipitar restos de micelio.
- 4. Recoger el sobrenadante en un tubo de 2 ml. Las muestras se almacenan a -20 ºC hasta su análisis (se pueden analizar inmediatamente).

NOTA: el metanol grado HPLC se adquirió a Fisher Scientific.

Durante el almacenamiento a -20 ºC puede aparecer un precipitado blanquecino. Para evitar arrastrar impurezas se centrifugaron las muestras 10 minutos a velocidad máxima antes de cargar los viales de HPLC o los pocillos de la placa de bioensayo.

II.6.3.2. Valoración cualitativa mediante bioensayo con S. cerevisiae TB23

El bioensayo permite detectar la presencia de un compuesto biocida en una muestra al inhibir el crecimiento del organismo sensible, que en medio sólido se manifestará en forma de halos de inhibición del crecimiento alrededor del punto en el que se añade la muestra con el biocida. Las cepas de *S. cerevisiae* que se utilizan normalmente en los laboratorios no son sensibles a tacrolimus, ya que no precisan de la calcineurina para el crecimiento vegetativo; sin embargo la cepa TB23 presenta defectos en la homeostasis iónica que hacen esencial esta enzima (Breuder y col., 1994). Puesto que no solo el tacrolimus, sino también la ascomicina producida por *S. tsukubaensis* presentan actividad antifúngica, este método no evidencia exclusivamente la presencia de tacrolimus en las muestras. Además, el diámetro de halo obtenido no mantiene una relación de proporcionalidad estricta con la concentración de tacrolimus presente, por lo que no es un método cuantitativo. El límite de detección obtenido en estas condiciones de trabajo fue de 150 ng, que corresponde a la aplicación en un pocillo de bioensayo de 80 µl de una solución con 1.875 µg/ml de tacrolimus.

Protocolo:

- 1. Inocular YPD líquido con *S. cerevisiae* TB23 a partir de una suspensión en glicerol al 20 % o de varias colonias crecidas en una placa de YPD sólido.
- 2. Incubar a 30 °C y 250 r.p.m. en matraces lisos durante 16 h.
- 3. Fundir el volumen deseado de YPD sólido (1.5 % de agar) en función de la placa que se vaya a utilizar para el bioensayo y mantenerlo fundido en un baño a 42 ºC. La altura del medio en la placa debe ser de aproximadamente 0.4 cm por lo que para una placa de un diámetro de 15 cm se emplearán 60 ml y para una placa cuadrada de 24.5 cm de lado se utilizarán 250 ml.
- 4. Antes de verter el medio en las placas, añadir un volumen de cultivo tal que la DO_{600} final en la placa sea 0.1: $V_{cultivo} \cdot DO_{600} = (V_{cultivo} + V_{medio}) \cdot 0.1$.
- 5. Agitar suavemente para evitar la formación de burbujas y verter sobre la placa.
- 6. Dejar solidificar durante unos 20 min.
- 7. Realizar los pocillos con un sacabocados de 5 mm de diámetro. En cada pocillo se colocan $80 \ \mu l$ de muestra.
- 8. Dejar la placa en reposo a 4 ºC durante 2 h para permitir la difusión de la muestra.
- 9. Incubar las placas a 30 °C durante 24 h.

NOTA: como control positivo se añadieron cantidades conocidas de tacrolimus disuelto en metanol al 50 % y como control negativo, metanol al 50 %.

II.6.3.3. Cuantificación de tacrolimus mediante HPLC

La cuantificación se realizó con ayuda de un cromatógrafo HPLC de Agilent, que constó de los siguientes componentes:

- Bomba binaria modelo G1312A.
- Autoinyector modelo G1329A-ALS.
- Muestreador automático refrigerado por Peltier modelo G1330B.
- Detector PDA modelo G1315B-DAD.
- Termostatizador modelo G1316A TCC.
- Desgasificador modelo G1379A.

El sistema se equipó con una columna Zorbax SB C18 3.5 μ m (4.6 mm × 150 mm), termostatizada a 60 °C. Se inyectaron 10 μ l de muestra y la longitud de onda seleccionada fue de 210 nm.

La fase móvil estuvo compuesta por dos soluciones: ácido trifluoroacético al 0.01 % en agua Milli-Q (A) y metil tert-butil éter al 20 % en acetonitrilo (B). Se utilizó un flujo de fase móvil de 1.7 ml/min. El programa de gradiente utilizado fue el indicado en la tabla 2.7.

Tiempo (min)	A (%)	В (%)
00:00	57	43
08:50	57	43
08:60	0	100
12:60	0	100
13:00	57	43
17:00	57	43

Tabla 2.7. Método de separación cromatográfica utilizado en la cuantificación de tacrolimus.

NOTA: utilizar metil tert-butil éter de grado HPLC (Merck), metanol grado HPLC (Fisher Scientific), acetonitrilo grado HPLC (Lab-Scan) y ácido trifluoroacético (Merck). Las fases móviles se filtran y se someten a un tratamiento de ultrasonidos durante 20 minutos.

Para la realización de la recta patrón de calibrado (figura 2.3) se prepararon diluciones de concentración conocida de tacrolimus (en el rango de 1.563 a 50 μ g/ml) disuelto en metanol al 50 %. Para este fin, Antibióticos S. A proporcionó una preparación de tacrolimus puro en forma sólida.



Figura 2.3. Patrón de tacrolimus para su cuantificación por HPLC. Cada dilución se valoró dos veces y se obtuvieron resultados prácticamente idénticos (obsérvese que solo se aprecian dos puntos diferentes en la muestra de mayor concentración).

II.6.4. Valoración de la actividad luciferasa en estudios de actividad promotora

La actividad promotora de una secuencia de ADN puede valorarse mediante la utilización de un sistema testigo basado en la actividad luciferasa. En este trabajo se valoró la actividad promotora de un gen del regulón *pho, glpQ1,* por medio del vector pLUX-*glpQ1* (Santos-Beneit y col., 2009b), que presenta los genes estructurales del operón de la luciferasa (*luxAB*) de *Vibrio harveyi* bajo el control del promotor de *glpQ1* de *S. coelicolor*. La reacción catalizada por esta enzima es la siguiente:

 $R-CHO + O_2 + FMNH_2 \rightarrow R-COOH + FMN + H_2O + hv$ (490 nm)

En esta expresión, R es una molécula alifática de al menos 7 átomos de carbono (en nuestro caso el n-decanal), FMN es flavín mononucleótido (proporcionado por las células), FMNH₂ es su forma reducida y *hv* es la energía asociada a un fotón. El sustrato n-decanal penetra instantáneamente en las células vivas y la actividad luciferasa se monitoriza por la emisión de luz. Una sola enzima luciferasa puede generar un fotón de luz en la reacción, por lo que la actividad de 10^5 moléculas de luciferasa puede detectarse en un luminómetro (Olsson y col., 1988).

Protocolo:

- 1. Tomar una muestra de 0.5 ml de cultivo y mantenerla en hielo hasta su valoración.
- En el momento de la medida, el equipo mezcla automáticamente 250 μl de cultivo con 250 μl de n-decanal al 0.1 % (luminómetro Sirius V4.2, Berthold Technologies).
- La medida se realiza con el programa Raw data, se emplea un tiempo de integración de 20 s y 5 s de espera. Las unidades de medida vienen dadas en unidades de luz relativa por segundo (ULR).

II.7. Métodos de manipulación y análisis de ADN

II.7.1. Extracción de ADN plasmídico de Escherichia coli

El protocolo desarrollado dependió de la cantidad de ADN plasmídico requerido.

II.7.1.1. Lisis alcalina

El protocolo empleado es una modificación del descrito por Birnboim y Doly (1979). Fue el método realizado cuando se requirió ADN plasmídico en grandes cantidades.

Durante el proceso el detergente SDS rompe las paredes celulares y desnaturaliza el ADN cromosómico; sin embargo, las cadenas del ADN plasmídico se mantienen unidas debido a su topología. Proteínas, restos de paredes celulares y ADN cromosómico precipitan gracias al efecto del SDS y de los iones Na⁺, mientras que el ADN plasmídico permanece en el sobrenadante. La adición de isopropanol permite precipitar el ADN plasmídico pero también ARN contaminante, que se elimina posteriormente mediante tratamiento con ARNasa. Finalmente, se eliminan los restos proteicos mediante fenolización (ver apartado II.7.3.1; pág. 117) y se precipita de nuevo el ADN para eliminar restos de sales y rediluirlo en el tampón adecuado.

- 1. Cultivar la cepa de *E. coli* en 100 ml de medio TB o LB (con antibióticos en su caso), en matraces lisos, a 37 ºC y 250 r.p.m. durante 16 h.
- 2. Recoger las células mediante centrifugación en tubos de 50 ml durante 10 min a 2300 × g.
- 3. Resuspender el precipitado en 8 ml de GTE.
- 4. Añadir 160 μ l de lisozima 50 mg/ml (concentración final de 1 mg/ml) e incubar 5 min a temperatura ambiente.

- Añadir 16 ml de NaOH/SDS recién preparado, homogeneizar la muestra e incubarla en hielo 10 min.
- 6. Añadir 8 ml de la mezcla acetato potásico-ácido acético fría y agitar vigorosamente.
- 7. Incubar en hielo 4 min.
- Centrifugar 8 min a 4800 r.p.m. y filtrar el sobrenadante a través de un algodón hidrófilo (contenido en una punta de pipeta de 5 ml).
- 9. Precipitar con 0.6 volúmenes de isopropanol (idealmente 0.54 volúmenes) e incubar durante 15 min a temperatura ambiente.
- 10. Centrifugar 5 min a 4800 r.p.m. y descartar el sobrenadante.
- 11. Lavar con 1 ml de etanol al 70 % a temperatura ambiente, resuspender muy bien el precipitado y pasarlo a un tubo de 2 ml.
- 12. Centrifugar 10 min a 13 200 r.p.m.
- 13. Resuspender en 1 ml de tampón TE y añadir 2 μl de ARNasa 10 mg/ml.
- 14. Incubar 30 min a 37 ºC.
- 15. Fenolizar (ver apartado II.7.3.1).
- Precipitar con ¼ volúmenes de acetato amónico 10 M (evita que precipiten nucleótidos tras la digestión con ARNasa) o 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol al 100 %.
- 17. Incubar 30 min-60 min a -20 °C. Debe aparecer un precipitado blanco.
- 18. Centrifugar 10 min a 4800 r.p.m. y 4 ºC.
- 19. Lavar con 1 ml de etanol al 70 % a 4 ºC (no hace falta resuspenderlo).
- 20. Centrifugar 10 min a 4800 r.p.m. y 4 °C, eliminar bien el sobrenadante y dejar que se evapore el etanol.
- 21. Resupender en 40 μl de tampón TE (o agua si se utiliza para secuenciación).

Soluciones:

GTE: 25 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA, pH 8; 50 mM glucosa. Esterilizar en autoclave 15 minutos. **Lisozima**: preparada en solución acuosa a 50 mg/ml.

NaOH/SDS: 0.2 N NaOH; 1 % SDS en agua.

Acetato potásico-ácido acético: 60 % acetato potásico 5 M (estéril); 11.5 % ácido acético glacial y 28.5 % de agua, pH 4.8. Conservar a 4 °C. Esta solución tiene una concentración 3 M y 5 M en potasio y acetato respectivamente.

ARNasa: solución madre preparada a 10 mg/ml en Tris-HCl 10 mM pH 7.5; NaCl 15 mM. Las ADNasas presentes se eliminan por ebullición de la solución durante 15 minutos. Se deja enfriar lentamente y se guarda a -20 °C.

Acetato amónico 10 M o acetato sódico 3 M pH 5.2 preparados en solución acuosa. Tampón TE: Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8.

II.7.1.2. Minipreparaciones de ADN plasmídico

Este método se utilizó principalmente para la extracción de pequeñas cantidades de ADN plasmídico, por ejemplo, cuando se deseaba comprobar por restricción una construcción introducida por transformación en *E. coli*. Es una modificación del descrito por Holmes y Quigley (1981).

- 1. Tomar una colonia con un palillo estéril e inocular un microtubo de 1.5 ml con 0.4 ml de medio TB con los antibióticos requeridos en su caso. Opcionalmente replicar en una placa los cultivos tocando con la punta del palillo.
- 2. Incubar durante 16 h a 37 °C en agitación a 250 r.p.m.

- 3. Precipitar las células mediante centrifugación a velocidad máxima durante 5 min. Retirar bien el sobrenadante para eliminar restos de medio de cultivo.
- 4. Mientras tanto, mezclar STET (vol = 250 μ l · N) y lisozima (vol = 5 μ l · N). N= número de minipreparaciones en microtubo.
- 5. Añadir 250 μl de la solución anterior a cada microtubo y resuspender vigorosamente hasta que la suspensión celular sea homogénea.
- 6. Hervir durante 40 s.
- 7. Centrifugar inmediatamente durante 15 min a velocidad máxima y eliminar con un palillo estéril el precipitado de restos celulares y proteínas.
- Añadir 50 μl de acetato sódico 3 M pH 5.2, agitar y añadir 160 μl de isopropanol. Mezclar y centrifugar a temperatura ambiente durante 15 min a velocidad máxima.
- 9. Eliminar bien el sobrenadante y dejar secar el precipitado al aire para que se evaporen los restos de isopropanol.
- 10. Resuspender en 20 μl de tampón TE o agua.

Soluciones:

STET: 8 % (p/v) sacarosa; 0.5 % (v/v) Tritón X-100; 50 mM EDTA, pH 8; 10 mM Tris-HCl, pH 8 en solución acuosa.

Lisozima: preparada en solución acuosa a 50 mg/ml.

Acetato sódico 3 M pH 5.2: ver apartado II.7.1.1 (pág. 113). TE: ver apartado II.7.1.1 (pág. 113).

Cuando se realizaron digestiones enzimáticas se utilizaron 2.5 µl de la suspensión de ADN plasmídico obtenida. En los casos en los que se pretendía discriminar fragmentos de menos de 500 pb en un gel de agarosa (0.8 %) se añadió al tampón de carga 0.1 µl de una solución de ARNasa 10 mg/ml (ver apartado II.7.1.1; pág. 113).

II.7.1.3. Utilización de sistemas comerciales

Para extraer plásmidos de manera rápida para transformar o para secuenciar se utilizó en ocasiones el sistema comercial Illustra™ PlasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare). Como método alternativo a la lisis alcalina se utilizó el sistema comercial NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

Los cósmidos en SuperCosI pertenecientes a la genoteca de *S. tsukubaensis* y utilizados en el sistema ReDirect[©] se extrajeron de *E. coli* XL1-Blue[®] con el kit QIAprep[®] Spin Miniprep (Qiagen), con algunas modificaciones del protocolo sugerido por el fabricante. Estas preparaciones fueron utilizadas para secuenciación y para transformación.

- Partir del precipitado de 25 ml de cultivo en LB en presencia de los antibióticos necesarios y resuspenderlo en 1.5 ml de tampón P1. Ajustar los volúmenes de los tampones utilizados en pasos posteriores al volumen de partida (1.5 ml) y seguir las indicaciones recomendadas para cósmidos (volúmenes dobles de P2 y N3 y elución en EB a 70 °C). En concreto: adicionar 1 ml de tampón P2 y 1.4 ml de tampón N3 en los pasos correspondientes.
- Eluir con 100 μl de EB a 70 °C, añadir 10 μl de acetato amónico pH 7.5 y 200 μl de etanol al 100 % y dejar precipitar al menos 2 h a -20 °C.
- 3. Transcurrido este tiempo, centrifugar las suspensiones durante 40 min a 4 ºC y a 13 200 r.p.m. en una microcentrífuga.
- 4. Retirar el sobrenadante y realizar un lavado con 200 μ l de etanol al 70 %.

5. Centrifugar las muestras en las mismas condiciones durante 7 min y retirar totalmente el sobrenadante, dejar evaporar los restos de etanol y redilur el precipitado en 20 μl de agua Milli-Q.

NOTA: Los tampones P1, P2, N3 y EB vienen suministrados con el kit.

II.7.2. Extracción de ADN total de Streptomyces

II.7.2.1. Método de salting out

Este método de precipitación con sal (Pospiech y Neumann, 1995) se utilizó para extraer ADN total de *Streptomyces* en grandes cantidades. El ADN aislado se utilizó posteriormente como molde para reacciones de PCR, en digestiones enzimáticas, hibridación de ácidos nucleicos, etc.

Protocolo:

- 1. Inocular con esporas 30 ml de medio TSB en presencia de antibióticos en su caso.
- 2. Incubar en agitación (ver apartado II.2.2.1; pág. 91).
- 3. Recoger el micelio mediante centrifugación a 2300 × g durante 5 min. Retirar el sobrenadante. El precipitado puede almacenarse a -20 ºC hasta su procesamiento.
- 4. Resuspender el micelio en 5 ml de tampón SET y añadir 100 μ L de solución de lisozima 50 mg/ml.
- 5. Incubar a 37 °C durante 30 min-60 min.
- 6. Añadir 140 μ L de proteinasa K (20 mg/ml) y 600 μ L de SDS 10 % y mezclar por inversión.
- 7. Incubar a 55 °C durante 2 h y mezclar por inversión ocasionalmente.
- 8. Añadir 2 ml de NaCl 5 M y mezclar vigorosamente por inversión, dejar enfriar hasta los 37 ºC.
- Añadir 5 ml de cloroformo y mezclar por inversión. Mantener 30 min a 20 ºC invirtiendo el tubo cada cierto tiempo.
- 10. Centrifugar durante 15 min a 4500 × g y 20 °C.
- 11. Transferir el sobrenadante (~ 6 ml) a un tubo limpio y añadir 0.6 volúmenes de isopropanol.
- 12. Mezclar por inversión durante 3 min. Normalmente se forma un ovillo de ADN que se rescata con una pipeta Pasteur sellada.
- 13. Lavar el ADN con etanol al 70 % y dejar secar al aire.
- 14. Rediluir en 0.2 ml-1 ml de tampón TE a 55 °C, en función de la cantidad de material obtenido. Es importante resuspender mediante pipeteo suave, para no romper los cromosomas, especialmente en el caso de que el ADNg vaya a ser empleado en experimentos de hibridación de ácidos nucleicos.

Soluciones:

Tampón SET: 75 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8; 20 mM Tris-HCl pH 7.5.
Lisozima 50 mg/ml: ver apartado II.7.1.2 (pág. 114).
Proteinasa K 20 mg/ml: preparada en Tris-HCl 50 mM pH 8; 1.5 mM de acetato cálcico.
NaCl 5 M: preparado en solución acuosa.
TE: ver apartado II.7.1.1 (pág. 113).

II.7.2.2. Obtención de ADN de esporas mediante hervido para molde de PCR

Para la comprobación de posibles exconjugantes por PCR se optó por hervir un mililitro de agua Milli-Q que contenga 10⁶-10⁷ esporas durante 10 minutos. Tras este paso se

centrifugó la suspensión durante 3 minutos a velocidad máxima y se tomaron 2 μ l de sobrenadante como molde para la PCR.

II.7.2.3. Extracción rápida por fenolización

En las ocasiones en las que el ADN obtenido por el método anterior no produjo una amplificación adecuada en las reacciones de PCR, se extrajo ADN para usarlo como molde con el siguiente protocolo:

Protocolo:

- 1. Inocular con esporas 5 ml de medio TSB, en presencia de los antibióticos correspondientes e incubar durante 24 h en un tubo de 50 ml en agitador orbital (ver apartado II.2.2.1 (pág. 91).
- 2. Tomar 100 μl del cultivo y añadir 300 μl de TE.
- 3. Tratar con ARNasa durante 30 min a 37 ºC.
- 4. Fenolizar (ver apartado II.7.3.1 (pág. 117).
- Precipitar con 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol al 100 %. Almacenar a -20 ºC durante 30 min.
- Centrifugar 20 min a 4 °C y máximas r.p.m. Retirar el sobrenadante y añadir 50 μl de etanol al 70 %.
- 7. Centrifugar 5 min a 4 °C y máximas r.p.m. Retirar el sobrenadante y dejar evaporar los restos de etanol.
- 8. Resuspender en 50 μl de TE.

Soluciones: TE: ver apartado II.7.1.1 (pág. 113). ARNasa: ver apartado II.7.1.1 (pág. 113). Acetato sódico 3 M pH 5.2: ver apartado II.7.1.1 (pág. 113).

II.7.3. Limpieza y precipitación de ADN

II.7.3.1. Fenolización

La fenolización es un proceso que se realiza rutinariamente para eliminar restos de proteínas de las preparaciones de ácidos nucleicos. En este proceso el fenol neutro precipita las proteínas y el ADN queda en la fase acuosa de la solución. La adición de CIA tiene como finalidad la desnaturalización y precipitación de proteínas (de forma menos efectiva que con fenol) y la eliminación de trazas de fenol.

- Mezclar la solución de ADN con un volumen de fenol neutro, agitar horizontalmente durante 1 min y centrifugar durante 5 min a velocidad máxima. Este paso podría omitirse si la preparación tiene pocos contaminantes proteicos.
- 2. Recoger el sobrenadante evitando arrastrar la interfase blanquecina que contiene coágulos de proteínas.
- Mezclar la solución de ADN con un volumen de fenol neutro-CIA, agitar horizontalmente 1 min y centrifugar durante 5 min a velocidad máxima. Este paso se repite las veces necesarias hasta que la interfase aparece transparente.

4. Recoger el sobrenadante y añadir un volumen de CIA, agitar horizontalmente 1 min y centrifugar durante 3 min a velocidad máxima.

NOTA: para facilitar la separación de las fases en los pasos 3 y 4 se utilizaron en este trabajo tubos PLG (5 PRIME) que contienen una resina inmiscible con los solventes utilizados.

Soluciones:

Fenol neutro: 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. 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. El alcohol isoamílico reduce la formación de espuma.

II.7.3.2. Precipitación

La precipitación del ADN de una solución tiene normalmente la finalidad de aumentar su concentración al resuspenderlo en un volumen menor o eliminar las trazas de sales o de CIA tras la fenolización. Consiste básicamente en reducir la solubilidad del ADN en agua mediante la adición de sales y un alcohol.

Protocolo:

- 1. Añadir 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M pH 5.2 para neutralizar las cargas negativas de los ácidos nucleicos y mezclar por inversión.
- Añadir dos volúmenes de etanol al 100 %. Esta preparación se deja a -20 ºC durante al menos 2 h o a -80 ºC durante 30 min. Cuanto menor sea la cantidad de ADN en suspensión más tiempo se requiere para su precipitación.
- Centrifugar a velocidad máxima y a 4 ^QC durante al menos 45 min (cantidades inferiores a 10 ng/μl requieren tiempos prolongados). Si la precipitación se realiza con isopropanol se centrifuga a temperatura ambiente.
- 4. El precipitado se lava con etanol al 70 % y se vuelve a centrifugar a 4 ºC y máximas revoluciones durante 5 min.
- 5. Eliminar el sobrenadante y dejar evaporar los restos de etanol.
- 6. Rediluir en el volumen deseado de tampón TE o en agua.

NOTA 1: Si la solución inicial contiene EDTA en concentraciones superiores a 1 mM, dado que este compuesto precipita a pH ácido, se utiliza acetato sódico 3 M no tamponado en proporción 1/10. Si la solución inicial contiene nucleótidos (por ejemplo, después de una digestión con ARNasa) es preferible añadir acetato amónico 10 M en proporción 1/4 para minimizar su precipitación. Finalmente si la solución inicial contiene SDS se utiliza NaCl 5 M a una concentración final 0.2 M, ya que permite que el SDS se mantenga soluble en etanol al 70 %.

NOTA 2: Alternativamente a la precipitación con acetato sódico y etanol se pueden utilizar 0.6 volúmenes de isopropanol y dejar precipitar a temperatura ambiente. En ese caso la centrifugación del punto 3 se realiza a temperatura ambiente.

Soluciones:

Acetato sódico 3 M pH 5.2: ver apartado II.7.1.1 (pág. 113). TE: ver apartado II.7.1.1 (pág. 113).

II.7.4. Eliminación enzimática de ARN

Los procesos de purificación de ADN dan lugar normalmente a muestras que presentan contaminación con ARN. Para eliminarlo selectivamente se empleó la enzima ribonucleasa A de páncreas bovino (ARNasa), libre de ADNasas. Se utilizó a una concentración final de 20 µg/ml y se incubó la reacción a 37 °C durante media hora. El modo de preparación de esta enzima se indica en el apartado II.7.1.1 (pág. 113).

II.7.5. Análisis de la pureza, concentración e integridad de la solución de ADN

La concentración y pureza de las soluciones de ADN obtenidas se valoró espectrofotométricamente con ayuda del equipo NanoDropTM ND-1000 (Thermo Scientific). La estimación de la concentración de la muestra se basa en la equivalencia de una unidad de absorbancia a 260 nm con 50 µg/ml de ADN bicatenario o 33 µg/ml de ADN monocatenario. La valoración espectrofotométrica permite determinar además la pureza de la muestra (A_{260}/A_{280}) y la presencia de contaminantes no proteicos (A_{260}/A_{230}). Una muestra pura de ADN presenta una relación A_{260}/A_{280} de 1.8 (la presencia de proteínas contaminantes en las muestras reduce este cociente, ya que algunos de los residuos aminoacídicos presentan máximos de absorción a 280 nm; Sambrook y Russell, 2001). El valor de la relación A_{260}/A_{230} en el caso de ácidos nucleicos puros se encuentra entre 1.8 y 2.2.

Adicionalmente, la integridad de los fragmentos de ADN se comprobó mediante visualización en un gel de agarosa, puesto que este parámetro no viene determinado espectrofotométricamente.

II.7.6. Tratamientos enzimáticos del ADN

II.7.6.1. Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción se llevaron a cabo en volúmenes de entre 20 y 130 μ l y se empleó normalmente una unidad de enzima por μ g de ADN. Siempre se tuvo en cuenta que la concentración final de glicerol en la mezcla de reacción estuviera por debajo del 10 % para evitar actividad "estrella", que consiste en la alteración de la especificidad de la enzima.

Cuando el ADN estuvo diluido en tampón TE, el volumen final de la digestión se adaptó para que fuera al menos 10 veces mayor que el volumen de solución de ADN añadida con la finalidad de evitar la acción del EDTA sobre las enzimas de restricción.

Los tampones utilizados y la temperatura de incubación se determinaron en función de las recomendaciones de la casa comercial proveedora. El tiempo de incubación varió entre una y 16 horas, en función de: a) la actividad de la/s enzimas en el tampón seleccionado; b) la posible actividad "estrella" en periodos de incubación prolongados y c) la situación del punto de corte con respecto al extremo de una molécula lineal.

II.7.6.2. Rellenado de extremos

Cuando los extremos generados por las enzimas de restricción no fueron compatibles entre sí o se deseó eliminar un punto de corte, éstos se rellenaron parcial o completamente. La enzima utilizada varió en función del extremo protuberante:

- Extremo protuberante 5' (3' recesivos): se empleó el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Roche), ya que presenta actividad 5' → 3' polimerasa y 3' → 5' exonucleasa.
- Extremo protuberante 3': se empleó la ADN polimerasa del fago T4 (Fermentas), por su actividad 5' → 3' polimerasa y 3' → 5' exonucleasa.

La cantidad de ADN utilizado en la reacción de rellenado fue normalmente 1 µg, y se empleó una unidad de enzima. El tampón utilizado fue el proporcionado por el fabricante, aunque la mayoría de tampones para enzimas de restricción son compatibles. Los dNTP se añadieron a una concentración final de 100 µM. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 15 minutos en el caso de utilizar el fragmento Klenow y durante 5 minutos en caso de utilizar la ADN polimerasa del fago T4. La reacción se inactivó por incubación a 75 °C durante 10 minutos o por fenolización.

II.7.6.3. Desfosforilación de extremos 5'

En algunos casos los extremos 5' resultantes de la digestión de los vectores de clonación con enzimas de restricción fueron desfosforilados con fosfatasa antártica (New England BioLabs) para impedir su religación por formación de un enlace fosfodiéster. Este protocolo se realizó cuando las ligaciones resultaban problemáticas o cuando el vector se digirió con una sola enzima. La cantidad de ADN incorporado en la reacción de desfosforilación fue de 1 µg y se añadió una unidad de enzima. La incubación se realizó a 37 °C durante 30 minutos y se inactivó a 65 °C durante 15 minutos. Además, el ADN se fenolizó y precipitó.

II.7.6.4. Ligación de fragmentos de ADN

La ligación de fragmentos de ADN se realizó en un volumen final de 10 μ l con la ADN ligasa del fago T4 (Roche) y el tampón suministrado por la casa comercial. Esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3-hidroxilo y 5'-fosfato del ADN de doble cadena y requiere iones Mg²⁺ y ATP como cofactores. La proporción inserto/vector fue, en principio, la mayor posible en función de la disponibilidad de ambos para favorecer las reacciones intermoleculares. Las cantidades de vector y enzima añadidas se ajustaron de acuerdo a la tabla 2.8.

Tabla 2.8. Concentraciones finales de ligasa y vector utilizadas en ligaciones de fragmentos de ADN de extremos cohesivos o romos. Se considera un tamaño del vector de 3 kb.

	Ligasa	Vector
Cohesivos	0.05 U/µl	0.15-1.5 fmol/μl
Romos	0.25 U/µl	0.75-3.5 fmol/μl

NOTA: fmol/ μ l = ng/ μ l · 1.52 · (1000/pb)

La incubación se realizó a temperatura ambiente y el tiempo de incubación varió de 15 minutos (extremos cohesivos) a 16 horas (extremos romos). La reacción se inactivó a 65 °C durante 15 minutos antes de proceder a la transformación de *E. coli* para aumentar la eficiencia.

II.7.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica permite obtener un elevado número de copias de un determinado fragmento de ADN, gracias a la repetición cíclica de tres pasos fundamentales:

- Desnaturalización de las dos cadenas del ADN molde (el ADN que incluye la secuencia que se desea amplificar) mediante la incubación a una temperatura elevada (92 ºC-96 ºC).
- Hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias en el ADN molde. La temperatura escogida para llevar a cabo este paso constituye un factor crítico en la especificidad y en la eficiencia de la PCR.
- Extensión o síntesis del ADN desde el extremo 3´ de los cebadores por la acción de una ADN polimerasa termoestable que emplea como molde la región flanqueada por los mismos, a una temperatura próxima a los 72 °C y durante un tiempo que depende de la longitud del fragmento a amplificar.

En este trabajo se emplearon varios tipos de polimerasas y se siguieron siempre las instrucciones de sus fabricantes:

-GoTaq[®] DNA polymerase (Promega): cuando la introducción de errores no era crucial, por ejemplo, en la comprobación de colonias exconjugantes. Esta enzima deja una desoxiadenosina en cada extremo 3'.

-Polimerasas de alta fidelidad: se utilizaron siempre que los fragmentos amplificados fueron objeto de una clonación posterior, en cuyo caso se requiere exactitud en la secuencia obtenida.

- a. Phusion[®] High Fidelity DNA polymerase (New England BioLabs): genera extremos romos en los fragmentos amplificados y su tasa de introducción de errores es 50 veces menor que la de la Taq.
- b. Hybrid[®] DNA Polimerase (EURx): genera extremos romos y presenta 10 veces más fidelidad de copia que las Taq.
- c. Q5[®] High Fidelity DNA Polimerase (New England BioLabs): genera extremos romos y su tasa de incorporación de errores es más de 100 veces inferior a la de la Taq.

En la tabla 2.9 se detallan las concentraciones finales de los componentes de la reacción que se utilizaron en este trabajo.

Componente	Concentración final	
Tampón comercial	1 ×	
dNTP	0.2 mM	
MgCl ₂	1.5 mM	
Cebadores	0.2 μM	
ADN malda	1-5 ng/μl si es genómico	
ADN Molde	0.2 ng/μl si es plasmídico	
DMSO*	4 %	
Polimerasa	0.02 U/μl	
1 01111111130	0.02 0/μι	

Tabla 2.9. Concentraciones finales de los componentes de las reacciones PCR.

NOTA: El DMSO se utilizó en las reacciones de PCR que tenían como molde ADN de *Streptomyces* con el fin de facilitar la separación de las hebras del ADN (que tiende a formar estructuras secundarias por su elevado contenido en GC) y aumentar la eficiencia de la reacción.

Por lo general, se realizó siempre una primera reacción de optimización, en la que se empleó un gradiente de temperaturas de hibridación para identificar aquella en la que no se producen amplificaciones inespecíficas. Cuando la reacción de PCR estuvo optimizada se realizó un paso de desnaturalización inicial de 2 minutos y un solo bucle de amplificación, con un número de ciclos variable, entre 25 y 35 normalmente. El esquema general es el presentado en la tabla 2.10, aunque estos valores son orientativos y se ajustaron en función de las instrucciones del fabricante de la polimerasa (por ejemplo, las velocidades de procesamiento difieren de unas enzimas a otras y los tiempos de extensión pueden variar). Otros factores que se tuvieron en cuenta a la hora de determinar los tiempos y temperaturas de la reacción fueron el contenido en GC del ADN molde y de los cebadores.

Cuando la reacción presentó productos de amplificación inespecíficos, se utilizaron dos bucles de amplificación en el programa de ciclos para aumentar la cantidad de producto específico.

Al finalizar la reacción se analizó una fracción de la misma en un gel de agarosa para comprobar el tamaño y la cantidad del fragmento amplificado, así como la presencia o ausencia de bandas de amplificación inespecíficas.

Paso		Tª (ºC)	Tiempo (s)	Ciclos
Inicio		95	0	
Desnaturalización inicial		95-98	59	1
	Desnaturalización	95-98	15	
Primer bucle	Hibridación	Tm + 10	15	19
	Extensión	72	*	
	Desnaturalización	95-98	15	
Segundo bucle	Hibridación	Tm	15	10
	Extensión	72	*	
Extensión final		72	600	1
Conservación		4	0	

Tabla 2.10. Programa genérico de termociclación utilizado en la optimización de reacciones de PCR.

NOTA: El tiempo de extensión indicado por el asterisco dependió del tamaño del producto de PCR. Se utilizaron 15 s/kb si el molde fue ADN plasmídico y 30 s/kb si fue ADNg o de otro tipo.

II.7.8. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa se realizó según las indicaciones de Sambrook y Russell (2001). Los geles de agarosa se prepararon en tampón TAE a concentraciones de 0.6 %-2 %, en función del tamaño de los fragmentos que se pretendía discriminar (ver tabla 2.11). Cuando la finalidad fue extraer un fragmento de ADN, se utilizaron concentraciones de 0.6 %-0.8 % para aumentar la eficiencia de la extracción.

Tabla 2.11. Concentraciones de agarosa utilizadas en los geles para la resolución de fragmentos de ADN de diferentes tamaños. Tomado de Sambrook y Russell (2001).

Concentración de agarosa (%)	Tamaño de los fragmentos de ADN separados (kb)
0.8	0.5-15
1.0	0.25-12
1.2	0.15-6
1.5	0.08-4

El grosor del gel preparado fue de entre 5 y 6 mm y la altura de la capa de tampón sobre el gel de unos 5 mm. Se procuró siempre que la altura de la carga en el pocillo no superase los 2.5 mm y el voltaje aplicado fue como máximo de 5 V/cm. Para la extracción de fragmentos de hasta 2 kb se aplicó una relación de 1 µg de ADN por centímetro de pocillo (por encima de este tamaño se utilizaron relaciones menores y un voltaje de 3 V/cm).

Como tampón de carga se utilizó el 5 × Green GoTaq[™] Flexi Buffer, suministrado con la enzima GoTaq[®] DNA polymerase (Promega). Este tampón presenta un colorante azul y otro amarillo que migran como fragmentos de 3 kb-5 kb y 50 pb, respectivamente, en un gel de agarosa al 1 %. Como marcador de pesos moleculares se utilizaron 7 µl de 1 kb Plus DNA Ladder[™] (Invitrogen). La electroforesis se llevó a cabo en cubetas Bio-Rad y la visualización se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta tras teñir con una solución de bromuro de etidio durante 5-10 minutos.

Soluciones:

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

Bromuro de etidio: se prepara una solución concentrada a 10 mg/ml en agua y se conserva a 4 $^{\circ}$ C protegido de la luz. Para un litro de agua se añaden 200 μ l de la solución concentrada. Conservar a temperatura ambiente.

II.7.8.1. Extracción de ADN de un gel de agarosa mediante el método de congelación rápido (*freeze-squeeze*)

Es un método rápido y sencillo que permite la recuperación del 70 %-80 % del ADN retenido en la agarosa. El protocolo presentado es una adaptación del procedimiento de

Polman y Larkin (1989), en el que se sustituye el uso de un filtro de acetato de celulosa por algodón hidrófilo.

Protocolo:

- Colocar la banda de agarosa que contiene el fragmento de ADN de interés en un microtubo de 1.5 ml al que previamente se ha practicado un orificio en el fondo y obturado con algodón hidrófilo estéril. Dicho tubo se coloca sobre otro tubo de 2.2 ml al que se ha cortado la tapa.
- 2. Congelar el conjunto a -80 ºC durante al menos 20 min.
- 3. Centrifugar a temperatura ambiente durante 10 min a 13 200 r.p.m. 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 fenol neutro/CIA y seguidamente con CIA para eliminar los restos de fenol.
- 5. Precipitar la fase acuosa recogida con 1/10 de volumen de NaCl 3 M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol.
- 6. Precipitar a -20 °C de un día para otro o a -80 °C durante 2 h-3 h.
- 7. Centrifugar durante un mínimo de 45 min a 13 200 r.p.m. y 4 ºC en función de la concentración de la muestra.
- 8. Lavar con etanol al 70 % frío. Centrifugar, eliminar el sobrenadante y dejar evaporar los restos de etanol.
- 9. Resuspender en el volumen apropiado de agua o tampón TE.

Soluciones: **Fenol neutro:** ver apartado II.7.3.1 (pág. 117). **CIA:** ver apartado II.7.3.1 (pág. 117). **NaCl 3 M pH 5.2:** preparado en solución acuosa. **TE:** ver apartado II.7.1.1 (pág. 113).

II.7.8.2. Extracción de ADN de un gel de agarosa mediante kits comerciales

En algunas ocasiones se utilizaron sistemas comerciales para la extracción de ADN a partir de geles de agarosa (ver tabla 2.6). El kit utilizado dependió del tamaño del fragmento que se pretendía recuperar: para fragmentos de ADN de hasta 10 kb se utilizó el Illustra™ GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), mientras que para fragmentos de mayor tamaño se empleó el QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (Qiagen).

II.7.9. Hibridación de ADN

La interacción de una secuencia de interés con una sonda complementaria marcada se utilizó en este trabajo en la identificación de dobles recombinantes y en el rastreo de la genoteca de *S. tsukubaensis*. Consta de varias fases que se describen en los siguientes apartados (síntesis de sondas marcadas, transferencia del ADN problema a la membrana de hibridación, hibridación, lavado de la membrana y detección).

II.7.9.1. Transferencia del ADN desde geles de agarosa a la membrana de hibridación

La transferencia a un soporte sólido de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción y sometidos a migración electroforética en geles de

agarosa se denomina *Southern blotting* (Southern, 1975). Los fragmentos de ADN se desnaturalizan y transfieren en forma monocatenaria a la membrana, a la que se fijan mediante luz UV. El sistema de transferencia empleado fue un sistema de vacío (VacuGene[™] XL, GE Healthcare). Esta técnica se empleó en la validación de dobles recombinantes obtenidos mediante ReDirect[©].

Protocolo:

- Separar los fragmentos de ADN obtenidos tras la digestión mediante electroforesis. Sambrook y Russell (2001) recomiendan que el gel tenga menos de un 1 % de agarosa y un grosor de entre 4 y 5 mm.
- Teñir y, en caso de utilizar marcador de pesos moleculares no marcado, fotografiar junto a una regla para poder calcular el tamaño de las bandas de hibridación. Es necesario enjuagar el gel con agua destilada, especialmente si se ha teñido con bromuro de etidio.
- Cortar un filtro de nailon (se recomienda que esté cargado positivamente, Hybond[™]-N+; GE Healthcare) del tamaño del gel más 1 cm por cada lado, manejándolo por los extremos con guantes sin polvo y con pinzas.
- 4. Situar la membrana centrada en la ventana de transferencia evitando la formación de burbujas entre la membrana y la placa porosa del sistema de vacío.
- Depositar el gel sobre la membrana, comenzar por el extremo con pocillos e ir dejándolo caer suavemente. Es importante que no queden burbujas, las cuales interferirían en la transferencia de ADN.
- 6. Encender la bomba de vacío (estabilizar la presión a 50 mbar, no debe sobrepasarse en todo el proceso).
- Cubrir toda la superficie del gel con solución despurinizante y dejar 7 min (en este tiempo el frente de migración del azul de bromofenol debe cambiar su color de azul a amarillo). Vigilar que el gel se mantenga cubierto. Transcurrido este tiempo retirar la solución.
- 8. Cubrir la superficie del gel con solución desnaturalizante durante 7 min (el azul de bromofenol recupera su color azul original).
- 9. Retirar la solución y cubrir la superficie del gel con la solución neutralizante durante 7 min.
- 10. Por último, retirar la solución neutralizante y cubrir la superficie del gel con SSC 20 ×. Transferir durante 30 min-90 min.
- 11. Retirar todo el líquido y posteriormente el gel (tener la precaución de marcar la posición de los pocillos en la membrana).
- 12. Apagar la bomba de vacío.
- 13. Marcar la cara de la membrana que porta el ADN y retirarla. Se debe lavar bien la base del aparato para evitar acúmulos de cristales de SSC.
- 14. Colocar la membrana sobre dos capas de papel de filtro empapadas en SSC 10 ×. La membrana debe estar húmeda pero no mojada y con la cara que contiene el ADN hacia arriba.
- 15. Fijar el ADN mediante la aplicación de 120 mJ de luz ultravioleta (Stratalinker[®] UV Crosslinker 2400, Stratagene).
- 16. Enjuagar brevemente la membrana en agua y dejar secar.
- 17. Estos filtros se pueden conservar a 4 ºC protegidos con papel Whatman 3MM y papel de aluminio durante varios meses.

NOTA: como marcador de pesos moleculares se utilizó el DNA Molecular Weight Marker II Digoxigenin-labeled (Roche).

Soluciones: SSC 20 ×: 3 M NaCl; 0.3 M citrato sódico, pH 7. SSC 10 ×: preparada mediante dilución de la anterior. Solución despurinizante: 0.25 M HCl. Preparación (1 litro): 25 ml de HCl concentrado en 975 ml de agua. Solución desnaturalizante: 1.5 M NaCl; 0.5 N NaOH. Preparación (1 litro): 87.6 g de NaCl y 20 g de NaOH en agua. Solución neutralizante: 1.5 M NaCl; 1 M Tris-HCl, pH 7.5. Preparación (1 litro): 121 g de Tris; 87.6 g de

II.7.9.2. Transferencia *in situ* de ADN de colonias bacterianas a una membrana de hibridación

Esta técnica se empleó en el rastreo de la genoteca de *S. tsukubaensis*. Consiste básicamente en cultivar las colonias directamente sobre la membrana, lisarlas mediante un tratamiento alcalino e inmovilizar su ADN con luz ultravioleta. Se aplicó el método del manual específico de hibridaciones con digoxigenina DIG Application Manual for Filter Hybridization 2000 (Roche Diagnostics GmbH) con algunas modificaciones, como se detalla a continuación.

Protocolo:

NaCl, ajustar pH a 7.5 con HCl y enrasar con agua.

- 1. Cultivar los clones de la genoteca en *E. coli* en microtubos con 0.5 ml de LB (en presencia de los antibióticos necesarios) a 37 °C y 250 r.p.m. durante 16 h.
- 2. Distribuir 200 μl de cada cultivo en un pocillo de una placa de 96 pocillos.
- Replicar con ayuda de un replicador de placas de 96 pocillos sobre una membrana de nailon (se recomienda que tenga carga neutra; Hybond[™]-N; GE Healthcare) que repose sobre una placa de LB (con antibióticos en su caso).
- 4. Incubar durante 16 h-20 h en estufa a 37 ºC.
- 5. Colocar la membrana (tomándola con pinzas) sobre una lámina de papel Whatman 3MM seco.
- 6. Preparar 3 bandejas con dos láminas de papel Whatman cada una. Sobre estas bandejas se irán añadiendo las soluciones desnaturalizante, neutralizante y SSC 2 × para que asciendan por capilaridad desde las láminas hacia la membrana.
- 7. Colocar la membrana (con las colonias hacia arriba) durante 15 min sobre las dos láminas de papel Whatman empapado en la solución de desnaturalización.
- 8. Pasar la membrana a una lámina de papel Whatman seco.
- 9. Colocar la membrana durante 15 min sobre dos láminas de papel Whatman empapado en la solución de neutralización.
- 10. Pasar la membrana a una lámina de papel Whatman seco.
- 11. Colocar la membrana durante 10 min sobre las dos láminas de papel Whatman empapado en SSC 2 ×.
- 12. Fijar el ADN a la membrana con luz UV sobre el papel Whatman empapado en SSC 2 × (Stratalinker® UV Crosslinker 2400, Stratagene).
- 13. Colocar la membrana en una bandeja y añadir una solución de proteinasa K 2 mg/ml en tampón SSC 2 × hasta cubrir la superficie.
- 14. Incubar tapado para evitar evaporaciones durante 1 h a 37 ºC.
- 15. Colocar la membrana entre dos láminas de papel Whatman empapadas en agua y aplicar presión con un rotulador o una botella sobre la superficie para eliminar restos celulares. Repetir hasta que la membrana quede completamente limpia.

Solución desnaturalizante: ver apartado II.7.9.1 (pág. 124). Solución neutralizante: ver apartado II.7.9.1 (pág. 124). SSC 2 ×: preparada por dilución de la SSC 20 ×. Proteinasa K 2 mg/ml en SSC 2 ×: preparada por dilución de la solución de proteinasa K 20 mg/ml (ver apartado II.7.2.1; pág. 116) en SSC 2 ×.

II.7.9.3. Marcaje de sondas de ADN con digoxigenina

Tanto en el caso de la hibridación *Southern* como en la hibridación *in situ* de colonias, se necesitan sondas específicas marcadas para evidenciar la presencia de secuencias complementarias en la membrana de hibridación. El sistema de marcaje no radiactivo utilizado en este trabajo, DIG DNA Labeling Kit (Roche), emplea digoxigenina-1-dUTP, que se va incorporando aleatoriamente durante la síntesis de la sonda. Como molde se utilizaron fragmentos internos del gen a detectar (en el caso del rastreo de la genoteca) o fragmentos que incluían un gen y parte de sus secuencias flanqueantes (en el caso de la validación de dobles recombinantes por hibridación *Southern*), generados en ambos casos por PCR. Como cebadores aleatorios se emplean hexanucleótidos y la polimerización la realiza el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli.* El procedimiento está ajustado en la proporción de DIG-1-dUTP frente a dTTP, de manera que cada 20 nt-25 nt se incorpore una molécula de digoxigenina. Esta densidad de haptenos en la sonda proporciona una gran sensibilidad en la inmunodetección posterior realizada con anticuerpos antidigoxigenina unidos a la enzima fosfatasa alcalina.

Para el marcaje de las sondas se siguieron las instrucciones del sistema comercial con algunas modificaciones, como se describe a continuación.

Protocolo:

- 1. Añadir 1 μg-3 μg del ADN que se quiere marcar en un volumen máximo de 15 μl.
- 2. Desnaturalizar en agua hirviendo durante 10 min y mantener en hielo.
- Añadir 2 μl de la mezcla de dNTP 10 ×, 2 μl de mezcla de hexanucleótidos 10 × y 1 μl de Klenow (2 U). Preparar la mezcla en hielo y dar un pulso de centrífuga para recoger la muestra en el fondo del microtubo.
- 4. Incubar a 37 ^oC de 1 a 20 horas. Se obtiene tres veces más cantidad de sonda marcada con la incubación más prolongada.
- 5. Parar la reacción añadiendo 0.8 μl de EDTA 0.5 M pH 8 y mantener a -20 ºC hasta su utilización.

NOTA: Ya que la digoxigenina está unida a dUTP mediante un enlace éster que puede ser eliminado en condiciones alcalinas, los filtros empleados pueden reutilizarse.

Soluciones:

La mezcla de dNTP, los hexanucleótidos 10 × y el fragmento Klenow vienen suministrados con el kit.

Se puede estimar la cantidad de sonda sintetizada siguiendo la tabla 2.12, aunque solo de forma aproximada, pues en realidad influyen factores como la pureza de la preparación, la secuencia de la sonda, la calidad de la polimerasa, etc.

Tabla 2.12. Estimación de la cantidad de sonda marcada sintetizada partiendo de 10 ng a 3 μ g de sonda con incubaciones de una hora o 20 horas. Tomado del manual DIG DNA Labeling Kit (Roche).

ng molde	ng sonda 1 h	ng sonda 20 h
10	15	50
30	30	120
100	60	260
300	120	450
1000	260	780
3000	530	890

II.7.9.4. Hibridación, lavados y detección

En el proceso completo de hibridación se pueden distinguir cuatro fases: prehibridación, hibridación, lavados y detección. La prehibridación tiene como finalidad bloquear los sitios activos de la membrana donde no se han unido ácidos nucleicos y equilibrarla. La hibridación en sentido estricto consiste en la unión de la sonda marcada con digoxigenina al ADN fijado en la membrana. La especificidad de esta unión depende tanto de las condiciones utilizadas durante la incubación (temperatura a la que se desarrolla la hibridación y concentraciones de sales y detergentes en el tampón de hibridación) como de las utilizadas en los lavados posteriores. Los lavados permiten eliminar selectivamente las uniones inespecíficas que hayan podido producirse entre la sonda y el ADN. Esto se consigue disminuyendo la concentración de sales y aumentando la de detergentes en el tampón de lavado y aumentando la temperatura y la duración del lavado. La detección se consigue gracias a una reacción colorimétrica con NBT y BCIP: la hidrólisis del BCIP por acción de la fosfatasa libera un grupo Pi y un intermediario que, oxidado por el NBT, se dimeriza generando un precipitado de color púrpura.

Protocolo de prehibridación:

- 1. Precalentar la solución de hibridación a la temperatura final a la que se vaya a realizar la hibridación (70 ºC).
- 2. Colocar la membrana en un tubo de vidrio o en una bolsa de hibridación.
- 3. Añadir 0.1 ml de solución de hibridación por cm² de membrana si el proceso se realiza en tubo de vidrio o 0.2 ml por cm² si es en bolsa (redondear al alza para que la membrana se empape en su totalidad). Normalmente se emplean los mismos volúmenes en la prehibridación y en la hibridación, de manera que cuanto menor sea el volumen añadido más efectiva será la concentración de sonda para alcanzar el ADN diana.
- 4. Incubar durante 2 h a 70 °C (mínimo 1 h).

NOTA: las temperaturas de prehibridación e hibridación para sondas 100 % homólogas varían entre 65 °C y 68 °C según lo recomendado por Roche. Para *Streptomyces*, debido a su alto % en GC, es preferible el rango de 70 °C a 80 °C.

Protocolo de hibridación:

- 1. Hervir la sonda 10 min para desnaturalizar el ADN y enfriar rápidamente en hielo.
- 2. Precalentar la solución de hibridación a la temperatura final y añadir la sonda desnaturalizada de manera que la concentración final sea de entre 5 y 25 ng/ml.
- 3. Dejar hibridando a 70 ºC un mínimo de 8 h, preferiblemente, de un día para otro.

Soluciones:

Solución de hibridación: SSC 5 ×; N-lauroilsarcosina 0.1 %; SDS 0.02 %; solución de reactivo bloqueante 1 %. Preparación (10 ml): 2.5 ml de SSC 20 ×; 0.1 ml de N-lauroilsarcosina 10 %; 0.01 ml SDS 20 % y 1 ml de solución de reactivo bloqueante 10 %.

Solución de reactivo bloqueante 10 %: reactivo bloqueante en solución de maleico 0.1 M. Preparación (50 ml): disolver 5 g de reactivo bloqueante en 50 ml de solución de maleico, calentando hasta 60 °C y agitando para disolver pero evitando la ebullición. Esterilizar en autoclave.

Solución de maleico 0.1 M: ácido maleico 0.1 M; NaCl 0.15 M, pH 7.5 (ajustado con NaOH). Esterilizar en autoclave.

Tras la hibridación se puede recuperar la solución de hibridación que contiene sonda no hibridada reutilizable. Para ello se guarda congelada y a la hora de reutilizarla se desnaturaliza hirviendo 10 minutos.

Protocolo de lavado:

- 1. Realizar dos lavados de 5 min cada uno a temperatura ambiente en bandeja con solución de lavado 2 × y agitación moderada.
- 2. Realizar dos lavados de 15 min cada uno a 68 ºC con solución de lavado 0.5 × en agitación moderada.

Soluciones:

Solución de lavado 2 ×: SSC 2 ×; SDS 0.1 %. Preparación (10 ml): 1 ml de SSC 20 × y 0.05 ml de SDS 20 % en agua.

Solución de lavado 0.5 ×: SSC 0.5 ×; SDS 0.1 %. Preparación (10 ml): 0.25 ml de SSC 20 × y 0.05 ml de SDS 20 % en agua.

Protocolo de detección con NBT y BCIP:

- 1. Equilibrar la membrana con 20 ml de solución de lavado durante 1 min.
- 2. Bloquear la membrana con 20 ml de solución bloqueante en agitación suave durante 30 min-60 min.
- Diluir en factor 1:5000 el anticuerpo antidigoxigenina-fosfatasa alcalina (previamente centrifugado) en solución bloqueante (concentración final de 150 mU/ml). Mezclar suavemente por inversión. Esta solución es estable durante 12 h a 4 ºC.
- 4. Descartar la solución bloqueante e incubar con 20 ml de solución de anticuerpo en agitación suave durante 30 min.
- 5. Decantar y lavar dos veces con 100 ml de solución de lavado durante 15 min.
- 6. Preparar la solución colorante: 90 μl de NBT + 70 μl de BCIP + 20 ml de solución de detección. Se debe preparar fresca y proteger de la luz hasta su uso.
- 7. Equilibrar la membrana con 20 ml de solución de detección durante 2 min.
- 8. Decantar y revelar en oscuridad con 20 ml de solución colorante. La incubación del revelado puede durar desde pocos minutos a 12 h, siempre en oscuridad y sin agitar.

 El revelado se para cuando la intensidad de la señal es la adecuada, lavando con agua o tampón TE. La membrana se almacena en una bolsa con TE ya que al secarse el color se apaga.

NOTA: Todas las incubaciones se realizan a temperatura ambiente.

Soluciones:

Solución de lavado: Tween 20 al 3 % (v/v) en solución de maleico. Preparación (300 ml): 242.5 ml de solución de maleico y 7.5 ml de Tween 20.

Solución bloqueante: reactivo bloqueante al 1 % en solución de maleico. Preparación (40 ml): 4 ml de solución de reactivo bloqueante al 10 % y 36 ml de solución de maleico 0.1 M.

Anticuerpo antidigoxigenina-fosfatasa alcalina (Roche).

Solución de detección: Tris-HCl 0.1 M; NaCl 0.1 M. Preparación (30 ml): 3 ml de Tris-HCl 1 M pH 9.5 y 1 ml de NaCl 3 M en agua.

NBT: sal de nitrotetrazolio azul (Roche). Se vende a 100 mg/ml en dimetilformamida. Se diluye a 75 mg/ml en dimetilformamida al 70 % (v/v).

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, sal de toludinio, 50 mg/ml en dimetilformamida (Roche). **TE**: ver apartado II.7.1.1 (pág. 113).

II.7.10. Secuenciación del ADN

La fidelidad de secuencia de los productos amplificados por PCR se comprobó por secuenciación cuando fue necesario. Para ello, los productos se clonaron normalmente en el vector pUC19, se transformaron células competentes de E. coli y se purificó el plásmido obtenido. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas por el servicio de secuenciación de INBIOTEC. En este servicio se utiliza el sistema ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit y un equipo ABI PRISM® 3130 (Applied Biosystems®). El proceso consta de dos pasos: en primer lugar se desarrolla una PCR con didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP), que carecen del grupo 3' hidroxilo necesario para la formación de enlaces fosfodiéster, de manera que se genera un conjunto de moléculas de diferentes tamaños (Sanger y col., 1977). Además cada ddNTP está conjugado con un fluoróforo específico. En un segundo paso los productos de PCR se someten a una electroforesis en capilar en la que los fluoróforos son excitados por un haz de luz láser. Cada fluoróforo emite luz de una longitud de onda específica, que es captada y almacenada por el sistema, permitiendo que los cuatro tipos de emisiones fluorescentes puedan detectarse simultáneamente. El Programa Secuencing Analysis v5.2 (Applied Biosystems), interpreta las señales de fluorescencia y genera un archivo de salida con formato ".abi", compatible con el visor Chromas (gratuito y disponible en http://technelysium.com.au) y con la aplicación ContigExpress de VectorNTi® Advance 10.3.0.

II.7.11. Introducción de ADN en cepas de Escherichia coli

La transformación mediante choque térmico fue el método más utilizado para la introducción de construcciones plasmídicas en *E. coli*. Las células competentes utilizadas fueron adquiridas a casas comerciales o preparadas en el laboratorio.

II.7.11.1. Inducción del estado de competencia

Se siguieron dos métodos de inducción del estado de competencia dependiendo de la eficiencia deseada en cada caso: el basado en el uso de cationes divalentes que utiliza cloruro de rubidio (Hanahan, 1985) y el descrito inicialmente por Inoue y col. (1990). En ambos casos resulta sumamente importante mantener las soluciones y las células a 4 °C (en un baño de hielo) durante todo el proceso.

• Método de Inoue

El método de Inoue permite obtener eficiencias de hasta $3 \cdot 10^8$ transformantes por µg de ADN y se utilizó de manera rutinaria para inducir el estado de competencia de diferentes cepas de *E. coli*, especialmente de las DH5 α . El protocolo, modificado de Sambrook y Russell (2001) es el siguiente:

Protocolo:

- 1. Cultivar la cepa de *E. coli* en medio LA para obtener un cultivo fresco.
- 2. Cultivar un preinóculo durante toda la noche a 37 ºC en medio SOC (5 ml) a partir de 20-30 colonias de *E. coli*.
- Inocular 50 ml de medio SOC con un 1 % del preinóculo anterior. Incubar en agitación (250 r.p.m.) a 18 ºC.
- 4. Cuando el cultivo alcance una DO₆₀₀ de 0.6, colocar el matraz en hielo 10 min. A partir de este paso trabajar en frío.
- 5. Centrifugar a 2500 × g en tubos de tipo GSA durante 10 min.
- 6. Retirar bien los restos de medio y resuspender en 80 ml de tampón Inoue frío (4 ºC). No usar agitador. Dejar en hielo 10 min.
- 7. Centrifugar a 2500 × g durante 10 min.
- 8. Retirar los restos de medio y resuspender en 20 ml de tampón Inoue frío mediante agitación manual.
- 9. Anadir 1.4 ml de DMSO (concentración final 7 %). Agitar suavemente y dejar en hielo 10 min.
- 10. Repartir las células en alícuotas de 100 μl en microtubos de 1.5 ml. Inmediatamente congelar en nitrógeno líquido. Conservar a -80 ºC.
- 11. Con 10 pg-20 pg de un plásmido previamente cuantificado, comprobar la eficiencia de transformación. Ésta se expresa en transformantes por μg de ADN.

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

Soluciones:

Tampón Inoue (Para 1 litro): 10 mM PIPES (3.025 g); 15 mM CaCl₂ (1.65 g); 250 mM KCl (18.65 g). Ir añadiendo KOH 1 M para que se disuelvan los componentes y a la par ajustar el pH a 6.7. Después añadir 10.9 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$. Esterilizar por filtración y conservar a 4 $^{\circ}C$.

• Método del cloruro de rubidio

El método del cloruro de rubidio, descrito inicialmente por Hanahan (1983; 1985), rinde mayores eficiencias de transformación que el protocolo anterior. Fue el procedimiento aplicado para obtener células competentes de *E. coli* ET12567/pUZ8002, que se transforman con cósmidos en el protocolo de ReDirect[©].

Protocolo:

- 1. Cultivar la cepa en medio LA para refrescar el cultivo.
- Inocular una colonia en 5 ml de medio SOB al que se ha adicionado la solución de magnesio (2 ml por cada 100 ml de SOB).
- 3. Incubar de 12 h a 14 h a 37 ºC y 250 r.p.m.
- 4. Inocular 200 μl-400 μl del cultivo anterior en 100 ml de SOB con magnesio.
- 5. Incubar a 37 °C y 250 r.p.m. hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.48.
- 6. Enfriar el matraz en hielo. A partir de este paso trabajar en frío.
- 7. Recoger las células por centrifugación en tubos GSA a 5000 r.p.m. y 4 °C durante 5 min y retirar el sobrenadante.
- 8. Resuspender suavemente el precipitado en 30 ml de solución fría RF1 (4 ºC).
- 9. Mantener en hielo durante 30 min.
- 10. Centrifugar 5 min a 5000 r.p.m. y 4 °C y retirar el sobrenadante.
- 11. Resuspender el precipitado en 8 ml de la solución fría RF2 (4 ºC).
- 12. Repartir las células en alícuotas de 120 μl en microtubos de 1.5 ml y congelar en nitrógeno líquido inmediatamente. Conservar a -80 °C.
- 13. Con 10-20 pg de un plásmido previamente cuantificado, comprobar la eficiencia de transformación y expresarla en transformantes por μg de ADN.

Soluciones:

RF1: 100 mM RbCl; 50 mM MnCl₂ · $4H_2O$; 30 mM acetato potásico; 10 mM CaCl₂ · $2H_2O$; 15 % (p/v) glicerol. Ajustar el pH a 5.8 con ácido acético 0.2 M. Esterilizar por filtración.

RF2: 10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂ \cdot 2H₂O; 15 % (p/v) glicerol. Ajustar el pH a 6.8 con NaOH 1N. Esterilizar por filtración.

Solución madre de magnesio: 1 M MgCl₂ · 6H₂O; 1M MgSO₄ · 7H₂O. Esterilizar por filtración.

II.7.11.2. Protocolo de transformación

El método de transformación empleado es una adaptación del descrito por Hanahan (1983). Se utilizó para transformar células competentes preparadas en laboratorio, ya que cuando se transformaron células comerciales se siguieron los protocolos indicados por el proveedor.

- 1. Descongelar el vial de células competentes manteniéndolo en hielo.
- Añadir la solución de ADN (como máximo 1/5 del volumen de células competentes) y mantener la mezcla en hielo durante 30 min.
- 3. Someter la mezcla a un choque térmico de 42 ºC durante 45 s y enfriar en hielo 2 min.
- 4. Anadir 400 μl de LB e incubar las células durante 1 h en agitación (250 r.p.m.) a 37 °C.
- 5. Sembrar diferentes volúmenes de la transformación en placas de LA o SOB en presencia de los antibióticos adecuados para la selección de transformantes.
- 6. Incubar a 37 °C en estufa durante 16 h.

II.7.12. Introducción de ADN en Streptomyces

La introducción de material genético en las diferentes cepas de *Streptomyces* se llevó a cabo mediante conjugación. Puesto que se utilizó como cepa donadora *E. coli* ET12567/pUZ8002, se trata de una conjugación intergenérica. *E. coli* ET12567/pUZ8002 es deficiente en los sistemas de metilación *dam*, *dcm* y *hsd*, lo que evita que *Streptomyces* degrade la construcción transferida. El plásmido pUZ8002, no transferible, contiene los genes necesarios para la movilización de vectores que contienen en su secuencia un *oriT* (Paget y col., 1999).

El protocolo utilizado varía ligeramente según la especie receptora, debido a las diferencias en la eficiencia de conjugación, de modo que se presentan métodos independientes para *S. tsukubaensis* y *S. coelicolor*. Los protocolos incluyen un paso de aplicación de una cobertera, en la que además de ácido nalidíxico (funcional solo para *E. coli*), se añaden los antibióticos a los que confiere resistencia la construcción introducida para poder seleccionar los exconjugantes (tabla 2.13).

Tabla 2.13. Concentraciones de los antibióticos de selección utilizados en las coberteras de conjugación. Se considera que las placas contienen aproximadamente 30 ml de medio (ISP4 con MgCl₂ 20 mM para *S. tsukubaensis* o MS con MgCl₂ 10 mM para *S. coelicolor*).

Antibiótico	Concentración de la preparación	Concentración final en la placa	Vol. en 1.5 ml de cobertera
Ácido nalidíxico	25 mg/ml	25 µg/ml	30 µl
Apramicina	50 mg/ml	50 µg/ml	30 µl
Kanamicina	100 mg/ml	200 µg/ml	60 µl

II.7.12.1. Protocolo de conjugación para S. tsukubaensis

En este caso, debido a la baja eficiencia de conjugación, se aplicaron ciertas modificaciones al protocolo inicial presentado en el sistema ReDirect[©] (ver apartado III.3.3; pág. 256).

- 1. Inocular la cepa de *E. coli* ET12567/pUZ8002 que contiene la construcción que se quiere transferir a *S. tsukubaensis* en 100 ml de LB con los antibióticos necesarios.
- 2. Incubar a 37 °C y 250 r.p.m. durante toda la noche
- Cuando la DO₆₀₀ está entre 1.1 y 1.4, recoger 50 ml de cultivo mediante centrifugación a 2200 × g durante 7 min y a 4 ºC.
- 4. Lavar el precipitado de células con 50 ml de LB, resuspender mediante pipeteo y centrifugar de nuevo en las mismas condiciones que en el paso anterior.
- 5. Repetir el paso de lavado con 50 ml de LB.
- Eliminar bien cualquier resto de medio de lavado y resuspender el precipitado celular en 0.5 ml de LB. Mantener en hielo.
- 7. Añadir al menos $8 \cdot 10^9$ esporas de la cepa de *S. tsukubaensis* que se quiere conjugar a 0.4 ml de medio 2×YT y someter a un choque térmico a 50 °C durante 10 min.
- Cuando el vial que contiene las esporas se ha enfriado, añadir las células de *E. coli* y mezclar mediante pipeteo.

- 9. Centrifugar a 2200 × g durante 3 min y a temperatura ambiente.
- 10. Retirar el sobrenadante y resuspender el precipitado de esporas y células en 0.3 ml de 2×YT.
- 11. Sembrar tres placas de ISP4 al que se ha añadido $MgCl_2$ a una concentración final de 20 mM con diferentes volúmenes de la mezcla esporas-células (p. ej., 50, 100 y 200 μ l).
- 12. Incubar a 28 °C durante unas 22 h.
- 13. Añadir 1.5 ml de cobertera con los antibióticos de selección de la construcción y ácido nalidíxico a cada placa. Dejar secar las placas en campana de flujo laminar.
- 14. Continuar la incubación a 28 ºC durante 10 días. A los 5 días debe intuirse el crecimiento de las colonias y a los 10 días deben aparecer colonias bien esporuladas.

NOTA: para preparar ISP4 $MgCl_2$ 20 mM se añaden 0.8 ml de una solución $MgCl_2$ 2.5 M esterilizada en autoclave.

II.7.12.2. Protocolo de conjugación para S. coelicolor

Este fue el protocolo utilizado para introducir la construcción de expresión controlada de *phoP* por anhidrotetraciclina en *S. coelicolor*. El protocolo presentado es una adaptación del de Kieser y colaboradores (2001).

Protocolo:

- 1. Inocular la cepa de *E. coli* ET12567/pUZ8002 que contiene la construcción que se quiere transferir a *S. coelicolor* en 5 ml de LB en presencia de los antibióticos necesarios.
- 4. Cultivar a 37 ºC y 250 r.p.m. durante toda la noche
- A la mañana siguiente, recoger 2 ml de cultivo mediante centrifugación a 2200 × g durante 7 min y a 4 ºC.
- 6. Lavar el precipitado de células con 1 ml de LB, resuspender mediante pipeteo y centrifugar de nuevo en las mismas condiciones que en el paso anterior.
- 7. Repetir el paso de lavado con 1 ml de LB.
- Eliminar bien cualquier resto de medio de lavado y resuspender el precipitado celular en 100 μl de LB. Mantener en hielo.
- Añadir entre 5 · 10⁷ y 10⁹ esporas de la cepa de S. coelicolor que se quiere conjugar a 0.5 ml de medio 2×YT y someter a un choque térmico a 50 °C durante 10 min.
- 10. Cuando el vial que contiene las esporas se ha enfriado, añadir las células de *E. coli* y mezclar mediante pipeteo.
- 11. Centrifugar a 2200 × g durante 3 min y a temperatura ambiente.
- 12. Retirar el sobrenadante y resuspender el precipitado de esporas y células en 150 μl de 2×YT.
- 13. Sembrar tres placas de MS al que se ha añadido $MgCl_2$ a una concentración final de 10 mM con diferentes volúmenes de la mezcla esporas-células (p. ej., 10, 50 y 100 μ l).
- 14. Incubar a 30 °C durante unas 20 h.
- 15. Añadir 1.5 ml de cobertera con los antibióticos de selección de la construcción y ácido nalidíxico a cada placa. Dejar secar las placas en campana de flujo laminar.
- 16. Continuar la incubación a 30 ºC. Al quinto día las colonias están bien esporuladas.

NOTA: para preparar MS MgCl₂ 20 mM se añaden 0.4 ml de una solución MgCl₂ 2.5 M esterilizada en autoclave.

II.7.12.3. Protocolo de conjugación con cromosomas artificiales para *S. coelicolor*

Fue el utilizado para transferir el cromosoma artificial de 130 kb que contiene la agrupación de tacrolimus (PAC20N) a las cepas de *S. coelicolor* M145 y $\Delta pfkA2$.

Protocolo:

- 1. Inocular la cepa de *E.coli* ET12567/pR9406/PAC20N en 2 ml de LB en presencia de kanamicina, cloranfenicol y carbenicilina (para mantener PAC20N, *dam* y pR9406, respectivamente).
- 2. Incubar a 37 °C y 200 r.p.m. durante toda la noche.
- 3. Al día siguiente añadir 500 μ l de este precultivo a 10 ml de LB con los mismos aditivos que en el paso anterior e incubar en las mismas condiciones durante 3 h-4 h hasta que alcance una DO₆₀₀ de 0.4-0.6.
- 4. Centrifugar a 3500 r.p.m. durante 6 min para recoger las células.
- 5. Realizar dos lavados con 5 ml-10 ml de LB.
- 6. Resuspender el precipitado de células en 1 ml de LB y dejarlo a temperatura ambiente mientras se da el choque térmico a las esporas.
- 7. Añadir $5 \cdot 10^9$ esporas de la cepa de *S. coelicolor* que se quiere conjugar a 500 µl de 2×YT e incubar en termobloque a 50 °C durante 10 min.
- 8. Dejar enfriar 3 min sobre la mesa y mezclar 500 μl de la suspensión de *E. coli* con las esporas. Agitar el vial en la mano suavemente durante 10 s.
- Centrifugar 2 min a 3500 r.p.m. y eliminar el sobrenadante por decantación. El precipitado de bacterias y esporas se resuspende en el volumen restante (~ 50 μl).
- 10. Hacer una dilución 1:10 en agua, en un volumen final de 100 μ l y sembrar en una placa de R2 sin sacarosa.
- 11. Incubar en estufa a 30 ºC durante 18 horas.
- 12. Aplicar la cobertera de ácido nalidíxico y tioestreptona (para seleccionar el PAC20N) y dejar secar las placas en campana de flujo laminar.
- 13. Continuar la incubación a 30 ºC durante 4-5 días.

II.7.13. Inactivación de genes mediante el sistema ReDirect[©]

Este sistema, descrito por Gust y col. (2002) para obtener mutantes de reemplazamiento o delecionados en *S. coelicolor*, se aplica a una gran variedad de *Streptomyces* y es la estrategia de referencia en este género. En líneas generales consiste en la sustitución de la secuencia cromosómica de interés por un casete de resistencia a un antibiótico que a su vez, se puede eliminar en un paso posterior mediante el uso de recombinasas. La aplicación de esta técnica conlleva los siguientes pasos:

 Amplificación de un casete de resistencia extendido. El casete está formado por el gen de resistencia al antibiótico y un *oriT* flanqueados por secuencias *frt* o *loxP* (reconocidas por las recombinasas FLP y Cre, respectivamente). La amplificación del casete extendido es específica para cada mutación deseada y se realiza por PCR desde un vector molde, con dos cebadores que incorporan en sus extremos 5' un segmento complementario a las secuencias que flanquean el gen a reemplazar en el cromosoma.

- 2) Transformación de *E. coli* BW25113/pIJ790 con el cósmido que contiene el gen a reemplazar y el casete de resistencia extendido. En esta cepa se produce la recombinación entre en el cósmido y el casete de resistencia, de manera que se obtiene un cósmido reemplazado.
- Transformación de la cepa deficiente en sistemas de metilación *E. coli* ET12567/pUZ8002 con el cósmido que presenta el reemplazamiento y transferencia a *Streptomyces* por conjugación intergenérica.
- 4) Una vez se ha producido la doble recombinación que reemplaza la secuencia del gen por el casete de resistencia en el cromosoma de *Streptomyces*, existe la opción de escindir dicho casete mediante el uso de recombinasas y obtener una deleción limpia.

El protocolo detallado, así como los esquemas de los diferentes casetes de resistencia o algunos artículos útiles se encuentran disponibles en <u>http://strepdb.streptomyces.org.uk/cgi-bin/tn inserts info.pl</u>.

II.7.13.1. Purificación del casete de resistencia molde usado en la PCR

En primer lugar se debe elegir un casete de resistencia adecuado para la cepa de trabajo (por ejemplo, *S. tsukubaensis* es resistente a higromicina de forma natural). En este trabajo se utilizó el vector pIJ774 (que contiene el gen *aac(3)IV*) como molde y se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII según las indicaciones del apartado II.7.6.1 (pág. 119).

El fragmento de 1374 pb se purificó a partir de un gel de agarosa al 0.6 % y se extrajo mediante el protocolo de *freeze-squeeze* (apartado II.7.8.1; pág. 123). Una vez purificado el fragmento, se comprobó mediante electroforesis la presencia de una única banda, pues contaminantes plasmídicos en el molde para la PCR pueden dar lugar a falsos positivos que son resistentes al antibiótico pero no contienen la construcción con la sustitución.

II.7.13.2. Diseño de cebadores para la PCR

Por cada gen que se quiere inactivar, se necesitan dos cebadores cuyo extremo 5' contenga 39 nt homólogos a la secuencia que flanquea el gen en el cromosoma y cuyo extremo 3' contenga 19 nt o 20 nt homólogos a los extremos del casete de resistencia. La posición de los 39 nt es muy importante para crear deleciones en marco utilizando los sistemas de escisión mediados por recombinasas. Las secuencias de 19 nt-20 nt de los extremos son iguales en todos los casetes excepto en el pIJ774, que contiene un nucleótido menos en una de ellas (Khodakaramian y col., 2006). Los cebadores empleados en este trabajo para mutar los genes *pfkA* fueron los denominados RDpfkA1F y R, RDpfkA2F y R y RDpfkA3F y R (tabla 2.4).

II.7.13.3. Amplificación por PCR del casete de resistencia extendido

Se utilizó la polimerasa de alta fidelidad Phusion[®] (New England BioLabs) para evitar errores en la amplificación del casete de resistencia. La mezcla de reacción y el programa de termociclación empleados se indican en la tabla 2.14. El producto de 1452 pb se extrajo mediante el protocolo de *freeze-squeeze* (apartado II.7.8.1; pág. 123) y se comprobó un pequeño volumen por electroforesis en gel de agarosa.

Tabla 2.14. Composición de la mezcla de reacción para la amplificación del casete extendido y programa de ciclos utilizado.

Componente	Concentración final
dNTP	0.2 mM
Cebadores	0.5 μM de cada uno
ADN molde pIJ774	2 ng/µl
DMSO	4 %
ADN polimerasa Phusion [®]	0.02 U/μl
Tampón Phusion [®] GC 5 ×	1 ×

NOTA: El tampón viene suministrado con la enzima y contiene MgCl₂ 7.5 mM.

Paso	Tª (ºC)	Tiempo (s)	Ciclos
	95	0	
Desnaturalización	98	59	1
Desnaturalización	98	15	
Hibridación	90	15	20
Extensión	72	23	
Desnaturalización	98	15	
Hibridación	70	15	11
Extensión	72	23	
Extensión final	72	600	1
Conservación	4	0	

II.7.13.4. Introducción del cósmido de interés en *E. coli* BW25113/pIJ790 mediante electroporación

El protocolo seguido es una adaptación del propuesto en el manual de ReDirect[©] (Gust y col., 2002):

- 1. Sembrar *E. coli* BW25113/pIJ790 en una placa de LA con cloranfenicol (pIJ790) e incubar a 30 °C durante 16 h para obtener colonias aisladas.
- Inocular una colonia en 5 ml de SOB con cloranfenicol y MgSO₄ a una concentración final de 20 mM. Incubar a 30 °C y 250 r.p.m. durante 16 h.
- Inocular 1 ml del cultivo anterior en 100 ml de SOB con cloranfenicol y MgSO₄ 20 mM e incubar en las mismas condiciones hasta que la DO₆₀₀ sea de 0.4.
- Recuperar las células mediante centrifugación a 2700 × g y 4 ºC durante 5 min en un rotor Sorvall GS3.
- 5. Lavar el precipitado de células con 100 ml de glicerol al 10 % frío.
- 6. Centrifugar igual que en el paso 4 y resuspender en 25 ml de glicerol al 10 % frío.
- 7. Centrifugar, retirar el sobrenadante y resuspender en 1 ml de glicerol al 10 %. Repartir alícuotas de 50 μ l que se almacenan a -80 $^{\circ}$ C.
- 8. En el momento de la electroporación, mezclar 100 ng del cósmido (1 μ l-2 μ l) con el vial de células y electroporar en una cubeta de 0.2 cm previamente enfriada en hielo. Condiciones de la electroporación: 200 Ω , 25 μ F y 2.5 kV (t = 4.5 ms-4.9 ms).
- 9. Añadir inmediatamente 1 ml de LB frío e incubar 1 h a 30 ºC.

- 10. Centrifugar a $2300 \times g$ y eliminar unos 900 μ l de sobrenadante. Resuspender el precipitado de células en el volumen restante.
- 11. Sembrar en LA con cloranfenicol y los marcadores de resistencia del cósmido (kanamicina y ampicilina para el SuperCos I).
- 12. Incubar a 30 °C durante 16 h.
- 13. Seleccionar una colonia e inocularla en 5 ml de LB en presencia de los mismos aditivos que en el paso anterior e incubar a 30 ºC y 250 r.p.m. 16 h. Este cultivo sirve como preinóculo para el protocolo de introducción del casete de resistencia extendido mediante electroporación.

NOTA: En una misma célula pueden coexistir copias del cósmido original y del cósmido recombinante. Una sola copia del cósmido que contenga el marcador de resistencia es suficiente para dotar de resistencia a la célula, de modo que, normalmente, cuanto mayor es el tamaño de la colonia, mayor número de copias mutagenizadas del cósmido contendrá.

II.7.13.5. Introducción del casete de resistencia extendido en *E. coli* BW25113/pIJ790 y reemplazamiento del gen en el cósmido

En este paso, la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790 que contiene el cósmido se electrotransforma con el casete de resistencia extendido y se promueve la recombinación entre el casete y el cósmido al inducir la expresión del sistema λ RED con L-arabinosa.

- Inocular un 1 % de un cultivo incubado durante toda la noche de la cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790 que contiene el cósmido de interés (paso 13 del protocolo anterior) en 10 ml de SOB con cloranfenicol y los antibióticos a los que confiere resistencia el cósmido.
- Añadir 100 μl de L-arabinosa 1 M (concentración final 10 mM) e incubar a 30 °C y 250 r.p.m. hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.4.
- 3. Recuperar las células mediante centrifugación a 2700 × g y 4 ºC durante 5 min en un rotor Sorvall GS3.
- 4. Lavar las células en 10 ml de glicerol al 10 % frío.
- 5. Centrifugar igual que en el paso 3 y resuspender en 5 ml de glicerol al 10 % frío.
- 6. Centrifugar, eliminar el sobrenadante y resuspender en 100 μl de glicerol al 10 %. Repartir alícuotas de 50 $\mu l.$
- 7. En el momento de la electroporación, mezclar 100 ng del casete de resistencia extendido (1 μ l-2 μ l) con el vial de células y electroporar en una cubeta de 0.2 cm previamente enfriada en hielo. Condiciones de la electroporación: 200 Ω , 25 μ F y 2.5 kV (t= 4.5 ms-4.9 ms).
- 8. Añadir inmediatamente 1 ml de LB frío e incubar 1 h a 37 °C. A esta temperatura se pierde el plásmido pIJ790.
- 9. Centrifugar a $2300 \times g$ y eliminar unos 900 µl de sobrenadante. Resuspender el precipitado de células en el volumen restante.
- 10. Sembrar en LA en presencia de los antibióticos a los que confiere resistencia el cósmido y el marcador de resistencia del casete extendido.
- 11. Incubar a 37 ºC durante 16 h para promover la pérdida del pIJ790.

NOTA: si se pretende hacer más inactivaciones sobre el mismo cósmido, las temperaturas de incubación de los pasos 8 y 11 son de 30 °C y además, en el paso 11 se adiciona cloranfenicol, todo ello para mantener el pIJ790. En este caso, se utiliza un casete que contenga *oriT* para la primera inactivación y casetes sin *oriT* y diferentes genes de resistencia para las siguientes inactivaciones.

Para comprobar la recombinación del cósmido en las colonias obtenidas se realizó una PCR con la pareja de cebadores de amplificación del casete de resistencia extendido correspondiente. La mezcla de reacción fue equivalente a la de la reacción de amplificación del casete. Como molde se añadió una pequeña cantidad de la colonia en el fondo del tubo y el programa de termociclación incluyó un paso previo de 95 °C y 10 minutos para asegurar la lisis de las células.

II.7.13.6. Transferencia a Streptomyces del cósmido con el gen reemplazado

Los cósmidos se extrajeron mediante lisis alcalina y se introdujeron en *E. coli* ET12567/pUZ8002 mediante transformación química (ver apartado II.7.11.2; pág. 132). Esta cepa se cultivó en presencia de kanamicina, cloranfenicol y apramicina y se utilizó para transferir la construcción definitiva a *Streptomyces* por conjugación intergenérica siguiendo el protocolo descrito en el apartado II.7.12.1 (pág. 133).

II.8. Métodos de manipulación y análisis de ARN

En esta sección se presentan los protocolos utilizados para obtener ARN de cultivos líquidos de *Streptomyces* para su posterior aplicación en experimentos de micromatrices y de RT-qPCR. Algunas consideraciones generales son las siguientes:

- 1. Para el trabajo con ARN es imprescindible evitar la contaminación de las muestras con ARNasas, por lo que se trabaja con guantes que se cambian frecuentemente.
- 2. Las ARNasas son proteínas muy resistentes que mantienen la actividad en cierta proporción tras el tratamiento térmico en autoclave, por lo que las puntas de pipeta utilizadas en su procesamiento se autoclavan dos veces.
- 3. Para limpiar pipetas, gradillas y superficies de trabajo se utiliza la solución RNaseZap[®] de Ambion. Se aplica con un papel y guantes, ya que es corrosiva, y después se aclara el material con agua Milli-Q abundante.
- 4. El agua utilizada ha de ser libre de ARNasas, preferentemente agua Milli-Q de sistema de filtración con luz UV tratada a 121 ºC durante 20 minutos en olla o, alternativamente, agua comercial.

II.8.1. Extracción de ARN total de Streptomyces

Todos los reactivos y el material empleado tienen que ser adecuados para el trabajo con ARN (ver apartado anterior). Para mayor claridad, este procedimiento se ha dividido en dos apartados.

II.8.1.1. Recolección de las muestras del cultivo y estabilización del ARN de *Streptomyces*

Una cuestión importante antes de comenzar la recogida de muestras es la determinación de la cantidad óptima de micelio de partida y el rendimiento esperado. La capacidad máxima de unión de la minicolumna RNeasy[®] es de 100 µg según el manual de Qiagen y no conviene saturar la matriz de la columna para evitar impurezas y pérdida de ARN en el eluido final. Además, el estado fisiológico de las células determina el rendimiento y la calidad del ARN. En fase de crecimiento rápido el micelio contiene más ARN y a partir de un momento determinado del cultivo, se obtiene ARN degradado y en menor cantidad.

Ya que en un cultivo de *S. tsukubaensis* en medio MGm-2.5, al procesar muestras de 2.5 a 15.5 mg se obtiene una concentración de ARN que varía de 340 ng/µl a 2.4 µg/µl, se tomó como referencia la siguiente norma:

- Para muestras en las que el peso seco del cultivo fuese menor o igual a 4 mg/ml se recogió 1 ml de muestra para la extracción de ARN.
- Para muestras en las que el peso seco del cultivo fuese mayor de 4 mg/ml se recogieron 0.6 ml de muestra.

Las muestras se mezclaron inmediatamente con dos volúmenes de RNAprotect[™] Bacteria Reagent (Qiagen), que impide la degradación del ARN así como la síntesis de nuevos transcritos.

Protocolo:

- Preparar tubos (de al menos 4 volúmenes de capacidad con respecto a la muestra) con 2 volúmenes del reactivo RNAprotect[™] Bacteria Reagent.
- 2. Recoger el volumen de cultivo del matraz inmediatamente después de sacarlo del incubador con puntas de pipeta adecuadas para el trabajo con ARN.
- Inmediatamente verter el volumen de cultivo en el tubo de RNAprotect[™] Bacteria Reagent.
- 4. Agitar inmediatamente en *vortex* durante 5 s.
- 5. Dejar actuar 5 min a temperatura ambiente.
- 6. Centrifugar a velocidad máxima durante 5 min (tubos de 1.5 ml-2 ml) o 10 min-15 min (tubos de 10 ml), a más de 15 °C para que no precipiten los componentes del reactivo.
- 7. Decantar y retirar bien el sobrenadante apoyando la boca del tubo sobre papel.
- 8. Congelar el precipitado de micelio a -20 ºC o a -80 ºC hasta el momento de la extracción.

NOTAS: El período de congelación recomendado por Qiagen a -20 °C es de hasta dos semanas y a -80 °C, de hasta 4 semanas. En este trabajo se han mantenido muestras más de 5 meses a -20 °C sin diferencias de calidad del ARN.

Soluciones:

RNAprotect[™] **Bacteria Reagent** (Qiagen).

II.8.1.2. Lisis enzimática y mecánica del micelio

En este procedimiento el micelio se somete primero a una rotura enzimática mediante tratamiento con lisozima (pasos 1 a 5) y posteriormente, a una rotura mecánica

con bolas de vidrio en un agitador FastPrep[®] (pasos 6 a 12). El lisado obtenido se prepurifica por fenolización (pasos 13 a 18) antes de tratarlo con las columnas RNeasy[®].

Protocolo:

- 1. Descongelar los micelios tratados a temperatura ambiente unos 10 min antes de resuspenderlos con la solución de lisozima.
- Añadir 170 μl de lisozima 15 mg/ml disuelta en TE y resuspender por pipeteo hasta disgregar el micelio. Evitar en lo posible formar espuma y utilizar puntas de pipeta cortadas adecuadas para el trabajo con ARN.
- Incubar a temperatura ambiente durante 10 min exactos: llevar la cuenta para cada tubo a partir del momento en que comienza la disgregación del micelio. Menos tiempo causa un menor rendimiento en la extracción y más tiempo puede resultar en degradación del ARN.
- 4. Añadir 600 μ l de RLT- β -ME a cada tubo en campana extractora (a partir de este momento se trabaja en campana extractora).
- 5. Agitar con *vortex* sin demora (según vayan cumpliéndose los 10 min de cada tubo se añade el RLT-β-ME y se agita).
- 6. Transferir el contenido a tubos Lysing Matrix B (MP Biomedicals). Apretar fuertemente los tubos de rosca para evitar fugas de β -ME o contaminaciones y mantener en hielo.
- 7. Agitar en FastPrep[®]: velocidad 6.5 durante 30 s.
- 8. Introducir 1 min en hielo para enfriar la muestra.
- 9. Repetir la agitación en FastPrep[®] como en el paso 7.
- 10. Centrifugar a temperatura ambiente durante 4 min para que las bolitas de la matriz de lisis se compacten.
- 11. Preempaquetar los tubos PLG: dos microtubos de 2 ml por muestra, (centrifugándolos durante 30 s a velocidad máxima).
- 12. Transferir 750 μl del lisado a un tubo PLG.
- 13. Añadir 400 μl de fenol ácido (Aquaphenol[™], MP Biomedicals) y 400 μl de CIA. Es conveniente usar una pipeta automática cuando se procesan 4 o más preparaciones.
- 14. Agitar vigorosamente los tubos en sentido longitudinal hasta formar una suspensión. Continuar la agitación durante 1 min.
- 15. Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 min a velocidad máxima. La fase superior acuosa se transfiere a un nuevo tubo PLG.
- 16. Repetir la extracción con fenol-CIA.
- 17. Centrifugar a temperatura ambiente durante 5 min a velocidad máxima. Preparar las minicolumnas en una gradilla y rotularlas.
- Pipetear la fase acuosa a un microtubo de 2 ml ajustando la P1000 en 740 μl (debería quedar algo de líquido). De esta forma se iguala el volumen recuperado entre muestras.
- 19. Añadir 412 μl de etanol absoluto (con la P5000 para 4 o más muestras). En caso de recuperar menos de 740 μL en el paso anterior, el volumen de etanol se obtiene multiplicando por 0.56 el volumen acuoso recuperado. Se mezcla el etanol en el momento de la carga de la columna.

Purificación con columnas RNeasy[®]:

- 20. Descongelar la ADNasa I y atemperar el tampón RDD (Qiagen).
- 21. Mezclar por pipeteo suave el etanol con el resto de la solución. Si se forma un ovillo se pasa por la columna igualmente. No centrifugar.
- 22. Añadir 650 μ l de la preparación a la minicolumna. El máximo volumen de carga es de 0.7 ml.
- 23. Centrifugar 15 s a temperatura ambiente y máximas revoluciones.

- 24. Descartar el eluido por decantación, evitando el contacto del interior de la minicolumna con cualquier superficie.
- 25. Cargar el resto de la preparación.
- 26. Centrifugar 15 s (como en el paso 23). Descartar el eluido de la forma anteriormente descrita.
- 27. Añadir 350 μl de tampón RW1 (con la P5000 para 4 o más muestras) a cada minicolumna.
- 28. Centrifugar 15 s (como en el paso 23).
- 29. Descartar el eluido de la forma anteriormente descrita (a partir este paso se puede prescindir de la campana extractora).
- 30. Preparar la solución de ADNasa I en RDD. Se necesitan (10 \cdot N) μ l de ADNasa disuelta en agua, donde N es el número de muestras. Añadir 7 volúmenes de solución RDD. Mezclar pipeteando suavemente. Se puede dar un pulso suave.
- 31. Pipetear 79 μ l de la solución de ADNasa I sobre la membrana de la columna e incubar 30 °C en estufa durante 30 min.
- 32. Centrifugar brevemente.
- 33. Añadir 350 μl de RW1 y dejar 5 min a temperatura ambiente para inactivar la ADNasa.
- 34. Preparar nuevos tubos de recolección de 2 ml sin rotular y tubos de recolección de 1.5 ml rotulados (incluidos en el sistema comercial).
- 35. Centrifugar 15 s (como en el paso 23). Cambiar la columna a un tubo de recolección de 2 ml.
- 36. Añadir 500 µl de solución RPE (comprobar que se hubo completado con etanol)
- 37. Centrifugar 15 s (como en el paso 23). Descartar el eluido.
- 38. Añadir 500 μl de solución RPE.
- 39. Centrifugar 2 min (como en el paso 23)
- 40. Opcional: descartar el eluido y centrifugar 15 s para asegurar la eliminación del RPE de la punta de la minicolumna.
- 41. Transferir la columna a un microtubo de recolección de 1.5 ml con cuidado.
- 42. Añadir 50 μl de agua libre de ARNasas sobre la membrana.
- 43. Incubar durante 1 min y centrifugar 1 min (como en el paso 23) para eluir el ARN.
- 44. Descartar la columna, mezclar el eluido por pipeteo y cerrar el tubo de colección. Almacenar a -20 ºC hasta su uso.

Soluciones:

Lisozima 15 mg/ml para ARN (Fluka): es conveniente usar un vial reservado para ARN a 4 ºC. Se toma con una espátula flameada y se disuelve en TE (ver apartado II.7.1.1; pág. 113) esterilizado dos veces. Se guardan alícuotas a -20 ºC. No usar tras más de 2 ciclos de congelación.

RLT- β -**ME**: (6 μ I de β -mercaptoetanol + 600 μ I de RLT) · número de muestras.

Fenol ácido: Aquaphenol[™] (MP Biomedicals).

CIA: ver apartado II.7.3.1 (pág. 117). Es conveniente usar una preparación reservada para ARN.

Tampones **RLT**, **RW1** y **RPE** vienen incluidos en el RNeasy[®] Mini kit (Qiagen). El tampón RPE se completa con etanol cuando se utiliza por primera vez.

La **ADNasa I**, el tampón **RDD** y el **agua libre de ARNasas** se incluyen en el sistema comercial RNase-Free DNase Set (Qiagen). Para preparar la ADNasa I se diluye el liofilizado en 0.55 ml de agua, inyectada a través del tapón de goma utilizando una jeringa estéril. Tras resuspender se hacen alícuotas de unos 40 μ l y se guardan a -20 °C.

II.8.2. Análisis de la concentración, pureza e integridad del ARN

La medida de la concentración se realizó espectrofotométricamente utilizando el equipo NanodropTM ND-1000 y 1.5 μ l de muestra. Se determinaron la concentración y los indicadores de pureza A₂₆₀/A₂₈₀ (2.1 idealmente) y A₂₆₀/A₂₃₀ (mayor de 2, en torno a 2.3).

La valoración de la integridad del ARN se realizó con el equipo Bioanalyzer 2100, utilizando chips RNA Nano 6000 (ambos de Agilent). El principio básico del análisis es la electroforesis en gel de las moléculas cargadas eléctricamente. Gracias a un marcador con fragmentos de tamaño conocido se calcula el tamaño de cada fragmento de la muestra en función de su tiempo de migración. Las muestras se mezclan con un fluoróforo cuyas moléculas se intercalan entre las del ARN y los complejos formados son detectados por fluorescencia inducida por láser. Los datos se traducen en imágenes similares a las de un gel clásico y a electroferogramas.

El sistema aplica un algoritmo para determinar la integridad de las moléculas de ARN, el resultado es el valor RIN (<u>RNA Integrity Number</u>), que varía de 1 (muestra completamente degradada) a 10 (muestra intacta).

Es importante tener en cuenta los siguientes factores:

-La cantidad y calidad de ácido nucleico aplicado al chip es crucial para el buen desarrollo de la electroforesis, por lo que se revisaron previamente los valores de A₂₆₀ y A₂₈₀. Aunque las instrucciones del aparato bioanalizador indican que no se deben cargar más de 500 ng, con muestras de aproximadamente 1.2 µg/µl la electroforesis fue correcta (Antonio Rodríguez García, comunicación personal). Cuando las concentraciones fueron superiores, diluimos con agua libre de ARNasas hasta obtener una concentración de 0.5 µg/µl.

-Puesto que las partículas sólidas interfieren en la electroforesis, se manipuló el chip siempre con guantes sin polvo y la electroforesis se ejecutó en menos de 5 minutos tras la preparación del chip para evitar la precipitación de las soluciones. Es importante agitar el chip antes de introducirlo en el equipo para evitar que posibles burbujas situadas en el fondo del pocillo impidan la penetración de la muestra en los microcanales.

-Se deben evitar vibraciones de la superficie en la que se apoya el equipo ya que esto afecta a los picos y a la línea base del electroferograma.

Protocolo:

a. Preparación de la matriz:

- 1. Pipetear 550 µl de matriz de gel en un tubo con filtro (suministrado con el kit).
- 2. Centrifugar a 3600 r.p.m. durante 10 min a temperatura ambiente.
- Preparar alícuotas de 65 µl de matriz de gel filtrada en tubos de 1.5 ml libres de ARNasa (suficiente para 2 chips). Guardar a 4 ºC las alícuotas que no se necesitan. Estas alícuotas tienen una vida útil de 4 semanas a 4 ºC.
- b. Preparación de la mezcla matriz-fluoróforo:
- 1. Atemperar durante 30 min el fluoróforo concentrado, mezclar con *vortex* durante 10 s y dar un pulso de centrífuga. Mantener el fluoróforo protegido de la luz.
- 2. Añadir 1 µl de este fluoróforo a la alícuota de 65 µl de matriz y mezclar bien con *vortex*.

- 3. Centrifugar a velocidad máxima durante 10 min a temperatura ambiente. Esta mezcla es suficiente para preparar 2 chips, pero debe ser usada en el mismo día.
- c. Preparación de las muestras de ARN y de la escalera de tamaños:
- Preparar 3 μl de cada ARN y de la escalera de tamaños en tubos de 0.2 ml. En la carga del chip se utilizará 1 μl, preparando 3 μl nos aseguramos de tener suficiente cantidad como para repetir la electroforesis en caso necesario.
- 2. Desnaturalizar a 70 ºC durante 3 min en termociclador.
- Pasar a un baño de hielo durante 2 min y dar un pulso de centrífuga durante 20 s. Mantener en hielo.
- d. Ensamblaje de la plataforma de cebado del chip:
- 1. Insertar y apretar la jeringa en la plataforma de carga. Colocar un chip RNA 6000 Nano en la base de la plataforma de carga de chips.
- 2. Subir el émbolo de la jeringa hasta la posición 1 ml (presionar la pinza para permitirlo).
- e. Cargar de la mezcla matriz-fluoróforo, el estándar interno, la escalera de tamaños y las muestras:
- 1. Pipetear 9 μl de la mezcla gel-fluoróforo en el centro del pocillo (no en la pared) señalado con una 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).
- 3. Esperar exactamente 30 s y soltar la pinza de retención. El émbolo va retrocediendo por sí mismo.
- 4. Esperar 5 s y subir manual y lentamente el émbolo de la jeringa hasta la posición de 1 ml. Esperar otros 5 s.
- 5. Abrir la plataforma de cebado de chips y pipetear 9 μ l de la mezcla gel-fluoróforo en los dos pocillos marcados con una G.
- 6. Pipetear 5 μl del estándar interno ARN Nano 6000 en los 12 pocillos de la muestra y en el pocillo señalado con la escalera.
- 7. Pipetear 1 µl de escalera de tamaños en el centro del pocillo señalado con la escalera.
- 8. Pipetear 1 μl de muestra en el centro de cada uno de los otros 12 pocillos. En caso de no cargar todos los pocillos con muestra, pipetear 1 μl de agua o de estándar interno.
- f. Descontaminación de los electrodos del bioanalizador (antes y después de la electroforesis):
- Cargar 350 μl de RNaseZap[®] en uno de los pocillos del chip de limpieza y 350 μl de agua libre de ARNasas en el chip de enjuagado (se distribuirá al resto de los pocillos).
- Colocar en el bioanalizador el chip de limpieza, cerrar la tapa para lavar los electrodos y esperar 1 min. Sustituir por el chip de enjuagado, cerrar la tapa y esperar 1 min. Retirar el chip de enjuagado.
- g. Electroforesis:
- Colocar el chip de electroforesis en el *vortex* con adaptador específico para chips (IKA) y agitar durante 1 min a 2400 r.p.m. No sobrepasar la velocidad para evitar salpicaduras entre los pocillos.
- 2. Es importante ejecutar el chip de electroforesis en el Bioanalizador dentro de los 5 min siguientes a la agitación. El programa empleado será Prokaryote Total RNA Nano assay.
- 3. Tras la electroforesis, descontaminar los electrodos del Bioanalizador como se explicó anteriormente.

NOTA: El **RNA 6000 Nano kit** contiene: el fluoróforo concentrado, el estándar interno, la matriz de gel y la escalera de fragmentos de ARN. De la escalera, que es muy lábil a la congelación, se preparan alícuotas de 2 μ l (para dos chips) en microtubos apropiados y se almacenan a -20 °C.
El electroferograma debe mostrar los picos de ARN ribosomal, que constituyen la mayoría del ARN de la muestra, bien definidos y estrechos, con la línea base sin grandes fluctuaciones (ver figura 2.4). Este perfil se altera en función de la degradación del ARN y ello revierte en el RIN. Aunque lo deseable es obtener ARN con un RIN de 10, este valor no tiene por qué ser crítico a la hora de realizar un ensayo: una RT-qPCR concreta puede ser reproducible utilizando ARN de un valor de RIN de 7. Si se trabaja con un conjunto de muestras de ARN (por ejemplo, en un experimento de micromatrices) es preferible que todas tengan valores de RIN similares.



Figura 2.4. Representación de electroferogramas de muestras de ARN con diferente RIN. A) RIN = 8.6 y B) RIN = 9.5.

II.8.3. Estudios transcriptómicos mediante micromatrices

Los estudios transcriptómicos de *S. tsukubaensis* y de *S. coelicolor* se realizaron con micromatrices del fabricante Agilent de formato 8 × 15 K. Este formato presenta 8 micromatrices idénticas en un soporte de vidrio del tamaño de un portaobjetos de microscopía. Cada micromatriz contiene 15 744 características constituidas por sondas de oligonucleótidos de 45 nt-60 nt sintetizadas *in situ*. De las 15 744 características, 15 208 corresponden a sondas experimentales cuya secuencia está determinada por el investigador y 536 corresponden a controles (sondas negativas, blancos, sondas de control interno) que son incluidos por el fabricante. Estos controles no fueron utilizados en los procedimientos de análisis empleados.

El principio básico de este tipo de estudios es la hibridación de los ácidos nucleicos de la muestra con las sondas de secuencia complementaria que se encuentran depositadas sobre la superficie de la micromatriz. En todos los casos se optó por un diseño con referencia: el ADNc sintetizado a partir de una muestra de ARN y marcado con Cy[™]-3 hibrida con las sondas y proporciona la señal de medición del transcrito, y el ADNg marcado con Cy[™]-5 hibrida con las mismas sondas y proporciona la señal de referencia. La metodología de estos estudios implica que la cantidad de ADN de una especie que hibrida con una sonda determinada es proporcional a la cantidad que existe en la muestra. El ADN hibridado en cada sonda se detectó por medida de la fluorescencia procedente de los fluoróforos Cy[™]-3 y Cy[™]-5 con el lector Agilent G2565BA. Los valores de fluorescencia se cuantificaron con el programa FeatureExtraction versión 9.5.1 de Agilent. La cuantificación básicamente consiste en que los valores de intensidad de cada pixel de la imagen se segmentan en función de la posición y forma de cada característica, se discrimina la señal del frente y del fondo, y se resumen con diversos estadísticos. En los análisis de este trabajo se usaron en todos los

casos la media de la señal del frente y la mediana de la señal del fondo para cada canal (dos canales, cada uno procedente de un fluoróforo).

Los diseños concretos de las micromatrices empleadas y los procedimientos de marcaje, hibridación y detección se indican en los siguientes apartados.

II.8.3.1. Diseños de micromatrices

El diseño de las sondas experimentales (la determinación de la secuencia de nucleótidos) fue realizado por el Dr. Antonio Rodríguez utilizando la plataforma eArray (<u>https://earray.chem.agilent.com/earray/</u>). En este trabajo se utilizaron dos diseños de micromatrices para *S. tsukubaensis*: el nº 1 (identificador 029522), empleado para los estudios del mutante $\Delta fkbN$, y el nº 2 (identificador 034745), para los estudios de adición de azúcares y de N-acetilglucosamina. En el experimento de expresión heteróloga de la agrupación de tacrolimus en *S. coelicolor* se utilizaron las micromatrices del diseño con identificador 062686.

El diseño nº 1 (identificador 029522) de las micromatrices de S. tsukubaensis se realizó a partir de la secuencia borrador del cromosoma, del conjunto de las secuencias sueltas (contigs) que no fueron ensambladas en el cromosoma y de la anotación preliminar (identificación de secuencias codificantes). Tanto la anotación como las secuencias fueron producidas por el equipo dirigido por el Dr. Juan Francisco Martín en INBIOTEC y en colaboración con CeBiTec (Universidad de Bielefeld, Alemania). Se diseñaron tanto sondas de expresión (sondas asignadas a cada locus definido en la anotación) como sondas teseladas (sondas regularmente espaciadas a lo largo de una región cromosómica). Se diseñaron sondas teseladas para cubrir por ambas cadenas la región que contiene la agrupación de biosíntesis de tacrolimus. Posteriormente a la obtención del diseño, el borrador del cromosoma fue depositado en GenBank con el número de acceso AJSZ00000000 (Barreiro y col., 2012). En el proceso de depósito, la secuencia cromosómica fue reanotada por el sistema automático del NCBI (NCBI prokaryotic genome automatic annotation pipeline). Las secuencias sueltas no fueron incluidas en el depósito. Estas secuencias contienen frecuentemente secuencias codificantes de proteínas incompletas. Para el análisis de los experimentos transcriptómicos de este trabajo se contó con una anotación del cromosoma mejorada respecto a la utilizada para el diseño. Por este motivo se reasignaron las sondas del diseño a los genes de la nueva anotación. Así, el diseño nº 1 contiene sondas para analizar la expresión de 6517 genes codificantes de proteínas (455 en secuencias sueltas no ensambladas en el cromosoma), 890 genes hipotéticos de ARN pequeños (29 en secuencias sueltas) y 19 genes de ARNt. Las regiones correspondientes a ARN pequeños hipotéticos fueron identificadas por el Dr. Carlos Prieto, principalmente a partir de la detección bioinformática de terminadores. La mayoría de los genes tienen asignada una única sonda, pero para 904 existen sondas múltiples (2 a 397 sondas). En todos los experimentos realizados los valores de expresión asignados a los genes con sondas múltiples corresponden a la media aritmética de los valores de sus sondas tras la normalización.

El diseño nº 2 (identificador 034745) se realizó a partir de un borrador del genoma y de una anotación más avanzados que los del diseño 1, aunque igualmente se reasignaron las sondas, una vez obtenidas las micromatrices, a la misma anotación final que en el caso del

diseño 1. Así mismo se incluyeron sondas teseladas para la agrupación de tacrolimus, aunque solamente las sondas correspondientes a la cadena codificante de cada gen biosintético, para así poder incluir más sondas de expresión. De este modo, las micromatrices de este diseño contienen una o varias sondas para cada uno de los 6717 genes codificantes de proteínas detectados en la secuencia del borrador. De este conjunto, 6244 genes se localizan en el cromosoma ensamblado y el resto (473) son generalmente secuencias parciales anotadas en secuencias sueltas. Además de los genes codificantes de proteínas data 1353 ARN pequeños hipotéticos y 35 ARNt.

El diseño de la micromatriz de *S. coelicolor* (identificador 062686) se obtuvo a partir de la secuencia y de la anotación pública del genoma. Se incluyeron sondas de expresión para los genes y también las mismas 1502 sondas teseladas de la agrupación de tacrolimus del diseño 2 de *S. tsukubaensis*. De esta forma se pudo analizar la expresión heteróloga de la agrupación de biosíntesis.

II.8.3.2. Marcaje de ADN genómico con Cy[™]-5

La muestra de ADN total utilizada se extrajo de un cultivo en fase estacionaria (para evitar que estuviera más representada la región central donde se origina la replicación, Musialowski y col., 1994) mediante *salting out* (apartado II.7.2.1; pág. 116). La muestra se sometió a un tratamiento con ARNasa a concentración final de 0.04 μ g/ μ l, fenolización, precipitación con acetato sódico y etanol y se resuspendió en agua o en Tris-HCl 10 mM pH 8 (solución EB de RNeasy[®]). Para un cristal de 8 matrices, fue suficiente marcar 3 μ g de ADNg.

Durante el desarrollo del protocolo debe evitarse la exposición de los fluoróforos a la luz directa o intensa; por tanto, se debe mantener en oscuridad el reactivo y las mezclas. El CyTM-5 es especialmente sensible al ozono (20 μ g/m³) y a la humedad (50 %).

Protocolo:

- Mezclar en un microtubo de 1.5 ml 20 μl de la solución de cebadores aleatorios 2.5 ×, X μl de la solución de ADNg (3 μg finales) y completar hasta 40 μl con agua Milli-Q.
- 2. Mezclar bien pipeteando y desnaturalizar en termobloque a 95 ºC durante 5 min.
- 3. Enfriar en hielo (más de 5 min), agitar en *vortex* y centrifugar (máximas revoluciones durante 10 s). Mantener en hielo.
- Añadir a la mezcla mantenida en hielo 5 µl de la mezcla de nucleótidos dCTP 10 × y 3.75 µl de Cy™-5-dCTP (GE).
- 5. Mezclar con *vortex* y someter a un pulso de centrífuga la mezcla.
- 6. Añadir 1.5 μ l de Exo-Klenow, pipetear suavemente para homogeneizar y transferir a un microtubo de 0.2 ml.
- 7. Incubar en el termociclador a 37º C durante toda la noche.
- Añadir 5 μl de solución de paro y mantener en hielo. Se puede guardar a -20 ºC durante unos días hasta su uso.

Soluciones:

El sistema de marcaje BioPrime[®] Array CGH Genomic Labeling Module (Invitrogen) incluye los siguientes componentes: **cebadores aleatorios 2.5** × (octámeros, 750 µg/ml); **mezcla de nucleótidos dCTP 10** × (dATP, dGTP, y dTTP 1.2 mM; dCTP 0.6 mM, en Tris pH 8.0 10 mM; EDTA 1 mM); **fragmento Exo-Klenow** de ADN polimerasa (40 U/µl) y **solución de paro** (EDTA 0.5 M pH 8.0). **Cy™-5-dCTP** 1 mM (GE).

II.8.3.3. Síntesis de ADNc marcado con Cy™-3 a partir de ARN

El ARN debe estar purificado por el método adecuado y disuelto en tampón EB del kit RNeasy[®] o en agua. La escala de reacción habitual es 0.35 ×, en la que se usan 4.2 µg de ARN. Dados los volúmenes de la mezcla de marcaje el ARN debe estar a una concentración mínima de 0.8 µg/µl. Cuando no se alcanzaba dicha concentración, se evaporó en centrífuga de vacío a temperatura ambiente, sin llegar a desecarlo.

Protocolo:

- Para utilizar la escala 0.35 ×, comprobar que la concentración de ARN total en las muestras es igual o superior a 0.79 μg/μl, ya que en esta escala se utilizan 4.2 μg de ARN y el volumen máximo de solución que se puede añadir es de 5.3 μl. Si el ARN está demasiado diluido, la forma más correcta es: 1) evaporar sin llegar a desecar el volumen que contiene los 4.2 μg en centrífuga de vacío, 2) tomar 5.3 μl de agua y depositarla en la tapa del microtubo 3) con la misma punta de pipeta y volumen en la pipeta cargar la solución de ARN sin tomar aire con la punta y 4) completar los 5.3 μl recogidos por la punta con el agua depositada en la tapa.
- 2. Preparar en microtubos de 0.2 ml las mezclas de ARN total y cebadores aleatorios, de la siguiente manera (escala 0.35 ×): mezclar 0.6 μl de la solución de cebadores aleatorios, X μl de la solución de ARN total (4.2 μg) y completar hasta 5.9 μl con agua Milli-Q. En el caso de utilizar la escala 1 × se mezclan 1.7 μl de cebadores aleatorios, X μl de la solución de ARN total (12 μg) y se completa hasta 16.9 μl con agua Milli-Q.
- 3. Desnaturalizar en termociclador a 70 ºC durante 10 min.
- 4. Enfriar en hielo (durante más de 1 min) y centrifugar (máximas revoluciones durante 10 s). Mantener en hielo.
- 5. Calcular la mezcla madre de marcaje que incluye los nucleótidos y la transcriptasa reversa. Multiplicar los volúmenes requeridos, según el escalado elegido en el paso 1, por el número de marcajes que se van a hacer, más un 12 %-20 % de margen de seguridad. Proteger el fluoróforo de la luz en los siguientes pasos.
- 6. Añadir el volumen requerido de la mezcla madre (4.6 μ l en la escala 0.35 ×) a las muestras de ARN-cebadores. Mezclar bien por pipeteo y evitar la formación de burbujas.
- 7. Incubar en termociclador a 25 °C durante 10 min y a 46 °C durante 5 h-6 h. Si se deja por la noche, incluir un paso final a 4 °C.
- Para lisar químicamente el ARN, añadir 3.5 μl de NaOH 1 M (para la escala 0.35 ×; 10 μl para la escala 1 ×) y mezclar bien.
- 9. Incubar en termociclador a 70 ºC durante 10 min.
- 10. Neutralizar la solución con 3.5 μl de HCl 1 M (para la escala 0.35 ×; 10 μl para la escala 1 ×) y mezclar bien. Es necesario que los volúmenes de base y ácido se añadan con precisión: usar la misma pipeta en ambos casos. Los marcajes se pueden congelar en este momento. Evitar los ciclos de congelación-descongelación innecesarios. Proteger de la luz.

Soluciones:

Cebadores aleatorios (hexámeros, 3 µg/µl, Invitrogen).

Mezcla de dNTP para marcaje de ARN, "dNTP-R" (dA/G/TTP: 25 mM; dCTP: 10 mM). Se preparan a partir de dATP, dCTP, dGTP, dTTP 100 mM cada uno (New England BioLabs).

Transcriptasa reversa **SuperScript® III** (200 u/µl, Invitrogen). El **DTT** y la solución **Primera cadena 5** × vienen suministrados con la enzima.

Cy™-3-dCTP 1 mM (GE).

NaOH 1.0 N y HCl 1.0 N (Sigma).

Componentes	1 ×	0.35 ×	Para 8 reacciones
Solución Primera cadena 5 ×	6 μl	2.10 μl	18.8 µl
DTT 100 mM	3 μl	1.05 μl	9.4 μl
dNTP-R	0.6 μl	0.21 μl	1.88 µl
Cy™-3-dCTP 1 mM	1.5 μl	0.53 μl	4.7 μl
Superscript [®] III (o II)	2.0 μl	0.70 μl	6.27 μl
Volumen final	13.1 µl	4.59 μl	41.1 μl

Tabla 2.15. Composición de la mezcla madre de marcaje para las escalas $1 \times 0.35 \times y$ para 8 reacciones de escala $0.35 \times con un 12 \%$ de margen de seguridad.

II.8.3.4. Purificación del ADN marcado mediante minicolumnas MinElute®

Estas minicolumnas se utilizaron en la purificación del ADN marcado, tanto ADNg como ADNc sintetizado a partir de ARN. Las minicolumnas se almacenan a 4 °C y las muestras se procesan con material para ADN.

Protocolo:

- Preparar las minicolumnas en una gradilla, rotuladas en la tapa, con su tubo de colección y con la tapa abierta. Comprobar que la solución PE tiene añadido el etanol. En el caso del marcaje del ADNg, si se ha escalado la reacción, escalar también el número de minicolumnas para no sobrepasar la capacidad de unión de las columnas.
- Añadir 5 volúmenes de solución PB a cada marcaje: (90 μl para la escala 0.35 × en el marcaje de ADNc y 250 μl en el marcaje 1 × de ADNg), mezclar y cargar las minicolumnas.
- 3. Centrifugar a 13 000 r.p.m. durante 1 min.
- 4. Comprobar la coloración de la membrana de la minicolumna y del eluido. Descartar el eluido.
- 5. Añadir 500 μ l de solución PE a las minicolumnas para el primer lavado de las membranas.
- 6. Centrifugar a 13 000 r.p.m. durante 1 min.
- 7. Añadir 250 μ l de solución PE a las minicolumnas para el segundo lavado de las membranas.
- 8. Centrifugar a 13 000 r.p.m. durante 1 min. Descartar el eluido del tubo de colección.
- 9. Centrifugar a 13 000 r.p.m. durante 1 min para eliminar los restos de etanol (de la solución PE) que puedan quedar en la punta de la minicolumna.
- 10. Transferir las minicolumnas a microtubos de 1.5 ml a los que se les ha cortado la tapa.
- 11. Añadir 10 μ l de solución EB (Tris-HCl 10 mM pH 8.5) sobre el centro de las membranas si se trata de ADNc o 20 μ l si se trata de ADNg.
- 12. Mantener 1 min a temperatura ambiente.
- 13. Centrifugar a 13 000 r.p.m. durante 1 min.
- 14. Añadir otros 10 μl de solución EB distribuyéndolos en la zona de las membranas que retengan color (habitualmente en la periferia) si se trata de ADNc o 20 μl precalentados a 60 °C si se trata de ADNg.
- 15. Mantener 1 min a temperatura ambiente.
- 16. Centrifugar a 13 000 r.p.m. durante 1 min.
- En el caso de ADNc: recoger los 20 μl eluidos y volver a aplicarlos sobre las membranas. En el caso del ADNg: añadir 10 μl de la solución de EB precalentada a 60 ºC.
- 18. Mantener 1 min a temperatura ambiente.

- 19. Centrifugar a 13 000 r.p.m. durante 1 min.
- Pasar el eluido a un microtubo con tapa para su conservación y pipetear varias veces para homogeneizarlo (el eluido recogido directamente mantiene un gradiente de ácidos nucleicos).

NOTA: Si el eluido del ADNc presenta una coloración rosa débil o está incoloro, el marcaje habría fracasado. Entonces el remedio habitual es repetirlo aplicando una escala superior.

Soluciones:

PE, PB y EB están incluidas en el sistema comercial MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen).

II.8.3.5. Cuantificación del ADN marcado por espectrofotometría y conservación

La cuantificación se realizó con el equipo Nanodrop[™], con el programa Microarray. El blanco se realizó con tampón de elución EB (1.5 µl). Para la cuantificación del ADNg se utilizó la opción «DNA-50», mientras que para la del ADNc sintetizado a partir de ARN total se utilizó la opción «ssDNA-33». Los valores medidos por el equipo son la concentración de fluoróforo (pmol/µl) y la concentración de ADN (ng/µl). A partir de estos datos, se calcularon los siguientes parámetros:

Rendimiento de la síntesis (ng):

• Para ADNg:

ADN (ng/ μ l) · volumen eluido (μ l)

• Para ADNc:

ADNc (ng/ μ l) · (37/33) · volumen eluido (μ l)

En este último caso, se corrige la concentración de ADNc (ng/µl) por el factor 37/33 ya que el Nanodrop^M utiliza el factor 33 para convertir la A₂₆₀ en ng/µl. Sin embargo, parece más correcto (y así lo indica el manual Agilent) usar el factor 37.

Actividad específica (Cy[™]-x pmol/ADN µg):

- Para ADNg (Cy[™]-5 pmol/ADN μg): (Cy[™]-5 pmol · μl⁻¹/ADN ng · μl⁻¹) · 1000
- Para ADNc (Cy[™]-3 pmol /ADNc μg): (Cy[™]-3 pmol · μl⁻¹/ADNc ng · μl⁻¹ · 37/33) · 1000

Según los requisitos de Agilent para matrices 8 × 15 K, el marcaje de ADNc es válido si el rendimiento de la síntesis es mayor de 650 ng y la actividad específica es superior a 40 pmol/ μ g.

Las actividades específicas de los marcajes de ADNg utilizados en este trabajo fueron de 48.3 pmol/µg y 47.4 pmol/µg para los ADNg de *S. tsukubaensis* y de *S. coelicolor* que contiene la agrupación de tacrolimus, respectivamente.

Los marcajes se almacenaron a -20 °C en oscuridad hasta su uso. No está definido el tiempo máximo de conservación ya que en el desarrollo de este trabajo se utilizaron en el plazo de pocos días. Se deben evitar los ciclos de congelación-descongelación.

II.8.3.6. Protocolo de hibridación en micromatrices

A continuación se detalla el procedimiento para hibridar micromatrices de Agilent de formato 8×15 K, con el diseño experimental que emplea ADNg marcado con Cy^m-5 (ADNg-Cy^T-5) y ADNc marcado con Cy^m-3 (ADNc-Cy^T-3).

Para mayor claridad, este apartado se ha subdividido en tres apartados, correspondientes a los pasos de preparación de la mezcla de hibridación, montaje e incubación.

Protocolo:

- Preparar la solución madre de hibridación para las 8 matrices del cristal en microtubos de 1.5 ml según la tabla 2.16. La solución debe ser reciente. Aunque se preparan 50 μl, se aplicarán solo 40 μl sobre cada micromatriz.
- Preparar las mezclas de los marcajes en microtubos de 1.5 ml de manera que se añadan 300 ng de ADNc-Cy[™]-3 y 10 pmoles de ADNg-Cy[™]-5 y completar hasta un volumen final de 18.8 µl con agua Milli-Q. En el caso de que las muestras se encuentren 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 ºC durante 3 min. Procesar las reacciones de 4 en 4: desnaturalizar y completar rápidamente hasta el paso 6 con cada grupo de 4 para evitar las renaturalizaciones.
- 4. Inmediatamente tras la incubación centrifugar 5 s a velocidad máxima.
- 5. Añadir 31.2 μl de la solución madre a los 18.8 μl de las mezclas de marcajes (volumen final 50 μl). Mezclar por pipeteo y evitar formar burbujas.
- Cuando estén completadas las 8 mezclas de hibridación, centrifugar 1 min para eliminar las burbujas. Mantener en oscuridad y a temperatura ambiente mientras se prepara el montaje de la cámara de hibridación.
- 7. Anotar la disposición de las muestras según el esquema de la figura 2.5.

Soluciones:

NaCl 5 M (Sigma).

MES 12 ×: se prepara mezclando 17.6 g de MES ácido monohidratado libre (Sigma) y 48.3 g de MES en sal sódica (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 μm.

Tritón 10 % (Sigma).

Formamida 100 % (Sigma). Manejar en campana extractora. EDTA 0.5 M (Sigma).

Tabla 2.16. Composición de la solución madre de hibridación para un cristal de 8 micromatrices.

	Volumen por cristal
MES 12 ×	46.7 μl
NaCl 5 M	112 μl
Formamida 100 %	112 μl
EDTA 0.5 M	22.4 μl
Tritón 10 %	56 µl
Volumen final	349 μl

reobjeto	Matriz 1_1	Matriz 1_2	Matriz 1_3	Matriz 1_4
en el cub				
de barras	Matriz 2_1	Matriz 2_2	Matriz 2_3	Matriz 2_4
Código				

Código de barras del portaobjetos de las micromatrices:_

Figura 2.5. Organización de las muestras de hibridación en un cristal 8 × 15 K.

Una vez preparadas las mezclas, se procede al montaje de la cámara de hibridación. Es muy importante trabajar en todo momento con guantes sin polvo y revisar que ni el portaobjetos ni el cubreobjetos tengan polvo o defectos visibles. En caso necesario se puede eliminar el polvo con aire comprimido, en cuyo caso se debe tener especial cuidado con la cara impresa de la micromatriz (es la que indica Agilent).

Protocolo:

- 1. Disponer las dos partes de la cámara de hibridación de tal forma que el tornillo de sujeción se coloque por la derecha y que las etiquetas del cubre y del porta queden a la izquierda.
- 2. Encajar el cubreobjetos en la base de la cámara.
- 3. Trabajar con la base de la cámara atravesada sobre algún soporte cuadrado (se accede mejor a los bordes cuando se coloca el cristal).
- Poner 40 μl de solución de hibridación mediante carga forzada de la pipeta (para evitar formar burbujas al expulsar el líquido sobre el cubreobjeto) en el centro de cada compartimento.
- 5. Posicionar el porta con la cara impresa (la que está marcada con la palabra Agilent) hacia abajo, sujetándolo por la parte de la etiqueta. Acercar el lado contrario al de la etiqueta al cubre haciendo tope para evitar que se deslice. Bajar hasta que esté a unos 3 mm del cubreobjetos. Depositarlo suavemente (ver figura 2.6).
- 6. Situar la parte superior de la cámara de hibridación sobre el conjunto previo.
- 7. Mantener en horizontal el conjunto hasta que esté atornillado.
- 8. Colocar la pinza de sujeción deslizándola a partir del extremo redondeado de la cámara. Atornillar con firmeza cuando esté situada en el centro.
- 9. En orientación vertical, rotar el conjunto 2 o 3 veces en sentido horario para humedecer las superficies (de frente a la base de la cámara como se ve en la figura 2.6).

- 10. Inspeccionar la formación de una burbuja única en cada compartimento.
- 11. Girar en vertical el conjunto y observar que las burbujas dentro de cada compartimento se mueven libremente.
- 12. Soltar las burbujas fijas que no se desprendan por rotación mediante golpes con el extremo redondeado de un lápiz.

Material:

Cristal de micromatrices Agilent en formato 8 × 15 K.

Cubreobjetos con gomas para el formato 8×15 K (Hybridization Gasket Slide Kit-8 microarrays per slide format, Agilent).



Figura 2.6. Manipulación de la cámara de hibridación. Imágenes tomadas del manual del producto.

Cuando la cámara de hibridación está montada, se procede a su incubación. En nuestro caso la incubación se realizó durante 64 horas en agitación en un horno Grant Boekel que carece de adaptadores para albergar cámaras de hibridación de este tipo, pero que tiene dos platos giratorios con soportes para la incubación de tubos. Hay que poner especial cuidado en proteger la cámara de la exposición a la luz intensa.

Protocolo:

- 1. Encender el horno de hibridación con tiempo previo suficiente e introducir al menos 3 botellines con agua (200 ml cada uno) para aumentar la inercia térmica del horno.
- 2. Incubar a 55 °C durante 60-67 horas en el horno de hibridación a 4 r.p.m. La cámara se introduce en una bolsa y se coloca apoyada, por su base, sobre la cara interna del plato vertical donde van las pinzas. Enganchar la cámara a las pinzas con gomas elásticas para sujetarla y poner un contrapeso.
- 3. Es necesario revisar la formación de burbujas durante los días intermedios y destruir las inmóviles golpeando con el extremo de un lapicero (a las 24 h suelen existir muchas burbujas; sin embargo, a las 48 h desparecen casi totalmente).

II.8.3.7. Lavado y estabilización de las matrices de hibridación

Protocolo:

- 1. Encender el baño a 37 ºC con tiempo previo suficiente.
- Rotular y llenar con 50 ml dos tubos con la solución de lavado I (el tubo para desprender el cubreobjetos del cristal y el tubo para el primer lavado) y un tubo con la solución de lavado II.
- Añadir 25 μl de detergente Tritón X-102 a las soluciones de lavado I y II (no es necesario añadirlo al primer tubo de la solución I). Este detergente reduce la formación de artefactos que pueden afectar en la lectura de la fluorescencia.
- 4. Precalentar la solución II a 37 ºC durante un mínimo de 30 min.

- 5. Disponer en la gradilla un tubo de 50 ml lleno de solución de estabilización y secado. Importante: controlar que no tenga precipitados ni esté amarillenta.
- 6. Desmontar la cámara de hibridación y sumergir verticalmente en el primer tubo con solución de lavado I el conjunto con las etiquetas hacia arriba.
- 7. Desacoplar, haciendo palanca con las pinzas, el cristal con las matrices del cubreobjetos con cuidado de no arañar la matriz.
- Transferir rápidamente el cristal, sujetándolo exclusivamente por el área del código de barras, o por los bordes, al tubo de 50 ml que contiene la solución de lavado I a temperatura ambiente. Evitar que la micromatriz se deseque e introducirla lo antes posible en el tubo.
- 9. Cerrar el tubo y ponerlo en una caja opaca, en horizontal y con la cara impresa del cristal hacia arriba. Agitar durante 5 min a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 85 r.p.m. El largo del tubo se colocará paralelo al movimiento del agitador. Evitar el deslizamiento del tubo dentro de la caja haciendo tope con alguna almohadilla.
- 10. Con ambos tubos sobre la gradilla en la poyata y destapados, sacar el cristal con las pinzas lentamente para evitar burbujas y transferirlo sin demora al tubo con la solución II precalentada a 37 ºC.
- 11. Mantener en agitación, como en lavado anterior, a temperatura ambiente exactamente durante 1 min.
- 12. Retirar lentamente, usando pinzas limpias, el cristal e introducirlo en el tubo con 50 ml de la solución de estabilización y secado durante unos segundos. Sacarlo lentamente de la solución (se puede volver a introducir si hubiese una burbuja o manchas).
- 13. Guardar el cristal en oscuridad en un contenedor adecuado o directamente en la cámara del lector.

Soluciones:

Soluciones de lavado I, II y **Tritón X-102** están incluidas en el sistema comercial de lavado Agilent Gene Expression Wash Buffer Kit.

Solución de estabilización y secado (Agilent). Puede formar precipitados; en ese caso calentar en un baño a 37 ºC-40 ºC (nunca en microondas) y dejar enfriar a temperatura ambiente antes de su uso. Esta solución se reutiliza para varios cristales (más de diez sin problemas). Si está sucia o amarillenta se descarta.

II.8.3.8. Lectura de la fluorescencia

Se realizó con ayuda del lector de micromatrices Agilent G2565BA. Este escáner posee dos láseres de longitudes de onda de 532 nm y 633 nm que excitan, respectivamente, los fluoróforos Cy[™]-3 y Cy[™]-5. La señal fluorescente es amplificada y convertida en una señal digital que permite su cuantificación. El programa de control ScanControl (del propio fabricante del lector), que recoge los datos del lector y genera los archivos de imagen, se utilizó en el modo XDR (rango dinámico extendido). Este método implica que se obtienen dos imágenes de fluorescencia por canal, una con los tubos fotomultiplicadores al 100 % de voltaje y otra con el 10 % de potencia. La cuantificación posterior de los datos de intensidades con el programa FeatureExtraction versión 9.5.1 de Agilent combina los valores de ambas imágenes en un único valor. De esta forma, se amplía el rango dinámico de los valores medidos (las intensidades de fluorescencia que saturasen el sistema a máxima potencia del tubo fotomultiplicador no darían lugar a píxeles saturados en la imagen con el tubo fotomultiplicador a la mínima potencia; por otro lado, el mayor voltaje garantiza la máxima sensibilidad del sistema).

Antes de introducir la carcasa con las micromatrices en el lector, se comprobó que no presentaban motas de polvo y en caso de tenerlas se eliminaron con aire comprimido. Los parámetros introducidos en el programa ScanControl de Agilent fueron los siguientes:

- Scan Area: "61 mm × 21.6 mm".
- Scan Resolution: "5 μm".
- Scanning Mode: "single pass".
- XDR: seleccionado.
- Dye Channel: "Red and Green".
- Green PMT XDR, hi: 100 %; lo: 10 %.
- Red PMT XDR, hi: 100 %; lo: 10 %.

II.8.3.9. Análisis de los datos transcriptómicos

Los valores de cuantificación fueron normalizados y analizados estadísticamente con los paquetes limma (del inglés *linear models for microarray data;* Smyth y Speed, 2003; Smyth, 2004) 3.20.9 o 3.22.1 en entorno R 3.1.1 o R 3.1.2, respectivamente. Dichos paquetes se encuentran incluidos en las versiones 2.14 y 3.0 del proyecto Bioconductor, respectivamente (http://www.bioconductor.org/).

Los valores de trabajo fueron los siguientes:

- M_g: logaritmo en base dos del cociente de la intensidad de hibridación del fluoróforo Cy[™]-3 respecto a la de Cy[™]-5. En nuestro caso, al existir varias sondas para un mismo *locus* (gen codificante de proteínas o de ARN), se indican los valores "M_glocus". Estos se obtienen a partir del promedio de los valores M_g de sondas con secuencia idéntica seguido del promedio de los valores de secuencias de un mismo *locus*.
- M_gX: representa la media de los valores M_g para un determinado *locus* (M_gXLocus) en una muestra y condición de la serie temporal.
- M_c: es un valor de contraste obtenido a partir de dos valores M_gXLocus. Normalmente los valores M_gXLocus utilizados permiten comparar un mismo tiempo de condiciones experimentales diferentes o diversos tiempos de una misma condición experimental.

Para filtrar los resultados de los contrastes en base a su significación estadística se utilizó el valor p corregido por el método de Benjamini-Hochberg (p_{FDR} ; Benjamini y Hochberg, 1995).

II.8.4. Realización de estudios transcripcionales mediante RT-qPCR

Esta técnica se utilizó para validar los resultados de los análisis transcriptómicos y para comprobar el funcionamiento de la construcción de sobreexpresión de *glpX* en *S. tsukubaensis*.

II.8.4.1. Fundamento

Las RT-qPCR realizadas en este trabajo se ejecutaron en dos pasos: una primera reacción en la que se sintetizó ADNc a partir de la muestra de ARN por retrotranscripción (de ahí el prefijo RT) y una segunda reacción de PCR con carácter cuantitativo (qPCR).

La reacción de qPCR presenta los mismos principios que una PCR común, con la diferencia de que a la mezcla de reacción se le añade un fluoróforo que monitoriza el progreso de la reacción (en nuestro caso SYBR® Green). Con cada ciclo de amplificación, la intensidad de la fluorescencia aumenta de forma proporcional a la concentración de amplicón, ya que este fluoróforo se une al ADN bicatenario, lo que incrementa su emisión de fluorescencia más de 1000 veces. El equipo establece un umbral de fluorescencia por encima de la fluorescencia basal pero dentro de la zona de incremento lineal de la fluorescencia en todas las reacciones, de manera que el número del ciclo en el que se sobrepasa este umbral (Ct) se correlaciona inversamente con la cantidad de molde al inicio de la reacción. Si se realiza previamente una curva estándar con cantidades de molde conocidas, podemos determinar la cantidad inicial de molde en nuestras muestras a través del valor Ct; de ahí que se denomine PCR cuantitativa. En nuestro caso, se ha realizado una cuantificación relativa respecto a una muestra calibradora, que puede ser el tiempo cero de una serie temporal o una condición control.

Los datos de fluorescencia pueden recogerse a tiempo final o en cada ciclo, en cuyo caso se habla de qPCR a tiempo real. Ésta última modalidad fue la opción elegida ya que genera datos más precisos. Los resultados se normalizan con respecto a genes cuya expresión se mantiene constante en todas las muestras, de manera que se controlan variaciones técnicas en la extracción del ARN, en la eficiencia de la reacción de retrotranscripción, diferencias entre muestras y entre experimentos. Por otro lado, la mezcla de reacción incluye un fluoróforo inerte de referencia (en nuestro caso ROX), que sirve para reducir las variaciones entre réplicas técnicas (por ejemplo, debido a errores de pipeteo).

II.8.4.2. Diseño de los cebadores para RT-qPCR

El diseño de cebadores se realizó con el programa Primer-BLAST del NCBI (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</u>). Los cebadores deben ser lo más específicos posible y, como las secuencias de los genomas *S. tsukubaensis* y *S. coelicolor* están publicadas, el programa nos indica si se producen hibridaciones inespecíficas o no con una pareja de cebadores determinada en secuencias génicas no deseadas. Los parámetros utilizados fueron los presentados por defecto en el servidor, exceptuando los siguientes:

- Tamaño de los cebadores: 18 nt-23 nt, óptimo 20 nt.
- Tamaño del producto: 70 pb-200 pb.
- Búsqueda de los cebadores en la región 5'codificante.
- Contenido en GC: mínimo 30 %, máximo 80 %, óptimo 50 %.
- Tm: mínima 62 ºC, máxima 66 ºC, óptima 64 ºC. Máxima diferencia de Tm de 3 ºC.
- Máximas G y/o C en el pentámero 3': máximo 3 G/C, idealmente 2.
- Máximo número de G o C seguidas en el pentámero 3': 2 (GC Clamp=1).
- Máximo número de repeticiones seguidas de un nucleótido en el oligo: 3.

- Máxima estabilidad del pentámero 3': 3.
- Máxima autocomplementariedad del cebador en el pentámero 3': 4.5.
- Concentración de cationes divalentes: 2.5 mM.
- Concentración de dNTP: 0.2 mM.
- Correcciones aplicadas: SantaLucía 1998.
- Evitar dos T seguidas y la baja complejidad del pentámero.

II.8.4.3. Validación de los cebadores diseñados

Una vez diseñados los cebadores debe comprobarse la eficiencia de la amplificación, la ausencia de productos inespecíficos y la ausencia de dímeros de cebadores, ya que SYBR[®] Green se une a ADN bicatenario y la presencia de estos subproductos falsearía los valores de fluorescencia recogidos. Para comprobar la eficiencia se realizaron reacciones con diluciones de ADNg de concentración conocida como molde de reacción.

En este trabajo se utilizaron las siguientes 6 concentraciones, obtenidas mediante la realización de diluciones seriadas en factor 1/6 desde una suspensión inicial a 100 ng/µl: 2.77 ng/µl, 0.46 ng/µl, 77.16 pg/µl, 12.86 pg/µl, 2.14 pg/µl y 0.36 pg/µl. Según el manual del equipo, la curva de eficiencia debe realizarse con al menos 5 puntos y se consideran aceptables parejas de cebadores con eficiencia mayor o igual al 90 % (en una reacción de eficiencia 100 % la cantidad de molde se duplica en cada ciclo).

Para comprobar la ausencia de dímeros se incluyó en el ensayo un control negativo consistente en la reacción sin molde (NTC). Cada reacción (7 en total por cada pareja de cebadores) se realizó por duplicado. La composición de la mezcla de reacción y el programa de termociclación se muestran a continuación (tabla 2.17 y figura 2.7, respectivamente). Es importante proteger el tampón Master Mix 2 × y el fluoróforo de referencia (ROX) de la luz.

Componente	Concentración Final	Volumen en la reacción
Agua		3.63 μl
Molde		1.8 µl
Master Mix 2 ×	1 ×	9 µl
Cebadores 10 µM cada uno	300 nM	3.3 μl
ROX 2 μM	30 nM	0.27 μl
Volumen final		18 µl

Tabla 2.17. Composición de la mezcla de reacción para RT-qPCR.

Soluciones:

El **Master Mix 2** × y el **ROX** (1 mM) vienen incluidos en el Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent). La solución de ROX 2 μ M se prepara diluyendo en agua libre de nucleasas (1:500) y se utiliza en los dos días posteriores a su preparación como máximo.



Figura 2.7. Representación del programa de termociclación utilizado en las reacciones de RT-qPCR en este trabajo.

El valor umbral de fluorescencia se definió en 0.05 por defecto para todos los ensayos y se comprobó que se situara en la zona de incremento exponencial. Se comprobaron las curvas de disociación de todas las reacciones y además 10 μ l de la reacción se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 3 % para comprobar el tamaño de los productos amplificados y la ausencia de dímeros de cebadores y de productos inespecíficos.

Todas las parejas de cebadores ensayadas en esta tesis cumplieron los requisitos de eficiencia y no generaron dímeros ni productos de amplificación inespecíficos. A partir de las curvas estándar de eficiencia se determinó el rango de valores Ct en el que los resultados obtenidos son fiables (tabla 2.18).

Gen diana	ana Eficiencia (%) Ct mínima		Ct máxima
pfkA1	90.5	15.30	29.28
pfkA2	97.6	16.55	29.48
pfkA3	94.5	16.26	27.03
fkbN	90.1	16.45	30.37
glpX	92.5	16.50	27.52
gyrB	95.7	16.31	29.46
phoP	85.9	16.36	30.64
crp	97.6	16.66	29.78
hrdA	93.5	16.88	30.14
amtB	91.4	17.18	28.47
gltD	91.0	17.72	31.46
metF	<i>metF</i> 96.5		29.60

Tabla 2.18. Eficiencia y rango de Ct de cada ensayo de RT-qPCR.

II.8.4.4. Purificación de las muestras de ARN

Las muestras de ARN utilizadas en este trabajo se obtuvieron de acuerdo al protocolo de extracción de ARN a partir de micelio de *Streptomyces*. Es necesario comprobar

la pureza del ARN de partida mediante análisis espectrofotométrico así como su integridad electroforéticamente. Para realizar un análisis preciso es necesario que el ADNc sintetizado proceda de una muestra pura de ARN, ya que de estar contaminada con ADNg éste actuaría como molde en la reacción de qPCR y falsearía los resultados.

• Digestión con ADNasa de las muestras de ARN utilizadas para la síntesis de ADNc

Se realizó por tratamiento con la ADNasa TURBO[™] (Ambion) según el siguiente protocolo:

Protocolo:

- 1. Tomar el volumen que contenga 1.5 μg de ARN y completar con agua libre de ARNasas hasta un volumen de 35.2 μl.
- 2. Añadir 4 μ l de tampón TURBO[™] MIX 10 × y 0.8 μ l de ADNasa TURBO[™]. Mezclar suavemente por pipeteo.
- 3. Incubar 30 min en termociclador a 37 ºC.
- 4. Añadir 0.8 μl de enzima, mezclar y reincubar 30 min en termociclador a 37 ºC.
- 5. Detener la reacción con 8 μl de tampón de inactivación.
- 6. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente y mezclar ocasionalmente.
- 7. Centrifugar 3 min a velocidad máxima para que la resina del tampón de inactivación se compacte.
- Recoger el sobrenadante (aproximadamente 45 μl) y almacenarlo en un tubo nuevo. Esta solución tiene una concentración final de ARN de 33 ng/μl.

Soluciones:

La **ADNasa TURBO**[™], el tampón **TURBO**[™] **MIX 10 X** y el **tampón de inactivación** vienen incluidos en el sistema comercial TURBO DNA-free[™] (Ambion).

• Comprobación de la ausencia de ADN en las muestras de ARN

Para comprobar la eficacia de la digestión con ADNasa TURBO^{**}, se realizaron reacciones de RT-qPCR con la pareja de cebadores más eficiente (*crp*) y se añadió como molde 0.9 µl de muestra purificada (~ 30 ng de ARN purificado). En estos controles negativos, denominados "No RT", el volumen de solución de ARN añadido es el doble del que se añadirá a la reacción definitiva con ADNc (en la reacción de RT-qPCR con ADNc se añaden 1.8 µl de molde a 8.33 ng/µl). Por este motivo, aunque idealmente no debería existir ningún producto de amplificación, cuando se obtuvieron reacciones positivas con Cts \geq 32 se utilizaron las muestras en la síntesis de ADNc.

II.8.4.5. Síntesis de ADNc

Se utilizó el sistema comercial AffinityScript[™] qPCR cDNA Synthesis kit (Agilent). Previamente, se desecaron en centrífuga de vacío 30 µl de la solución de ARN purificado (~ 1 µg) y se resuspendieron en 10 µl de agua libre de ARNasas, para dejar la muestra a una concentración final de 100 ng/µl. Con esta solución se pueden realizar dos retrotranscripciones, ya que se emplean 500 ng por reacción.

Protocolo:

- 1. Tomar 5 μ l de la solución de ARN purificado (100 ng/ μ l) y completar con agua libre de ARNasas hasta 6 μ l.
- 2. Añadir 10 μ l de la solución Master Mix 2 ×, 3 μ l de cebadores aleatorios (0.1 μ g/ μ l) y 1 μ l de la solución que contiene la retrotranscriptasa.
- 3. Incubar a 25 °C durante 5 min, 42 °C durante 15 min y 95 °C durante 5 min.
- 4. Al terminar la reacción, añadir 40 μl de agua, mezclar y almacenar a -20 ºC. La concentración final de ARN que queda en la solución es de 8.33 ng/μl. El ADNc sintetizado se utiliza directamente para la reacción de RT-qPCR.

Soluciones:

La AffinityScript[™], el tampón Master Mix 2 ×, los cebadores aleatorios y el agua libre de ARNasas vienen suministrados en el sistema comercial AffinityScript[™] qPCR cDNA Synthesis kit (Agilent).

II.8.4.6. Reacciones RT-qPCR

Las reacciones definitivas se realizaron siempre por triplicado, en placas de 96 pocillos, respetando la composición indicada en el apartado II.8.4.3 (pág. 157). Tanto en la preparación de las mezclas como en el reparto de las alícuotas en los pocillos, se utilizaron pipetas automáticas para reducir la variabilidad técnica. Además, en el caso del tampón Master Mix se utilizaron velocidades de aspiración y dispensación bajas, por su elevada densidad. El material se manipuló siempre con guantes sin polvo.

Por lo general, se preparó una mezcla "madre 1" con un margen de volumen del 15%. Esta mezcla, que contenía agua, tampón Master Mix y ROX, se repartió en tubos de 1.5 ml para preparar mezclas "madre 2". Las mezclas "madre 2", preparadas también con un 10% de margen de volumen, se diferenciaron por el ADNc molde que contenían.

En un primer paso se repartieron los cebadores en los pocillos correspondientes (3.3 μ l de una mezcla 10 mM de cada uno) y posteriormente, las soluciones "madre 2" (14.7 μ l por pocillo). En las placas siempre se incorporaron uno o dos ensayos normalizadores (*gyrB* y *metF*) con dos réplicas técnicas de cada reacción y controles sin molde. Antes de introducir la placa en el equipo se agitó en *vortex* para asegurar la mezcla de todos los componentes, se sometió a una breve centrifugación y se comprobó la ausencia de burbujas en los pocillos.

II.8.4.7. Análisis de los resultados de RT-qPCR

El análisis de los resultados se realizó con el programa del equipo MxPro-Mx3005P o con el programa gratuito REST2009 (Pfaffl, 2001; Pfaffl y col., 2002; Vandesompele y col., 2002). En ambos casos se emplearon algoritmos que tienen en cuenta la eficiencia de la pareja de cebadores, de manera que los resultados son más exactos que los generados por el método del $\Delta\Delta$ Ct. REST2009 permite incluir los valores de dos ensayos normalizadores y valora la significación estadística de los resultados obtenidos mediante algoritmos de aleatoriedad.

En el desarrollo de este trabajo se aplicaron algunos recursos informáticos que se detallan a continuación.

II.9.1. Programas informáticos

- **Chromas Lite 2.1.1:** visor de electroferogramas de reacciones de secuenciación, accesible en http://technelysium.com.au/?page_id=13
- Limma 3.20.9 y 3.22.1: paquetes para la normalización y tratamiento estadístico de los valores de cuantificación recogidos por el lector de micromatrices. Disponibles en http://www.bioconductor.org/.
- MxPro-Mx3005P: programa de análisis de resultados de RT-qPCR. Suministrado con el equipo.
- **REST2009:** programa de análisis de resultados de RT-qPCR. Obtenido de <u>http://rest.gene-quantification.info/</u>.
- VectorNTi[®] Advance 10.3.0 (Invitrogen): programa para el manejo general de secuencias de ADN, diseño de construcciones y de cebadores.

II.9.2. Herramientas en línea

- antiSMASH 2.0: programa para la búsqueda de agrupaciones de metabolitos secundarios en la secuencia del genoma. Disponible en <u>http://antismash.secondarymetabolites.org/</u>).
- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI): programa para la búsqueda de regiones con similitud entre secuencias biológicas. Disponible en <u>http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</u>.
- **BPROM**: programa de búsqueda de promotores bacterianos. Disponible en <u>http://www.softberry.com</u>.
- **ClustalW2 y Clustal Omega**: programas de realización de alineamientos de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas. Disponible en la base EMBL-EBI.
- **EMBL-EBI** (The European Molecular Biology Laboratory- European Bioinformatics Institute): base de acceso a diversos tipos de herramientas bioinformáticas. Disponible en <u>http://www.ebi.ac.uk/services</u>.
- KEGG Mapper-Search & Color Pathway: programa que permite generar representaciones de rutas metabólicas en las que las reacciones de interés aparecen evidenciadas con un código de colores elegido por el ususario. Disponible en <u>http://www.kegg.jp/kegg/tool/map_pathway2.html</u>)
- **KEGG PATHWAY Database** (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes): base de datos utilizada en el estudio de rutas metabólicas y de los genes implicados en ellas. Disponible en <u>http://www.genome.jp/kegg/pathway.html</u>
- **KOALA:** servidor de KEGG que permite adscribir genes a rutas metabólicas. Utilizado en el análisis de datos transcriptómicos. Disponible en <u>http://www.kegg.jp/blastkoala/</u>.

- New England BioLabs Tools and Resources: página web utilizada principalmente en el diseño de digestiones enzimáticas (búsqueda de tampones para digestiones dobles o triples) y de cebadores (recomendaciones sobre la actividad de las enzimas en la vecindad de los extremos de una molécula de ADN lineal). Disponible en https://www.neb.com/tools-and-resources/.
- NNPP (Neural Network Promoter Prediction): programa de búsqueda de promotores bacterianos. Disponible en <u>http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html</u>.
- **Online Analysis Tools**: base de herramientas bioinformáticas. Concretamente se han utilizado las relacionadas con la búsqueda de promotores y terminadores y la predicción de estructuras proteicas. Disponible en <u>http://www.molbiol-tools.ca./</u>
- **Plataforma eArray:** servidor para el diseño de sondas experimentales para micromatrices. Disponible en <u>https://earray.chem.agilent.com/earray/</u>.
- **Primer-BLAST:** servidor para el diseño de cebadores específicos para RT-qPCR. Disponible en <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</u>
- **PubMed** (NCBI): base de datos para la búsqueda de bibliografía. Disponible en <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</u>.
- StrepDB: base de datos utilizada para la obtención de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes de diferentes especies de *Streptomyces*, búsqueda de ortólogos, información sobre ReDirect[©], etc. Disponible en <u>http://strepdb.streptomyces.org.uk</u>.
- **ThermoScientific Web Tools**: web empleada para determinar la eficiencia de corte de las enzimas de restricción en los extremos de las moléculas lineales de ADN. Disponible en <u>http://www.thermoscientificbio.com/webtools/</u>.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



III.1. Regulación por catabolito de carbono en *Streptomyces tsukubaensis*

El objetivo principal de estudio de esta tesis es la regulación por catabolito de carbono de la producción de tacrolimus en *Streptomyces tsukubaensis* y su interacción con la regulación por fosfato (Pi). Para cumplir este objetivo se realizó un experimento exploratorio en el que se identificaron dos fuentes de carbono represoras y posteriormente se analizó su efecto sobre el transcriptoma.

III.1.1. Identificación de fuentes de carbono represoras de la producción de tacrolimus en *Streptomyces tsukubaensis*

Para identificar fuentes de carbono represoras de la producción de tacrolimus se realizó un experimento de adición de diferentes azúcares en cultivos en medio líquido. El primer objetivo para poder realizar el subsiguiente análisis transcriptómico fue definir los siguientes factores: a) el medio de cultivo, b) las fuentes de carbono y la concentración final de las mismas y c) el momento de la adición.

Para el cultivo se usó el medio MGm-2.5, que es una modificación del medio MG formulado por Doull y Vining (1989). El medio MG fue el elegido por nuestro grupo de investigación en INBIOTEC para los estudios ómicos de regulación por Pi en *Streptomyces coelicolor* (Rodríguez-García y col., 2007). En un trabajo posterior se estableció en 2.5 mM la concentración de Pi añadido al medio para que este nutriente fuese el limitante. Al medio se le denominó MG-3.2 de acuerdo a la concentración real de Pi determinada experimentalmente (Santos-Beneit y col., 2008). En la formulación inicial del MG-3.2 el almidón era del fabricante Scharlau. Posteriormente, se determinó que el almidón de la marca Difco[™] aumenta la producción de tacrolimus en *S. tsukubaensis* respecto del medio preparado con almidón de Scharlau (Martínez-Castro y col., 2013). Esta nueva formulación del medio se denominó MGm-2.5, donde "m" hace referencia a la modificación de la marca de almidón utilizada y 2.5 a la concentración de Pi añadida.

En los medios MG el almidón es la fuente de carbono principal, el ácido glutámico es la fuente secundaria de carbono y la única de nitrógeno y el Pi es el nutriente limitante. Tanto en los cultivos de *S. coelicolor* en MG-3.2 como de *S. tsukubaensis* en MGm-2.5, la fase de producción se desencadena tras el agotamiento del Pi y la inoculación se realiza con esporas, lo que propicia la repetitividad de los cultivos. Esto hace que sean medios muy adecuados para los estudios de regulación nutricional y en particular, para el estudio de la respuesta al agotamiento del Pi.

III.1.1.1. Diseño experimental

Aunque las fuentes de carbono represoras más comunes son la glucosa y el glicerol (Ruiz y col., 2010), no son las únicas capaces de ejercer este efecto; por ejemplo, la manosa reprime la producción de estreptomicina en *S. griseus* (Demain e Inamine, 1970). Por este motivo se ensayaron diversos azúcares, tanto monosacáridos (glucosa, glicerol, fructosa,

manitol y xilosa) como disacáridos (maltosa, lactosa y sacarosa), en la búsqueda de fuentes de carbono represoras de la producción de tacrolimus.

Para establecer la concentración de la fuente de carbono fue orientativo el trabajo de Chen y col. (2012), que indica diferentes valores de concentración de la fuente de carbono y determina el valor umbral por encima del cual se produce la represión. Chen y col. estudiaron el efecto de la glucosa sobre la producción de tacrolimus en la cepa parental S. tsukubaensis ZJU01 y en cepas derivadas que expresaban constitutivamente una copia adicional de los genes implicados en la formación de alilmalonil-CoA (tcsABCD) y/o de metoximalonil-CoA (fkbGHIJK). Se generaron cepas en las que uno de estos grupos de genes se insertó en el sitio ϕ C31 del cromosoma y cepas en las que ambos grupos de genes se insertaron conjuntamente en los sitios de integración ϕ C31 y VWB. Se valoró la producción al sexto día de cultivo en medios que contenían concentraciones de glucosa del 0.5 % al 2 % (p/v), en incrementos de un cuarto, desde el inicio. En las cepas ensayadas, la producción aumentó con la concentración de glucosa hasta distintos umbrales a partir de los cuales disminuyó: hasta el 1 % de glucosa para la cepa silvestre y la que presenta una copia adicional de los genes de formación de alilmalonil-CoA, hasta el 1.75 % para la que presenta una copia adicional de los genes de formación de metoximalonil-CoA y hasta el 1.5 % para las dos cepas que presentan copias adicionales de ambas agrupaciones (que difieren en el sitio de integración utilizado para cada una de ellas). Además, se tuvo en cuenta que en los estudios de Martínez-Castro y col. (2013) la presencia de glucosa al 2 % (p/v) desde el inicio de la fermentación en medio ISP4 no reprimió la producción de tacrolimus en S. tsukubaensis NRRL 18488. En función de estos trabajos se tomó un 2.8 % (p/v) como concentración de la fuente de carbono.

La presencia de un azúcar fácilmente asimilable desde el inicio de la fermentación no solo afecta a la producción del metabolito de interés, sino que también supone un incremento de la tasa de crecimiento que complica la interpretación de su efecto represor (Lounès y col., 1996). Por este motivo se decidió realizar la adición de manera puntual y una vez avanzado el crecimiento, aunque en una fase previa al desencadenamiento del metabolismo secundario, pues entonces las adiciones podrían no tener efecto. Se eligió un momento en la fase de crecimiento en la que el Pi no se ha agotado ya que, según indican otros trabajos, el estudio de la regulación cruzada carbono-fosfato debe realizarse en condiciones de disponibilidad de Pi (p. ej., en *Bacillus*, CcpA reprime *phoPR* en condiciones de exceso de Pi; Puri-Taneja y col., 2006).

Como se puede observar en la figura 3.1, a las 70 h de cultivo en medio MGm-2.5 S. tsukubaensis se encuentra en la fase de crecimiento exponencial y el Pi no se ha agotado (consideramos como agotamiento concentraciones de Pi inferiores a 100 μ M; Santos-Beneit y col., 2008), por lo que se eligió este momento para realizar la adición.



Figura 3.1. Crecimiento (línea negra) y consumo del Pi en el medio de cultivo (línea gris) en cultivos de *S. tsukubaensis* NRRL 18488 en MGm-2.5. Se representan la media y la desviación típica de tres cultivos.

Los cultivos se realizaron por triplicado (excepto en las condiciones de adición de lactosa y maltosa, que se realizaron por duplicado) según lo indicado en el apartado II.2.2.1 (pág. 91). A las 70 h de cultivo se adicionaron 7 ml (el volumen remanente del cultivo fue de aproximadamente 93 ml, ya que se retiraron muestras de 3.5 ml a las 65 h y 70 h para la valoración del crecimiento mediante medida del peso seco y para la medida del Pi) de la solución del azúcar al 40 % (p/v) o de agua Milli-Q como control (para evitar valorar un efecto de dilución del cultivo). Se recogieron muestras para determinar el crecimiento a las 64 h, 70 h, 88 h, 92 h, 100 h, 112 h, 138 h y 161 h. Además, en los 5 últimos tiempos se recogieron muestras para la extracción de tacrolimus, que se valoró mediante bioensayo.

III.1.1.2. La glucosa y el glicerol reprimen la producción de tacrolimus en *S. tsukubaensis*

El crecimiento de los cultivos fue similar tras cualquiera de las adiciones, por lo que se descartó que el efecto represor se debiera al aumento de la tasa de crecimiento (figura 3.2). Se observó halo de inhibición en los bioensayos de los caldos de los cultivos frente a *S. cerevisiae* TB23 en las muestras del tiempo 112 h desde la inoculación $(t_{112 h})$ y posteriores, excepto en los cultivos en los que se añadió xilosa, en los que el halo apareció en la muestra $t_{100 h}$, y en los que se adicionó glucosa o glicerol, en los que no se detectó halo de inhibición en ninguna muestra. Por tanto, la glucosa y el glicerol al 2.8 % p/v (155 mM y 304 mM, respectivamente) redujeron la producción de tacrolimus por debajo de los niveles detectables mediante bioensayo (1.9 µg/ml), al menos hasta las 161 h de cultivo.



Figura 3.2. Representación del crecimiento de *S. tsukubaensis* en los cultivos con adición de fuente de carbono. A) Cultivos en los que se adicionó glucosa, glicerol, manitol, xilosa o fructosa. B) Cultivos en los que se adicionó lactosa, maltosa o sacarosa. Los cultivos se realizaron por triplicado, excepto en las adiciones de lactosa y maltosa, que se realizaron por duplicado. El valor de $t_{138 h}$ procede de un solo cultivo en las series de lactosa y xilosa. La serie de cultivo control (adición de agua) se ha representado en ambas gráficas para facilitar la comparación. Las barras de error representan la desviación típica.

III.1.2. Estudio transcriptómico del efecto de la adición de glucosa y glicerol en cultivos de Streptomyces tsukubaensis limitados en fosfato: diseño experimental y estrategia de análisis

III.1.2.1. Condiciones experimentales

Una vez conocidas las fuentes de carbono represoras se reprodujo el experimento anterior con las siguientes modificaciones:

- a) En lugar de agua se utilizó maltosa como control, ya que no produjo represión. No se pudo emplear almidón como control debido a su baja solubilidad, que no permite obtener soluciones madre suficientemente concentradas. La utilización de almidón requiere generalmente la presencia de amilasas secretadas al medio (Boss y Shuman, 1998) y el transporte al interior celular de los productos de su degradación, principalmente maltosa y maltodextrinas, a través de transportadores ABC. En *S. coelicolor* el transportador ABC de maltosa está formado por una proteína periplásmica de unión a maltosa (MaIE), un complejo de membrana formado por las subunidades MaIF y MaIG y la ATPasa MsiK (van Wezel y col., 1997). En otras especies como *Streptomyces reticuli, S. lividans* y *S. avermitilis* se han caracterizado transportadores ABC de maltosa con una gran similitud entre sí (Schlösser y col., 2001; 1997; Li y col., 2010).
- b) Las fuentes de carbono se adicionaron de manera que la concentración molar en el medio fuese la misma, a diferencia del experimento anterior en el que lo que se igualó fue el porcentaje de peso por volumen. Se añadieron 8 ml de soluciones de glucosa o glicerol 2.78 M, lo que supuso una concentración final en el medio de 222 mM (4 % y 2 % p/v, respectivamente). En el caso de la adición control de maltosa se añadieron 8 ml de una solución 1.39 M, de manera que la concentración final en el medio fue de 111 mM (3.8 % p/v). La concentración de moléculas de maltosa adicionadas al medio de cultivo fue la mitad que de glucosa con la intención de igualar el número de moléculas de glucosa en el interior celular. Ello supone que en *S. tsukubaensis*, al igual que en las especies anteriormente citadas, existe un transportador de maltosa de tipo ABC (STSU_26064-STSU_26059-STSU_26054, ortólogos de *malEFG*, respectivamente) y que la maltosa transportada se metaboliza hasta generar glucosa en el interior celular, como se ha sugerido en *S. clavuligerus* (García-Domínguez y col., 1989).

Se realizaron dos cultivos por cada adición y se tomaron muestras que posibilitasen el análisis de la respuesta inmediata a las adiciones (en el tiempo de muestreo de las 70.7 h, simbolizado como «t_{70.7 h}»), la activación del regulón *pho* (t_{80 h}-t_{89 h}) y la expresión de la agrupación biosintética de tacrolimus en la condición control (de t_{89 h} en adelante; estos periodos se confirmaron en el posterior análisis transcriptómico). Los tiempos de recogida de muestras y los parámetros valorados se resumen en la tabla 3.1. Tabla 3.1. Muestreo del experimento transcriptómico de adición de glucosa y glicerol en *S. tsukubaensis.* Con un «+» se indica si se tomó muestra para la medición o extracción indicada. PS: determinación del peso seco; Pi: determinación de la concentración de Pi en el medio; FK506: cuantificación de tacrolimus en el caldo de cultivo; ARN: extracción de ARN.

Hora	PS	Pi	FK506	ARN
65	+	+		
70	+	+		+
70.7				+
72				+
76	+	+		+
80	+	+		+
89	+	+		+
92	+	+	+	+
100	+	+	+	+
104	+	+	+	+
114	+	+	+	+
124	+	+	+	+
137	+	+	+	
148	+	+	+	+
161	+	+	+	
194			+	
235	+	+	+	

III.1.2.2. Crecimiento, agotamiento del fosfato y producción de tacrolimus en los cultivos de la serie temporal

El crecimiento de los cultivos en las tres series fue muy semejante (figura 3.3), especialmente en el periodo de extracción de muestras para el estudio transcriptómico. Para este tipo de análisis exhaustivo, esto es un requisito importante, ya que se minimizan las diferencias debidas al estado fisiológico de los cultivos.

La glucosa bloqueó totalmente la producción de tacrolimus y no se produjeron cantidades detectables mediante HPLC. El glicerol inhibió y retrasó la producción pero no la suprimió totalmente (se alcanzaron casi 6 μ g/ml a las 235 h de cultivo, que es aproximadamente un 40 % de la producción máxima alcanzada en la condición control). Este resultado indica que la intensidad o los mecanismos de la represión son diferentes, al menos en parte.

Como se puede observar en las figuras 3.3 C y D, el Pi se agotó antes de $t_{89 h}$ en los 6 cultivos. En la condición control, como se esperaba, el agotamiento del nutriente limitante, el Pi, precedió a la producción de tacrolimus. Por tanto, el efecto represor de ambos azúcares no fue consecuencia de un agotamiento retrasado del Pi.



Figura 3.3. Crecimiento, producción de tacrolimus y concentración de fosfato en los cultivos del experimento transcriptómico. En los paneles B, C y D se representan los datos de los cultivos individuales con tonos de rojo para la adición de glucosa, tonos de azul para la adición de glicerol y negro y gris para la adición control; en el panel A se representan los valores promedio y se sigue la misma correspondencia, pero usando el tono más oscuro. A) Crecimiento promedio en cada condición experimental. Las barras de error representan la desviación típica. B) Detalle del crecimiento de los seis cultivos durante el periodo principal de toma de muestras para extracción de ARN (se recogieron dos muestras adicionales a las 124 h y 148 h). C) Producción volumétrica de tacrolimus en los seis cultivos. D) Concentración de Pi en los caldos de los seis cultivos. Nótese que la escala temporal no es la misma en todas las gráficas.

III.1.2.3. Metodología del análisis transcriptómico

Se extrajo ARN total de micelio siguiendo las indicaciones y protocolos del apartado II.8.1 (pág. 139). La integridad de las preparaciones de ARN obtenidas se analizó por electroforesis capilar (II.8.2; pág. 143) y presentó siempre un valor de RIN igual o superior a 8.2. Este ARN se utilizó como molde para obtener ADNc marcado con Cy[™]-3-dCTP en el proceso de retrotranscripción (apartados II.8.3.3 y II.8.3.4; págs. 148 y 149).

En las hibridaciones se utilizó ADNg de *S. tsukubaensis* marcado con Cy[™]-5 como señal de referencia. Para ello, el ADN fue extraído mediante *salting out* (apartado II.7.2.1; pág. 116), se comprobó la ausencia de degradación por electroforesis en gel y su pureza y concentración mediante espectrofotometría. El marcaje se realizó mediante cebado con hexanucleótidos aleatorios y polimerización con el fragmento Klenow de la polimerasa en presencia de Cy[™]-5-dCTP, de acuerdo con los protocolos indicados en los apartados II.8.3.2 y II.8.3.4 (págs. 147 y 149).

Se utilizaron matrices de diseño nº 2 (identificador 034745, véase el apartado II.8.3 (pág. 145). En total se hibridaron 54 muestras, correspondientes a $t_{70 h}$ (justo antes de la adición), $t_{70.7 h}$, $t_{72 h}$, $t_{76 h}$, $t_{80 h}$, $t_{89 h}$, $t_{92 h}$ y $t_{100 h}$ de los seis cultivos (48 muestras) y los tiempos $t_{124 h}$ y $t_{148 h}$ de una sola réplica: los cultivos representados como "1" en la figura 3.3 (6 muestras más). La cantidad de marcaje añadido en las hibridaciones, las condiciones de la hibridación y de los lavados, y la lectura de la fluorescencia se especifican en los apartados II.8.3.6, II.8.3.7 y II.8.3.8 (págs.151, 153 y 154).

Los datos de cuantificación de la fluorescencia de cada característica o punto de las micromatrices fueron procesados y analizados por medio de la biblioteca limma en el entorno R por el Dr. Antonio Rodríguez (apartado II.8.3.9; pág. 155). La representación y la interpretación de los resultados se realizaron por medio de hojas de cálculo del programa Excel. Para cada gen se obtuvieron los valores Mg, definidos como logaritmo binario del cociente normalizado entre las fluorescencias netas Cy[™]-3 (muestra) y Cy[™]-5 (referencia) para cada tiempo y cultivo. Los valores M_g son aproximadamente proporcionales a la abundancia de los respectivos transcritos. En este experimento adquieren valores entre -5.87 y 10.97; lo que implica 5 órdenes de magnitud en el rango dinámico del sistema de medida. Cabe indicar que un valor M_g = 0 no establece el límite absoluto entre los genes que se expresan y los que no, sino que indica que el gen con un valor M_g = 0 en una determinada condición se situaría en el medio de la lista de los genes ordenados por su expresión (la mitad superior de los genes se expresarían más en esa condición y la mitad inferior, menos). Esto es así porque los valores están normalizados por la mediana. No obstante, como guía aproximada que ayuda en la interpretación de los resultados, se considera que los valores negativos indican una expresión pobre y que cuanto más negativo es el valor, más probable es que la expresión sea nula. Esta guía se apoya en la experiencia en el análisis de resultados transcriptómicos de nuestro laboratorio y también en los resultados de RNAseq de Gatewood y col. (2012), que deducen que el 40 % de los genes de S. coelicolor, en condiciones de fase exponencial en medio R2YE, apenas se expresan.

Por medio del paquete de funciones limma se realizaron diversos contrastes estadísticos, o comparaciones entre dos condiciones, para obtener los valores M_c o valores de contraste de hipótesis (la diferencia entre los respectivos valores M_g), que cuantifican la diferencia de transcripción, expresada como logaritmo en base dos, entre las dos condiciones comparadas. Los valores p_{FDR} , que representan los valores p corregidos por el método de Benjamini-Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995), se utilizaron para filtrar los resultados por su significación estadística.

Cabe destacar que a lo largo de este trabajo la condición de ortólogo fue determinada por el criterio de resultado recíproco en la búsqueda con el algoritmo BLAST de la secuencia de aminoácidos de la proteína de un organismo frente al proteoma deducido del otro y con un porcentaje de identidad mayor o igual al 25 %.

III.1.3. Efecto de las adiciones sobre las rutas centrales del metabolismo del carbono

Para facilitar el análisis de las rutas del metabolismo central se realizó una anotación adicional del genoma de *S. tsukubaensis* con el servidor KOALA (*KEGG Orthology And Links Annotation*, disponible en <u>http://www.kegg.jp/blastkoala/</u>), lo que posibilitó la adscripción por homología de genes a rutas metabólicas (Kanehisa y col., 2014). De este modo se identificaron 23 genes relacionados con la glucólisis, 12 genes relacionados con la gluconeogénesis, 27 genes implicados en el ciclo TCA y 10 relacionados con la ruta PP.

Para valorar un posible efecto transcripcional de las adiciones sobre las rutas centrales del metabolismo del carbono se analizaron los perfiles de transcripción (la representación, en función del tiempo, de los valores M_g promedio de las réplicas biológicas) de los genes específicos de cada ruta; es decir, aquellos que no participan en otras rutas metabólicas (10 en el caso de la glucólisis, 2 en el caso de la gluconeogénesis, 9 en el caso de la ruta PP y 23 en el caso del ciclo TCA):

- Glucólisis: STSU_05303, STSU_19832, STSU_26554, STSU_31605, STSU_11460, STSU_09924, STSU_26589, STSU_30615, STSU_09939 y STSU_27199.
- Gluconeogénesis: STSU_12200 y STSU_11500.
- Ciclo TCA: STSU_03160, STSU_20327, STSU_23816, STSU_06338, STSU 31425, STSU 10561, STSU 26264, STSU 26269, STSU_13848, STSU 13853, STSU 12875, STSU 12880, STSU 02385, STSU 11375, STSU_11380, STSU 12675, STSU_02380, STSU_12680, STSU_02390, STSU 12665, STSU 12670, STSU 11515, STSU 11525 y STSU 12815.
- Ruta PP: STSU_27511, STSU_27501, STSU_02530, STSU_17533, STSU_29686, STSU_24258, STSU_27521, STSU_30850 y STSU_27516.

Los valores del contraste ^{Glc} $M_c^{70.7 h-70 h}$ indican la diferencia de valor M_g entre las muestras tomadas a las 70.7 h tras la adición de glucosa y las 70 h, por lo que se utilizan en el siguiente apartado para describir las variaciones observadas.

III.1.3.1. Efecto de la adición de glucosa sobre las rutas del metabolismo del carbono

• Glucólisis

Cuando se analizaron los perfiles de los genes específicos de la glucólisis se detectó una regulación positiva de la mayoría de ellos, aunque esta solo fue significativa ($p_{FDR} \le 0.05$) en el caso de STSU_30615 (ortólogo de *pfkA3*) y de STSU_09924 (ortólogo de *pfkA2*) (ver figura 3.4). Los valores ^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} fueron 2.78 y 1.16 para *pfkA3* y *pfkA2*, respectivamente. Cabe destacar que *pfkA2* también presentó una regulación positiva significativa tras la adición control, aunque en menor medida (^{Mal}M_c^{70.7 h-70 h} = 0.74). La estimulación de la

transcripción de genes implicados en la glucólisis es una respuesta lógica, ya que se trata de la ruta de metabolización de este sustrato. Así mismo, en *B. subtilis* la adición de glucosa produce una activación transcripcional de los genes que participan en la glucólisis (Blencke y col., 2003), lo que concuerda con los resultados obtenidos.



Figura 3.4. Perfil transcripcional de los genes específicos de la glucólisis en los cultivos a los que se añadió glucosa (panel A) y en los cultivos control (panel B). Rojo: STSU_09939 (*pyk2*); verde: *pfkA3*; azul: *pfkA2*; naranja: STSU_26554 (*glk*); negro: STSU_11460 (*ppgK*); morado: STSU_26589 (*pfkA1*); rosa claro: STSU_27199 (*pyk1*). Los perfiles de color gris corresponden a STSU_05303 y STSU_31605. No se lograron asignar sondas a STSU_19832 en las micromatrices utilizadas.

Una observación interesante de este análisis fue la diferente regulación de los parálogos que codifican 6-fosfofructoquinasas, ya que la transcripción de *pfkA1* no presentó una respuesta significativa, en contraposición de las regulaciones positivas de *pfkA2* y *pfkA3*. El tercer capítulo de este trabajo (pág. 251) se dedica al estudio de los genes *pfkA* en *S. tsukubaensis* y dentro de él se engloban los resultados obtenidos en este experimento transcriptómico, en el experimento transcriptómico de adición de N-acetilglucosamina (pág. 227) y los obtenidos del análisis de los mutantes en cada uno de ellos.

Cabe destacar que, aunque no se trata en este apartado por no ser un gen específico de la glucólisis, la transcripción de STSU_03549, ortólogo de *gap2*, presentó una regulación negativa significativa (ver apartado III.1.5.4; pág. 194).

• Gluconeogénesis

Se detectó una disminución significativa ($p_{FDR} \le 0.05$) de la transcripción de los dos genes específicos de la gluconeogénesis tras la adición de glucosa (figura 3.5). La adición disminuyó la transcripción de STSU_12200 (que codifica una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) y de STSU_11500 (que codifica una fructosa-1,6-bifosfatasa y es ortólogo de glpX) con valores ${}^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h}$ de -3.19 y -2.67, respectivamente. La disminución de su transcripción continuó en t_{72 h}, lo cual es lógico ya que en condiciones de disponibilidad de glucosa no es necesaria su síntesis. Sin embargo, los valores de transcripción aumentaron a partir de t_{72 h} y esto podría indicar un agotamiento de la glucosa.

La represión de la transcripción del gen que codifica la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa es un fenómeno que también se ha descrito en cultivos de *B. subtilis* a los que se adiciona glucosa (Blencke y col., 2003). En el control, la tendencia de estos genes fue de disminución de la transcripción, lo cual se explica si consideramos que la maltosa es una fuente de carbono no preferida, de asimilación lenta, que se emplea en una primera fase para la generación de biomasa y posteriormente para la producción de tacrolimus.



Figura 3.5. Perfil transcripcional de los genes específicos de la gluconeogénesis en los cultivos a los que se añadió glucosa (panel A) y en los cultivos control (panel B). Negro: STSU_12200; gris: *glpX*.

• Ruta de las pentosas fosfato

Las variaciones observadas en los genes específicos de la ruta de las pentosas fosfato (PP) no fueron significativas ($p_{FDR} \le 0.05$), lo que sugiere que la adición no tuvo efecto sobre su transcripción. La mayoría de genes presentó una disminución de la transcripción en t_{70.7 h} y recuperó los valores M_g iniciales en t_{72 h} (figura 3.6), que, además, fue común a la condición control de adición de maltosa (figura 3.6).



Figura 3.6. Perfil transcripcional de los genes específicos de la ruta PP en los cultivos a los que se añadió glucosa (panel A) y en los cultivos control (panel B). Se han resaltado aquellos genes cuya transcripción tuvo una respuesta positiva a la adición de glucosa (aunque no significativa). Rojo: STSU_29686 (*rpe*); azul: STSU_02530 (*gnd3*); verde: STSU_30850 (*tktA2*).

• Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

De los 24 genes específicos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) solo 3 presentaron una variación significativa ($p_{FDR} \le 0.05$) tras la adición de glucosa (figura 3.7): STSU_02380, STSU_02385 y STSU_02390, que codifican tres subunidades de la succinato deshidrogenasa (subunidad ferrosulfurosa, flavoproteína y citocromo b, respectivamente). Son ortólogos de SCO0922, SCO0923 y SCO0924, respectivamente. Los valores GlcMc^{70.7 h-70 h} de estos genes estuvieron comprendidos entre -2.85 y -2.94 y su transcripción continuó disminuyendo de forma significativa a las 72 horas. En B. subtilis se ha comprobado la represión de genes del ciclo TCA por glucosa (Blencke y col., 2003). Aunque la adición de glucosa reguló negativamente la transcripción de estos genes hasta t_{76 h}, en etapas posteriores del cultivo los valores Mg de transcripción se recuperaron en los cultivos con glucosa pero no en la condición control. Cabe destacar que STSU 11375 y STSU 11380 (parálogos de STSU_02385 y STSU_02380, respectivamente) presentaron un perfil transcripcional muy semejante al de los genes de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus, tanto en la condición control como en la de adición de glucosa (ver apartado III.1.8.1; pág. 218). Estos genes que codifican subunidades alternativas de succinato deshidrogenasa presentan un comportamiento opuesto al de STSU_02380-STSU_02390, lo que indica un nuevo ejemplo de regulación específica para los casos en que Streptomyces presenta genes parálogos, como es el caso de los genes pfkA.



Figura 3.7. Perfil transcripcional de los genes específicos de la ruta TCA en los cultivos a los que se añadió glucosa (panel A) y en los cultivos control (panel B). Rojo: STSU_02390; azul: STSU_02380; fucsia: STSU_02385; negro: STSU_11375 y STSU_11380.

III.1.3.2. Efecto de la adición de glicerol sobre las rutas del metabolismo del carbono

• Glucólisis

La adición de glicerol solo afectó de forma significativa ($p_{FDR} \le 0.05$) a la transcripción de *glk*, que presentó una regulación positiva ($^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} = 0.40$), aunque de corta duración (figura 3.8). De estos resultados se puede inferir que la adición de glicerol no afectó a los genes implicados en la glucólisis, lo que es lógico ya que el gliceraldehído-3-fosfato se incorpora en esta ruta en un paso tardío.



Figura 3.8. Perfil transcripcional de los genes específicos de la glucólisis en los cultivos a los que se añadió glicerol (panel A) y en los cultivos control (panel B). Rojo: *pyk2*; verde: *pfkA3*; azul: *pfkA2*; naranja: STSU_26554 (*glk*); negro: *ppgK*; morado: *pfkA1*; rosa claro: *pyk1*. Los perfiles de color gris corresponden a STSU_05303 y STSU_31605. Cabe destacar que no se representa el perfil de STSU_19832 porque las micromatrices utilizadas no contienen sondas asignadas a dicho gen.

Gluconeogénesis

La adición de glicerol no supuso variaciones significativas ($p_{FDR} \le 0.05$) en la transcripción de los dos genes específicos de la gluconeogénesis (figura 3.9). Sin embargo, mientras que la tendencia en la condición control fue de disminución de su transcripción, en la condición de adición de glicerol los valores M_g de transcripción se mantuvieron elevados, lo que concuerda con el papel gluconeogénico de este sustrato (Berg, 2002).



Figura 3.9. Perfil transcripcional de los genes específicos de la gluconeogénesis en los cultivos a los que se añadió glicerol (panel A) y en los cultivos control (panel B). Negro: STSU_12200; gris: *glpX*.

• Ruta de las pentosas fosfato

Solo uno de los genes de esta ruta presentó una variación significativa ($p_{FDR} \le 0.05$) de los niveles de transcripción tras la adición de glicerol: STSU_29686 (ortólogo de *rpe*) presentó un valor ^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} de 0.60. Los genes que codifican transcetolasas STSU_27521 (*tktA1*) y STSU_30850 (*tktA2*) presentaron un comportamiento opuesto al resto de genes de la ruta tras la adición y, además, *tktA2* aumentó su transcripción a partir de t_{72 h} hasta t_{124 h}, mientras que el resto de genes mantuvieron unos valores M_g más o menos constantes (figura 3.10).





• Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

De los 24 genes específicos del ciclo TCA, solo STSU_11525 presentó una variación significativa ($p_{FDR} \le 0.05$) en sus niveles de transcripción tras la adición de glicerol. STSU_11525 (ortólogo de *fumC*), que codifica una hidratasa de fumarato, presentó el mayor incremento de la transcripción con un valor ${}^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h}$ de 2.52, aunque fue un efecto transitorio. Al igual que en el caso de la adición de glucosa, STSU_02380, STSU_02385 y STSU_02390, disminuyeron su transcripción tras la adición, aunque de forma no significativa (figura 3.11).



Figura 3.11. Perfil transcripcional de los genes específicos de la ruta TCA en los cultivos a los que se añadió glicerol (panel A) y en los cultivos control (panel B). Rojo: STSU_02390; azul: STSU_02380; fucsia: STSU_02385; negro: STSU_11375 y STSU_11380. En el panel A se puede distinguir entre los perfiles grises el de *fumC*, que presentó el mayor incremento detectado en $t_{72 \text{ h}}$.

III.1.4. Visión general de las respuestas a las adiciones de glucosa y glicerol

En el apartado anterior se analizó el comportamiento de los genes de las rutas centrales del metabolismo del carbono. Para valorar la respuesta transcripcional del resto de los genes a las adiciones se consideraron, para cada serie, los contrastes estadísticos que comparan los valores de las muestras tomadas a los 40 minutos ($t_{70.7 h}$) y a las dos horas ($t_{72 h}$) con el tiempo inmediatamente anterior a la adición (t70 h). Los valores Mg de t70.7 h y t72 h empleados en el contraste proceden de las dos réplicas de cada condición experimental, mientras que los valores de t70 h proceden del promedio de los seis cultivos, ya que la condición experimental en t70 h es la misma en todos los casos. Como base del análisis se establecieron los contrastes t70.7 h-t70 h. Para cada adición se seleccionaron aquellos genes que variaron de forma amplia y significativa, con un valor $M_c^{70.7 h-70 h} \ge 2 o \le -2 y$ un valor p_{FDR} \leq 0.05. De este conjunto inicial de genes (GCI) se eliminaron aquellos que variaron significativamente en la condición control con valor $p_{FDR} \leq 0.05$, independientemente de su valor M_c (GSC), con la intención de detectar variaciones específicas de las adiciones de glucosa y glicerol (tabla 3.2). Los genes filtrados (GF) se presentan en el archivo I.2 del Material Suplementario sobre fondo blanco. En estas tablas, además de los datos correspondientes al contraste $t_{70.7 h}$ - $t_{70 h}$, se presentan los datos del contraste $t_{72 h}$ - $t_{70 h}$. Este contraste nos permite valorar si la naturaleza de las respuestas fue sostenida o transitoria en función de si se mantuvo o no el cambio detectado en el primer contraste utilizando los mismos criterios de valor M_c y p_{FDR}. Por último, cuando se detectaron genes vecinos con un perfil idéntico al de un determinado GF, estos se incorporaron en las tablas para enriquecer el conjunto de datos. Los genes incorporados (GI) se presentan en dichas tablas sobre fondo gris.
Tabla 3.2. Resumen del número de genes cuya transcripción aumenta (↑) o disminuye (↓) en t_{70.7 h} tras la adición de glucosa o glicerol. GCI: genes del conjunto inicial (valor $M_c^{70.7 h-70 h} \ge 2 \text{ o} \le -2 \text{ y}$ un valor $p_{FDR} \le 0.05$), GSC: genes significativos en la condición control (cualquier valor $M_c^{70.7 h-70 h} \ge 2 \text{ o} \le -2 \text{ y}$ valor $p_{FDR} \le 0.05$), GF: genes filtrados que aparecen en las tablas (GCI-GSC), GI: genes incorporados a las tablas por presentar un perfil idéntico y situarse en el entorno génico de un GF, GT: genes totales que aparecen en las tablas.

		GCI	GSC	GF	GI	GT
Chucoco	\uparrow	71	25	46	12	58
Glucosa	\downarrow	51	1	50	32	82
Clicarol	\uparrow	112	6	106	20	126
Gilceroi	\downarrow	16	2	14	21	35

Como se puede observar en la tabla 3.2, la adición de glucosa generó incremento y disminución de la transcripción de un número semejante de GF, mientras que el efecto del glicerol fue principalmente de incremento. En cuanto al mantenimiento de la respuesta de los GF en el t_{72 h} (tabla 3.3), el 50 % de los genes regulados positivamente y el 94 % de los genes regulados negativamente tras la adición de glucosa mantuvieron su respuesta a las dos horas de la adición. En el caso de la adición de glicerol, un 41.5 % de los GF cuya transcripción aumentó y un 50 % de los GF cuya transcripción disminuyó tras la adición mantuvieron su respuesta dos horas más tarde.

Tabla 3.3. Clasificación de los GF afectados por las adiciones de glucosa o glicerol en función del tipo de respuesta obtenido. Se considera respuesta sostenida cuando se obtuvieron valores $M_c^{72 h-70 h} \ge 2$ o ≤ -2 y valores $p_{FDR} \le 0.05$ y respuesta transitoria cuando no supera dichos parámetros.

	G	lucosa	Glice	erol
	1	\checkmark	1	\checkmark
Transitoria	23	3	62	7
Sostenida	23	47	44	7
TOTAL	46	50	106	14

Se detectaron 7 GF cuya transcripción aumentó tras ambas adiciones, que codifican funciones de transporte (STSU_12520, STSU_28056, STSU_11155, STSU_29227-STSU_29232 y STSU_21329) y una proteína pequeña (50 aminoácidos) muy conservada en *Streptomyces* (STSU_11130). Cuatro GF disminuyeron su transcripción tras ambas adiciones; estos genes codifican enzimas relacionadas con la biosíntesis de ácidos grasos (STSU_23706-STSU_23711 y STSU_06268) y una proteína hipotética (STSU_09064).

Para facilitar la visualización de los resultados, se agruparon los GF que presentaron perfiles semejantes. Este proceso se realizó de forma manual, ya que los resultados de los algoritmos de agrupamiento automático (p. ej., splinecluster, disponible en <u>http://wwwf.imperial.ac.uk/~naheard/</u>) resultaron insatisfactorios, puesto que en muchas ocasiones se agruparon perfiles que en realidad no son similares. Ello pudo ser debido a que la duración del cultivo fue extensa y comprendió importantes cambios fisiológicos, por lo que los cambios en el transcriptoma obtenidos fueron complejos. Con los genes de cada grupo se generó un perfil promedio con la precaución de que fuese representativo de todos y cada

uno de los integrantes del grupo, de manera que la mayoría de grupos tiene un número reducido de componentes. En total se identificaron 12 grupos de GF cuya transcripción aumentó tras la adición de glucosa (simbolizados como A_{glc}), 12 grupos cuya transcripción disminuyó tras la adición de glucosa (R_{glc}), 12 grupos de GF cuya transcripción aumentó tras la adición de glucosa (R_{glc}), 12 grupos de GF cuya transcripción aumentó tras la adición de glucosa (R_{glc}), 12 grupos de GF cuya transcripción aumentó tras la adición de glucosa (R_{glc}), 12 grupos de GF cuya transcripción aumentó tras la adición de glucosa (R_{gol}) y 4 grupos cuya transcripción disminuyó tras la adición de glicerol (R_{gol}). Algunos GF no se adscribieron a ningún grupo en concreto por presentar un perfil único o intermedio entre grupos. Este fue el caso de 8 genes de tipo A_{glc} , 8 de tipo R_{glc} , 18 de tipo A_{gol} y 3 de tipo R_{gol} , que aparecen en las tablas como SC (sin clasificar).

A continuación se describen, para cada adición y tipo de respuesta, los cambios observados y se presentan los perfiles promedio de los grupos de GF identificados. Se prestó especial atención a los componentes de aquellos grupos en los que el cambio producido tras la adición se mantuvo a lo largo del cultivo o a aquellos en los que los niveles de transcripción en fase estacionaria fueron muy diferentes entre las condiciones de adición de glucosa o glicerol y la adición control. Para dichos grupos se realizó una búsqueda de genes con perfil similar u opuesto mediante coeficientes de correlación de Pearson (*r*) con el fin de enriquecer los resultados. La exposición que sigue se inicia con los resultados del análisis de la respuesta a la adición de glucosa.

III.1.5. Respuesta a la adición de glucosa

III.1.5.1. Clasificación por el perfil transcripcional de los genes regulados positivamente tras la adición de glucosa

Para filtrar los genes regulados positivamente tras la adición de glucosa se aplicó el criterio expuesto en el apartado III.1.4 (pág. 180). Se detectaron 46 GF cuya transcripción aumentó tras la adición de glucosa, de los cuales 20 presentaron un valor M_c mayor de 3, es decir, aumentaron su transcripción más de 8 (2³) veces (ver archivo I.2 del Material Suplementario). Los 46 GF se clasificaron en 12 grupos en función de su perfil, a excepción de 8 que no se adscribieron a ningún grupo (ver tabla 3.4). Como se puede observar en los perfiles promedio (figura 3.12), la respuesta obtenida fue de carácter transitorio en la mayoría de los casos ($A_{glc}1$, $A_{glc}2$, $A_{glc}3$, $A_{glc}4$, $A_{glc}8$, $A_{glc}11$) o incluso se produjo un aumento de la transcripción no significativo en la condición control ($A_{glc}2$, $A_{glc}10$, $A_{glc}12$).

Grupo	Componentes
Aglc1	STSU_07503, STSU_12390
Aglc2	STSU_30071, STSU_17469, STSU_12236f, stsu_c_contig00639_3_898, STSU_17474,
	STSU_18582
Aglc3	STSU_29232, STSU_29227
Aglc4	STSU_29364, stsu_c_contig00869_2_201
Aglc5	STSU_33110, STSU_33105
Aglc6	STSU_23786, STSU_23777a, STSU_23771
Aglc7	STSU_27069, STSU_27064, STSU_09154
Aglc8	STSU_29606, STSU_29611, STSU_29631, STSU_29626, STSU_29636, STSU_29616,
	STSU_29621, STSU_29601
Aglc9	STSU_11130, STSU_28056, STSU_28051, STSU_12520

Tabla 3.4 Clasificación de los 46 GF cuya transcripción se incrementó tras la adición de glucosa en función de su perfil transcripcional.



Figura 3.12. Perfiles promedio de los grupos de GF que presentaron un incremento de la transcripción tras la adición de glucosa. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g). En la parte superior izquierda de cada gráfico se indica el número del grupo. El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

III.1.5.2. Visión general de los genes regulados positivamente tras la adición de glucosa

• Efecto sobre la síntesis de pirimidinas

La adición de glucosa reguló positivamente y de forma significativa la transcripción de 8 genes implicados en la biosíntesis de pirimidinas. STSU_29601-STSU_29636 son los ortólogos de SCO1488-SCO1481 de *S. coelicolor*, que forman parte del operón *pyr*, y presentaron valores ^{Gic}M_c^{70.7 h-70 h} de entre 2.19 y 4.68. Su perfil transcripcional promedio se presenta en la figura 3.12 y corresponde al grupo A_{glc}8 (ver apartado III.1.5.1; pág. 182). Los nucleótidos de pirimidina son de gran importancia para el metabolismo celular, no sólo por

formar parte del ADN y del ARN, sino por su intervención en el ensamblado de la membrana celular, la glicosilación de proteínas y la biosíntesis de glucógeno (Evans y Guy, 2004). La detección del aumento de la transcripción de STSU_30071 (SCO1388), que codifica una nucleotidiltransferasa (${}^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = 2.80$); STSU_06353 (SCO5998; *murA2*), que codifica una UDP-N-acetilglucosamina-1-carboxivinil transferasa (${}^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = 2.56$) y STSU_21963 (SCO3097), que codifica una proteína con un posible dominio transglicosilasa (${}^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = 2.46$), sugiere una posible estimulación de la glicosilación de nucleótidos tras la adición de glucosa (figura 3.13).



Figura 3.13. Perfiles transcripcionales de STSU_30071, *murA2* y STSU_21963. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glucosa).

• Efecto sobre genes del regulón pho

Se produjo un aumento de la transcripción de STSU_19400, ortólogo de *phoU* de *S. coelicolor* (SCO4228; ^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = 2.08). El perfil transcripcional de *phoU* (ver perfil A_{glc}10 en el apartado III.1.5.1; pág. 182) fue el mismo que el de los genes STSU_19405 y STSU_19410, por lo que éstos se incorporaron en la tabla como GI (valores ^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} de 1.53 y 1.13, respectivamente). Estos últimos son los ortólogos de *phoR* y *phoP* de *S. coelicolor* (SCO4229 y SCO4230, respectivamente), que codifican el sistema de dos componentes que responde a la escasez de Pi en el medio. Se produjo una regulación positiva de los genes del operón *pstSCAB*, que codifica un transportador de Pi cuya transcripción depende de PhoP (valores ^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} de entre 4.24 y 4.95). Como se comentará en el apartado III.1.7 (pág. 213), la regulación positiva de la transcripción de carbono ensayadas.

Efecto sobre el metabolismo de aminoácidos

La adición de glucosa produjo una regulación positiva de la transcripción de los genes que participan en los dos primeros pasos de la ruta de biosíntesis de aminoácidos de la familia del aspártico a partir de ácido aspártico. Se trata de STSU_15904 y STSU_15909, que codifican una aspartato semialdehído deshidrogenasa y una aspartato quinasa, y son ortólogos de asd2 y ask, respectivamente (valores GlcMc^{70.7 h-70 h} de 2.45 y 1.70, respectivamente; ver figura 3.14). Las reacciones catalizadas por dichas enzimas generan aspartato- β -semialdehído que puede dirigirse a la síntesis de L-treonina, L-metionina y L-lisina. Cuando se observaron los perfiles transcripcionales de los genes implicados en el último paso de la rutas de síntesis de L-treonina (STSU_10249, ortólogo de trhC), L-lisina (STSU 10259, ortólogo de lysA), y de L-isoleucina (STSU 09054, ortólogo de ilvE), se observó un incremento de su transcripción significativo en t72 h tras la adición de glucosa que sugiere una estimulación de la producción de los tres aminoácidos tras la adición (resultados no mostrados). El perfil del ortólogo de metE (STSU_01790), implicado en la síntesis de L-metionina, no pudo comprobarse debido a la ausencia de sondas asignadas a este gen en las micromatrices. Por otro lado se produjo un aumento de la transcripción de STSU 33105 (ortólogo de *tdh*; ${}^{Glc}M_{c}$ ${}^{70.7 h-70 h}$ = 2.39) y STSU 33110 (ortólogo de *kbl*; ${}^{Glc}M_{c}$ ${}^{70.7 h-70 h}$ = 2.16), que codifican una L-treonina-3-deshidrogenasa y una 2-amino-3-cetobutirato CoA ligasa, respectivamente (ver figura 3.14). Estas actividades enzimáticas participan en la interconversión entre L-glicina y L-treonina y, al tratarse de reacciones bidireccionales, no se puede inferir el sentido de la reacción. También se detectó un incremento de la transcripción de STSU_09154 (ortólogo de serA; ^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = 3.01), que codifica una D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa implicada en la síntesis de serina. El perfil del ortólogo del gen implicado en el último paso de la síntesis de L-serina (STSU_28076, ortólogo de serB2) presentó un incremento significativo en t72 h, lo que sugiere que la adición de glucosa también estimuló la síntesis de este aminoácido (ver figura 3.14).



Figura 3.14. Perfil transcripcional de varios genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos en los cultivos a los que se añadió glucosa (panel A) y en los cultivos control (panel B). Rojo oscuro: *asd2*; rojo claro: *ask*; azul oscuro: *tdh*; azul claro: *kbl*; verde oscuro: *lysA*; verde claro: *thrC*; naranja: *ilvE*; morado: *serA*; fucsia: *serB2*; negro: *gltB*; gris: *gltD*.

En el grupo A_{glc}7, además del ya mencionado *serA*, se clasificaron STSU_27064 (ortólogo de *gltB*) y STSU_27069 (ortólogo de *gltD*), que codifican las subunidades de la glutamato sintasa. Los valores $^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h}$ fueron de 4.63 y 5.57, respectivamente. Como se

puede observar en la figura 3.14, varios de los genes tratados en este apartado presentaron una regulación positiva tras la adición de maltosa (*asd2, ask, serA, serB2, gltB* y *gltD*).

En S. coelicolor gltB y gltD forman una unidad transcripcional (Kormanec y Sevciková, 2002b) y su expresión se induce en presencia de glucosa (Gubbens y col., 2012), como ocurre con los genes ortólogos gltAB de B. subtilis (Blencke y col., 2003). En S. tsukubaensis y en S. coelicolor ambos genes se encuentran codificados en la misma cadena y los 8 últimos nucleótidos de gltB solapan con el inicio de gltD. S. coelicolor cuenta con un parálogo de *gltD*, SCO1977, para el que no se encontró correspondencia en *S. tsukubaensis*. La glutamato sintasa cataliza la formación de dos moléculas de L-glutamato a partir de L-glutamina y 2-cetoglutarato (Fisher, 1989) y participa en la ruta de asimilación de amonio junto con las glutamina sintetasas, que incorporan amonio en el L-glutamato intracelular y dan lugar a dos moléculas de L-glutamina. En S. tsukubaensis se encuentran cinco genes cuyo producto predicho es una glutamina sintetasa. De ellos, STSU_26189 y STSU_26139 son los ortólogos de glnA y glnII, respectivamente, que codifican las glutamina sintetasas funcionales de S. coelicolor; STSU_25949 y STSU_29012 son los ortólogos de los parálogos de glnA SCO2241 y SCO1613, respectivamente, cuyos productos no presentan actividad glutamina sintetasa en el organismo modelo (Rexer y col., 2006), y STSU 14393 presenta homología con SCO2241 (casi un 29 % de identidad aminoacídica). En S. tsukubaensis, glnA y glnII presentaron un incremento de su transcripción tras la adición de glucosa que no pasó los filtros aplicados en el apartado III.1.4 (pág. 180) en $t_{70.7 h}$ o $t_{72 h}$, ya que el valor p_{FDR} fue superior a 0.05. Sin embargo, la transcripción de glnA y glnII aumentó en t_{80 h} respecto de t_{70 h} con una diferencia de valores M_g (que equivalen a un valor ${}^{Glc}M_c^{80 h-70 h}$) de 6.92 y 8.24, respectivamente (ver figura 3.15). Estos resultados se pueden interpretar como una activación de la asimilación de amonio en respuesta al aumento de la disponibilidad de carbono.



Figura 3.15. Perfiles transcripcionales de *glnA*, *glnII* y STSU_14393. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

En la búsqueda de perfiles similares u opuestos mediante coeficientes de correlación se detectó STSU_22794 (r = -0.83, respecto de *gltB*), que codifica una NAD-glutamato deshidrogenasa y es ortólogo de SCO2999 de *S. coelicolor* (figura 3.16). Este gen disminuyó

su transcripción de forma significativa con un valor ^{Glc} $M_c^{70.7 h-70 h}$ de -2.83. Esta enzima cataliza la reacción reversible de condensación de 2-cetoglutarato y amonio para formar glutamato. En *S. coelicolor* existen dos genes que codifican glutamato deshidrogenasas y que presentan una regulación opuesta: *gdhA* (ortólogo de STSU_30700) es inducido por glucosa, mientras que SCO2999 es reprimido (Gubbens y col., 2012). En nuestro experimento, *gdhA* incrementó su transcripción de forma significativa tras la adición de glucosa (^{Glc} $M_c^{70.7 h-70 h} = 1.01$; figura 3.16), lo que concuerda con los resultados obtenidos por Gubbens y col. (2012). Estos autores sugieren que SCO2999 participa en la utilización del glutamato como fuente de energía en vez de en su síntesis.



Figura 3.16. Perfiles transcripcionales de STSU_22794 y *gdhA*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

Se puede concluir que la respuesta transcripcional de los genes relacionados con el metabolismo del glutamato a la adición de glucosa observada en S. tsukubaensis coincidió con la descrita en S. coelicolor: aumentó la transcripción de genes que codifican enzimas de síntesis de glutamato (gltB, gltD y gdhA) y disminuyó la transcripción de un gen cuyo producto se ha propuesto que interviene en el consumo del mismo (STSU 22794). En base a sus resultados, van Wezel y col. (2006) afirman que en S. coelicolor el glutamato se consume como fuente de carbono completamente antes de que la asimilación de glucosa comience. Cabe pensar, por tanto, que la adición de glucosa no afectaría a la utilización de glutamato. Sin embargo, la situación puede ser más compleja, como exponen Wentzel y col. (2012), y se produce un consumo simultáneo (y no secuencial) de ambas fuentes de carbono. En este último trabajo se indica que en presencia de ambas fuentes de carbono el L-glutamato actúa como fuente principal mientras que la D-glucosa tiene un papel secundario. En el medio de cultivo en el que se utilizó D-glucosa y L-glutamato marcados con C¹³, Wentzel y col. (2012) detectaron el C¹³ procedente de ambas fuentes en metabolitos de las rutas centrales del metabolismo del carbono. En concordancia con lo anterior, Thomas y col. (2012) observaron que cuando S. coelicolor se cultiva en un medio con glucosa como fuente de carbono y ácido glutámico como fuente de carbono y nitrógeno (como en el medio MGm-2.5 con glucosa), la concentración de glucosa disminuye a lo largo del cultivo aunque en una proporción mucho menor que la de glutamato.

• Efecto sobre el metabolismo del carbono

El efecto de la adición de glucosa sobre las rutas centrales del metabolismo del carbono se describe en el apartado III.1.3.1 (pág. 173), por lo cual este apartado se centrará en los GF relacionados con otras rutas del metabolismo del carbono. Entre los GF que presentaron una regulación positiva y que están relacionados con las rutas del metabolismo central solo se detectaron *pfkA3* ($^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = 2.78$) y STSU_28630 ($^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = 2.14$), que codifica una gluconoquinasa que canaliza gluconato hacia la ruta PP.

Se detectó un aumento de la transcripción de dos genes cuyo producto predicho es una xilosa isomerasa: STSU_04491 (ortólogo de *xylA;* ^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = 2.81) y STSU_23777a (^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = 3.22; ver siguiente apartado). La respuesta de genes relacionados con el metabolismo de la xilosa a la adición de glucosa no es extraña, ya que existe una conexión directa entre el metabolismo de ambos azúcares (ver apartado I.3.3.2; pág. 55). Adyacente a *xylA* y en sentido divergente se localiza un gen que codifica un regulador ROK (STSU_04496), ortólogo de SCO1060, cuya transcripción se incrementó únicamente en fase estacionaria en la condición control (ver figura 3.17). Este regulador presenta homología con el regulador XylR de *S. coelicolor,* que regula la transcripción de *xylA* y *xylB* (que codifica una enzima con actividad D-xilulosa quinasa) en este organismo. El descenso de la transcripción de *xylA* y *xylB* durante la fase estacionaria en la condición control se correlacionó con el aumento de la transcripción de STSU_04496, por lo que el producto de este último podría actuar como un regulador negativo de los anteriores. Cuando se buscaron genes con un perfil similar al de STSU_04496 mediante coeficientes de correlación se detectó el gen STSU_17474 (*r* = 0.80), que codifica un factor sigma.



Figura 3.17. Perfiles transcripcionales de *xylB* (secuencia de STSU_04486), *xylA* y STSU_04496. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

Aunque la reacción principal de XylA es la conversión reversible de la D-xilosa a D-xilulosa, también es capaz de isomerizar glucosa a D-fructosa, propiedad aprovechada en la fabricación industrial de siropes (Jensen y Rugh, 1987). Una limitación de esta enzima en su aplicación industrial es su represión transcripcional por glucosa, que en el caso de Streptomyces rubiginosus es independiente de Glk (Wong y col., 1991). En nuestro experimento, no sólo no se produjo una disminución de la transcripción tras la adición de glucosa, sino que se detectó un aumento. Este fenómeno es atribuible a la existencia de una regulación compleja en la que intervengan mecanismos independientes. Por ejemplo, en B. subtilis, xyIA presenta dos mecanismos reguladores con efecto aditivo: participan un elemento cre regulado por CcpA, independiente de la concentración de glucosa, y el regulador XyIR, cuyo efecto solo es apreciable en presencia de concentraciones bajas de glucosa (máximo efecto a 7 mM-13.9 mM, 0.13 %-0.26 % p/v); de manera que en presencia de concentraciones de glucosa elevadas (p. ej., de 111 mM, 2 % p/v) la represión transcripcional disminuye (Kraus y col., 1994). En cuanto al efecto de la adición de glicerol sobre la transcripción de xylA, se observó una disminución de la transcripción, al igual que ocurre en Streptomyces sp. EC10 (Belfaquih y Penninckx, 2000).

El siguiente paso en la metabolización de la D-xilulosa es su fosforilación a D-xilulosa-5-fosfato por la xilulosa quinasa XylB. Tanto en *S. coelicolor* como en *S. tsukubaensis* XylA y XylB están codificadas por genes adyacentes y divergentes. En *S. tsukubaensis* se detectaron dos secuencias anotadas como secuencias parciales de xilulosa quinasa, STSU_04481 y STSU_04486, cuyos productos tienen un tamaño de 349 y 144 aminoácidos, respectivamente. Puesto que en *S. coelicolor xylB* (SCO1170) codifica un producto de 481 aminoácidos, se supone que se trata de un error en la anotación y que STSU_04486 (idéntico al de STSU_04481) indicó que la transcripción de este gen también se reguló positivamente y de forma significativa por glucosa ($^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = 1.74$; ver figura 3.17). La D-xilulosa-5-fosfato se isomeriza a ribulosa-5-fosfato gracias a la epimerasa codificada por *rpe*, que presentó un incremento de la transcripción significativo en t_{72 h} (ver figura 3.6). Puesto que el medio de cultivo no contiene D-xilosa, este resultado no es fácil de interpretar. Una posible explicación se describe en el apartado III.1.5.6 (pág. 201).

En *S. coelicolor* la regulación de *xylA* y *xylB* es independiente de la de los genes implicados en el transporte de xilosa (SCO6009-SCO6011, *xylFGH*) y de su regulador negativo *rok7B7* (SCO6008, ortólogo de STSU_06313). Es a través de este regulador dónde se observa la conexión entre el metabolismo de la xilosa y la CCR por glucosa independiente de Glk (Swiatek y col., 2013). *rok7B7* está muy conservado en el género *Streptomyces* y se encuentra flanqueado por dos operones de transporte de azúcares: *xylFGH* en posición posterior y SCO6005-SCO6007 en posición anterior (del que no se conoce su sustrato). En el mutante de *S. coelicolor* en *rok7B7* no sólo incrementa la transcripción del transportador de xilosa *xylFGH*, sino también la de las permeasas de glucosa *glcP1* y *glcP2*, y se triplica la cantidad de proteína Glk detectada en estudios proteómicos, lo que indica la corregulación del transporte de ambos azúcares. En *S. tsukubaensis* se conserva la organización génica de *S. coelicolor*, aunque los genes están codificados en la cadena +1 (ver figura 3.18). Los perfiles de transcripción de los ortólogos de *xylFGH* (STSU_06308, STSU_06303 y STSU_06298, respectivamente) se muestran en la figura 3.18 y, como se puede observar,

todos ellos presentaron una disminución de la transcripción tras la adición de glucosa, que fue significativa en el caso de STSU_06308 y STSU_06303 (valores $^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h}$ de -1.24 y -0.90, respectivamente) Esta respuesta es coherente con el fenómeno de represión por carbono, ya que en presencia de glucosa se reprime el transporte de fuentes de carbono alternativas.



Figura 3.18. Organización del entorno génico de *rok7B7* en *S. coelicolor* y *S. tsukubaensis* (panel superior) y perfiles transcripcionales en *S. tsukubaensis* (panel inferior). Se indica el identificador SCO del gen en *S. coelicolor* y el ortólogo en *S. tsukubaensis*. Los genes que codifican proteínas de unión a sustrato, de membrana o catabólicas se señalan con S, M o C, respectivamente. El sustrato predicho o conocido se indica en el superíndice. Aunque Rok7B7 presenta un 92 % de identidad aminoacídica con NgcR de *Streptomyces olivaceoviridis*, que controla un transportador dual de N-acetilglucosamina/quitobiosa (Xiao y col., 2002), la baja identidad aminoacídica de SCO6005-SCO6007 con el transportador NgcEFG (en torno a un 35 %) hace probable que el compuesto transportado no sea N-acetilglucosamina (Swiatek y col., 2013). En el panel inferior el eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición control (maltosa). La asignación funcional de los genes de *S. coelicolor* está tomada de Swiatek y col. (2013).

• Efecto sobre genes con función reguladora

Varios genes cuyo producto presenta una función reguladora incrementaron su transcripción tras la adición de glucosa. STSU_28051 (${}^{Glc}M_{c}{}^{70.7 h-70 h} = 2.37$) codifica un producto anotado como regulador de la familia GntR, cuyos miembros actúan como sensores ambientales y controlan genes implicados en la respuesta a estímulos externos (Haydon y Guest, 1991). La similitud de su perfil con el del gen adyacente STSU_28056, que codifica un transportador con un dominio de transporte de cianato (COG287), sugiere que podría actuar como regulador de este último (ver figura 3.19). STSU_20227 (${}^{Glc}M_{c}{}^{70.7 h-70 h} = 1.66$) codifica un regulador de la familia MarR cuyo ortólogo en *S. coelicolor* (SCO4336) se induce transcripcionalmente tras la síntesis de ppGpp (Hesketh y col., 2007).



Figura 3.19. Perfiles transcripcionales de STSU_28051, su posible diana STSU_28056 (con función transportadora) y STSU_20227. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glucorol y el perfil negro la condición control (maltosa).

Dentro del grupo $A_{glc}6$ se encuentra STSU_23786, anotado como regulador de la familia MarR. Este gen destaca por su elevado valor ${}^{Glc}M_{c}{}^{70.7 h-70 h}$ (4.67) y por el mantenimiento de su respuesta en el tiempo. Dicho grupo incluye además a STSU_23771 (regulador de la familia LysR) y a STSU_23777a (posible xilosa isomerasa). Su perfil promedio se puede observar en el apartado III.1.5.1 (pág. 182). Los valores ${}^{Glc}M_{c}{}^{70.7 h-70 h}$ de estos genes fueron de 2.37 y 3.22, respectivamente y, además de presentar una respuesta sostenida, ésta fue específica de la adición de glucosa.

Los reguladores de la familia MarR (del inglés <u>Multiple Antibiotic Resistance</u> Regulator) regulan una gran variedad de funciones biológicas como son la respuesta al estrés ambiental, factores de virulencia y rutas catabólicas de compuestos aromáticos (Wilkinson y Grove, 2006). Estos reguladores se encuentran en el citoplasma en forma de homodímeros, actúan normalmente como represores y modulan su actividad a través de la unión a un ligando (que suele ser un pequeño compuesto fenólico, en el caso de la regulación de rutas metabólicas) o mediante modificaciones covalentes generadas por oxidación de residuos de cisteína (en el caso de la respuesta al estrés oxidativo; Wilkinson y Grove, 2006). Puesto que la secuencia aminoacídica de STSU_23786 solo contiene un residuo de cisteína, es probable que su regulación se realice mediante la unión a un ligando y no a través de las modificaciones covalentes mediadas por residuos de cisteína. Algunos ejemplos de esta familia de reguladores son: AbsC, regulador pleiotrópico de la biosíntesis de antibióticos en S. coelicolor (Stevenson y col., 2007); OhrR, que actúa como sensor de peróxidos orgánicos (Oh y col., 2007) y PcaV, que regula la ruta del β -cetoadipato implicada en el catabolismo de compuestos aromáticos derivados de la lignina (Davis y col., 2013). El mecanismo regulador general de esta familia consiste en la unión del regulador en ausencia de ligando a la región intergénica entre su gen y otro gen u operón divergente, lo que supone la represión de la transcripción de ambos (Perera y Grove, 2010). La organización de estos tres genes en S. tsukubaensis se representa en la figura 3.20. Como se puede observar, STSU 23771 y STSU 23777a no se localizan en sentido divergente como en la mayoría de los casos. El entorno génico del ortólogo de *S. coelicolor* (SCO5228) difiere del de *S. tsukubaensis*, ya que en el organismo modelo se encuentran genes que codifican permeasas, proteínas de membrana y también reductasas de ribonucleótidos difosfato que intervienen en el metabolismo de purinas y pirimidinas (no mostrado). No se encontró información publicada sobre el ortólogo de STSU_23771 en *S. coelicolor*, SCO2757.



Figura 3.20. Organización génica de STSU_23771, STSU_23777a y STSU_23786 en *S. tsukubaensis*.

• Efecto sobre genes relacionados con la diferenciación

STSU_21551, ortólogo de *ssgE* (SCO3158) presentó una regulación positiva de carácter transitorio tras la adición de glucosa que no pasó los filtros aplicados inicialmente (^{Gic} $M_c^{70.7 h-70 h} = 1.61$) pero que fue significativa, por lo que se trata de un GI. Su producto se ha relacionado con la separación autolítica de las cadenas de esporas en *S. coelicolor* (Noens y col., 2005). En el organismo modelo, *ssgE* presenta niveles de transcripción bajos (Noens y col., 2005); sin embargo, en *S. tsukubaensis* los valores M_g se situaron en torno a 5 en las tres condiciones ensayadas (ver figura 3.21). En ambas especies su transcripción parece ser independiente del ciclo celular.



Figura 3.21. Perfil transcripcional de *ssgE*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

III.1.5.3. Clasificación por el perfil transcripcional de los genes regulados negativamente tras la adición de glucosa

Cuando se aplicó el criterio indicado en el apartado III.1.4 (pág. 180), se obtuvo un conjunto de 50 GF cuya transcripción disminuyó tras la adición de glucosa, la mayoría de los cuales presentó una respuesta de tipo sostenido. Cinco presentaron valores $^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h}$ menores de -3, es decir, redujeron más de 8 veces su transcripción. Los 50 GF se clasificaron en 12 grupos en función de su perfil, a excepción de 8 que no se adscribieron a ningún grupo (ver tabla 3.5). Los perfiles promedio se representan en la figura 3.22. Cabe destacar que en el caso del perfil R_{glc} 3, aunque la respuesta inmediata fue de disminución de la transcripción, en etapas posteriores del cultivo se recuperaron y mantuvieron los niveles de transcripción tras la adición de glucosa, pero los valores M_g se recuperaron en etapas posteriores y se alcanzaron niveles de transcripción comparables a los de la condición control (R_{glc} 9, R_{glc} 10, R_{glc} 11 y R_{glc} 7). El grupo R_{glc} 5 presentó una disminución permanente de la transcripción pero ésta también se produjo en la condición control durante la fase estacionaria.

Grupo	Componentes
$R_{glc}1$	STSU_30920, STSU_30925, STSU_30915
R _{glc} 2	STSU_23711, STSU_23706, STSU_06268
R _{glc} 3	STSU_02380, STSU_02385, STSU_02390
$R_{glc}4$	STSU_09319, STSU_09314, STSU_09324, STSU_09304, STSU_09309
R _{glc} 5	STSU_10289, STSU_10284, STSU_10294
R _{glc} 6	STSU_03494, STSU_03479, STSU_31720, STSU_30480, STSU_04366, STSU_15654,
	STSU_20717, STSU_28235
R _{glc} 7	STSU_03549, STSU_12200, STSU_11500
R _{glc} 8	STSU_03729, STSU_03739, STSU_03734, STSU_03714
R _{glc} 9	STSU_21077, STSU_18108, STSU_09064
$R_{glc}10$	STSU_05528, STSU_23336
R_{glc} 11	STSU_08534, STSU_22954
R_{glc} 12	STSU_30270, STSU_17948, STSU_28650
SC	STSU_14448, STSU_01255, STSU_02445, STSU_10781, STSU_29022, STSU_22794,
	STSU_03989, STSU_29177

Tabla 3.5 Clasificación de los GF cuya transcripción disminuyó tras la adición de glucosa en función de su perfil transcripcional.



Figura 3.22. Perfiles promedio de los GF que presentaron una regulación negativa tras la adición de glucosa. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). En la parte superior izquierda de cada gráfico se indica el número del grupo. El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

III.1.5.4. Visión general de los genes regulados negativamente tras la adición de glucosa

• Efecto sobre el metabolismo de aminoácidos

Entre los genes relacionados con el metabolismo aminoacídico regulados negativamente tras la adición de glucosa se detectaron genes cuyos productos participan en la síntesis de L-arginina desde L-aspartato (argininasuccinato sintasa y liasa codificadas por STSU_29177 y STSU_29182, ortólogos de *argG* y *argH*, respectivamente). La regulación negativa de estos genes fue de carácter transitorio y de hecho, incrementaron su transcripción en t_{72 h}, por lo que es difícil concluir la naturaleza de la respuesta (figura 3.23). Se detectó un gen (STSU_29017; ^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = -1.82) que codifica una enzima con actividad aldehído deshidrogenasa que podría estar implicada en el catabolismo de la L-fenilalanina; sin embargo, debido a la falta de ortólogos de *S. coelicolor* conocidos implicados en el resto de pasos, no se pudo determinar el perfil de otros genes relacionados con esta ruta (figura 3.23). Los resultados descritos en el apartado III.1.5.2 (pág. 183) acerca del efecto de la

glucosa sobre el metabolismo del glutamato se reforzaron con la detección de la regulación negativa de STSU_22794, que codifica una NAD-glutamato deshidrogenasa.



Figura 3.23. Perfiles transcripcionales de argG, argH y STSU_29107. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

Efecto sobre el metabolismo del carbono

El efecto de la adición de glucosa sobre las rutas centrales del metabolismo del carbono se describe en el apartado III.1.3.1 (pág. 173). Entre los GF cuya transcripción presentó una regulación negativa en $t_{70.7 h}$ se detectaron los dos genes específicos de la gluconeogénesis; STSU_03549 (ortólogo de *gap2;* $^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = -3.36$), que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa encargada de oxidar el gliceraldehído-3-fosfato hasta 1,3-bifosfoglicerato en la glucólisis, y los genes relacionados con el ciclo TCA STSU_02380-STSU_02390 (valores $^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h}$ de entre -2.85 y -2.94; ver apartado III.1.3.1; pág. 173).

Gubbens y col. (2012) observaron una represión transcripcional de *gap2* por glucosa en *S. coelicolor*, lo que les llevó a proponer que el papel de Gap2 es gluconeogénico y antagoniza al de Gap1 y Gap3, que participan en la glucólisis. El perfil transcripcional de *gap2* fue tan similar al perfil de los genes específicos de la gluconeogénesis que se agrupó con ellos en el grupo R_{glc}7 (figura 3.24). Se detectó un ortólogo de *gap1* en *S. tsukubaensis* (STSU_27461), pero no de *gap3*. Su perfil se presenta en la figura 3.24.



Figura 3.24. Perfiles transcripcionales de *gap1* y *gap2*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

STSU_22954, que codifica una malato oxidoreductasa que se ha relacionado con la redirección de intermediarios del ciclo TCA hacia el metabolismo secundario en *S. coelicolor* (Rodríguez y col., 2012), se reguló negativamente tras la adición de glucosa (^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = -2.23; ver figura 3.25). Varios genes cuyos productos están implicados en el metabolismo de ácidos grasos y del acetil-CoA redujeron su transcripción tras la adición de glucosa. Entre ellos destacaron STSU_05523 (^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = -1.77) y STSU_05528 (^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = -2.64), ortólogos de *fadD1* y *macS1*, respectivamente, que forman un operón en *S. coelicolor*. Estos genes codifican una acetil-CoA sintetasa necesaria para el inicio correcto de la producción de antibióticos en esta especie (Banchio y Gramajo, 2002). Cabe destacar que, aunque la transcripción de este operón disminuyó tras la adición de glucosa, posteriormente aumentó e incluso se alcanzaron valores M_g superiores en dicha condición con respecto a la condición control (figura 3.25).



Figura 3.25. Perfiles transcripcionales de STSU_22954, *fadD1* y *macS1*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

Efecto sobre genes que codifican sistemas de transporte

El análisis de los transportadores es de gran importancia a la hora de establecer relaciones entre la señalización nutricional y la diferenciación morfológica (Colson y col., 2008). Existen varios ejemplos de proteínas de unión a soluto de transportadores ABC relacionadas con el control de la diferenciación morfológica en Streptomyces, como por ejemplo DasA o las codificadas por el operón bldK (Colson y col., 2008; Nodwell y col., 1996). La retención de este tipo de proteínas en el interior celular en el mutante Δcrp (proteína receptora de AMPc) de S. coelicolor impide en cierto modo la captación de señales ambientales que inducen la diferenciación (Piette y col., 2005). Varios genes que codifican sistemas de transporte presentaron una regulación negativa tras la adición de glucosa y varios de ellos se relacionan, según su anotación, con el transporte de aminoácidos. Entre ellos destacaron 5 genes que codifican un transportador ABC de oligonucleótidos (STSU_09304-STSU_09324; valores ^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} de entre -2.17 y -2.84; figura 3.26) cuyos ortólogos en S. coelicolor (SCO5480-SCO5476) se inducen por S-adenosilmetionina (Park y col., 2005). Según Park y col. (2005), la inhibición del desarrollo morfológico y la estimulación de la producción de antibióticos en el género Streptomyces por S-adenosilmetionina se ejerce a través de la inducción de transportadores de oligopéptidos de tipo ABC como, por ejemplo, BldK. La deleción del ortólogo de STSU_09324 en S. coelicolor (SCO5476), que codifica una permeasa, bloquea el efecto promotor de la S-adenosilmetionina sobre la producción de actinorrodina (Shin y col., 2007). STSU_09319 codifica una lipoproteína de unión a oligopéptidos y su ortólogo en S. coelicolor (SCO5477) pertenece a la familia OppA, la cual está implicada en el transporte de moléculas reguladoras. Otro gen cuyo producto es dependiente de S-adenosilmetionina (STSU_03754, que codifica una metiltransferasa) presentó una regulación negativa tras la adición de glucosa, lo que sugiere que la hexosa podría bloquear la transmisión de la señal de la S-adenosilmetionina mediante la represión de genes que responden a ella.



Figura 3.26. Perfiles transcripcionales de los genes STSU_09304-STSU_09324. En el panel superior de izquierda a derecha: STSU_09304, STSU_09309 y STSU_09314. En el panel inferior de izquierda a derecha STSU_09319 y STSU_09324. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

Coherente con la represión de genes relacionados con el transporte de fuentes de carbono alternativas se detectó una disminución de la transcripción de STSU_23336 (^{Gic}M_c^{70.7 h-70 h} = -2.57), que presenta homología con el gen que codifica el componente IIC del sistema PTS (pero no es ortólogo recíproco), y de STSU_10781 (^{Gic}M_c^{70.7 h-70 h} = -2.32), que codifica el componente *dasA* del transportador de quitobiosa (ver figura 3.27). Este último resultado se vio reforzado por el perfil equivalente de los genes adyacentes STSU_10776 y STSU_10771 (ortólogos de los componentes *dasB* y *dasC*, respectivamente) y STSU_10766 (que codifica una hidrolasa; resultados no mostrados). De ellos solo *dasB* y STSU_10766 presentaron una variación significativa con valores ^{Gic}M_c^{70.7 h-70 h} de -1.59 y -1.57, respectivamente.



Figura 3.27. Perfil transcripcional de STSU_23336 y de *dasA*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

Efecto represor de la glucosa sobre genes de metabolismo secundario y de diferenciación

Es bien conocido el efecto represor de la glucosa sobre la diferenciación morfológica en S. griseus y S. coelicolor (Ueda y col., 2000). En S. tsukubaensis la adición de glucosa negativamente la transcripción de STSU 15654 reguló (ortólogo de wbIA: $^{Glc}M_{c}^{70.7 \text{ h}-70 \text{ h}} = -2.14$) y de STSU_14448 (ortólogo de *bldN*; $^{Glc}M_{c}^{70.7 \text{ h}-70 \text{ h}} = -2.22$; figura 3.28). WblA es un regulador necesario para el inicio de la esporulación en varias especies de Streptomyces (Rabyk y col., 2011; Kang y col., 2007; Fowler-Goldsworthy y col., 2011). BldN es un regulador clave de la diferenciación morfológica: es necesario para la formación de micelio aéreo en S. coelicolor (Bibb y col., 2000) y activa la transcripción de bldM y de los genes codificantes de chaplinas y rodlinas en Streptomyces venezuelae (Bibb y col., 2000; Bibb y col., 2012). La reducción de su expresión en S. coelicolor a causa de la presencia de glucosa en el medio ha sido observada anteriormente en estudios proteómicos, en los que, además, se ha determinado que se trata de un proceso independiente de Glk (Gubbens y col., 2012). Aunque no apareció entre los GF regulados negativamente tras la adición de glucosa porque su variación solo fue significativa en t_{72 h}, cabe destacar el perfil transcripcional del regulador de la familia Crp/Fnr codificado por STSU 03599 (ortólogo de eshA). Este regulador, cuyo perfil se trata en el apartado III.1.6.4 (pág. 210), regula la producción de actinorrodina en S. coelicolor y la diferenciación morfológica y la producción de estreptomicina en S. griseus.

Otro de los genes con un producto con función reguladora que presentó una disminución de la transcripción permanente y significativa tras la adición de glucosa (y glicerol en $t_{72 h}$) fue STSU_02445 (^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = -3.13; ver figura 3.28). Este gen está anotado

como factor sigma L de la ARN polimerasa y no existe información publicada sobre su ortólogo en *S. coelicolor* (SCO0942).

La adición de glucosa reguló negativamente la transcripción de STSU_03714 ($^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = -2.02$; figura 3.28). Este gen codifica un regulador y contiene un codón TTA y un dominio relacionado con la regulación de la expresión de genes que codifican sintasas de policétidos (COG2508). Los valores de transcripción en las condiciones de adición de glucosa y glicerol sugieren una transcripción nula de este gen que contrasta con el perfil obtenido en los cultivos control. Sobre su ortólogo en *S. coelicolor*, SCO2426, no existe información publicada.



Figura 3.28. Perfiles transcripcionales de *wblA*, *bldN*, STSU_02445 y STSU_03714. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

III.1.5.5. Análisis del perfil transcripcional de la glucosa permeasa codificada por STSU_08759

En S. coelicolor el transporte de glucosa se produce principalmente a través de la permeasa codificada por glcP1 (SCO5578), cuya transcripción se induce en presencia de dicho azúcar (van Wezel y col., 2005). En el genoma secuenciado de S. tsukubaensis, al igual que ocurre en los genomas completos de S. avermitilis o S. clavuligerus, solo existe un gen cuyo producto anotado es una glucosa permeasa, STSU_08759. Este gen es el ortólogo de glcP2 de S. coelicolor. El perfil transcripcional de glcP2 en S. tsukubaensis (figura 3.29) no presentó una regulación positiva tras la adición de glucosa y mantuvo valores Mg en torno a -1 de forma constante en las tres condiciones. Esto indica que glcP2 no se transcribe o lo hace en pequeño grado en la mayoría de los tiempos y cultivos. La excepción más clara fue el incremento de la transcripción (más de 3 veces) detectado a partir de t_{92 h} en uno de los cultivos control (resultado no mostrado). En el promotor de glcP de S. clavuligerus, las secuencias conservadas -10 (TAGTCT) y -35 (TTGACT) que caracterizan el promotor de glcP1 de S. coelicolor (van Wezel y col., 2005) son difícilmente reconocibles y la expresión débil de glcP se traduce en la incapacidad del microorganismo para crecer utilizando glucosa como fuente de carbono única (Pérez-Redondo y col., 2010). Cuando se analizó la región promotora de glcP2 con BPROM (disponible en http://www.softberry.com) y NNPP (del inglés <u>N</u>eural <u>N</u>etwork <u>P</u>romoter Prediction, disponible en http://www.fruitfly.org/seq tools/promoter.html) no se detectaron promotores procarióticos claros, lo que no excluye la existencia de un promotor no dependiente del factor sigma 70 (constitutivo) en este gen. Como se sabe, en Streptomyces hay multitud de factores sigma, y puede haber uno que regule la transcripción de un promotor no constitutivo en *qlcP2*. Esta sería la explicación mas probable teniendo en cuenta la activación observada en uno de los cultivos de la serie control. Por otro lado, la ausencia de regulación positiva tras la adición de glucosa hace pensar en la existencia de un transportador de glucosa alternativo en S. tsukubaensis. Esta situación no es extraña ya que en S. coelicolor se asume la existencia de un transportador de baja afinidad aún no identificado (Hodgson, 1982; van Wezel y col., 2005) y en S. lividans se ha demostrado bioquímicamente la existencia de un transportador de alta afinidad y otro de baja afinidad (Hurtubise y col., 1995).



Figura 3.29. Perfil transcripcional de *glcP2*, único gen cuya anotación indica la codificación de una enzima con actividad glucosa permeasa en *S. tsukubaensis*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

III.1.5.6. Sinopsis sobre los efectos principales de la adición de glucosa sobre el transcriptoma

Los resultados de esta sección revelan varios aspectos importantes de la respuesta a la adición de glucosa en concentraciones represoras de la producción de tacrolimus. En primer lugar, la ausencia de incremento de la transcripción del gen de la glucosa permeasa *glcP2* sugiere su dependencia de un factor sigma no constitutivo o la existencia de algún sistema de transporte de glucosa alternativo en *S. tsukubaensis* (o ambas explicaciones). La adición de glucosa estimuló la transcripción de genes de la glucólisis y disminuyó la de los genes específicos de la gluconeogénesis y la de algunos genes del ciclo TCA, lo que refleja una estimulación del consumo de glucosa y unas condiciones nutricionales de abundancia de carbono. Por otro lado, aumentó la transcripción de genes implicados en la biosíntesis de ribonucleótidos de pirimidina y de genes relacionados con la glicosilación de nucleótidos, lo que podría significar un aumento de la síntesis de pirimidinas y su posterior glicosilación. Los

nucleótidos glicosilados podrían dirigirse a la formación de peptidoglicano, que sería necesaria para sostener el crecimiento celular. La adición estimuló la transcripción de genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos de la familia del aspártico, L-serina y L-glutamato. La estimulación de la transcripción de los genes gltB y gltD (glutamato sintasa) se interpreta como una estimulación de la asimilación de amonio en respuesta a la adición. Se produjo un aumento de la transcripción de phoRP y de los genes que codifican el transportador de Pi PstSCAB, lo que se interpreta como una escasez transitoria de Pi que podría ser debida a su utilización en el transporte de la glucosa o a la necesidad de una molécula fosforilada. Coherente con el fenómeno de CCR se produjo una disminución de la transcripción de genes que codifican sistemas de transporte de fuentes de carbono alternativas, como, por ejemplo, xyIFGH (D-xilosa) o dasABC (quitobiosa). En relación al metabolismo de la D-xilosa, se detectó una regulación positiva de dos genes que codifican enzimas con actividad xilosa isomerasa y una xilulosa quinasa. La explicación más probable es la existencia de un mecanismo regulador que se anticipa a la presencia de D-xilosa en el medio en respuesta a la presencia de D-xilulosa-5-fosfato en la célula. La fructosa-6-fosfato puede actuar como precursor de la D-xilulosa-5-fosfato en una reacción catalizada por una transcetolasa. Posteriormente, la D-xilulosa-5-fosfato se canaliza hacia la ruta PP por acción de la ribulosa-5-fosfato epimerasa. La hipótesis de un desvío de la fructosa-6-fosfato hacia la ruta PP se vio apoyada por el aumento de la transcripción de tktA2 y rpe, que codifican la transcetolasa y la ribulosa-5-fosfato epimerasa, respectivamente. La presencia de D-xilulosa-5-fosfato podría sugerir una situación de disponibilidad de hemicelulosas como fuente de D-xilosa, lo que explicaría la activación transcripcional de los genes relacionados con el metabolismo de la D-xilosa. En este contexto cabe destacar que la anticipación a los cambios ambientales es un rasgo seleccionado evolutivamente y que se ha observado tanto en procariotas como en eucariotas (Mitchell y col., 2009).

El efecto represor de la glucosa sobre la diferenciación morfológica se reflejó en la regulación negativa de la transcripción de genes como *wblA* y *bldN*. Este efecto podría estar mediado por la represión de algún transportador clave en la transmisión de señales, como por ejemplo el codificado por STSU_09304-STSU_09324, que en *S. coelicolor* se induce por S-adenosilmetionina y afecta a la producción de actinorrodina. Además se detectó una regulación negativa de STSU_03714, que codifica un regulador transcripcional que contiene un dominio relacionado con la regulación de la expresión de sintasas de policétido y presenta un codón TTA. La producción de antibióticos podría haberse visto afectada no solo a través de la regulación de transportadores y de reguladores transcripcionales, sino también a través de actividades enzimáticas del metabolismo primario. Los genes de un operón que codifica una acetil-CoA sintetasa necesaria para el inicio de la producción de antibióticos en *S. coelicolor* y un gen que codifica una malato oxidorreductasa relacionada con el desvío de intermediarios del ciclo TCA al metabolismo secundario en el organismo modelo presentaron una regulación negativa.

En el análisis de la respuesta a glicerol se detectaron varios genes del operón *nuo*, que, aunque no superaron los filtros en los contrastes realizados en la condición de adición de glucosa, presentaron una disminución de la transcripción significativa en t_{70.7 h} y/o t_{72 h} tras la adición de glucosa. Como se verá en el apartado III.1.6.4 (pág. 210), la transcripción de los genes que codifican la NADH deshidrogenasa I implicada en la cadena respiratoria (operón *nuo*) disminuyó tras las adiciones de glucosa y glicerol. En *E. coli* el operón *nuo* se reprime en condiciones de anaerobiosis (Bongaerts y col., 1995), aunque también la estimulación de la glucólisis y la reducción del poder reductor en forma de NAD⁺ genera una respuesta similar a la de la anaerobiosis (Vemuri y col., 2006). En *S. tsukubaensis* se detectó una regulación positiva de la transcripción significativa en t_{72h} de STSU_11565m, ortólogo de *oxyR*, y de STSU_11585 y STSU_11590, ortólogos de *ahpC* y *ahpD*. OxyR es el regulador implicado en la respuesta a estrés oxidativo y AhpC y AhpD son reductasas de hidroperóxidos de alquilo que responden a dicho estímulo (ver apartado III.1.6.2; pág. 205). Estos resultados se interpretaron como la generación de un estrés oxidativo por concentraciones altas de glucosa, que es un fenómeno que se extiende incluso a las células eucariotas como, por ejemplo, las células β del páncreas (Fridlyand y Philipson, 2004).

III.1.6. Respuesta a la adición de glicerol

III.1.6.1. Clasificación por el perfil transcripcional de los genes regulados positivamente tras la adición de glicerol

Se detectaron 106 GF cuya transcripción se incrementó tras la adición de glicerol y superaron el criterio aplicado indicado en el apartado III.1.4 (pág. 180) de los cuales 49 presentaron un valor ^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} mayor o igual a 3. Aunque cabría esperar una gran diversidad de perfiles debido al gran número de genes detectados, los GF se clasificaron en 12 grupos, a excepción de 16 que no se adscribieron a ninguno de ellos (tabla 3.6). Muchos de los perfiles promedio (figura 3.30) presentan solo ligeras diferencias entre sí (p. ej., A_{gol}3 y A_{gol}4). Los grupos que presentaron un mayor número de genes fueron A_{gol}7, A_{gol}3 y A_{gol}1, con 24, 16 y 13 GF, respectivamente. Como se puede observar, en la mayoría de los casos el incremento de la transcripción fue transitorio y no se observaron grandes diferencias transcripcionales entre condiciones a lo largo del cultivo (Agol1, Agol3, Agol4, Agol8, Agol9 y Agol11). Por otro lado, dichos incrementos no fueron específicos de la adición de glicerol en la mayoría de los casos, sino que también se produjeron con menor intensidad tras la adición de glucosa (p. ej., Agol1, Agol5, Agol8). En el caso del grupo Agol10 el incremento de la transcripción se produjo de manera más sostenida pero los niveles de transcripción se igualaron a los de la condición control en la fase estacionaria. El grupo Agol2 presentó un perfil difícil de interpretar, en el que se alternan etapas de incremento y disminución de la transcripción. El único grupo que presentó un incremento de la transcripción específico de la adición de glicerol y de carácter sostenido fue A_{gol}6.

Grupo			Compo	onentes		
	STSU_27581,	STSU_27586,	STSU_27556,	STSU_06028,	STSU_06043,	STSU_06038,
$A_{gol}1$	STSU_06033,	STSU_06023,	STSU_06008,	STSU_06018,	STSU_06013,	STSU_20067,
-	STSU_10219					
A _{gol} 2	STSU_05768, S	STSU_12420				
	STSU_21998,	STSU_05093,	STSU_10821,	STSU_27286,	STSU_17598,	STSU_21217,
A _{gol} 3	STSU_12315,	STSU_10836,	STSU_27691,	STSU_10826,	STSU_05133,	STSU_17593,
	STSU_24233, S	STSU_00060, STS	SU_04191, STSU	_12005		

Tabla 3.6. Clasificación de los 106 GF cuya transcripción aumentó tras la adición de glicerol en función de su perfil transcripcional.

Grupo	Component	25	
A _{gol} 4	STSU_12010, STSU_21526, STSU_11625, STS	J_23751, STSU_28	450, STSU_15037,
	STSU_15739, STSU_19325		
A _{gol} 5	STSU_08984, STSU_08979, STSU_25107		
A _{gol} 6	STSU_28757, STSU_28747, STSU_28752, STSU_287	12	
A _{gol} 7	STSU_29232, STSU_29227, STSU_29237, STS	J_08058, STSU_22	610, STSU_03574,
	STSU_03569, STSU_03564, STSU_03579, STS	J_03559, STSU_03	554, STSU_11585,
	STSU_11590, STSU_28967 ,STSU_28982, STS	J_28962, STSU_28	977, STSU_28972,
	STSU_28987, STSU_28992, STSU_14108, STSU_261	29, STSU_22605, STSU	J_17142
A _{gol} 8	STSU_13240, STSU_16497, STSU_13245, STSU_275	51	
A _{gol} 9	STSU_01680, STSU_11525, STSU_14253, STSU_214	51, STSU_30695	
A _{gol} 10	STSU_03919, STSU_09739, STSU_21456, STSU_072	33	
A _{gol} 11	STSU_32615, STSU_09744, STSU_04291		
A _{gol} 12	STSU_12520, STSU_28056		
SC	STSU_28762, STSU_24482, STSU_11155, STS	J_21222, STSU_22	884, STSU_09734,
	STSU_29711, STSU_21329, STSU_08063, STS	J_11130, STSU_01	835, STSU_01830,
	STSU_10980, STSU_26204, STSU_21324, STSU_304	0, STSU_24253, STSU	J_02325



Figura 3.30. Perfiles promedio de los GF que presentaron una regulación positiva de la transcripción tras la adición de glicerol. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). En la parte superior izquierda de cada gráfico se indica el número del grupo. El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

III.1.6.2. Visión general de los genes regulados positivamente tras la adición de glicerol

Muchos de los GF regulados positivamente tras la adición de glicerol codifican proteínas hipotéticas. La agrupación de los GF por función permitió observar que la adición de glicerol afectó principalmente al metabolismo de los ácidos grasos, del glicerol, del sulfato y a genes relacionados con el estrés oxidativo y con funciones de transporte.

• Metabolismo del acil-CoA y de los ácidos grasos

Entre los genes relacionados con el metabolismo del acil-CoA destacaron STSU 08979 ($^{Gol}M_c^{70.7 \text{ h}-70 \text{ h}} = 3.34$) y STSU 08984 ($^{Gol}M_c^{70.7 \text{ h}-70 \text{ h}} = 3.58$), ortólogos de accE (SCO5536) y accB (SCO5535), respectivamente. Ambos genes presentaron un perfil idéntico por lo que solo se representa el de accB en la figura 3.31. Forman un operón en S. coelicolor y codifican una acil-CoA carboxilasa cuyo papel fisiológico es la producción de malonil-CoA. El malonil-CoA producido por esta enzima participa directamente en la producción de metabolitos secundarios en el organismo modelo, ya que los mutantes en accB no producen actinorrodina ni undecilprodigiosina (Rodríguez y col., 2001). Entre los genes relacionados con la biosíntesis de ácidos grasos regulados positivamente tras la adición de glicerol se encontraron STSU_25097, STSU_15102 y STSU_25107, ortólogos de fabF, acpP y fabH de S. coelicolor, respectivamente. Estos genes presentaron un perfil idéntico puesto que forman parte del operón de biosíntesis de ácidos grasos fabD-fabH-acpP-fabF. Solo fabH y fabF presentaron variaciones significativas con valores ^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} de 2.59 y 1.89, respectivamente. En la figura 3.31 se presenta el perfil de fabH como representante de los perfiles de este operón. Tanto en S. coelicolor como en S. glaucescens se ha demostrado que la β-oxoacil-CoA sintasa III FabH es la responsable del inicio de la síntesis de ácidos grasos (Revill y col., 2001; Han y col., 1998). Las micromatrices utilizadas en este experimento no contienen sondas asignadas a la secuencia de STSU_25112, ortólogo de fabD, por lo que no existe información sobre el perfil transcripcional de dicho gen. Cabe destacar que los perfiles de accE, accB, fabH, acpP y fabF fueron prácticamente idénticos, lo que indicaría una regulación común de estos genes. Aunque la adición de glicerol y, en menor medida, la de glucosa produjeron una regulación positiva de la transcripción, los valores Mg en la fase estacionaria fueron superiores en la condición control.



Figura 3.31. Perfil transcripcional de *accB* y *fabH*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

• Transporte y metabolismo del glicerol

La adición de glicerol incrementó la transcripción de genes implicados en su transporte y metabolismo. STSU_28757 (ortólogo de glpF; ^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} = 4.08), codifica una proteína facilitadora del transporte de glicerol; STSU_28752 (ortólogo de glpK; ^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} = 3.69) codifica una quinasa de glicerol; STSU_28747 (ortólogo de SCO1661; ^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} = 3.91) codifica una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y STSU_28742 codifica un regulador transcripcional de la familia GntR (^{Gol}Mc^{70.7 h-70 h} = 2.30). Este último regulador se encuentra también en los operones de utilización de glicerol de S. clavuligerus, S. avermitilis, S. scabies y S. venezuelae, pero no en el de S. coelicolor. Los cuatro genes se adscribieron al grupo A_{gol}6, por lo que su perfil puede observarse en el apartado III.1.6.1 (pág. 203). El operón de utilización de glicerol de S. coelicolor se induce por glicerol y se reprime por glucosa (Smith y Chater, 1988), lo que es coherente con lo observado en *S. tsukubaensis*. En posición posterior al gen de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa se encuentra parJ, cuyo producto interviene en la segregación cromosómica durante la esporulación (Ditkowski y col., 2010). Tanto en S. coelicolor como en S. tsukubaensis el gen que codifica el regulador de operón (STSU_28762, ortólogo de gylR) se encuentra situado en posición anterior a dicho operón. El perfil transcripcional de gylR es semejante al perfil del grupo Agol6, pero no se incorporó en él por su diferente respuesta a la adición de glucosa (figura 3.32). GylR media la inducción por gliceraldehído-3-fosfato y la represión transcripcional del operón de glicerol en S. coelicolor (Hindle y Smith, 1994). Su transcripción se induce por glicerol en S. coelicolor, lo que coincide con lo observado en *S. tsukubaensis* ($^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} = 3.40$). Una posible explicación para la estimulación de la transcripción del represor de un operón en presencia del sustrato que se metaboliza sería la expuesta por Weickert y Adhya (1993), que consideran que esto permite una represión rápida del operón cuando la concentración del inductor (en este caso gliceraldehído-3-fosfato) empieza a decaer. La adición de glucosa

supuso un aumento de la transcripción de gyIR significativa en t_{72 h}, lo que sería coherente con la represión del operón en presencia de glucosa.



Figura 3.32. Perfil transcripcional de *gylR*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

• Efecto sobre genes del regulón pho

Como se indicó en el apartado III.1.5.2 (pág. 183), se produjo un aumento de la transcripción de *phoU*, *phoRP* y *pstSCAB* tras cualquiera de las adiciones que se describirá en el apartado III.1.7 (pág. 213). En el caso de *phoU*, *phoR* y *phoP* los valores ^{Gol} $M_c^{70.7 h-70 h}$ fueron de 0.90, 1.37 y 1, respectivamente. La transcripción de los genes del operón *pst* presentó valores ^{Gol} $M_c^{70.7 h-70 h}$ comprendidos entre 2.94 y 4.07.

Asimilación y metabolismo del sulfato

La adición de glicerol produjo un incremento de la transcripción de genes relacionados con el transporte de compuestos azufrados (transportador ABC codificado por STSU_03564-STSU_03574 y sulfatasa codificada por STSU_03559; valores ^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} de entre 3.83 y 5.24; figura 3.33) y con la asimilación de sulfato (reductasa de nitrito/sulfito codificada por STSU_05998, ortólogo de syrA; Fischer y col., 2012). Adyacente al transportador mencionado se detectó un gen que codifica un regulador de tipo CRP (STSU 03579, ortólogo de SCO7543) cuya deleción en S. coelicolor afecta negativamente a la producción de antibióticos (Swiatek y col., 2013). La adición de glicerol reguló positivamente la transcripción de varios genes cercanos a syrA cuyos productos intervienen en la reducción de sulfato a sulfito (STSU_06008-STSU_06023, ortólogos de cysHCDN de S. coelicolor; valores ^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} de entre 2.17 y 2.32; figura 3.33). Estas variaciones pueden interpretarse como una respuesta al incremento de la necesidad de azufre. El aumento de la transcripción de dos genes que codifican dioxigenasas de cisteína (STSU_08058 y STSU_22610; ^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} de 4.89 y 3.88, respectivamente) apoya esta hipótesis (figura 3.33). Las dioxigenasas de cisteína participan en el primer paso del catabolismo de la cisteína y catalizan la sulfoxidación de la cisteína a sulfinato de cisteína (Dominy y col., 2006).



Figura 3.33. Perfiles transcripcionales de STSU_03564, *syrA, cysH* (representativo al de los genes *cysC, cysD* y *cysN*), STSU_05058 y STSU_22610. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glucerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

• Respuesta al estrés por disulfuro y al estrés oxidativo

Entre los genes regulados positivamente tras la adición de glicerol se detectaron algunos relacionados con la respuesta al estrés por disulfuro (S-S). Se produjo un aumento de la transcripción de STSU_10826 ($^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} = 3.03$), ortólogo *sigR* (que codifica un factor sigma) y de STSU_10821 ($^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} = 3.46$), ortólogo de *rsrA* (que codifica el factor antisigma de SigR), cuyos productos regulan el estado de reducción de los grupos tiol en *Streptomyces* (figura 3.34). Mientras que en condiciones normales SigR se encuentra secuestrado por RsrA, en condiciones de estrés por S-S se forman puentes disulfuro en el interior de RsrA que hacen disminuir su afinidad por SigR.

Cuando SigR se encuentra liberado, es capaz de activar la transcripción de su propio operón *sigR-rsrA*, *trxB* (que codifica una tiorredoxina reductasa) y *trxA* y *trxC* (que codifican tiorredoxinas) (Paget y col., 2001). Coherente con el aumento de la transcripción de *sigR* y *rsrA*, se observó un aumento de la transcripción de los ortólogos de *trxB* (STSU_17598; $^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} = 3.06$), *trxA* (STSU_17593; $^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} = 2.50$) y *trxC* (STSU_02325;

 ${}^{Gol}M_{c}$ ^{70.7 h-70 h} = 3.46) que sugiere que la adición de glicerol produjo una situación de estrés por S-S. Los perfiles de *trxC* y *trxA* (equivalente al de *trxB*) se presentan en la figura 3.34.

Los actinomicetos presentan respuestas independientes al estrés por S-S y al estrés oxidativo (Paget y col., 2001). La transcripción de los genes STSU_11585 y STSU_11590, que codifican reductasas de hidroperóxidos de alquilo y son ortólogos de *ahpC* y *ahpD*, se incrementó tras la adición de glicerol (valores ^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} de 2.81 y 2.75, respectivamente; figura 3.34). Ambos genes se transcriben conjuntamente y están regulados por OxyR en *S. coelicolor*, cuya transcripción se autoactiva en presencia de H₂O₂ (Hahn y col., 2002). Como se puede observar en la figura 3.34, la transcripción de *oxyR* (STSU_11565m) se reguló positivamente y de forma significativa tras la adición de glicerol en t_{70.7 h} (^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} = 1.73) y de glucosa en t_{72 h} (^{Gic}M_c^{72 h-70 h} = 1.80), lo que sugiere que los cultivos experimentaron estrés oxidativo.



Figura 3.34. Perfiles transcripcionales de genes implicados en la respuesta al estrés por S-S y al estrés oxidativo. El perfil de *trxA* es representativo del de *trxB* y el de *ahpC* es representativo del perfil de *ahpD*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

III.1.6.3. Clasificación por el perfil transcripcional de los genes regulados negativamente tras la adición de glicerol

Tras aplicar el criterio expuesto en el apartado III.1.4 (pág. 180) se detectaron 14 GF cuya transcripción disminuyó tras la adición de glicerol, todos con valores $^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h}$ de entre -2 y -3. Los 14 GF se clasificaron en 4 grupos (tabla 3.7), a excepción de 3 de ellos, que no se adscribieron a ningún grupo. Los perfiles de cada grupo se presentan en la figura 3.35. De los cuatro grupos obtenidos, $R_{gol}1$ y $R_{gol}3$ presentaron niveles de transcripción semejantes entre la condición de adición de glicerol y la condición control y $R_{gol}2$ presentó una disminución de la transcripción tras la adición de glicerol común a la adición de glicerol y un aumento de la transcripción propio de genes relacionados con el metabolismo secundario en la condición control. Este grupo lo forman STSU_26019 y STSU_09064, que codifican proteínas hipotéticas y no presentan ningún dominio conservado.

Tabla 3.7. Clasificación de los GF cuya transcripción disminuyó tras la adición de glicerol en función de su perfil transcripcional.

Grupo	Componentes
R _{gol1}	stsu_c_contig01195_2_531, stsu_c_contig00790_39_628, STSU_13973
R _{gol2}	STSU_23706, STSU_06268, STSU_23711, STSU_17117
R _{gol3}	STSU_20202, STSU_12850
R _{gol4}	STSU_26019, STSU_09064
SC	STSU_21137, STSU_23515, STSU_03599



Figura 3.35. Perfiles promedio de los GF regulados negativamente tras la adición de glicerol. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g). En la parte superior izquierda de cada gráfico se indica el número del grupo. El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

III.1.6.4. Visión general de los genes regulados negativamente tras la adición de glicerol

Efecto sobre el sistema NADH deshidrogenasa I

Entre los genes regulados negativamente tras la adición de glicerol se detectó STSU_13973 ($^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} = -2.16$), ortólogo de *nuoG*, que pertenece al operón *nuo*. Posteriormente, se añadieron a la tabla 14 GI pertenecientes al mismo operón (STSU_13933-STSU_14003). El perfil transcripcional de estos genes fue el representado por el grupo R_{gol}1

(ver apartado anterior) y, como se puede observar, también presentaron una disminución de la transcripción tras la adición de glucosa que no superó el filtro impuesto en el contraste correspondiente. Los genes de este operón codifican una NADH deshidrogenasa I que permite regenerar el NAD⁺ reducido durante la glucólisis y el ciclo TCA. La regulación negativa de este sistema se traduce en una disminución de la capacidad reductora de la célula que podría ser la causa de la activación de la respuesta al estrés oxidativo y al estrés por S-S observada tras la adición de glicerol.

• Efecto sobre el metabolismo de ácidos grasos

Se detectaron tres genes cuyos productos se relacionan con la degradación de ácidos grasos: STSU_17117 (ortólogo de acdH2; ${}^{Gol}M_c{}^{70.7 h-70 h} = -2.81$), STSU_06268 (${}^{Gol}M_c{}^{70.7 h-70 h} = -2.06$) y STSU_06273 (variación no significativa). Estos dos últimos genes presentaron un perfil transcripcional idéntico, por lo que en la figura 3.36 solo se representa el de STSU_06268. La regulación negativa de genes implicados en la degradación de ácidos grasos es coherente con la regulación positiva de otros implicados en su biosíntesis.



Figura 3.36. Perfil transcripcional de *acdH2* y STSU_06268 (idéntico al de STSU_06273). El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glucosa).

• Efecto sobre reguladores relacionados con la diferenciación

Solo se detectó un gen codificante de un regulador transcripcional cuya transcripción se reguló negativamente tras la adición de glicerol. STSU_03599 (ortólogo de *eshA;* $^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} = -2.26$) codifica un regulador de la familia Crp/Fnr y, como se puede observar en la figura 3.37, también presentó una regulación negativa tras la adición de glucosa que no superó los filtros impuestos. En *S. coelicolor, eshA* (SCO7699) regula la producción de actinorrodina y modula los niveles de ppGpp (Saito y col., 2006). En *S. griseus* controla la producción de estreptomicina y la formación de micelio aéreo (Kawamoto y col., 2001; Saito y col., 2003). Su transcripción en el organismo modelo se produce en la fase de crecimiento

tardía y es dependiente de BldA (Kawamoto y col., 2001; Kwak y col., 2001). Este patrón de transcripción se produjo también en los cultivos control de *S. tsukubaensis*.



Figura 3.37. Perfil transcripcional de *eshA*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

III.1.6.5. Sinopsis sobre el efecto de la adición de glicerol

Aunque la adición de glicerol reguló positivamente un mayor número de genes que la adición de glucosa, muchos de ellos codifican proteínas hipotéticas y otros muchos están relacionados con facetas concretas del metabolismo. La adición de glicerol estimuló su propio transporte y metabolismo y también estimuló la transcripción de los genes que codifican el sistema de dos componentes PhoRP y el transportador de Pi PstSCAB. Al igual que en el caso de la adición de glucosa, esta respuesta se entendió como un aumento transitorio de la necesidad de Pi. Al contrario que en el caso de la adición de glucosa, no se detectaron genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos afectados por la adición y en cuanto al metabolismo de los nucleótidos solo se detectó una regulación negativa de STSU 12850 y STSU 12845 (ortólogos de purN y purH, respectivamente) que están implicados en la síntesis de purinas. La adición estimuló la transcripción de genes relacionados con la síntesis de malonil-CoA y ácidos grasos y reprimió la de otros relacionados con su degradación. Se produjo una regulación positiva de genes relacionados con el transporte de compuestos azufrados y con la reducción del sulfato, lo que se interpretó como un aumento de la necesidad de azufre reducido en la célula. Además, algunos genes cuyos productos participan en el catabolismo de la cisteína se regularon positivamente tras la adición, lo que refuerza esta hipótesis. La adición de glicerol pudo generar una situación de estrés en los cultivos, ya que se observó un aumento de la transcripción de varios genes cuyos productos participan en la respuesta al estrés por S-S y al estrés oxidativo. La causa de estrés podría estar relacionada con la regulación negativa de la transcripción de genes del operón nuo, cuyos productos participan en la cadena respiratoria y regeneran el poder reductor, que también se reprimieron tras la adición de glucosa.

III.1.7. Estudio de la respuesta a la escasez de fosfato: activación de genes del regulón *pho* en *Streptomyces tsukubaensis*

Como se indicó en el apartado I.3.1 (pág. 42) la caracterización del regulón *pho* en *Streptomyces* ha sido uno de los objetos de estudio principales de nuestro grupo de trabajo desde que Sola-Landa y col. (2003) demostraron su participación en el control de la producción de antibióticos. Los estudios realizados en *S. tsukubaensis* consisten en la búsqueda de cajas PHO en el genoma y la validación de algunas de ellas mediante ensayos de retraso en gel (Martínez Castro, 2011). En estos estudios se comprobó la regulación por PhoP de genes del regulón *pho* como *pitH2*, *pstS*, *ppK*, *phoU* y *phoRP*; genes del metabolismo del nitrógeno como *glnA* y *amtB* y del regulador del metabolismo secundario *afsS*.

Para ampliar el estudio de la respuesta al agotamiento del Pi en *S. tsukubaensis* se realizó una búsqueda de ortólogos de genes del regulón *pho* de *S. coelicolor* (revisados en Martín y col., 2012b). De los 67 genes indicados en dicha revisión, 31 presentaron un ortólogo recíproco en *S. tsukubaensis* y de éstos, 13 presentaron un perfil semejante al de *phoP* (ver archivo I.2 del Material Suplementario). Este grupo de genes se denominará en adelante GO_{*pho*}. Entre los 18 genes restantes, que tienen un ortólogo en *S. coelicolor* que pertenece al regulón *pho* pero cuyo perfil en *S. tsukubaensis* difiere del de *phoP*, se encontraron STSU_25639 (ortólogo de *phoA*) y STSU_26859 (ortólogo de *phoD*) que codifican, respectivamente, una fosfatasa alcalina y una fosfolipasa que intervienen en la respuesta primaria al agotamiento del Pi en *S. coelicolor* (Sola-Landa y col., 2003; Apel y col., 2007). Aunque en el caso de *phoA* se detectó un aumento de la transcripción tras el agotamiento del Pi en la condición control, ni *phoA* ni *phoD* parecen estar regulados por PhoP en *S. tsukubaensis* ya que no se detectan bandas de retraso en gel con sus promotores y PhoP (Martínez Castro, 2011). Sus perfiles se presentan en la figura 3.38.



Figura 3.38. Perfiles transcripcionales de *phoA* y *phoD*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

El análisis se completó con la realización de tres contrastes estadísticos con limma, uno por cada condición experimental. Se utilizó el perfil transcripcional de *pstS* (STSU_18950) para determinar el momento en que se produjo la activación del regulón *pho* (ver figura 3.39), ya que es uno de los genes que presenta una mayor respuesta tras el agotamiento del Pi (Rodríguez-García y col., 2007). En la condición control, la activación transcripcional se produjo entre $t_{80 h}$ y $t_{89 h}$ en ambos cultivos, mientras que en los casos de adición de glucosa y glicerol uno de los cultivos se adelantó. Ambos tiempos fueron los elegidos para la realización de los contrastes y, mientras que en el caso de la condición control se emplearon los datos de $t_{80 h}$ de los dos cultivos, en el caso de las adiciones de glucosa y glicerol se emplearon los valores de $t_{80 h}$ del cultivo en el que el Pi aún no se había agotado.



Figura 3.39. Perfil transcripcional de *pstS* en los seis cultivos. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). Los perfiles rojos representa los cultivos de la condición de adición de glucosa, los azules los cultivos de la condición de adición de glicerol y los negros los cultivos de la condición control (maltosa). Como se puede observar, el agotamiento del Pi se adelantó en uno de los cultivos de las series de adición de glicerol y glucosa.

El contraste realizado en la condición control se tomó como base del análisis y se filtraron aquellos genes significativamente activados con un valor $^{Mal}M_c^{89\,h-80\,h} \ge 2$ y un valor $p_{FDR} \le 0.05$. De este modo, se obtuvo un conjunto inicial de 74 genes. Tras visualizar los perfiles de los 74 genes, se excluyeron aquellos que no presentaron el perfil característico de *phoP*, ya que muchos de los genes significativos sólo en la condición control podrían estar más relacionados con el inicio del metabolismo secundario que con la respuesta a la escasez de Pi. De este modo, se seleccionó un conjunto final de 24 genes (denominados en adelante G_{CF}) que incluyó 9 genes cuya transcripción se incrementó de forma significativa en las tres condiciones, 7 genes cuya transcripción se incrementó de forma significativa en la condición control y en la adición de glucosa y 8 cuya transcripción aumentó significativamente solo en la condición control (ver archivo I.2 del Material Suplementario). Dentro del grupo G_{CF} se detectaron los 13 genes GO_{pho} y 11 nuevos genes candidatos a pertenecer al regulón *pho* en *S. tsukubaensis*. De estos últimos, 7 presentaron un ortólogo en el organismo modelo y 4 no. A continuación se describen las principales observaciones de este estudio.

• Nuevos candidatos del regulón *pho*: identificación de un sistema de dos componentes con perfil transcripcional semejante al de *phoP*

Entre los genes candidatos a pertenecer al regulón *pho* de *S. tsukubaensis* se incluyen una secuencia no mapeada, cuatro que codifican proteínas hipotéticas (STSU_01510, STSU_25247, STSU_25242 y STSU_18960), uno que codifica una proteína de unión a ATP/GTP (STSU_25237), uno que codifica una proteína de unión a ARN (STSU_16017), dos genes que codifican un sistema de dos componentes (STSU_26464-STSU_26469) y uno que codifica una proteína hidrofílica (STSU_26474). Posiblemente STSU_25242 y STSU_25247 codifican una misma proteína, ya que comparten ortólogo en *S. coelicolor* y aparecen anotadas como secuencias parciales.

En el caso de los perfiles de STSU_25237-STSU_25247 se produjo un incremento de la transcripción en las condiciones de adición de glucosa y control, pero no tras la adición de glicerol, que presentó un incremento más paulatino (figura 3.40).



Figura 3.40. Perfiles transcripcionales de STSU_25237, STSU_25242 y STSU_25247. Como se indica en el texto los dos últimos podrían codificar una misma proteína. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

Las secuencias de los genes STSU_26464, STSU_26469 y STSU_26474 se solapan, de manera que su transcripción se acopla, lo que es coherente con la similitud de sus perfiles transcripcionales (figura 3.41). STSU_26464 (regulador de respuesta) presenta dominios conservados relacionados con reguladores de la resistencia a metales pesados (TIGR01387; *score* = 1.7e⁻⁵⁶). La región en que se encuentra dicho sistema de dos componentes conserva la sintenia entre *S. coelicolor* y *S. tsukubaensis*: en posición anterior al sistema de dos componentes (codificado por SCO2142-SCO2143 en el organismo modelo) se encuentra un gen que codifica una proteína hidrofílica pequeña y en posición posterior se presentan genes que codifican un transportador integral de membrana y una glicerato quinasa (estos dos últimos con diferente perfil transcripcional). Por la similitud con el perfil de *phoP* podría representar un segundo sistema de respuesta a la escasez de Pi en *S. tsukubaensis*. En otros microorganismos existe más de un sistema de captación de la señal de escasez de Pi (p. ej.,

Myxococcus xanthus; Moraleda-Muñoz y col., 2003), por lo que profundizar en el papel de este sistema mediante la obtención de cepas mutantes en los genes que codifican las quinasas sensoras *phoP* y STSU_26469 sería de gran interés.



3.41. Perfiles transcripcionales de STSU_26464, STSU_26469 y STSU_26474. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glucosa).

Regulación positiva transitoria tras las adiciones

Un fenómeno interesante observado en la mayoría de perfiles (y especialmente en los del operón *pst*) fue la regulación transcripcional positiva transitoria tras las adiciones (figura 3.42). Este fenómeno se puede interpretar como una escasez puntual de Pi debido a su utilización en el transporte y metabolización de las fuentes de carbono adicionadas.



Figura 3.42. Perfiles promedio de los genes del operón *pstSCAB* y *phoRP*, donde se puede apreciar un incremento de la transcripción transitorio tras cualquiera de las adiciones. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glucosa).
• Perfiles de glpQ1 y pitH2

En *S. coelicolor, glpQ1* presenta una regulación cruzada carbono-fosfato ya que la adición de glucosa o glicerol al 2 % p/v no afecta a la actividad del promotor de *glpQ1* mientras que la adición de maltosa la reduce (Santos-Beneit y col., 2009b). En *S. tsukubaensis, glpQ1* se encuentra codificado en el *contig* stsu_c_contig01092_393_1390. Su transcripción se reguló positivamente tras la adición de glucosa ($^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = 0.35$) y negativamente tras las adiciones de glicerol y control ($^{Gol}M_c^{70.7 h-70 h} = -0.88$ y $^{Mal}M_c^{70.7 h70 h} = -0.30$), aunque el valor p_{FDR} fue mayor de 0.05 en los tres contrastes. Su mayor activación transcripcional tras el agotamiento del Pi se alcanzó en la condición control (figura 3.43). Cabe destacar que en *S. tsukubaensis* no parece existir un ortólogo de *glpQ2* ya que, aunque se detectan los genes adyacentes, no se identifica la secuencia de *glpQ2* (Martínez Castro, 2011).

El perfil transcripcional de pitH2 (STSU 27886) hasta t_{89 h} fue similar en las tres condiciones ensayadas y presentó la activación transitoria referida anteriormente. A partir de t_{89 h} se produjo una regulación negativa de su transcripción en la condición control pero no en las condiciones de adición de glucosa y glicerol (figura 3.43). En S. coelicolor se produce transcripción de *pitH2* en condiciones de disponibilidad de Pi y, tras el agotamiento, PhoP-P actúa primero como activador transcripcional y posteriormente como represor (Santos-Beneit y col., 2008). La activación de la transcripción de pitH2 es totalmente dependiente de PhoP, ya que en el mutante de S. coelicolor INB201 ($\Delta phoP$) el promotor no es activo. La complejidad de la región promotora de pitH2 hace que tras el agotamiento del Pi la unión de PhoP-P active la transcripción, pero que, a medida que continúa la oligomerización de PhoP-P sobre el operador, se produzca una represión (Santos-Beneit y col., 2008). En el promotor de *pitH2* de *S. tsukubaensis* se han detectado 5 cajas PHO y se ha comprobado la unión de PhoP mediante ensayos de retraso en gel en un trabajo anterior (Martínez Castro, 2011). El perfil transcripcional de pitH2 en S. tsukubaensis en la condición control es coherente con lo descrito en S. coelicolor por Santos-Beneit y col. (2008). La ausencia de disminución de la transcripción de pitH2 en la fase estacionaria en las condiciones de adición de glucosa y glicerol podría indicar que la cantidad de PhoP-P no llegó al umbral represor o incluso que se desfosforiló, lo que permitiría recuperar los valores M_a de transcripción iniciales.



Figura 3.43. Perfiles transcripcionales de *glpQ1* y *pitH2*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

III.1.8. Estudio de la agrupación biosintética de tacrolimus

Como se indicó en el apartado I.5.3 (pág. 78), la baja producción de tacrolimus de las cepas utilizadas a nivel industrial ha supuesto que los esfuerzos de los investigadores se centren en la mejora de la producción mediante la optimización de los medios de cultivo, los estudios metabólicos y la ingeniería genética. El análisis comparativo de los perfiles transcripcionales de los genes de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus en condiciones productoras y no productoras permite detectar dianas de manipulación.

III.1.8.1. Clasificación de los genes de la agrupación biosintética por perfil y búsqueda de genes con perfiles similares

Los genes de la agrupación biosintética de tacrolimus se clasificaron en tres grupos en función de su perfil transcripcional, a excepción de *fkbR* y *fkbG* que presentaron un perfil propio (ver figura 3.44):

- Grupo I: incluye *allS, allO, allP, allN* y *allM*.
- Grupo II: incluye *fkbQ* y *fkbN*.
- Grupo III: incluye el resto de genes de la agrupación a excepción de los adscritos a los grupos I y II, *fkbR* y *fkbG*. En él se agrupa la mayor parte de genes estructurales.



Figura 3.44. Clasificación de los genes de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus en función de su perfil transcripcional. Panel A: perfil transcripcional promedio y perfiles transcripcionales individuales en las condiciones de adición de glucosa, glicerol y maltosa de los genes integrantes de cada grupo. En la representación del perfil promedio la línea roja representa la condición de adición de glucosa, la línea azul la condición de adición de glicerol y la línea negra la condición de adición de maltosa. GI: *allSOPNM* (STSU_32050-32070); GII: *fkbQ* (STSU_31965) y *fkbN* (STSU_31970m); GIII: *fkbM* (STSU_31975), *fkbD* (STSU_31980), *fkbA* (STSU_31990m), *fkbP* (STSU_31995), *fkbO* (STSU_32000), *fkbB* (STSU_32005m), *fkbC* (STSU_32015), *fkbL* (STSU_32020), *fkbK* (STSU_32025), *fkbJ* (STSU_32030), *fkbI* (STSU_32035), *fkbH* (STSU_32040), *allD* (STSU_31960) y *fkbG* (STSU_32045). En los paneles A y B el eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción. Panel C: producción volumétrica de tacrolimus en los cultivos de la serie temporal. Se representan los cultivos individuales con tonos de rojo para la adición de glucosa, tonos azules para la adición de glicerol y negro y gris para la adición control.

Se ha sugerido que otros reguladores ajenos a la agrupación de tacrolimus pueden intervenir en su transcripción, puesto que la inactivación de los reguladores positivos fkbN y *fkbR* no bloquea totalmente la transcripción de genes como *fkbG* o *fkbB* (Goranovič y col., 2012). Los perfiles de fkbN y fkbQ constituyen el grupo II y, aunque cabría esperar un cierto retraso en la activación transcripcional de *fkbQ* con respecto a la de *fkbN*, ambos genes presentaron perfiles prácticamente idénticos, lo que puede indicar que ambos tienen un regulador común. FkbQ es una tioesterasa de tipo II, las cuales tienen una gran importancia en la acumulación de ciertos metabolitos secundarios (p. ej., tilosina en S. fradiae). Las tioesterasas de tipo II podrían purgar las sintasas de policétidos de productos aberrantes que, de permanecer unidos a ellas, bloquearían su actividad (Butler A. R. y col., 1999). En el caso de que *fkbQ* estuviera activado transcripcionalmente por FkbN y presentase una función purgadora, se explicaría por qué la disrupción de este último bloquea la producción de tacrolimus en S. tsukubaensis: en ausencia de FkbN no se produciría transcripción de fkbQ, de manera que la sintasa de policétido se bloquearía con productos aberrantes impidiendo la síntesis de tacrolimus. La regulación de *fkbQ* por parte de FkbN se discute en el apartado III.4 (pág. 292), en el que se exponen los resultados de la comparación del transcriptoma de la cepa $\Delta fkbN$ y de la cepa silvestre.

En consonancia con los resultados obtenidos por Goranovič y col. (2012) se observó que la transcripción de *fkbR* se produce de forma constante durante el cultivo, mientras que la de *fkbN* se inicia coincidiendo con la producción de tacrolimus.

Puesto que genes con perfiles semejantes pueden presentar una regulación común, se eligió un gen de cada grupo para identificar mediante coeficientes de correlación de Pearson (r) otros genes con perfiles similares a los de la agrupación. Se eligieron *allN* para el grupo I, *fkbN* para el grupo II y *fkbC* para el grupo III, mientras que *fkbR* y *fkbG* se analizaron de forma individual. Se filtraron aquellos genes con un valor $r \ge 0.80$ (ver archivo I.2 del Material Suplementario) y entre ellos se detectaron 19 genes cuyo producto anotado tiene una función relacionada con la biosíntesis de tacrolimus y 38 genes con función reguladora (reguladores transcripcionales, factores sigma y proteínas de unión a ADN). Dichos genes se presentan en archivo I.2 del Material Suplementario.

• Genes con función biosintética

Entre los genes con función biosintética se detectaron dos genes ortólogos de un ORF del *locus whiE*, relacionado con la síntesis del pigmento gris asociado a las esporas (STSU_05883 y STSU_05903), y STSU_03589, que codifica una metiltransferasa cuyo ortólogo en *S. coelicolor* está implicado en la síntesis de metilisoborneol (Wang y Cane, 2008). Se detectó STSU_07618, que codifica una tioesterasa y es ortólogo de *scoT* de *S. coelicolor* (figura 3.45). La expresión heteróloga de *scoT* en *S. fradiae* demostró que complementa la actividad de la tioesterasa TylO de la agrupación de tilosina (Kotowska y col., 2002). En la región de *scoT* se detectó un segundo gen con un perfil semejante al de la agrupación: STSU_07628 (figura 3.45). Codifica una 4'-fosfopanteteinil transferasa cuya función es activar los dominios transportadores de las sintasas de policétidos y de péptidos no ribosomales. La interrupción del ortólogo de STSU_07628 en *S. coelicolor* (SCO6673) bloquea la producción de CDA sin afectar a la de actinorrodina (Lu y col., 2008). Otro gen con

un perfil similar al de la agrupación fue *pfkA1*, que codifica una 6-fosfofructoquinasa (figura 3.45). La fructosa-1,6-bifosfato producida por esta enzima se puede metabolizar a 1,3-bifosfoglicerato, que actúa como precursor en la síntesis de tacrolimus, por lo que podría tratarse de un parálogo que canaliza específicamente la fructosa-1,6-bifosfato hacia la ruta biosintética. Un análisis del efecto de la deleción de esta *pfkA* y de sus parálogos *pfkA2* y *pfkA3* se presenta en el apartado III.3 (pág. 251).



Figura 3.45. Perfiles transcripcionales de *scoT*, STSU_07628 y *pfkA1*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

• Genes con función reguladora

Entre los genes cuyo producto anotado presenta una función reguladora y que presentan un perfil transcripcional diferente entre condiciones se encontraron algunos relacionados con la diferenciación morfológica en *Streptomyces*, como, por ejemplo, STSU_18523 (ortólogo de *bldC*) o STSU_00835 (ortólogo de *ramR*). Sus perfiles se representan en la figura 3.46. Como se indicó en el apartado I.1.3.4 (pág. 23), BldC forma parte de la cascada de señalización que conduce a la diferenciación morfológica en *Streptomyces*. RamR es un regulador de respuesta que controla la transcripción del operón *ram*, el cual marca la transición entre el crecimiento vegetativo y el aéreo en *S. lividans* (Keijser y col., 2002). La ausencia de transcripción de estos genes observada en las condiciones de adición de glucosa y glicerol indica un bloqueo de la diferenciación morfológica en estos cultivos.



Figura 3.46. Perfiles transcripcionales de *bldC* y *ramR*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log_2 de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

Se detectaron varios ortólogos de genes que codifican factores sigma estudiados en Streptomyces, cuyos perfiles se pueden observar en la figura 3.47. Entre ellos se encontraron siqU (STSU 22934), cuyo producto no se requiere para el desarrollo morfológico pero cuya actividad descontrolada bloquea la diferenciación morfológica en S. coelicolor (Gehring y col., 2001); sigH (STSU 10726) y su factor antisigma prs (STSU 10721), ambos relacionados con la respuesta al estrés osmótico y al choque térmico (Kormanec y col., 2000). SigH es esencial para el desarrollo morfológico en S. coelicolor (Sevciková y col., 2001) y presenta un papel esencial en el inicio de la diferenciación morfológica y de la producción de antibióticos en medios con glucosa en S. griseus (Takano H. y col., 2003). Otros genes que codifican factores sigma fueron los ortólogos de hrdA y hrdB (STSU 24896 y STSU 07858, respectivamente). La transcripción de hrdA se correlaciona con la formación de micelio aéreo en S. aureofaciens (Kormanec y Farkasovský, 1993) aunque su disrupción en S. coelicolor no tiene consecuencias fenotípicas (Buttner y Lewis, 1992). En S. tsukubaensis su transcripción se asoció a la fase estacionaria de crecimiento (figura 3.47). Strakova y col. (2014) proponen que entre las dianas de HrdA se encuentran genes del metabolismo secundario. hrdB, que codifica el factor sigma principal, es esencial en S. coelicolor (Buttner y col., 1990). En S. griseus, hrdB se transcribe durante la fase de crecimiento activo en medios ricos en Pi y no tanto durante la esporulación (Marcos y col., 1995), mientras que en S. aureofaciens se transcribe en todas las fases de desarrollo (Kormanec y Farkasovský, 1993). En S. tsukubaensis se detectó un incremento de la transcripción en la condición control a partir de t_{80 h} que lo correlacionaría positivamente con la producción de tacrolimus (figura 3.47). Además, en la especie cercana S. avermitilis, HrdB está implicado en la transcripción del regulador específico de ruta aveR y el incremento de su actividad transcripcional resulta en un aumento de la producción de avermectina (Zhuo y col., 2010). Otro de los genes identificados en este análisis fue el ortólogo de atrA (STSU 18801), que, como se indicó en el apartado I.2.3.3 (pág. 37), codifica un activador de los reguladores específicos de ruta actII-orf4 de S. coelicolor y strR de S. griseus.



Figura 3.47. Perfiles transcripcionales de *sigU*, *sigH* (representativo de *prs*), *hrdA*, *hrdB* y *atrA*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

III.1.8.2. Análisis de ortólogos de reguladores de S. coelicolor

Para completar el estudio de reguladores transcripcionales que podrían estar implicados en la producción de tacrolimus se identificaron los ortólogos de los reguladores de *S. coelicolor* tratados en la revisión de van Wezel y McDowall (2011). Entre los candidatos cuyo perfil transcripcional se asemejó al de la agrupación biosintética de tacrolimus (resaltados en negrita en la tabla 3.8) destacaron los activadores *atrA* (tratado en el apartado anterior) y *afsR*, cuya sobreexpresión podría ser una estrategia para aumentar la síntesis de tacrolimus en *S. tsukubaensis*.

Tabla 3.8. Genes que regulan la producción de antibióticos en *S. coelicolor* con ortólogo recíproco en *S. tsukubaensis*. En negrita se resaltan aquellos cuyo perfil transcripcional se asemejó al de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus y se indica el tipo de correlación con el perfil de *fkbN*. En esta tabla se prescinde de las citas bibliográficas, que se indican el apartado I.2.3.3 (pág. 37).

Gen	SCO	STSU	Correlación
bldH (adpA)	SCO2792	STSU_23624	+
scbA(afsA)	SCO6266	STSU_00255	
arfA	SCO3841	STSU_17382	
actll-orf4	SCO5085	STSU_00225	

Gen	SCO	STSU	Correlación
dasR	SCO5231	STSU_10786	
atrA	SCO4118	STSU_18801	+
rok7b7	SCO6008	STSU_06313	
absA2	SCO3226	STSU_09809	
cpkO(kasO)	SCO6280	STSU_02170	
scbR	SCO6265	STSU_00240	
ndgR	SCO5552	STSU_08914	
relA	SCO1513	STSU_29481	
rshA	SCO5794	STSU_07978	+
rplK	SCO4648	STSU_13590	
rроВ	SCO4654	STSU_13565	
afsR	SCO4426	STSU_20727	+
afsK	SCO4423	STSU_20667	
phoP	SCO4230	STSU_19410	
dmdR1/adm	SCO4394	STSU_20342	
sigQ	SCO4908	STSU_12475	+
afsQ1	SCO4907	STSU_12480	
rpoZ	SCO1478	STSU_29651	
cutR	SCO5862	STSU_06603	
bldB	SCO5723	STSU_08304	
bldC	SCO4091	STSU_18523	+
bldD	SCO1489	STSU_29596	
bldG	SCO3549	STSU_15482	
bldM	SCO4768	STSU_13050	+
bldN	SCO3323	STSU_14448	+
absB	SCO5572	STSU_08794	
absC	SCO5405	STSU_09999	
absR2	SCO6993	STSU_27656	
cdgA	SCO2817	STSU_23547	+
eshA	SCO7699	STSU_03599	+
nsdA	SCO5582	STSU_08734	+
nsdB	SCO7252	STSU_00765	+
rapA1	SCO5403	STSU_10009	
rrdA	SCO1104	STSU_31530	
ssgA	SCO3926	STSU_17763	+
wblA	SCO3579	STSU_15654	+
	SCO1712	STSU_28535	

III.1.9. Validación de los resultados transcriptómicos mediante RT-qPCR

Para validar los resultados obtenidos con las micromatrices se analizó la transcripción de *pfkA1* (STSU_26589), *pfkA2* (STSU_09924), *pfkA3* (STSU_30615), *glpX* (STSU_11500), *phoP* (STSU_19410), *fkbN* (STSU_31970m), *hrdA* (STSU_24896), *crp* (STSU_15619), *amtB* (STSU_08729) y *gltD* (STSU_27069) mediante RT-qPCR. Como ensayos normalizadores se eligieron los de los genes *metF* y *gyrB*, ya que presentaron unos niveles de transcripción constantes a lo largo de los cultivos (resultados no mostrados). Todas las muestras de ARN utilizadas para sintetizar el ADNc procedieron de los cultivos 1 (ver figura 3.3) y se purificaron siguiendo el protocolo del apartado II.8.4.4 (pág. 158) antes de realizar la síntesis de ADNc (ver apartado II.8.4.5; pág. 159). Las reacciones de RT-qPCR se realizaron

por triplicado (salvo en el caso de los ensayos normalizadores, que se realizaron por duplicado) y se siguieron los métodos y parámetros indicados en el apartado II.8.4.6 (pág. 160). Como cebadores se emplearon las parejas CMOq40-CMOq41 (*pfkA2*), CMOq42-CMOq43 (*phoP*), CMOq44-CMOq45 (*glpX*), CMOq89-CMOq90 (*pfkA1*), CMOq91-CMOq92 (*pfkA3*), CMOq93-CMOq94 (*crp*), CMOq95-CMOq96 (*fkbN*), CMOq97-CMOq98 (*hrdA*), CMOq99-CMOq100 (*amtB*), CMOq101-CMOq102 (*gltD*), CMOq103-CMOq104 (*metF*) y CMOq105-CMOq106 (*gyrB*), cuyas secuencias se indican en el apartado II.4.2.3 (pág. 102). Se añadieron controles sin molde para descartar contaminaciones en los componentes de la mezcla de reacción. Para reducir al máximo la variabilidad técnica todas las reacciones que implicaban una misma pareja de cebadores se realizaron en la misma placa multipocillo. Los resultados de expresión diferencial se presentan en la tabla 3.9.

Puesto que el programa del equipo MxPro-Mx3005P no permite combinar datos procedentes de distintas placas de reacción, el análisis de los resultados se llevó a cabo con el programa REST2009 de Qiagen (Pfaffl, 2001; Pfaffl y col., 2002; Vandesompele y col., 2002). Este último presenta dos características importantes frente al de MxPro: permite utilizar dos ensayos como normalizadores y valora la significación estadística de los resultados mediante algoritmos de aleatoriedad.

Tabla 3.9. Comparación de los resultados de diferencia de expresión obtenidos mediante RT-qPCR y micromatrices. Se indican con un asterisco aquellas diferencias que el programa REST2009 consideró significativas y el intervalo de confianza (95 %) determinado por el programa.

Gen	Comparación	Ratio de expresión diferencial con micromatrices	Ratio de expresión diferencial con RT-qPCR	IC 95%
phoP	^{Mal} t _{100 h} - ^{Mal} t _{80 h}	7.31	8.41*	7.61-9.76
glpX	^{Mal} t _{100h} - ^{Mal} t _{80 h}	0.20	0.12*	0.10-0.14
pfkA1	^{Mal} t _{100 h} - ^{Mal} t _{80 h}	9.58	29.82*	28.24-31.44
pfkA2	^{Mal} t _{100 h} - ^{Mal} t _{80 h}	1.06	0.88*	0.82-0.95
crp	^{Mal} t _{100 h} - ^{Mal} t _{80 h}	1.07	82.68*	69.5-97.73
hrdA	^{Mal} t _{100 h} - ^{Mal} t _{80 h}	13.36	39*	30.65-45.35
fkbN	^{Mal} t _{100 h} - ^{Mal} t _{80 h}	57.68	139.18*	134.14-146.08
pfkA1	${\overset{Mal}{\overset{fl}}{\overset{fl}{\overset{fl}{\overset{fl}}{\overset{fl}{\overset{fl}}{\overset{fl}{\overset{fl}}{\overset{fl}{\overset{fl}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}}{\overset{fl}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}$	14.12	83.8*	72.8-95.66
pfkA2	${\overset{Mal}{\overset{fl}{\overset{Glc}{\overset{Glc}{\overset{fl}{\overset{Glc}{\overset{fl}}{\overset{fl}{\overset{fl}{\overset{fl}}{\overset{fl}{\overset{fl}}{\overset{fl}{\overset{fl}}{\overset{fl}{\overset{fl}{\overset{fl}}{\overset{fl}{\overset{fl}}{\overset{fl}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}}{\overset{fl}}{\overset{fl}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}}$	1.17	1.73*	1.41-2.12
pfkA3	$^{Mal}t_{100\ h}^{Glc}t_{100\ h}^{Hal}$	0.34	0.31	0.24-0.38
pfkA2	^{Glc} t _{72 h} - ^{Glc} t _{70 h}	2.50	1.76*	1.41-2.23
pfkA3	^{Glc} t _{72 h} - ^{Glc} t _{70 h}	8.46	9.49*	9.03-9.94
gltD	^{Glc} t _{72 h} - ^{Glc} t _{70 h}	42.81	35.46*	28.44-44.99
pfkA2	${}^{\rm Glc}t_{100 h} - {}^{\rm Glc}t_{89 h}$	0.84	0.93	0.73-1.72
amtB	^{Glc} t _{89 h} - ^{Glc} t _{70 h}	53.82	122.64	104.44-143.67
amtB	^{Glc} t _{89 h} - ^{Mal} t _{89 h}	61.82	99.67*	91.16-109.99

En general, los resultados de expresión diferencial obtenidos mediante RT-qPCR se ajustaron a los obtenidos con el uso de las micromatrices (figura 3.48). Algunos ensayos como *pfkA1, hrdA* y *fkbN* presentaron diferencias debido a la mayor sensibilidad de la RT-qPCR. La mayor discrepancia se produjo con el ensayo de *crp*. En estos últimos casos se

descartó que las sondas empleadas en las micromatrices correspondientes a dichos genes presentasen perfiles muy diferentes entre sí (figura 3.49).



Figura 3.48. Relación entre los ratios de expresión obtenidos mediante micromatrices y RT-qPCR. En rojo oscuro se representan el resultado de la comparación ${}^{Glc}t_{89 h}$ - ${}^{Mal}t_{89 h}$; en verde el resultado de la comparación ${}^{Glc}t_{100 h}$ - ${}^{Glc}t_{70 h}$; en morado el resultado de la comparación ${}^{Glc}t_{100 h}$ - ${}^{Glc}t_{89 h}$; en azul los resultados de las comparaciones ${}^{Glc}t_{72 h}$ - ${}^{Glc}t_{70 h}$; en fucsia los resultados de las comparaciones ${}^{Mal}t_{100 h}$ - ${}^{Mal}t_{80 h}$.

En el caso de *crp*, las sondas utilizadas en las micromatrices abarcan las regiones 127 pb-186 pb y 389 pb-441 pb dentro del gen de 675 pb. Aunque la primera de las sondas se encuentra incluida dentro de la región amplificada mediante RT-qPCR (82 pb-218 pb), su perfil transcripcional fue plano a lo largo del cultivo (ver figura 3.48). Las sondas de *crp* se enfrentaron con el genoma de *S. tsukubaensis* para determinar si podría existir hibridación cruzada con otras regiones del genoma, y se consideró que habría existido hibridación cruzada cuando la complementariedad general de la diana inespecífica fuese mayor o igual al 75 % (Kane y col., 2000) o cuando presentase 15 o más nucleótidos contiguos complementarios (Hughes y col., 2001), pero no se detectó ninguna secuencia que pudiera dar lugar a este fenómeno.



Figura 3.49. Perfiles transcripcionales de las sondas de cada gen en la serie control. A) *pfkA1* B) *fkbN* y C) *crp*. No se muestra el perfil de *hrdA* porque solo se le asignó una sonda.

III.2. Estudio transcriptómico de la adición de N-acetilglucosamina en *Streptomyces tsukubaensis*

En el estudio de la regulación por carbono en *S. tsukubaensis* resulta interesante analizar la respuesta a la adición de N-acetilglucosamina en condiciones de riqueza nutricional. Este aminoazúcar presenta un papel inductor de la diferenciación morfológica en condiciones de escasez nutricional en el que interviene el regulador DasR. Por el contrario, en condiciones de riqueza nutricional genera el efecto contrario: bloquea el desarrollo y la producción de antibióticos. La represión producida por la N-acetilglucosamina podría estar mediada por el sistema PTS de transporte de N-acetilglucosamina, que transferiría grupos Pi a la N-acetilglucosamina y no a reguladores clave del desarrollo (Rigali y col., 2006; 2008).

Como se indicó en el apartado I.4.2.2 (pág. 62), en la región promotora de *pfkA1* de *S. coelicolor* existe una caja *dre* con una puntuación *score* de 8.39 (Rigali y col., 2008). Los estudios de RT-PCR tras la adición de N-acetilglucosamina como inductor a mitad de la fase exponencial de crecimiento descartaron una posible regulación por DasR (Siebring, 2010), aunque dichos estudios se realizaron en un medio de cultivo en el que no se detecta transcripción de *pfkA1*. Por otro lado, la diferente regulación de los tres parálogos *pfkA* tras las adiciones de glucosa y glicerol en *S. tsukubaensis* planteó la posibilidad de una regulación diferencial por N-acetilglucosamina.

Para profundizar en la CCR ejercida por la N-acetilglucosamina y en la regulación de la transcripción de los genes *pfkA* en *S. tsukubaensis* se planteó el experimento transcriptómico que se detalla a continuación.

III.2.1. Diseño experimental

Partiendo de la experiencia adquirida en el experimento transcriptómico anterior se realizaron cultivos de *S. tsukubaensis* NRRL 18488 en 100 ml de medio MGm-2.5 por duplicado, a los que se adicionó N-acetilglucosamina o agua Milli-Q como condición control a mitad de la fase exponencial de crecimiento $(t_{70 \text{ h}})$. Puesto que el efecto represor de este compuesto depende de su concentración y es especialmente notable por encima de 20 mM (Rigali y col., 2006), se eligió una concentración final de estudio del 0.5 % (p/v) (22.6 mM). En la práctica se adicionaron 3 ml de una solución madre de N-acetilglucosamina al 16.7 % (p/v) en un volumen de cultivo de 97 ml. Se recogieron muestras para peso seco a las 70 h (antes de la adición), 78.5 h, 89.5 h, 92 h, 100 h, 124 h, 148 h, 162.5 h y 235 h; muestras para la valoración de tacrolimus a las 148 h, 162.5 h y 235 h y muestras para la extracción de ARN inmediatamente antes de la adición, a las 70.5 h, 71 h y 72 h.

III.2.2. Caracterización del crecimiento y de las concentraciones de fosfato y de tacrolimus en los cultivos de la serie temporal de N-acetilglucosamina

La adición de N-acetilglucosamina no favoreció el crecimiento de los cultivos de forma significativa respecto de la condición control (figura 3.50), al contrario de lo que

ocurre en *S. coelicolor,* que es una cepa adaptada a la utilización de quitina (Swiatek y col., 2012b). Aunque la N-acetilglucosamina redujo significativamente ($p \le 0.05$ en una prueba t de Student) la producción de tacrolimus (figura 3.50), no la bloqueó totalmente, probablemente debido a la disminución progresiva de su disponibilidad a lo largo del cultivo. La producción de tacrolimus en la condición de adición de N-acetilglucosamina fue de un 46 %, 38 % y 33 % con respecto a la condición control en t_{148 h}, t_{162.5 h} y t_{235 h}, respectivamente.



Figura 3.50. Crecimiento (A) y producción volumétrica de tacrolimus (B) tras la adición de N-acetilglucosamina (GlcNAc) con respecto a la condición control (agua Milli-Q).

III.2.3. Procesamiento de las muestras, normalización y estadística

Al igual que en el experimento transcriptómico del apartado III.1 (pág. 165), el ARN total de micelio se extrajo siguiendo las indicaciones del apartado II.8.1 (pág. 139). El ARN obtenido, que presentó valores de RIN comprendidos entre 8.2 y 9.6, se utilizó como molde para obtener ADNc marcado con Cy[™]-3-dCTP (apartados II.8.3.3 y II.8.3.4; págs. 148 y 149).

Como señal de referencia en las hibridaciones se utilizó el mismo ADNg de S. tsukubaensis marcado con Cy[™]-5 empleado en el experimento transcriptómico anterior (apartado III.1.2.3; pág. 171).

Se utilizaron matrices de diseño nº 2 (034745, apartado II.8.3; pág. 145). En total se hibridaron 16 muestras, correspondientes a los tiempos $t_{70\,h}$, $t_{70.5\,h}$, $t_{71\,h}$ y $t_{72\,h}$ de los dos cultivos control y de los dos cultivos a los que se añadió N-acetilglucosamina. La cantidad de marcaje añadido en las hibridaciones y las condiciones de hibridación, lavados y lectura de la fluorescencia se especifican en los apartados II.8.3.6, II.8.3.7 y II.8.3.8 (págs. 151, 153 y 154).

Para analizar la respuesta a la adición de N-acetilglucosamina se realizaron, por medio de limma, contrastes estadísticos de tipo interacción, según la fórmula (^{GlcNAc}tx-^{GlcNAc}t70 h)-(^{Control}tx-^{Control}t70 h); donde x representa los tiempos 70.5 h, 71 h o 72 h. Los valores obtenidos en dichos contrastes se presentan en adelante con el identificador G^{lcNAc-C}M_c^{tx-70 h}. Además se realizó un contraste de tipo ^{GlcNAc}t70.5 h-^{GlcNAc}t70 h, que permitió analizar la respuesta a la adición y cuyos resultados se presentan con el identificador G^{lcNAc}Mc^{70.5 h-70 h}. Los valores p_{FDR} , que representan los valores p corregidos por el método de Benjamini-Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995), se utilizaron para filtrar los resultados por su significación estadística.

III.2.3.1. Estudio de los genes implicados en el transporte y metabolismo de la N-acetilglucosamina tras la adición

La anotación realizada con KOALA descrita en el apartado III.1.3 (pág. 173) identificó un transportador ABC de N-acetilglucosamina (codificado por STSU_06318-STSU_06328), ortólogo del transportador dual de N-acetilglucosamina/quitobiosa NgcEFG de *S. olivaceoviridis* (Xiao y col., 2002). Los tres genes que lo codifican presentaron una regulación negativa significativa ($p_{FDR} \le 0.05$) de su transcripción tras la adición de N-acetilglucosamina, con valores ^{GICNAC}M_c^{70.5 h-70 h} de -2, -2.13 y -2.42 (figura 3.51). Las adiciones de glucosa, glicerol o maltosa no produjeron variaciones significativas en la transcripción de estos genes (resultados no mostrados); sin embargo su transcripción aumentó a partir de t_{80 h} en la condición control (figura 3.52). La regulación negativa de este transportador podría indicar que en estas condiciones de cultivo la N-acetilglucosamina se incorpora a través de otro sistema de transporte alternativo.

La permeasa específica de N-acetilglucosamina del sistema PTS está formada por los componentes IIB (*malX2*) y IIC (*nagE2*). En *S. tsukubaensis* se detectó un ortólogo de *malX2* (STSU_23346), pero no de *nagE2*. La secuencia que presentó mayor homología con *nagE2* de *S. coelicolor* fue STSU_23341 (66 % de identidad nucleotídica y 70 % de similitud aminoacídica según el algoritmo de Needleman-Wunsch). En *S. coelicolor*, el componente IIC es el responsable de la internalización de la N-acetilglucosamina y su transcripción se induce tras la adición de su sustrato en medio mínimo con glicerol; por el contrario, en *S. olivaceoviridis* no solo participa NagE2 sino también el transportador NgcEFG (Nothaft y col., 2003b; Rigali y col., 2006). La adición de N-acetilglucosamina reguló negativamente y de forma significativa la transcripción de *malX2* en *S. tsukubaensis* (^{GlcNAc}M_c^{70.5 h-70 h} = -0.37; figura 3.51). De la misma manera la adición de STSU_23341 no se vio afectada de forma

significativa por la adición de N-acetilglucosamina (figura 3.51), ni tampoco por glucosa, glicerol o maltosa.

la S. coelicolor, N-acetilglucosamina internaliza en de En se forma N-acetilglucosamina-6-fosfato gracias a la actuación de la quinasa NagK (SCO4285, STSU 19832). La N-acetilglucosamina-6-fosfato es sustrato de la desacetilasa NagA (SCO4284, STSU 19827), que genera glucosamina-6-fosfato. Finalmente, la glucosamina-6-fosfato se transforma en fructosa-6-fosfato por acción la de desaminasa/isomerasa NagB (SCO5236, STSU 31895). En el organismo modelo nagA, nagK y nagB se inducen 2, 3 y 5 veces, respectivamente, media hora después de la adición de N-acetilglucosamina 25 mM en medio mineral con manitol y estos genes son dianas de DasR (Swiatek y col., 2012b). Desafortunadamente, no se lograron asignar las sondas de las micromatrices correspondientes a los genes nagA y nagK, pero si a nagB, que es el que presenta la mayor respuesta a la adición de N-acetilglucosamina en el organismo modelo (figura 3.51). La adición de N-acetilglucosamina no afectó a la transcripción de *naqB* en S. tsukubaensis, como tampoco lo hicieron las adiciones de glucosa, glicerol o maltosa en el experimento anterior. Este fenómeno podría indicar que en medios ricos la adición de N-acetilglucosamina no supone la liberación de DasR de las secuencias dre y/o que la célula carece de algún factor transcripcional necesario para la transcripción de estos genes.



Figura 3.51. Perfiles transcripcionales en la condición de adición de N-acetilglucosamina (panel A) y control (panel B). Gris: STSU_06318-STSU_06328; rojo: *malX2*; verde: *nagB*; azul: STSU_23341. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g).



Figura 3.52. Perfiles transcripcionales de los ortólogos del transportador NgcEFG. A) STSU_06318 (permeasa), B) STSU_06323 (permeasa) y C) STSU_06328 (proteína de unión a soluto). El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g). El perfil rojo representa la condición de adición de glucosa, el perfil azul la condición de adición de glicerol y el perfil negro la condición control (maltosa).

III.2.3.2. Estudio de la respuesta a la adición de N-acetilglucosamina

Para analizar la respuesta a la adición de N-acetilglucosamina se realizaron tres contrastes estadísticos de tipo interacción con limma (ver apartado III.2.3; pág. 228). Se identificó un total de 2883 genes que variaron significativamente en alguno de los tres contrastes con un valor $p_{FDR} \leq 0.05$ (GES). Posteriormente, se seleccionaron aquellos genes que variaron significativamente en los tres contrastes y en los dos últimos contrastes (1386 GES; 717 regulados positivamente y 669 regulados negativamente). Estos genes se presentan en el archivo II.2 del Material Suplementario. Los primeros representan una respuesta temprana a la adición de N-acetilglucosamina (286 GES regulados positivamente y 332 GES regulados negativamente). Por el contrario, aquellos que solo presentaron una variación significativa en los dos últimos tiempos representan una respuesta retardada (431 GES regulados positivamente y 337 GES regulados negativamente).

Los productos génicos se clasificaron según su función metabólica gracias a la adscripción de letras COG (KEGG Database). Esta clasificación adscribe en algunos casos más de una letra a un mismo producto génico, debido a su participación en diferentes procesos celulares. Por este motivo se decidió realizar una adscripción manual de funciones metabólicas que es, en cierto modo, subjetiva. En referencia a esta última se resumen los cambios producidos tras la adición de N-acetilglucosamina como sigue:

- Replicación, reparación y recombinación del ADN: 12 GES regulados positivamente y 1 GES regulado negativamente.
- Traducción (Ribosomas, ARNt y ARNt-aa): 40 GES regulados positivamente y 1 GES regulado negativamente.
- Reguladores de la transcripción: 77 GES regulados positivamente y 65 GES regulados negativamente.

- Metabolismo de aminoácidos: 49 GES regulados positivamente y 8 GES regulados negativamente.
- Metabolismo del carbono: 28 GES regulados positivamente y 38 GES regulados negativamente.
- Regulón *pho*: 7 GES regulados positivamente.
- Metabolismo de purinas, pirimidinas y nucleótidos azucarados: 22 GES regulados positivamente y 3 GES regulados negativamente.
- Quinasas sensoras: 15 GES regulados positivamente y 7 GES regulados negativamente.
- Función de transporte: 37 GES regulados positivamente y 48 GES regulados negativamente.
- Fosforilación oxidativa: 8 GES regulados positivamente y 8 GES regulados negativamente.
- Diferenciación morfológica: 2 GES regulados positivamente y 22 GES regulados negativamente.
- Hipotéticas: 175 GES regulados positivamente y 219 GES regulados negativamente.
- Otras categorías: 40 GES regulados positivamente y 46 GES regulados negativamente.
- Sin categoría: 205 GES regulados positivamente y 203 GES regulados negativamente.

Como se indicó en el apartado III.1.3 (pág. 173), se realizó una notación con KOALA del genoma de S. tsukubaensis que permite la adscripción de genes a rutas metabólicas. De los 1386 genes seleccionados, 436 presentaron adscrita una reacción enzimática. Para comprobar los efectos predichos sobre el metabolismo a partir de la lista de GES se introdujeron los códigos KO correspondientes a los 436 genes en el programa KEGG Mapper-Search & Color Pathway, (disponible en http://www.kegg.jp/kegg/tool/map_pathway2.html) que permite obtener mapas metabólicos en los que las reacciones de interés aparecen marcadas con los colores elegidos. Este programa facilita la interpretación de resultados ómicos, ya que permite localizar simultáneamente en una ruta aquellos pasos cuyos genes implicados se han regulado positiva o negativamente.

A continuación se describen los efectos principales de la adición de N-acetilglucosamina sobre el transcriptoma de *S. tsukubaensis*.

• Efecto sobre la replicación del ADN y la traducción

La adición de N-acetilglucosamina estimuló la replicación del ADN ya que reguló positivamente la transcripción de 4 genes que codifican subunidades de la ADN polimerasa y 8 genes relacionados con mecanismos de recombinación y reparación del ADN (valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de entre 0.48 y 1.44). El único gen detectado que codifica una proteína con función recombinasa cuya transcripción se reguló negativamente fue STSU_08073, ortólogo de *recA* (^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = -0.52). Por otro lado, se produjo una regulación positiva de 16 genes que codifican proteínas ribosómicas (valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de entre 0.30 y 1.14) y de 15 genes que codifican sintetasas de ARNt-aa (valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de entre 0.47 y 1.29), lo que indica un aumento de la traducción de genes tras la adición. Este efecto es congruente con el aumento de la biosíntesis de aminoácidos detectada (ver más adelante), que son necesarios para traducir los ARNm generados.

Efecto sobre el transporte y consumo de fuentes de carbono alternativas

La adición de N-acetilglucosamina reguló negativamente la transcripción de genes implicados en el transporte y consumo de fuentes de carbono alternativas. El transporte de glutamato se reguló negativamente tras la adición, ya que disminuyó la transcripción de los genes del transportador ABC de glutamato (STSU_08033-STSU_08048, ortólogos de gluABCD) y de STSU 05273, que codifica una proteína de unión a ATP asociada a este transportador (valores ^{GlcNAc-C}M^{70.5 h-70 h} significativos de entre -3.28 y -3.70; figura 3.53). La adición reguló negativamente la transcripción del operón que codifica el transportador de maltosa (STSU_26064-STSU_26054, ortólogos de malEFG; valores GlcNAc-CMc^{70.5 h-70 h} significativos de -2.33 y -2.38 para malF y malG, respectivamente) y de los componentes del transportador de quitobiosa codificados por STSU_10781 (ortólogo de dasA; GICNAC-CMc 70.5 h- $^{70 h}$ = -1.81) y STSU 10771 (ortólogo de *dasC*; $^{GlcNAc-C}M_{c}^{70.5 h-70 h}$ = -1.65; figura 3.53). STSU_19660, ortólogo de msiK, también se reguló negativamente tras la adición (^{GICNAC-C} $M_c^{71 h-70 h}$ = -1.54; figura 3.53). MsiK es una proteína de unión a ATP que participa en el transporte de varias fuentes de carbono como celobiosa y maltosa en Streptomyces y que es esencial para el transporte de quitobiosa en S. coelicolor (Schlösser y col., 1997; Saito y col., 2008).

También se produjo una regulación negativa de la transcripción de genes implicados en el transporte de compuestos que no forman parte del medio de cultivo como, por ejemplo, de un transportador ABC de espermidina/putrescina (STSU_03974-STSU_03989; valores ^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} de entre -1.87 y -2.60; no mostrado); STSU_32120, que codifica una proteína de unión a quitina (^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = -1.24); y de STSU_12805, STSU_11420 y STSU_11925 (ortólogo de *chiA*), los cuales codifican enzimas con actividad quitinasa (con valores ^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} de entre -1.06 y -2.15; figura 3.53). La transcripción de *chiA* se reprime por glucosa, glicerol y N-acetilglucosamina en *S. lividans* TK24 (Miyashita y col., 2000), lo que apoya el resultado obtenido. Como se indicó en el apartado III.2.3.1 (pág. 229), se produjo una disminución de la transcripción de los ortólogos del transportador NgcEFG. Se detectó un aumento de la transcripción de *gylR*, que codifica un regulador negativo de la transcripción del operón del glicerol (^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 1.28; figura 3.53).



Figura 3.53. Efecto de la adición de N-acetilglucosamina sobre la transcripción de genes implicados en el transporte y metabolismo de fuentes de carbono alternativas. Panel A: condición de adición de N-acetilglucosamina. Panel B: condición control. Gris: *gluABCD* y STSU_05273; verde: *malEFG*; rojo: *dasA* y *dasC*; negro: *msiK*; azul claro: STSU_32120; morado: STSU_12805; fucsia: STSU_11420; naranja: *chiA*; azul oscuro: *gylR*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g).

• Efecto sobre las rutas centrales del metabolismo del carbono

La adición de N-acetilglucosamina reguló positivamente la transcripción de genes implicados en la glucólisis como *glk*, *ppgK* y *pfkA3* (valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de 0.29, 0.84 y 2.10, respectivamente). Coherente con la estimulación de la glucólisis, se produjo una regulación negativa de los dos genes específicos de la gluconeogénesis (STSU_12200 y *glpX;* valores ^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} de -2.85 y -1.54, respectivamente). El efecto de la adición de N-acetilglucosamina sobre la transcripción de *pfkA3, glpX* y STSU_12200 fue la misma que se observó tras la adición de glucosa (ver apartado III.1.3.1; pág. 173). La adición de N-acetilglucosamina produjo una regulación negativa de dos genes implicados en la glucólisis: *pfkA1* y *gap2* (valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de -0.56 y -2.41, respectivamente). Como se indicó en el apartado III.1.5.4 (pág. 194), Gap2 podría tener un papel gluconeogénico con el que la regulación negativa tras las adiciones de glucosa y N-acetilglucosamina es coherente. Los perfiles transcripcionales de estos genes se presentan en la figura 3.54.





Respecto a la ruta PP sólo se detectó regulación positiva de cuatro genes (figura 3.55): STSU_27501 (que codifica una 6-fosfogluconolactonasa), STSU_25559 (que codifica una 2-deshidro-3-desoxifosfogluconato aldolasa, ortólogo de *kdgA* de *S. coelicolor*), STSU_27511 (que codifica la glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa y es el ortólogo de *zwf2* de *S. coelicolor*) y STSU_21776 (que codifica la ribosa-fosfato pirofosfoquinasa y es ortólogo de *prsA2* de *S. coelicolor*). Los valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de estos genes se situaron entre 0.39 y 1.85.

La adición de N-acetilglucosamina reguló negativamente la transcripción de varios genes implicados en el ciclo TCA cuyos productos participan en la conversión fumaratosuccinato (STSU_11380, que es el parálogo de STSU_02380, STSU_02380 y STSU_02385; valores ^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} de entre -0.79 y -1.52) y fumarato-malato (*fumC*; ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = -0.50). La regulación negativa de STSU_02380 y STSU_02385 fue compartida con la respuesta a la adición de glucosa. Solo se detectó un gen implicado en el TCA cuya transcripción se reguló positivamente y fue STSU_26264, que codifica una 2-cetoglutarato deshidrogenasa que forma succinil-CoA y es ortólogo de *sucB* de *S. coelicolor* (^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 0.39). Los perfiles transcripcionales de estos genes se representan en la figura 3.55.



Figura 3.55. Efecto de la adición de N-acetilglucosamina sobre la transcripción de genes implicados en la ruta PP y en el ciclo TCA. Panel A: condición de adición de N-acetilglucosamina. Panel B: condición control. Negro: *prsA2*; verde: *kdgA*; gris: STSU_27501; rojo: *zwf2*; azul oscuro: *sucB*; morado: STSU_02380; fucsia: STSU_02385; naranja: *fumC*; azul claro: STSU_11380. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g).

Se produjo una regulación positiva de un gen de la ruta de metabolización del piruvato a acetil-coA, STSU_26259, que codifica una 2-oxoácido deshidrogenasa y es ortólogo de *aceE1* de *S. coelicolor* (^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 2.12). La transcripción de STSU_05528 y STSU_05523, ortólogos de macS1 y fadD1, se redujo tras la adición (valores GlcNAc-CMc^{70.5 h-70 h} de -2.14 y -1.07, respectivamente). Como se indicó en el apartado III.1.5.4 (pág. 194), macS1 codifica una acetil-CoA sintetasa necesaria para el inicio de la producción de antibióticos en S. coelicolor. En el organismo modelo el operón macS1-fadD1 se regula positivamente por el regulador transcripcional AcsR (Arabolaza y col., 2006). La disminución de la transcripción de macS1 se correlaciona con la regulación negativa de acsR (STSU_05533) detectada tras la adición de N-acetilglucosamina en S. tsukubaensis. La producción de oxalacetato a partir de fosfoenolpiruvato también se reguló positivamente al aumentar la transcripción de STSU_21751, que codifica la fosfoenolpiruvato carboxilasa y es ortólogo de ppc de S. coelicolor (^{GlcNAc-C}M_c^{71h-70h} = 0.85). En congruencia con la regulación negativa de rutas anabólicas, se detectó una disminución de la transcripción de STSU_24836, que codifica una piruvato fosfato diquinasa encargada de regenerar fosfoenolpiruvato a partir de piruvato (^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = -2.57); STSU_10621, que codifica una malato deshidrogenasa que genera piruvato a partir de malato ($^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = -1.24$) y STSU_05383, que codifica una malato sintasa y es ortólogo de *aceB1* ($^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = -0.65$). Los perfiles transcripcionales de estos genes se representan en la figura 3.56.



Figura 3.56. Efecto de la adición de N-acetilglucosamina sobre la transcripción de genes implicados en el metabolismo del piruvato. Panel A: condición de adición de N-acetilglucosamina. Panel B: condición control. Rojo: *ppc*; azul: STSU_10621; negro: STSU_24836; fucsia: *aceE1*; verde: *acsR*; gris: *macS1* y *fadD*; morado: *aceB1*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g).

Efecto sobre el metabolismo de ácidos grasos

La adición de N-acetilglucosamina tuvo un efecto positivo sobre el metabolismo del acetil-CoA y sobre la biosíntesis de ácidos grasos. Dos genes cuyos productos están implicados en la interconversión entre acetato y acetil-CoA presentaron un incremento de su transcripción (STSU_09929 y STSU_09934, ortólogos de *pta* y *ackA* de *S. coelicolor*; valores $^{GlcNAc-C}M_c^{71h-70h}$ de 1.55 y 1.59, respectivamente). Se detectó un aumento de la transcripción de STSU_25107, STSU_28036 y STSU_28041, que son los ortólogos de *fabH*, *fabG* e *inhA* de *S. coelicolor*, respectivamente (valores $^{GlcNAc-C}M_c^{71h-70h}$ de entre 0.81 y 0.99). Como se indicó en el apartado III.1.6.2 (pág. 205), el operón *fabD-fabH-acpP-fabF* codifica una sintasa de ácidos grasos saturados y *fasR* (STSU_25117) codifica un activador transcripcional de dicho operón (Arabolaza y col., 2010). La transcripción de *fasR* se reguló positivamente tras la adición de N-acetilglucosamina en *S. tsukubaensis* ($^{GlcNAc-C}M_c^{70.5h-70h} = 0.86$). La regulación positiva de varios componentes del operón *fab* tras la adición de N-acetilglucosamina fue una respuesta común a la observada tras la adición de glicerol.

Coherente con estos resultados se detectó una regulación negativa de STSU_06268, que codifica una acetil-CoA acetiltransferasa, y STSU_23711 (*acdH2*), que codifica una acil-CoA deshidrogenasa (valores ^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} de -1.19 y -1.83, respectivamente). Ambas actividades están implicadas en la degradación de ácidos grasos. También se detectó una regulación negativa de STSU_06273, que codifica una subunidad de un complejo de oxidación de ácidos grasos (^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = -1.27). Los perfiles transcripcionales de estos genes se presentan en la figura 3.57.



Figura 3.57. Efecto de la adición de N-acetilglucosamina sobre la transcripción de genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos. Panel A: condición de adición de N-acetilglucosamina. Panel B: condición control. Gris: *pta* y *ackA*; rojo: *inhA*; verde: *fabG*; negro: *fasR*; azul: STSU_06268; fucsia: STSU_06273; morado: *acdH2*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g).

Aunque en general se detectó un efecto positivo de la adición de N-acetilglucosamina sobre la biosíntesis de ácidos grasos, se produjo una regulación negativa de tres genes con función biosintética: STSU_23686 (*accC*), STSU_30270 (*fabG3*) y STSU_30275 (*fabG2*), que presentaron valores ^{GicNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de entre -0.89 y -2.24. El primero de ellos codifica una acetil/propionil-CoA carboxilasa y los dos últimos una 3-cetoacil-ACP reductasa. Su regulación negativa tras la adición podría indicar que se trata de parálogos con una función y/o regulación diferentes (resultados no mostrados).

Efecto sobre el metabolismo de aminoácidos

La adición de N-acetilglucosamina afectó positivamente a la transcripción de un alto número de genes relacionados con el metabolismo aminoacídico. Al igual que en el caso de la glucosa, estimuló la transcripción de *gltB* y *gltD*, que codifican la L-glutamato sintasa, lo que puede significar un aumento de la síntesis de dicho aminoácido a partir de L-glutamina y 2-cetoglutarato (valores ^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} de 2.55 y 2.67, respectivamente). También estimuló la transcripción de *gdhA* (glutamato deshidrogenasa; ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 0.69), lo que podría reflejar un aumento de la asimilación de amonio y su incorporación en la molécula de 2-cetoglutarato. Los genes implicados en reacciones que consumen L-glutamato como, por ejemplo, STSU_22794 (NAD glutamato deshidrogenasa; ver apartado III.1.5.2; pág. 183), STSU_29012 (glutamina sintetasa cuyo ortólogo en *S. coelicolor* no presenta actividad; Rexer y col., 2006) y STSU_09124 (delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa) presentaron una regulación negativa de su transcripción con valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de entre -0.88 y -1.18.

Se estimuló la transcripción de dos genes cuyos productos participan en la formación de L-glutamato-5-semialdehído a partir de L-glutamato: STSU_24507 ($^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 0.76$) y STSU_24517 ($^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 1.15$), ortólogos de *proB* y *proA* de *S. coelicolor*, respectivamente. El L-glutamato-5-semialdehído es un precursor de la ornitina. La

transcripción de STSU_06498, que codifica una ornitina carbamoiltransferasa (ortólogo de *arcB* de *S. coelicolor*), aumentó tras la adición de N-acetilglucosamina ($^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 2.51$), lo que sugiere la producción de L-citrulina (precursora de la arginina) a partir de L-glutamato.

El L-aspartato pudo servir como precursor en la biosíntesis de otros aminoácidos, ya que tras la adición de N-acetilglucosamina aumentó la transcripción de *ask* y de STSU_10254, ortólogo de *thrA*, (valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de 0.42). Los productos de ambos genes intervienen en la formación de homoserina, previa generación de L-aspartato-4-semialdehído, a partir de L-aspartato. En pasos posteriores la homoserina se transforma en O-fosfo-L-homoserina y posteriomente en treonina. Este último paso está catalizado por el producto de SCO4293 en *S. coelicolor* y la transcripción de su ortólogo en *S. tsukubaensis*, STSU_19937, se reguló positivamente tras la adición (^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 1.48). El desvío de L-aspartato-4-semialdehído hacia la formación de ectoína se reguló negativamente, ya que disminuyó la transcripción de los genes cuyos productos están implicados en los dos primeros pasos (STSU_27721 y STSU_27726; valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de -1.50 y -1.21, respectivamente). STSU_14697 (*nadB*) codifica una L-aspartato oxidasa que regenera oxalacetato a partir de L-aspartato y su transcripción disminuyó tras la adición de N-acetilglucosamina (^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = -1.72). Por otro lado, aumentó la transcripción de STSU_27731, que codifica una aspartato aminotransferasa (^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 0.48).

Un total de 10 genes cuyos productos están implicados en la biosíntesis de los aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano aumentaron su transcripción tras la adición de N-acetilglucosamina (valores $^{GlcNAc-C}M_c^{71h-70h}$ de entre 0.46 y 1.48). Las reacciones catalizadas por sus productos conllevan la producción del precursor del L-triptófano 3-indolilglicerofosfato a partir de fenilpiruvato y 4-hidroxifenilpiruvato y la formación de siquimato a partir de eritrosa-4-fosfato.

Siete genes relacionados con la síntesis de L-histidina a partir de 5-fosfo-alfa-D-ribosa-1-difosfato procedente de la ruta PP incrementaron su transcripción tras la adición de N-acetilglucosamina (valores $^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h}$ de entre 0.50 y 1.21). La transcripción de los genes implicados en la síntesis de L-leucina a partir de 2-oxoisovalerato (STSU_09014 y STSU_08909 y STSU_08904, ortólogos de *leuC* y *leuD*) se reguló positivamente tras la adición (valores $^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h}$ de 1.56 y 1.66, respectivamente). Los productos de *leuC* y *leuD* también participan en los primeros pasos de la ruta de biosíntesis de L-isoleucina desde R-2-metilmalato. Otro gen cuya transcripción se reguló positivamente y cuyo producto participa en la síntesis de ambos aminoácidos fue STSU_14552, que codifica una deshidratasa de dihidroxiácidos ($^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 1.57$).

Se produjo un incremento de la transcripción de varios genes implicados en la síntesis de L-cisteína como STSU_31680 (que codifica una cisteína sintasa) y STSU_17743 y STSU_23266, ortólogos de *cysA* y *cysM* de *S. coelicolor*, respectivamente. Los valores $^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h}$ de estos genes se encontraron entre 0.65 y 0.85. El aumento de la transcripción de STSU_06518 ($^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 0.50$), que codifica una metiltransferasa de homocisteína, indica que la N-acetilglucosamina estimuló la formación de L-metionina a partir de L-homocisteína.

La glicina pudo servir como precursor en la formación de treonina ya que la adición de N-acetilglucosamina aumentó la transcripción de STSU_31570, que codifica una aldolasa implicada en esta reacción ($^{GlcNAc-C}M_c^{71h-70h} = 0.77$). Por otro lado, pudo estimular la producción de 5,10-metilentetrahidrofolato a partir de glicina ya que se incrementó la transcripción de los genes STSU_30135 (codifica una glicina deshidrogenasa) y STSU_09344 (codifica una aminometiltransferasa y es ortólogo de *gcvT* de *S. coelicolor*) con valores $^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h}$ de 0.72 y 0.76, respectivamente.

La transcripción de dos genes cuyos productos podrían estar implicados en la formación de L-serina a partir de 3-fosfohidroxipiruvato se incrementó tras la adición. Estos genes, STSU_20287 y STSU_28076, codifican una fosfoserina aminotransferasa y una fosfoserina fosfatasa y presentaron valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de 0.63 y 0.97, respectivamente. También se produjo un aumento de la transcripción de STSU_12280 (^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 1.09), que codifica una treonina deshidratasa. Esta última actividad genera L-serina a partir de piruvato y amonio. STSU_27009, ortólogo de *trpA* de *S. coelicolor*, aumentó su transcripción tras la adición (^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 0.98), lo que sugiere un aumento de la producción de L-triptófano a partir de serina.

En la ruta de biosíntesis de L-lisina se incrementó la transcripción de los genes STSU_16253 (codifica una aminotransferasa) y STSU_10259, ortólogo de *lysA* de *S. coelicolor* (valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71h-70 h} de 0.77 y 1.34, respectivamente).

• Efecto sobre la degradación proteica

La adición de N-acetilglucosamina reguló negativamente la transcripción de los componentes del proteasoma codificados por STSU_28827 y STSU_28832 (ortólogos de *pcrB* y *pcrA*, respectivamente); la ATPasa accesoria de la superfamilia AAA (del inglés <u>ATPases</u> <u>associated with various celular activities</u>) codificada por STSU_28812 (ortólogo de *arc*) y STSU_28817 y STSU_28852, que codifican posibles componentes del proteasoma (resultados no mostrados). Los valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de estos genes se encontraron entre -0.86 y -1.37. La función del proteasoma es la degradación controlada de proteínas, aunque en *Streptomyces* se desconocen sus dianas. En *S. coelicolor*, la inactivación de genes que codifican el proteasoma o proteínas accesorias afecta a la respuesta a estrés y aumenta la producción de una cloroperoxidasa cuyo gen ortólogo no se reguló positivamente tras la adición de N-acetilglucosamina (De Mot y col., 2007).

• Efecto sobre el metabolismo de purinas y pirimidinas

La adición de N-acetilglucosamina reguló positivamente la transcripción de 6 genes relacionados con el metabolismo de las pirimidinas y 14 del metabolismo de las purinas, con valores $^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h}$ de entre 0.38 y 2.81. Entre ellos se encuentra STSU_13315 (*adk*), que codifica la adenosina quinasa encargada de fosforilar AMP para formar ATP ($^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 1.02$). El aumento de la transcripción de STSU_22964, ortólogo de *murA* ($^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 0.85$), podría implicar una estimulación de la biosíntesis de peptidoglicano, ya que la UDP-N-acetilglucosamina-1-carboxiviniltransferasa codificada cataliza el primer paso de esta ruta. Esta respuesta es coherente con la estimulación de la replicación y de la

transcripción del ADN observada tras la adición de N-acetilglucosamina. Solo se detectaron tres genes relacionados con el metabolismo de nucleótidos y nucleósidos cuya transcripción se reguló negativamente tras la adición: STSU_18990 (5'-nucleotidasa; $^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = -2.28$), STSU_12510 (desaminasa de adenosina; $^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = -1.44$) y STSU_12370 (ortólogo de *cya*, que codifica una ciclasa de adenilato; $^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = -0.67$).

Efecto sobre la fosforilación oxidativa y el estrés oxidativo

Se detectó una regulación negativa de la transcripción de 6 genes del operón nuo (STSU_14003, STSU_13998, STSU_13993, STSU_13983 y STSU_13933, ortólogos de nuoA, nuoB, nuoC, nuoD, nuoE y nuoN, respectivamente), que codifica la NADH deshidrogenasa l encargada de regenerar el poder reductor en la cadena de transporte de electrones (figura 3.58). Dichos genes presentaron valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de entre -0.84 y -1.94. Por el contrario, se produjo una regulación positiva de la transcripción de 5 genes parálogos STSU 13793, STSU 13823, STSU 13808, STSU 14752 y STSU 13803 (ortólogos de nuoL2, nuoB2, nuol2, nuoD2 y nuoJ2, respectivamente) con valores GlcNAc-CMc^{71 h-70 h} de entre 0.53 y 0.78. También se reguló positivamente la transcripción de STSU_10174, ortólogo de atpH, que codifica la subunidad delta de la ATPasa implicada en la fosforilación oxidativa ($^{GICNAc-C}M_{c}^{71 h-70 h} = 0.48$). STSU 15472, que codifica una pirofosfatasa de membrana de translocación de protones presentó una regulación negativa ($^{GlcNAc-C}M_c^{71h-70h} = -1.91$). STSU 17813-STSU 17818, ortólogos de cydB y cydCD, que codifican una subunidad de la citocromo oxidasa y un transportador ABC, respectivamente (Brekasis y Paget, 2003), presentaron una regulación positiva tras la adición (GICNAC-CM, 71 h-70 h de 0.79 v 1.98. respectivamente).



Figura 3.58. Efecto de la adición de N-acetilglucosamina sobre la transcripción de genes implicados en la regeneración del poder reductor. Panel A: condición de adición de N-acetilglucosamina. Panel B: condición control. Gris: *nuoA, nuoB, nuoC, nuoD, nuoE y nuoN*; rojo: *nuoL2, nuoB2, nuol2, nuoD2 y nuoJ2;* morado: STSU_15472; naranja: *cydDC*; fucsia: *cydB*; azul: *atpH.* El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g).

La adición de N-acetilglucosamina estimuló la transcripción de *oxyR* (^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 1.42), que codifica un regulador de la respuesta al estrés oxidativo, y de las reductasas de hidroperóxidos de alquilo controladas por OxyR codificadas por *ahpC* (^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 0.96) y *ahpD* (^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 0.96; figura 3.59).

STSU 14433, ortólogo de rex de S. coelicolor, codifica un represor de respuesta al balance NADH/NAD⁺ (Brekasis y Paget, 2003) cuya transcripción se reguló positivamente tras la adición (GlcNAc-CM^{70.5 h-70 h} = 1.41; figura 3.59). En condiciones de aerobiosis, Rex reprime su propio promotor y el del operón cyd; mientras que, en presencia de inhibidores de la respiración o de limitación de oxígeno (que se traducen en un aumento del ratio NADH/NAD⁺), se suelta del ADN y permite la transcripción. Además del operón cydABCD, otros genes regulados por Rex en la especie modelo son los del operón hemACD (implicado en la biosíntesis del grupo hemo). En S. tsukubaensis se detectó un incremento de la transcripción de STSU_14428 (*hemA*; $^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 1.71$) que podría ser consecuencia de la liberación de Rex de su promotor (figura 3.59). Rex regula también la transcripción del operón nuo gracias a la existencia de un sitio de unión localizado en posición anterior al operón; sin embargo, la regulación de la transcripción de este operón parece depender de, al menos, otro mecanismo (Brekasis y Paget, 2003). Como se indicó anteriormente, el efecto de la adición de N-acetilglucosamina sobre la transcripción del operón nuo fue negativo, al contrario de lo que ocurre con rex y hemA, lo que apoya la existencia de mecanismos reguladores adicionales.

Se detectó un aumento de la transcripción de STSU_19767, ortólogo de *senS* de *S. coelicolor* ($^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 0.74$; figura 3.59). Éste último codifica la quinasa sensora de un sistema de dos componentes que podría responder a la respuesta en los balances redox (revisado en Ortiz de Orué Lucana y Groves, 2009).



Figura 3.59. Efecto de la adición de N-acetilglucosamina sobre la transcripción de genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo. Panel A: condición de adición de N-acetilglucosamina. Panel B: condición control. Rojo: oxyR; gris: ahpC y ahpD; azul: rex; verde: hemA; morado: senS. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g).

• Efecto sobre el metabolismo del fosfato

Al igual que tras las adiciones de glucosa y glicerol, se observó un aumento de la transcripción de *phoU*, *phoRP* (valores $^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h}$ de 1.10, 1.32 y 0.64, respectivamente) y del operón *pstSCAB*, que codifica un transportador de Pi regulado positivamente por PhoP (valores $^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h}$ de entre 2.96 y 3.27; figura 3.60).



Figura 3.60. Efecto de la adición de N-acetilglucosamina sobre la transcripción de genes implicados en la respuesta al agotamiento del fosfato. Panel A: condición de adición de N-acetilglucosamina. Panel B: condición control. Rojo: *phoP*; verde: *phoR*; azul: *phoU*; gris: *pstS, pstC, pstA* y *pstB*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el \log_2 de los valores de transcripción (valores M_g).

• Efecto sobre genes que codifican transportadores

La adición de N-acetilglucosamina reguló positivamente la transcripción de genes implicados en el transporte de iones metálicos. Se detectó un incremento de la transcripción de STSU_19160, ortólogo de *nur* de *S. coelicolor*, que codifica un regulador de respuesta de un transportador de níquel (^{GICNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 0.63). En presencia de níquel, Nur reprime la transcripción del operón de transporte de dicho elemento *nikABCDE* (Ahn y col., 2006). La adición de N-acetilglucosamina reguló positivamente la transcripción de STSU_32760 y STSU_32765, ortólogos de *nikC* y *nikD*, respectivamente, con valores ^{GICNAc-C}M_c^{71.h-70 h} en torno a 0.60. Algunos de los genes regulados negativamente tras la adición se relacionan con el transporte de cobalto (STSU_32120; ^{GICNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = -1.24) o con el transporte de aminoácidos (STSU_23510-STSU_23520; valores ^{GICNAc-C}M_c^{71.h-70 h} de entre -1.02 y -1.50).

También se produjo una regulación positiva de la transcripción de STSU_06698, ortólogo de *trkA* que codifica un transportador de potasio en *S. coelicolor* ($^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 1$). La captación de hierro se podría haber regulado positivamente tras la adición ya que aumentó la transcripción de STSU_23251, que codifica la proteína de unión a ATP de un transportador ABC de hierro y es ortólogo de *ftrE* de *S. coelicolor* ($^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 0.57$).

• Efecto sobre genes relacionados con la diferenciación morfológica y genes relacionados con el metabolismo secundario

La adición de N-acetilglucosamina reguló positivamente la transcripción de STSU_24482 (*obg*; ^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 0.80). Obg es una proteína de unión a GTP que se localiza en la membrana en *S. coelicolor*. La transcripción de *obg* disminuye coincidiendo con el desarrollo del micelio aéreo y se trata de un gen esencial para la viabilidad en el organismo modelo (Okamoto y Ochi, 1998). La regulación positiva de su transcripción podría suponer un retraso de la diferenciación morfológica en *S. tsukubaensis* en respuesta a la adición de N-acetilglucosamina. Dos genes relacionados con la síntesis de trehalosa (STSU_19947 y STSU_09859, ortólogos de *otsA* y *treSI*, respectivamente), material de reserva de las esporas, presentaron una regulación negativa en consonancia con el retraso de la diferenciación (valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71h-70 h} de -0.79 y -1.59, respectivamente).

La represión de la diferenciación morfológica puede producirse a través de la inhibición de la captación de señales de diferenciación. En este sentido se detectó una regulación negativa de la transcripción de los ortólogos del operón *bldK* STSU_11350-STSU_11330 (*bldKA*, *bldKB*, *bldKC*, *bldKD* y *bldKE*, respectivamente) con valores $^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h}$ de entre -1.69 y -2.18 (figura 3.61). Como se indicó en la introducción, el transportador de oligopéptidos BldK parece estar implicado en la captación y transmisión de la señal que desencadena la diferenciación. También se produjo una regulación negativa de la transcripción de STSU_17868, que codifica la proteína de unión a ATP de un transportador ABC cuyo ortólogo se induce por S-adenosilmetionina en *S. coelicolor* ($^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = -1.09$; figura 3.61). En el organismo modelo, este transportador presenta un papel clave en la transmisión de la señal de la S-adenosilmetionina y su deleción afecta negativamente a la producción de antibióticos (Lee y col., 2012), por lo que su regulación negativa en *S. tsukubaensis* podría tener un efecto similar.

Respecto a los reguladores relacionados con el proceso de diferenciación morfológica, se produjo una regulación negativa de varios genes *bld*, *whi* y *wbl* (figura 3.61). En concreto se detectó una disminución de la transcripción de *bldC* (STSU_18523; $^{GlcNAc-C}M_c^{71h-70h} = -0.73$), *bldM* (STSU_13050; $^{GlcNAc-C}M_c^{71h-70h} = -0.58$), *bldG* (STSU_15482; $^{GlcNAc-C}M_c^{71h-70h} = -0.44$) y *bldN* (STSU_14448; $^{GlcNAc-C}M_c^{71h-70h} = -1.84$). Como se indicó en la introducción, los productos de los genes *bld* participan en una cascada de señalización que finaliza con la formación del micelio aéreo (ver apartado I.1.3.4; pág. 23). Entre los genes *whi* y *wbl* se identificaron los ortólogos de *whiH* (STSU_07863; $^{GlcNAc-C}M_c^{71h-70h} = -2.37$), *wblA* (STSU_15654; $^{GlcNAc-C}M_c^{70.5h-70h} = -1.26$) y *wblI* (STSU_11505; $^{GlcNAc-C}M_c^{70.5h-70h} = -0.67$). Se detectó un gen *wbl* cuya transcripción se reguló positivamente: *wblC* (STSU_10985; $^{GlcNAc-C}M_c^{70.5h-70h} = 1.25$), que está relacionado con la resistencia a antibióticos (Fowler-Goldsworthy y col., 2011).



Figura 3.61. Efecto de la adición de N-acetilglucosamina sobre la transcripción de genes *bld*, *whi* y *wbl*. Panel A: condición de adición de N-acetilglucosamina. Panel B: condición control. Gris: *bldKA*, *bldKB*, *bldKC*, *bldKD* y *bldKE*; rojo: STSU_17868; fucsia: *bldN*; rojo oscuro: *wblC*; morado: *bldG*; naranja: *wblA*; azul oscuro: *wblI*; negro: *whiH*; verde: *bldC*; azul claro: *bldM*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g).

También se detectó una regulación negativa de los ortólogos de *ssgR* (STSU_17758), *ssgA* (STSU_17763), *ssgB* (STSU_29352) y *parB* (STSU_17583), los cuales se relacionan con la esporulación y la segregación cromosómica (ver apartado I.1.3.4; pág. 23) y presentaron valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de entre -0.53 y -1.25. STSU_26804, que codifica una proteína de división celular SepF, presentó una regulación negativa (^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = -0.55). En *Bacillus* SepF interviene en la formación de anillos Z sobre los que se ensambla la maquinaria de división celular (Hamoen y col., 2006). La adición de N-acetilglucosamina aumentó la transcripción de STSU_18448, ortólogo de *ragB* de *S. coelicolor*, que codifica una permeasa de un transportador ABC (^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 1.37). La transcripción del operón *ragABKR* se activa por el regulador RamR en *S. coelicolor* y modula la formación de hifas aéreas y la esporulación (San Paolo y col., 2006).

Se detectó una regulación negativa de la transcripción de STSU_18801, ortólogo de *atrA* ($^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = -0.80$; figura 3.62). Como se indicó en el apartado 1.2.3.3 (pág. 37), AtrA actúa como activador esencial de los promotores de *actII-orf4* en *S. coelicolor* y de *strR* de *S. griseus* y también activa *nagE2*, que codifica una permeasa de N-acetilglucosamina. También *eshA*, cuyo producto regula la producción de actinorrodina en *S. coelicolor* y la diferenciación morfológica y la producción de estreptomicina en *S. griseus*, presentó una regulación negativa ($^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = -3.82$; figura 3.62).

Se produjo una regulación positiva de STSU_12480 (*afsQ1*; ^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 0.35; figura 3.62) que codifica el regulador de respuesta de un sistema de dos componentes que regula la diferenciación morfológica y bioquímica en *S. coelicolor* y regula genes del metabolismo del nitrógeno y de transporte de Pi en presencia de concentraciones altas de glutamato (Wang y col., 2013). También se reguló positivamente la transcripción de STSU_09809 (*absA2*; ^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 0.88; figura 3.62) que codifica el regulador de

respuesta de un sistema de dos componentes que regula negativamente la transcripción de los reguladores específicos de ruta de actinorrodina, undecilprodigiosina y CDA en *S. coelicolor* (McKenzie y Nodwell, 2007).

Por último, se detectó una regulación negativa de STSU_17648 ($^{GICNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = -0.96$; figura 3.62) y STSU_17643, cuyos ortólogos en *S. coelicolor* se cotranscriben junto con otros dos genes. El ortólogo de STSU_17648, SCO3900, codifica un regulador negativo de la diferenciación morfológica (Zhang y col., 2010).

Se produjo una regulación negativa de varios genes que codifican quinasas sensoras y reguladores de respuesta de sistemas de dos componentes, entre los que destacaron STSU_06603 y STSU_06608, ortólogos de *cutR* y *cutS* de *S. coelicolor,* respectivamente (valores $^{GlcNAc-C}M_c^{71h-70h}$ en torno a -0.77; figura 3.62). Este sistema actúa como regulador negativo de la producción de actinorrodina en *S. lividans* (Chang y col., 1996) y se ha propuesto que regula el metabolismo del cobre (Tseng y Chen, 1991).



Figura 3.62. Efecto de la adición de N-acetilglucosamina sobre la transcripción de genes reguladores implicados en la producción de antibióticos. Panel A: condición de adición de N-acetilglucosamina. Panel B: condición control. Negro: *atrA*; naranja: *eshA*; azul: *afsQ1*; rojo: *absA2*; morado: STSU_17648; gris: *cutR* y *cutS*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g).

Respecto a la diferenciación bioquímica, la adición de N-acetilglucosamina estimuló la transcripción de STSU_28862 (^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 0.70; figura 3.63), que codifica una proteína de unión a tacrolimus (FKBP). Mientras que en las células T humanas este tipo de receptores media la respuesta inmunosupresora, en *Streptomyces* sirve para proteger al microorganismo de su propio metabolito (Pahl y Keller, 1992). Otros genes relacionados con la resistencia a metabolitos cuya transcripción aumentó tras la adición fueron STSU_21242 (^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 0.93), ortólogo del gen de resistencia a bialafos *bar* (Kumada y col., 1988; Bedford y col., 1991), y STSU_29192-STSU_29197 (valores ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} de 0.91 y 1.27, respectivamente), ortólogos del operón *pqrAB* de *S. coelicolor*, que confiere resistencia al viológeno comercializado con el nombre de Paraquat (Cho y col., 2003). Se detectaron varios genes que podrían estar relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios cuya

transcripción disminuyó tras la adición de N-acetilglucosamina. Entre ellos destacaron STSU_15864 ($^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = -0.60$), que codifica una 4'-fosfopanteteiniltransferasa, y *scoT* (STSU_07618; $^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = -0.57$), que codifica una tioesterasa cuyo perfil transcripcional se correlaciona con el de la agrupación de tacrolimus (ver apartado III.1.8.1; pág. 218). Los perfiles de ambos genes se muestran en la figura 3.63. Por el contrario, STSU_32890, que codifica un módulo de una NRPS, aumentó su transcripción ($^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 1.16$).



Figura 3.63. Efecto de la adición de N-acetilglucosamina sobre la transcripción de genes relacionados con la producción de metabolitos secundarios. Panel A: condición de adición de N-acetilglucosamina. Panel B: condición control. Negro: STSU_15864; naranja: *scoT*; morado: *fkbP*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g).

• Efecto sobre otros reguladores de la transcripción

Entre los genes codificantes de reguladores transcripcionales que se regularon tras la adición de N-acetilglucosamina se detectaron positivamente alnRII $(^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = 1.59)$, que codifica un regulador del nitrógeno, y STSU_13595 (*nusG*; $GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = 0.53$), que codifica un antiterminador de la transcripción presente en varias especies del género (Puttikhunt y col., 1993). Se produjo un aumento de la transcripción de STSU 20227 y STSU 19270 (^{GlcNAc-C}Mc^{70.5 h-70 h} de 1.16 y 0.63, respectivamente), que codifican dos reguladores y cuyos ortólogos se inducen por S-adenosilmetionina en S. coelicolor (Hesketh y col., 2007; figura 3.64). En congruencia con lo expuesto anteriormente se detectó un aumento de la transcripción de STSU 29661, ortólogo de *metK*, que codifica la S-adenosilmetionina sintetasa ($^{GlcNAc-C}M_{c}^{70.5 h-70 h} = 0.35$; figura 3.64).

Entre los genes que codifican reguladores cuya transcripción disminuyó tras la adición de N-acetilglucosamina se detectaron 4 que codifican factores sigma de la ARN $^{GlcNAc-C}M_{c}^{70.5 h-70 h} = -1.16),$ polimerasa: hrdA (STSU 24896; hrdB (STSU 07858; $GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = -1.07$), sigU (STSU 22934; $GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = -0.86$) y sigN (STSU 18170; $^{GlcNAc-C}M_{c}^{70.5 h-70 h} = -0.98$). Además, la transcripción de bldH (STSU 23624; ^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = -0.89) se reguló negativamente (figura 3.64). Otros genes cuya transcripción la adición fueron STSU 08173 y STSU 07948. disminuvó tras STSU 08173 $(^{GlcNAc-C}M_c^{71 h-70 h} = -0.52)$, ortólogo de *osaB*, codifica el regulador de respuesta de un sistema de dos componentes implicado en la adaptación al estrés osmótico en *S. coelicolor* (Bishop y col., 2004) y STSU_07948 ($^{GlcNAc-C}M_c^{70.5 h-70 h} = -0.82$), ortólogo de *lexA*, codifica un represor del regulón SOS de respuesta al daño en el ADN.



Figura 3.64. Efecto de la adición de N-acetilglucosamina sobre la transcripción de reguladores. Panel A: condición de adición de N-acetilglucosamina. Panel B: condición control. Fucsia: *sigU*; verde: *hrdA*; rojo: *hrdB*; azul: *bldH*; gris: *sigN*; morado: STSU_20227; negro: STSU_19270; naranja: *metK*. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo y el eje vertical el log₂ de los valores de transcripción (valores M_g).

La similitud de la respuesta a la adición de glucosa y N-acetilglucosamina no es extraña, ya que en *S. coelicolor* existen pruebas de la interrelación entre las rutas de utilización de quitina, N-acetilglucosamina y glucosa, como es, por ejemplo, el incremento de la CCR por glucosa a causa de la inactivación de DasR (Colson y col., 2008).

III.2.4. Validación de los resultados mediante RT-qPCR

La validación de los resultados se realizó mediante RT-qPCR. Todas las muestras de ARN disponibles (4 tiempos y 2 réplicas biológicas de cada condición) se purificaron según el protocolo del apartado II.8.4.4 (pág. 158) y posteriormente se llevó a cabo la síntesis de ADNc (ver apartado II.8.4.5; pág. 159). Se analizó la transcripción de los genes *pfkA1* (cebadores CMOq89-CMOq90), *pfkA2* (cebadores CMOq40-CMOq41), *pfkA3* (cebadores CMOq91-CMOq92) y *fkbN* (cebadores CMOq95-CMOq96) por su interés como objeto de estudio de esta tesis. Como ensayo normalizador se utilizó el de *gyrB* (cebadores CMOq105-CMOq106) ya que presentó unos niveles de transcripción constantes a lo largo del cultivo (resultado no mostrado). Las secuencias de los cebadores utilizados se presentan en el apartado II.4.2.3 (pág. 102). Las reacciones se realizaron por duplicado según los parámetros indicados en el apartado II.8.4.6 (pág. 160) y se incluyeron controles sin molde para descartar contaminaciones en los componentes de la mezcla de reacción. Se emplearon dos placas multipocillo, una para las reacciones con las muestras de los cultivos problema. El análisis de los resultados se realizó con el programa REST2009 porque permite combinar los resultados de varias placas

multipocillo. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3.10 y se representan en la figura 3.65.

Tabla 3.10. Comparación de los resultados obtenidos mediante micromatrices y RT-qPCR para los genes *pfkA1*, *pfkA2*, *pfkA3* y *fkbN* en el experimento de adición de N-acetilglucosamina, donde 1 indica que no se produjeron cambios. Los valores marcados con un asterisco son aquellos que REST2009 consideró significativos con un valor p < 0.05.

Gen	Comparación	Ratio de expresión diferencial con micromatrices	Ratio de expresión diferencial con RT-qPCR	IC 95 %
	GlcNAc t _{70.5 h} -GlcNAc t _{70 h}	0.48	0.16*	0.11-0.22
pfkA1	$_{71 h}^{\text{GlcNAc}}$	0.42	0.15*	0.11-0.19
-	$\frac{GlcNAc}{t_{72}h}$	0.42	0.10*	0.08-0.13
	GlcNAc t _{70.5 h} - t _{70 h}	1.26	0.84	0.66-1.01
pfkA2	GlcNAc t _{71 h} -GlcNAc t _{70 h}	1.30	0.77*	0.61-0.93
	GlcNAc GlcNAc t _{72 h} - t _{70 h}	1.36	0.92	0.75-1.06
pfkA3	GlcNAc t _{70.5 h} -GlcNAc t _{70 h}	4.10	3.88*	2.71-4.99
	$\frac{\text{GlcNAc}}{\text{T}_{71 \text{ h}}} + \frac{\text{GlcNAc}}{\text{T}_{70 \text{ h}}}$	4.55	4.69*	3.48-5.66
	$^{\text{GlcNAc}}$ t _{72 h} - $^{\text{GlcNAc}}$ t _{70 h}	4.57	4.28*	3.06-5.37
fkbN	GlcNAc t _{70.5 h} -GlcNAc t _{70 h}	0.66	0.32*	0.16-0.47
	$_{71 h}^{\text{GlcNAc}}$	0.60	0.24*	0.12-0.35
	$\frac{GlcNAc}{t_{72}h}$ - $\frac{GlcNAc}{t_{70}h}$	0.57	0.20*	0.10-0.28





Figura 3.65. Representación de las diferencias de transcripción (\log_2) de los genes *pfkA1*, *pfkA2*, *pfkA3* y *fkbN* en t_{70.5h}, t_{71h} y t_{72h} tras la adición de N-acetilglucosamina y en la serie control. En el t_{70h} (inmediatamente antes de la adición) los valores son 0.

Los ratios de expresión diferencial obtenidos con ambas técnicas muestran una gran correlación, por lo que se consideran validados los resultados de las micromatrices (figura 3.66).



Figura 3.66. Correlación de los cocientes de expresión de *pfkA1*, *pfkA2*, *pfkA3* y *fkbN* en $t_{70.5 h}$ (circulo con relleno negro), $t_{71 h}$ (circulo con relleno blanco) y $t_{72 h}$ (cuadrado con relleno negro) obtenidos mediante micromatrices y RT-qPCR.

III.3. Efecto de la deleción de los genes codificantes de 6-fosfofructoquinasas en *Streptomyces tsukubaensis*

En *S. coelicolor*, la deleción de *pfkA2* aumenta la producción de antibióticos pigmentados gracias a la estimulación de la ruta PP y al incremento de la disponibilidad de NADPH (Borodina y col., 2008). Ya que en *S. tsukubaensis* el flujo a través de la ruta PP se ha correlacionado positivamente con la producción de tacrolimus (Huang y col., 2013a; Xia y col., 2013), se planteó la posibilidad de obtener cepas superproductoras mediante la obtención de mutantes en los genes *pfkA*. Para cumplir dicho objetivo se localizaron los cósmidos que contenían los genes que codifican 6-fosfofructoquinasas (*pfkA1, pfkA2 y pfkA3*) en una genoteca de *S. tsukubaensis* NRRL 18488 y, posteriormente, se obtuvieron cepas mutantes en cada uno de ellos.

III.3.1. Identificación de genes que codifican PfkA en *Streptomyces tsukubaensis*

En el momento en el que se desarrolló esta parte del trabajo no se había publicado el borrador de la secuencia completa del genoma de *S. tsukubaensis* (Barreiro y col., 2012), que se encontraba en fase de ensamblado y de anotación, en la que se empleó como genoma de referencia el de *S. avermitilis* (colaboración del grupo de INBIOTEC con el CeBiTec, Universidad de Bielefeld, Alemania). A partir de las secuencias aminoacídicas de las PfkA de *S. coelicolor* (obtenidas de la base de datos StrepDB), se realizó una búsqueda de alineamientos significativos con las proteínas codificadas en el borrador del genoma de *S. tsukubaensis*. Al igual que *S. coelicolor, S. avermitilis, S. scabies, S. lividans* y *S. clavuligerus,* se comprobó que *S. tsukubaensis* presenta tres secuencias anotadas como PfkA, que corresponden a los genes STSU_09924, STSU_26589 y STSU_30615 (tabla 3.11). La nomenclatura de los genes *pfkA* en este trabajo se corresponde con la de su ortólogo en *S. coelicolor* y no con la de *S. avermitilis,* utilizada en la anotación.

Tabla 3.11. Ortología y nomenclatura de los genes codificantes de PfkA en *S. tsukubaensis* NRRL 18488. Se indican los valores de identidad y similitud aminoacídica entre los ortólogos de *S. tsukubaensis* y *S. coelicolor* según el algoritmo de Needleman-Wunsch (herramienta EMBOSS-Needle, disponible en <u>http://www.ebi.ac.uk/services</u>), así como el tamaño de la secuencia codificante.

Gen	Ortólogo SCO	Nombre	ldentidad y similitud	Tamaño
STSU_09924	SCO5426	pfkA2	86.5 % (92 %)	1026 nt
STSU_26589	SCO2119	pfkA1	89 % (95 %)	1029 nt
STSU_30615	SCO1214	pfkA3	89 % (92 %)	1026 nt

Las secuencias con mayor porcentaje de identidad entre sí son las de *pfkA2* y *pfkA3* (tabla 3.12). Al igual que en *S. coelicolor*, ambas presentan en la posición aminoacídica 104 un residuo de glicina (G), mientras que *pfkA1* presenta un residuo de aspártico (D). La naturaleza del aminoácido 104 determina el sustrato utilizado como fuente de Pi y en consecuencia, el sentido de la reacción catalizada (Chi y Kemp, 2000; Siebring, 2010). Según este criterio, PfkA1 utiliza PPi, cataliza una reacción reversible y puede participar, por tanto, en la gluconeogénesis; por el contrario, PfkA2 y PfkA3 utilizan ATP y catalizan una reacción irreversible en sentido glucolítico.

Tabla 3.12. Resultados del alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las PfkA de *S. tsukubaensis* NRRL18488 realizado con el programa de alineamiento múltiple Clustal Omega (disponible en <u>http://www.ebi.ac.uk/services</u>).

	Identidad nt (%)	ldentidad de aás. (%)
pfkA1-pfkA2	64.6	54.1
pfkA1-pfkA3	65.3	57.4
pfkA2-pfkA3	75.3	68.3

III.3.2. Localización de genes *pfkA* en una genoteca de *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488

Para obtener cepas mutantes mediante ReDirect[©] (Gust y col., 2002) se precisa la utilización de cósmidos que contengan el gen de interés, que será sustituido por un casete de resistencia a un antibiótico. En el laboratorio se disponía de una genoteca de *S. tsukubaensis* en SuperCos I, formada por 1656 clones de *E. coli* XL1-Blue ordenados de forma piramidal, en 18 placas de 96 pocillos (Martínez Castro, 2011). Esta ordenación facilita el rastreo de la genoteca ya que en primer lugar se analiza la placa madre y, posteriormente, los 18 clones que conforman cada posición positiva (ver figura 3.67).
Placas Individuales



Figura 3.67. Organización de la genoteca de *S. tsukubaensis* NRRL 18488 y técnicas de rastreo empleadas en este trabajo. En la placa madre cada pocillo contiene 18 clones, excepto las posiciones A1, A12, H1 y H12, que son controles. Las posiciones correspondientes en las placas parciales contienen 6 clones y un solo clon en las placas individuales. Modificado de Martínez-Castro y col. (2009).

III.3.2.1. Identificación de clones portadores de pfkA3 y pfkA1 mediante PCR

Para detectar regiones poco conservadas entre las secuencias nucleotídicas de los genes pfkA y poder diseñar cebadores que detectasen las tres secuencias en una PCR múltiple, se realizó un alineamiento múltiple y por parejas de dichas secuencias con ayuda de la herramienta ClustalW 2.1 (http://www.ebi.ac.uk/services). De esta manera se diseñaron tres parejas de cebadores (CMOA1F-CMOA1R, CMOA2F-CMOA2R y CMOA3F-CMOA3R) que amplifican fragmentos de 531 pb, 328 pb y 449 pb de pfkA3, pfkA2 y pfkA1, respectivamente, cuyas secuencias se detallan en el apartado II.4.2.3 (pág. 102). Se pusieron a punto las condiciones para realizar una PCR múltiple con las tres parejas de cebadores y con ADN total de la cepa de E. coli que hospeda la genoteca como molde. La composición de la mezcla de reacción y las condiciones de termociclación se detallan en la tabla 3.13. Para el rastreo de la genoteca se utilizaron como molde de la reacción 2 µl de un cultivo celular incubado durante toda la noche a 37 ºC (volumen final de la reacción de 25 μl). El cultivo se realizó en 0.5 ml de LB y se inoculó con una colonia aislada en una placa de LA con la ayuda de un palillo. Con estas condiciones solo se obtuvo amplificación del fragmento interno de pfkA3, debido probablemente a la interferencia de productos celulares que no se encontraban en las reacciones de optimización. En consecuencia se recurrió a la realización de una PCR simple para cada pareja de cebadores en la que se empleó la misma mezcla de reacción y condiciones de termociclación.

Tabla 3.13. Composición de la mezcla de reacción y programa de termociclación de las PCR múltiples y simples realizadas durante el rastreo de la genoteca de *S. tsukubaensis*. El paso inicial de 95 ºC durante 10 minutos permite la lisis celular.

Componente	Concentración final	
dNTP 0.2 mM		
MgCl ₂	1 mM	
Cebadores	0.2 μM de cada uno	
DMSO	4 %	
Polimerasa GoTaq [®] 0.025 U/µ		
Tampón GoTaq [®] Green 5 ×	1 ×	

Temperatura (º C)	Duración (s)	Nº ciclos
95	600	1
95	30	
63.5	30	35
72	30	
72	600	1

NOTA: El tampón GoTaq[®] 5 × viene suministrado con la enzima

Mediante PCR simple se logró identificar varios clones portadores de *pfkA2*, pero no de *pfkA1*, por lo que este último gen se rastreó mediante hibridación *in situ* de colonias (ver siguiente apartado).

Se identificaron dos clones positivos de *pfkA2* (H7-16 y G8-11) y tres clones positivos de *pfkA3* (D4-11, D10-6 y E10-14, figura 3.68). Los cósmidos procedentes de éstas cepas se denominaron respectivamente MOC04, MOC05 (*pfkA2*), MOC01, MOC02 y MOC03 (*pfkA3*).



Figura 3.68. A1) Detección de las posiciones positivas para la secuencia pfkA3 en la placa madre (carriles 9 y 16 de la fila superior y 12 y 13 de la fila inferior, que corresponden a las posiciones D4, D10, E10 y E11 de la placa madre de la genoteca; la E11 no se analizó en la ronda posterior porque podía tratarse de una contaminación del pocillo E10). A2) Detección de los clones individuales de pfkA3 (de arriba abajo D4-11, D10-6 y E10-14). B1) Detección de las posiciones positivas para pfkA2 en la placa madre (carril 2 de la fila superior, 18 de la fila intermedia y 13 de la fila inferior, que corresponden a las posiciones A1, G8 y H7 de la placa madre de la genoteca. La posición A1 es un control positivo que contiene ADNg de *S. tsukubaensis.* B2) Detección de los clones individuales de pfkA2 (H7-16 y G8-11). Marcador de pesos moleculares en los carriles laterales: 1 kb Plus DNA LadderTM (Invitrogen).

Los clones positivos se cultivaron en 25 ml de LB para extraer el cósmido con el kit QIAprep[®] Spin Miniprep (Qiagen). En el protocolo de extracción se realizaron algunas modificaciones que se detallan en el apartado II.7.1.3 (pág. 115). Los cósmidos purificados se secuenciaron en el servicio de secuenciación de INBIOTEC para su posterior validación (apartado III.3.2.3; pág. 255).

III.3.2.2. Identificación de clones portadores de *pfkA1* mediante hibridación *in situ* de colonias

En este caso, los clones de la genoteca se cultivaron sobre una membrana sobre la que se inmovilizó el ADN tras lisar las células (ver apartado II.7.9.2; pág. 126). La secuencia de interés se detectó mediante hibridación con una sonda complementaria marcada con digoxigenina (II.7.9.3; pág. 127), en este caso el producto de PCR de 449 pb de la pareja de cebadores CMOA3F-CMOA3R. Los protocolos de hibridación, lavados y detección de la hibridación se indican en el apartado II.7.9.4 (pág. 128). Se detectaron 4 clones positivos para la secuencia de *pfkA1* correspondientes a las posiciones de las placas C10-17, E7-4, E8-1 y H4-6, cuyos cósmidos de denominaron MOC06, MOC07, MOC08 y MOC09, respectivamente (figura 3.69).



Figura 3.69. A) Detección de las posiciones positivas para *pfkA1* de la placa madre de la genoteca (C10, E7, E8 y H4). B) Detección de los clones individuales (C10-17, E7-4, E8-1 y H4-6).

Los cósmidos de los clones positivos se extrajeron con el kit QIAprep[®] Spin Miniprep (Qiagen) a partir de 25 ml de cultivo en LB (ver apartado II.7.1.3; pág. 115) y se secuenciaron en el servicio de secuenciación de INBIOTEC para su posterior validación (ver siguiente apartado).

III.3.2.3. Validación de los cósmidos identificados

La utilización de los cósmidos en la técnica de ReDirect[®] presenta como requisito que el gen de interés se localice centrado en el inserto. La frecuencia de recombinación es generalmente proporcional al tamaño de las regiones homólogas; de hecho, no se recomiendan tamaños inferiores a 500 pb (Kieser y col., 2000). Para seleccionar los cósmidos más adecuados se recurrió a la secuenciación de sus extremos. Se emplearon como cebadores T7-cos y T3-cos (ver apartado II.4.2.3; pág. 102), complementarios a los promotores de las ARN polimerasas de los fagos T3 y T7, que flanquean el punto de clonación de los insertos en SuperCos I. En la mayoría de los casos no se consiguió secuenciar el inserto por ambos extremos, debido a las dificultades para obtener muestras de cósmido

suficientemente puras. Un problema adicional fue el estado del borrador del genoma, aún en desarrollo, que no permitía discernir si las incongruencias de posición entre los extremos de los insertos podían ser debidas a errores de ensamblado o a reorganizaciones del cósmido en la cepa hospedadora. Para superar este obstáculo se recurrió al análisis de los patrones de restricción de los cósmidos con determinadas endonucleasas. De esta manera, la comparación de los tamaños de los fragmentos esperados y obtenidos permitió determinar el tamaño de las regiones flanqueantes al gen *pfkA* (ver figura 3.70). Cuando la secuencia de alguno de los extremos del inserto se localizó a una distancia superior a las 42 kb, que es el máximo tamaño del inserto en la genoteca (Martínez Castro, 2011), se buscaron genes ortólogos a los que flanquean dicha región en *S. avermitilis*. Este análisis permitió confirmar la correcta organización de los cósmidos y la reorganización del cósmido MOC08.

Finalmente, se eligieron los cósmidos MOC01 (*pfkA3*), MOC05 (*pfkA2*) y MOC09 (*pfkA1*) para proseguir con la técnica de ReDirect[©]. El gen no se localiza totalmente centrado en el inserto en ninguno de los tres cósmidos, pero el tamaño de la zona flanqueante más pequeña es aceptable (mínimo 4 kb posteriores a *pfkA2*, ver figura 3.70).



Figura 3.70. Representación del tamaño de las regiones flanqueantes comprobadas para cada gen *pfkA* en los insertos de los cósmidos. El extremo secuenciado del inserto se representa como un círculo y los puntos de corte más distales comprobados en cada digestión enzimática se indican con una línea punteada vertical. Se indican las enzimas utilizadas y entre paréntesis el tamaño de la región comprobada. Además, se indica a cada lado de la secuencia *pfkA* el tamaño de la región flanqueante comprobada. MOC01 se digirió con MluI y con SphI; MOC09 se digirió con NcoI y SphI y MOC05 se digirió con KpnI y NruI. El análisis de los patrones permitió determinar una región sin reorganizar de 31.3 kb en el caso de MOC01, 32.9 kb en el caso de MOC09 y 34.8 kb en el caso de MOC05.

III.3.3. Obtención del mutante *Streptomyces tsukubaensis* Δ*pfkA2*::Am^R mediante ReDirect[©]

Inicialmente se trató de conseguir las tres cepas mutantes mediante ReDirect[©]. Para ello, se aisló el casete de resistencia a apramicina (que contiene además un *oriT*) del vector pIJ774 mediante digestión doble con EcoRI y HindIII, electroforesis en gel de agarosa y extracción del fragmento de 1374 pb (ver apartado II.7.13.1; pág. 136). El ADN de este

fragmento sirvió como molde en la PCR para obtener el casete extendido (ver composición de la mezcla y programa de termociclación en el apartado II.7.13.3; pág. 136), en la que se utilizaron las parejas de cebadores RDpfkA1F-RDpfkA1R, RDpfkA2F-RDpfkA2R y RDpfkA3F-RDpfkA3R (ver apartado II.4.2.3; pág. 102) y la polimerasa de alta fidelidad Phusion[®] (New England BioLabs). El producto de 1452 pb se extrajo según el protocolo de *freeze-squeeze* tras su electroforesis en un gel de agarosa (apartado II.7.8.1; pág. 123).

La cepa de *E. coli* BW25113/pIJ790 se transformó por electroporación con 1.6 μ g de cada cósmido (Cm^R, Kan^R y Ap^R) y, posteriormente, con el casete extendido (540 ng de casete *pfkA2*, 450 ng de casete *pfkA3* y 320 ng de casete *pfkA1*) según los protocolos indicados en los apartados II.7.13.4 (pág. 137) y II.7.13.5 (pág. 138), respectivamente. Las colonias obtenidas, incubadas a 37 °C para favorecer la pérdida de pIJ790, presentaron un fenotipo Ap^R, Kan^R y Am^R, de acuerdo a la sustitución del gen *pfkA* por el casete de resistencia a apramicina. El reemplazamiento de las secuencias *pfkA* por el casete de resistencia en los cósmidos se comprobó mediante PCR con los cebadores de amplificación del casete extendido y aquellos que generaron una banda más nítida (de aproximadamente 1650 pb) se introdujeron en la cepa deficiente en sistemas de metilación *E. coli* ET12567/pUZ8002 (Kan^R, Cm^R, Ap^R y Am^R) mediante transformación química (ver apartado II.7.11.2; pág. 132).

III.3.3.1. Optimización del protocolo de conjugación intergenérica con *S. tsukubaensis*

A pesar de que el protocolo de conjugación intergenérica es de uso común en la ingeniería genética de *Streptomyces*, algunas especies son especialmente difíciles de manipular y con frecuencia se publican trabajos de optimización de los procesos de conjugación (Wang y Jin, 2014). *S. tsukubaensis* presenta bajas eficiencias de conjugación con el protocolo habitual (Gust y col., 2002), por lo que se modificaron dos parámetros para aumentar la eficiencia: el número de esporas de *S. tsukubaensis* y la cantidad de células de la cepa de *E. coli* donante.

- Número de esporas utilizadas: se emplearon entre 3 · 10⁹ y 9 · 10⁹ esporas en cada conjugación, puesto que al aumentar el número de esporas aumenta la eficiencia de conjugación (Martínez Castro, 2011). De acuerdo con esta premisa, se usó el vector integrativo pIB139 como control y se determinó que el número de colonias exconjugantes se duplicó al duplicar el número de esporas añadidas (resultados no mostrados).
- DO_{600} del cultivo de la cepa donante utilizado: al contrario de lo sugerido en el protocolo habitual (Gust y col., 2002), la utilización de cultivos con una DO_{600} superior a 0.4-0.6, aumentó la eficiencia de conjugación. Por ejemplo, con el cósmido MOC05 y el mismo número de esporas utilizadas se obtuvieron 63 y 249 colonias exconjugantes en dos conjugaciones independientes al utilizar un cultivo de $DO_{600} = 0.6$; mientras que con cultivos de $DO_{600} = 1.1$ se obtuvieron 388 y 517 colonias, respectivamente. Sin embargo, cuando se utilizó el mismo número de esporas y la misma DO_{600} de los cultivos de las cepas donantes que contienen los cósmidos MOC01 y

MOC09 se obtuvo un número reducido de colonias exconjugantes, lo que pone de manifiesto la importancia de la construcción en particular.

Como resultado de la combinación de estas observaciones se definió como protocolo de conjugación intergenérica definitivo el descrito en el apartado II.7.12.1 (pág. 133).

III.3.3.2. Obtención de dobles recombinantes

Las colonias obtenidas en la placa de conjugación se sembraron con palillo en dos placas de TSA al 2 %, una de ellas con ácido nalidíxico y apramicina y otra con ácido nalidíxico, apramicina y kanamicina. Se buscaron dobles recombinantes caracterizados por su fenotipo Am^R y Kan^S. Tras obtener varios cientos de colonias con un fenotipo Kan^R, se planteó la posibilidad de que la concentración de kanamicina utilizada no fuera suficiente para seleccionar dobles recombinantes y se realizaron ensayos con concentraciones de 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml y 200 µg/ml así como con neomicina a 60 µg/ml.

Se analizaron aproximadamente 1500 colonias de exconjugantes del cósmido MOC05 (para la deleción de *pfkA2*) en los cinco tipos de medios anteriormente indicados. Se obtuvieron 4 colonias con diferente nivel de sensibilidad a kanamicina. Solo una de ellas presentó un fenotipo Kan^s en todas las concentraciones ensayadas (kan44), mientras que el resto crecieron en presencia de kanamicina a 50 µg/ml y 100 µg/ml (kan13, kan52 y kan69; figura 3.71).



Figura 3.71. Crecimiento de los 4 candidatos con diferente sensibilidad a kanamicina en TSA en presencia de ácido nalidíxico, apramicina y distintas concentraciones de kanamicina (50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 150 μ g/ml y 200 μ g/ml) o neomicina a 60 μ g/ml.

Los cuatro candidatos se resembraron en TSA en presencia de ácido nalidíxico y apramicina (para eliminar la cepa donante y mantener la presión selectiva, respectivamente) y posteriormente se esporularon en ISP4 con apramicina. A partir de las esporas recogidas, se realizó una segunda ronda de aislamiento de colonias, cuyo fenotipo Am^R y Kan^S se reconfirmó en placas de TSA con ácido nalidíxico, apramicina y kanamicina en su caso (50 µg/ml). En el caso de los candidatos kan13 y kan69, se obtuvieron colonias de fenotipo blanco en la segunda ronda de aislamiento en una proporción muy elevada (1/4 y 1/2, respectivamente), lo que podría indicar mutaciones adicionales (ver apartado II.2.2.2; pág. 91).

Una colonia de cada exconjugante (incluidos kan13 y kan69) procedente de la placa de TSA con ácido nalidíxico y apramicina se esporuló en ISP4 para obtener una preparación

de esporas. A partir de un cultivo en TSB inoculado con dichas esporas se extrajo ADN total mediante *salting out* (II.7.2.1; pág. 116) para comprobar la doble recombinación mediante PCR e hibridación *Southern* (ver siguiente apartado).

En el caso de los cósmidos MOC09 y MOC01 (para la deleción de *pfkA1* y *pfkA3*, respectivamente) se analizaron más de 1300 colonias de exconjugantes sin éxito, por lo que se aplicaron estrategias alternativas (ver apartado III.3.4; pág. 260).

III.3.3.3. Validación de los mutantes de *S. tsukubaensis* Δ*pfkA2*::Am^R mediante PCR e hibridación *Southern*

Para comprobar mediante PCR la sustitución de *pfkA2* por el casete de resistencia se utilizó la pareja de cebadores externa al casete CMOA4F-CMOA4R. La concentración de los componentes de la mezcla de reacción fue la misma utilizada durante el rastreo de la genoteca (apartado III.3.2.1; pág. 253) y el programa de termociclación el indicado en la tabla 3.14.

Duración (s)	Nº de ciclos
0	
59	1
15	
15	20
90	
15	_
15	15
90	
600	1
0	
	Duración (s) 0 59 15 15 90 15 15 90 600 0

Tabla 3.14. Programa de termociclación utilizado para comprobar mediante PCR los candidatos de *S. tsukubaensis* $\Delta pfkA2$.

Además, se comprobaron los candidatos mediante hibridación *Southern* (figura 3.72). Para ello, se realizaron dos digestiones del ADN total extraído de los candidatos y de la cepa silvestre, una con Ncol y otra con Mlul y Sphl. Los productos de la digestión se separaron en un gel de agarosa al 0.8 % y se transfirieron a la membrana de hibridación (apartado II.7.9.1; pág. 124). La sonda utilizada fue el producto de amplificación de los cebadores CMOA4F-CMOA4R a partir de ADN total de la cepa silvestre. La concentración de los componentes de la mezcla de reacción fue la misma utilizada durante el rastreo de la genoteca (apartado III.3.2.1; pág. 253) y el programa de termociclación el indicado en la tabla 3.14. Esta sonda se marcó con digoxigenina según el protocolo indicado en el apartado II.7.9.3 (pág. 127) y se utilizó a una concentración de 25 ng/ml en la solución de hibridación. Los protocolos de hibridación, lavados y detección de la hibridación se detallan en el apartado II.7.9.4 (pág. 128).

El ADN total de todos los candidatos generó un producto de aproximadamente 1.8 kb en la reacción de PCR, lo que indica que se trata de dobles recombinantes. Este resultado se corroboró con el patrón obtenido por hibridación *Southern*. Puesto que el candidato kan44-7 fue el único que presentó un fenotipo gris y sensibilidad a kanamicina a $50 \mu g/ml$, fue el elegido para caracterizar el efecto de la deleción de *pfkA2* en *S. tsukubaensis*.



Figura 3.72. Validación de los candidatos de *S. tsukubaensis* ∆*pfkA2* mediante PCR e hibridación *Southern*. A) Resultados de las PCR de comprobación. El casete de resistencia genera un fragmento de 1827 pb y la secuencia silvestre un fragmento de 1485 pb. Marcador de pesos moleculares en los carriles laterales: 1 kb Plus DNA Ladder[™] (Invitrogen). B) Resultados de la comprobación por digestión enzimática e hibridación *Southern*. En la parte inferior de la figura se indican los tamaños esperados al digerir el casete de resistencia y la secuencia silvestre con NcoI y con MluI y SphI. Marcador de pesos moleculares: DNA Molecular Weight Marker II Digoxigenin-labeled (Roche).

III.3.4. Obtención de los mutantes *Streptomyces tsukubaensis* Δ*pfkA1*::Am^R y Δ*pfkA3*::Am^R

Como se indicó en el apartado III.3.3.2 (pág. 258) se analizaron más de 1300 colonias de exconjugantes para las deleciones de *pfkA1* y *pfkA3*. Todas presentaron un fenotipo Kan^R (correspondiente a recombinantes simples), por lo que se recurrió a varias estrategias alternativas. Entre las estrategias probadas para obtener los mutantes se encuentran:

a) Realización de subcultivos alternos en TSB en presencia de apramicina y sin apramicina: la finalidad de esta estrategia (comunicación personal de la Dra. Zahra Salehi Najfabadi) fue aumentar la proporción de genomas dobles recombinantes en sucesivos cultivos en medio líquido. Para ello, las colonias que presentaron peor crecimiento en TSA al 2 % en presencia de ácido nalidíxico, apramicina y kanamicina se esporularon en ISP4 con ácido nalidíxico y apramicina. Las esporas obtenidas se inocularon en 50 ml de TSB o TSB con apramicina y se incubaron durante 48 h a 220 rpm y 28 °C en matraces lisos de 250 ml de capacidad. A partir de las 48 h de cultivo se realizaron subcultvos diarios en los que un mililitro de cultivo se inoculó en 50 ml de TSB en presencia de apramicina si el cultivo anterior se realizó en ausencia del antibiótico o sin antibiótico en el caso de que el medio del cultivo anterior contuviera apramicina. Diariamente se sembraron diluciones de los cultivos líquidos en ISP4 con apramicina para obtener colonias aisladas. Las colonias se sembraron en una placa de TSA con ácido nalidíxico y apramicina y en una placa con ácido nalidíxico, apramicina y kanamicina, con la finalidad de detectar el fenotipo Am^R y Kn^S característico de los dobles recombinantes. Tras un total de 9 pases se descartó este procedimiento, por la degeneración de los cultivos, que presentaron un color anaranjado y agregados de células en TSB y dieron lugar a colonias calvas y rojizas en medio sólido.

b) Esporulación de un recombinante simple en ISP4 sin antibiótico y fenotipado intensivo mediante el uso de un replicador con superficie de terciopelo. Un recombinante simple se sembró en TSA con ácido nalidíxico y, posteriormente, en el medio de esporulación ISP4 sin antibióticos. La presencia de apramicina en el medio de esporulación puede impedir que se generen las torsiones necesarias en el ADN para que se produzca la segunda recombinación, al transcribirse el casete de resistencia correspondiente (Dr. Bertold Gust, comunicación personal). Las esporas recogidas se utilizaron para sembrar colonias aisladas en ISP4 sin antibiótico, cuyo fenotipo Am^R y Kn^S se comprobó en placas de TSA con ácido nalidíxico, apramicina y kanamicina y TSA con ácido nalidíxico y apramicina. Mediante esta estrategia se analizaron más de 20 000 colonias de exconjugantes para la construcción de deleción de *pfkA1* y más de 13 000 colonias que presentaron un peor crecimiento en presencia de kanamicina se sometieron a una segunda ronda de esporulación en medio sin antibiótico y de siembra de colonias aisladas para su fenotipado. Entre más de 3000 colonias analizadas tampoco se detectó ninguna con un fenotipo Am^R y Kn^S.

c) Utilización del vector de selección negativa pMP301 (Dubeau y col., 2009; figura 3.73). Dicho vector codifica una citosina desaminasa (codA(s)) que cataliza la desaminación de la citosina a uracilo en la ruta de salvamento de las pirimidinas (EC 3.5.4.1). Sin embargo, esta enzima también desamina la 5-fluorocitosina a 5-fluorouracilo, compuesto altamente tóxico. Basándose en la ausencia de esta enzima en el género Streptomyces, Dubeau y col. (2009) desarrollaron un vector conjugativo (pMP302; figura 3.73), que contiene genes de resistencia a ampicilina y neomicina. Aunque el vector solicitado a dicho grupo de investigación fue el pMP302, se envió una versión previa denominada pMP301 que carece del gen de resistencia a ampicilina y, por tanto, hace imposible la selección de las construcciones en E. coli ET12567/pUZ8002. Inicialmente se clonó el gen de resistencia a ampicilina bla del vector pUC19 en el sitio AvrII de pMP301 y se seleccionó la construcción en la que el gen presenta la misma orientación que en pMP302. Posteriormente, se sustituyó la secuencia de codA(s) por una versión mejorada denominada codA(sm), que presenta una mutación puntual D314A que permite la selección de colonias utilizando concentraciones más bajas de 5-fluorocitosina. Para ello se clonó el fragmento de 1213 pb producto de la digestión del vector pMG201M (no conjugativo y con gen neo; Dubeau y col., 2009; figura 3.73) con Ncol y BstXI. Finalmente, se clonaron en la construcción alelos de pfkA1 y pfkA3 que presentan una deleción en marco de 711 pb y 852 pb, respectivamente, cuya generación se detalla en el apartado III.3.4.1 (pág. 262). La eficiencia de conjugación con este vector en *S. tsukubaensis* fue muy baja y no se obtuvieron colonias de exconjugantes en ningún caso.



Figura 3.73. Vectores de selección negativa basados en el uso de la citosina desaminasa en presencia de 5-fluorocitosina desarrollados por Dubeau y col. (2009). Estos autores proporcionaron las construcciones pMP301 (conjugativo) y pMG201M (no conjugativo). En el desarrollo de esta tesis se generó un vector equivalente a pMP302 mediante la introducción del gen *bla* de pUC19 en el sitio AvrII. Este último se optimizó con la sustitución de *codA(s)* por *codA(sm)* (construcción no mostrada).

d) Utilización del vector pKC1139. Esta fue la única estrategia efectiva en la obtención de mutantes de S. tsukubaensis en los genes pfkA1 y pfkA3, por lo que su aplicación se describe detalladamente en el siguiente apartado.

III.3.4.1. Utilización del vector pKC1139 en la obtención de mutantes de *S. tsukubaensis*

Puesto que existen varios ejemplos de la utilización de este vector en la obtención de mutantes de *S. tsukubaensis*, en los que se emplean en algunos casos regiones homólogas pequeñas de tan solo 346 pb (Goranovič y col., 2010; Kosec y col., 2012; Goranovič y col., 2012), se recurrió a su uso en la obtención de mutantes en los genes *pfkA1* y *pfkA3*. Para obtener cepas mutantes carentes de genes de resistencia a antibióticos se decidió clonar en este vector versiones de *pfkA1* y *pfkA3* que presentan una deleción en marco que afecta a la mayor parte del gen (construcciones pKC1139-pfkA1del y pKC1139-pfkA3del, respectivamente).

Obtención de las construcciones pKC1139-pfkA1del y pKC1139-pfkA3del

Las regiones flanqueantes de cada *pfkA* más 165 pb y 152 pb del inicio y del final de la secuencia codificante de *pfkA1* y 114 pb y 60 pb del inicio y del final de la secuencia codificante de *pfkA3* se amplificaron con las parejas de cebadores CMO54-CMO55, CMO56-CMO57, CMO58-CMO59 y CMO60-CMO61 (apartado II.4.2.3; pág. 102) y la polimerasa de alta fidelidad Phusion[®] (New England BioLabs). La composición de la mezcla de reacción y el programa de termociclación se detallan en la tabla 3.15.

Tabla 3.15. Composición de la mezcla de reacción y programa de termociclación utilizados para la amplificación de las regiones flanqueantes de *pfkA1* y *pfkA3* para su clonación en el vector pKC1139.

Componente	Concentración final		
dNTP	0.2 mM		
Cebadores	0.8 μM de cada uno		
Molde	2.5 ng/μl		
DMSO	4 %		
Polimerasa Phusion [®]	0.02 U/µl		
Tampón Phusion [®] GC 5 ×	1 ×		

NOTA: El tampón GC 5 × viene suministrado con la enzima y contiene MgCl₂ 7.5 mM. Como molde para la amplificación de los fragmentos de *pfkA2* se utilizó el cósmido MOC09 y para *pfkA3* el cósmido MOC01.

Temperatura (º C)	Duración (s)	Nº ciclos
95	0	
98	59	1
98	15	
х	15	20
72	42	
98	15	
x - 20	15	11
72	42	
72	600	1
4	0	

NOTA: la temperatura señalada con x fue 91 ºC para la pareja de cebadores CMO54-CMO55; 87 ºC para la pareja CMO56-CMO57; 88.4 ºC para la pareja CMO58-CMO59 y 89.8 ºC para la pareja CMO60-CMO61.

Los productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción para las cuales se habían incorporado puntos de corte en los cebadores. En el caso de las secuencias amplificadas con CMO54 y CMO61, que presentan puntos de corte para dos enzimas de restricción, los productos se digirieron con EcoRI. Los fragmentos digeridos, purificados a partir de un gel de agarosa, se clonaron en el vector pUC19 digerido con las mismas enzimas de restricción (EcoRI-KpnI, KpnI-XbaI, EcoRI-BamHI y XbaI-BamHI) y se comprobaron mediante secuenciación con los cebadores propios de la amplificación y CMO36. Este último cebador hibrida a 89 pb del primer punto de restricción de la región de clonación múltiple de pUC19 (II.4.2.3; pág. 102). Posteriormente, los fragmentos se ensamblaron en pUC19 a través de los cortes comunes incorporados en los cebadores (KpnI para *pfkA1* y BamHI para *pfkA3*). Como resultado se obtuvieron nuevos alelos de *pfkA1* y *pfkA3* que presentan una deleción en marco de 711 pb y 852 pb, respectivamente. En la figura 3.74 se esquematiza la obtención de dichos alelos.

La nueva versión de *pfkA1* se extrajo de pUC19 mediante digestión con Pvull y HindIII (la banda aislada incorporaba 88 pb por el extremo cortado con Pvull y 24 pb por el extremo cortado con HindIII procedentes del vector pUC19) y se clonó en pKC1139 digerido con EcoRV y HindIII (Pvull y EcoRV generan extremos romos compatibles entre sí). Por su parte, la nueva versión de *pfkA3* se extrajo mediante digestión con EcoRI y HindIII (se incorporaron 24 pb del vector por el extremo cortado con HindIII) y se clonó en pKC1139 digerido con las mismas enzimas. Estas construcciones se introdujeron por transformación en *E. coli* ET12567/pUZ8002 (II.7.11.2; pág. 132) y se transfirieron a *S. tsukubaensis* por conjugación (II.7.12.1; pág. 133).





• Protocolo de subcultivos

Las placas de conjugación presentaron un gran número de colonias aisladas, pero sin llegar a presentar un crecimiento confluyente. Se recogieron todas las colonias presentes en las tres placas con un bastoncillo (alrededor de 600) y se sembraron en una placa de ISP4 con apramicina que se incubó a 28 ºC durante 11 días. A partir de las esporas obtenidas, recogidas con un mililitro de agua Milli-Q se inició el protocolo de subcultivos que se detalla a continuación:

- El mililitro de esporas se inocula en 50 ml de TSB con apramicina y se incuba a 28 ºC y 220 r.p.m. durante 24 h en matraces lisos de 250 ml de capacidad.
- El micelio procedente del cultivo anterior se recoge por centrifugación, se reinocula en 50 ml de TSB fresco con apramicina y se incuba en las mismas condiciones durante 24 h. En estos dos primeros cultivos, se seleccionan aquellas células que contienen la construcción, integrada o no, gracias a la presencia de apramicina.
- 3. Un mililitro del cultivo anterior se inocula en 50 ml de TSB fresco con apramicina y se incuba a 37 °C y 220 r.p.m. durante tres días. En este proceso se seleccionan recombinantes simples, ya que a estas temperaturas el plásmido no se replica y la presión selectiva selecciona el genotipo Am^R. (Nota: durante este cultivo no se observó crecimiento a simple vista).
- Se recoge todo el micelio del cultivo anterior mediante centrifugación, se reinocula en 50 ml de TSB fresco con apramicina y se incuba a 28 ºC y 220 r.p.m. durante 24 h. (Nota: en este paso se observó crecimiento a simple vista).
- 5. Un mililitro del cultivo anterior se inocula en 50 ml de TSB fresco sin antibiótico y se incuba a 28 ºC y 220 r.p.m. durante 24 h. En días posteriores se realizan nuevos subcultivos en medio fresco sin antibiótico, siempre a partir de 1 ml del cultivo del día anterior y se incuba en las mismas condiciones. Se realizan en total 9 subcultivos en ausencia de antibiótico, en los que la inexistencia de presión selectiva permite la doble

recombinación y la disminución de la proporción de cromosomas que contienen el plásmido integrado.

- 6. Finalmente, se recoge todo el micelio del último cultivo por centrifugación y se resuspende en 5 ml de TSB. Se siembran 0.1 ml, 0.5 ml, 1 ml, 2 ml y 3 ml en placas de ISP4 sin antibiótico y se incuban a 28 ºC durante 11 días. (Nota: las placas que presentaron mejor crecimiento correspondieron a las sembradas con 0.1 ml de la suspensión de micelio).
- 7. Se recogen todas las esporas de la placa que presenta mejor crecimiento (en nuestro caso fue la sembrada con 0.1 ml de suspensión de micelio) y se siembran diluciones en ISP4 sin antibiótico para obtener colonias aisladas. La primera dilución (10⁻²) se somete a un tratamiento de ultrasonidos durante 1 min para asegurar la rotura de las cadenas de esporas.
- 8. Las colonias obtenidas se siembran en TSA con ácido nalidíxico y en TSA con ácido nalidíxico y apramicina con ayuda de un replicador.

Mediante este proceso se comprobó el fenotipo de resistencia a apramicina de unas 2200 colonias procedentes de exconjugantes con la construcción pKC1139-pfkA1del y de 1100 colonias procedentes de exconjugantes con la construcción pKC1139-pfkA3del.

• Comprobación de los candidatos mediante PCR

Se realizó una segunda comprobación del fenotipo Am^S de los exconjugantes seleccionados en el paso anterior mediante siembra con palillo. Las colonias que presentaron un fenotipo Am^S se sembraron de nuevo en TSA con ácido nalidíxico y en TSA con ácido nalidíxico y apramicina. Muchos candidatos presentaron un crecimiento homogéneo en presencia de apramicina. Aquellos candidatos que presentaron un fenotipo Am^S o un pequeño número de aislados (de 1 a 3) se esporularon en ISP4 sin antibiótico. Se extrajo ADN molde mediante hervido de esporas (II.7.2.2; pág. 116), que se utilizó para una PCR de comprobación. Se usaron las parejas de cebadores CMOA6F-CMOA6R para *pfkA1* y CMOA5F-CMOA5R para *pfkA3* (ver figura 3.75). La composición de la mezcla de reacción y el programa de termociclación se detallan en la tabla 3.16.

Tabla 3.16. Composición de la mezcla de reacción y programa de termociclación para las PCR de comprobación del genotipo Am^s con las parejas de cebadores CMOA6F-CMOA6R (para *pfkA1*) y CMOA5F-CMOA5R (para *pfkA3*).

Componente	Concentración final
dNTP	0.2 mM
MgCl ₂	1.5 mM
Cebadores	0.2 μM de cada uno
Molde	5 ng/µl
DMSO	4 %
Polimerasa GoTaq [®]	0.025 U/μl
Tampón GoTaq [®] Green 5 ×	1 ×

NOTA: El tampón GoTaq[®] Green 5 × viene suministrado con la enzima.

Temperatura (º C)	Duración (s)	Nº de ciclos
95	0	
95	120	1
95	30	_
*	30	35
72	**	
72	600	1
4	0	

NOTA: La temperatura de hibridación utilizada (representada con *) fue de 62 ºC para la pareja de cebadores CMOA6F-CMOA6R y de 60 ºC para la pareja CMOA5F-CMOA5R. La duración del paso de extensión de la polimerización (representada con **) fue de 48 s en la reacción que empleó los cebadores CMOA6F-CMOA6R y de 63 s en la que empleó los cebadores CMOA5F-CMOA5R.



Figura 3.75. PCR de comprobación de las colonias candidatas tras la ronda de cribado mediante siembra con palillo. Las colonias positivas se resaltan con un asterisco negro en caso de presentar un fenotipo Am^S o blanco si presentaron crecimiento aislado en TSA con ácido nalidíxico y apramicina. A) PCR de los 15 candidatos $\Delta pfkA1$ con la pareja de cebadores CMOA6F-CMOA6R. Los productos esperados con el genotipo silvestre y mutante fueron 1208 pb y 503 pb, respectivamente B) PCR de los 26 candidatos $\Delta pfkA3$ con la pareja de cebadores CMOA5F-CMOA5R. Los productos esperados con el genotipo silvestre y mutante fueron 1705 pb y 859 pb, respectivamente. Carril D: reacción con ADN total. Carril C: reacción con la construcción como molde. Marcador de pesos moleculares: 1 kb Plus DNA LadderTM (Invitrogen).

En una tercera ronda de aislamiento se sembraron colonias aisladas de los candidatos con el patrón de bandas esperado. Su fenotipo Am^s se comprobó de nuevo en TSA con ácido nalidíxico y en TSA con ácido nalidíxico y apramicina. En este caso todas las colonias probadas (en torno a 20) presentaron un fenotipo Am^s, de manera que se seleccionó una de ellas como clon definitivo y se esporuló en ISP4 sin antibiótico. El número de colonias analizadas en cada etapa de proceso se resume en la tabla 3.17.

Tabla 3.17. Resumen del número de colonias analizadas en cada etapa del proceso de obtención de mutantes con el vector pKC1139. En la columna de siembra con palillo se indica el número de colonias que no presentaron crecimiento (Am^s), que presentaron de 1 a 3 colonias aisladas ("a"), 4 o más colonias aisladas ("va") y crecimiento homogéneo ("h") en la superficie sembrada en TSA.

	Replica			
	Nº colonias	Am ^s	Siembra palillo	PCR +
			3 Am ^s	1
pfkA1	2200	62	11 a	4
			48 h	
			25 Am ^s	1
pfkA3	1100	76	15 a	
	1100	76	13 va	
			23 h	

III.3.4.2. Validación de los mutantes por PCR

Los cinco candidatos $\Delta pfkA1$ y el candidato $\Delta pfkA3$ se validaron mediante tres reacciones de PCR diferentes (figura 3.76). Teniendo en cuenta que los productos de amplificación de las parejas de cebadores CMOA6F-CMOA6R y CMOA5F-CMOA5R son muy diferentes según el genotipo silvestre o mutante, se diseñaron las parejas de cebadores CMO83-CMO84 (para los candidatos $\Delta pfkA1$) y CMO86-CMO87 (para el candidato $\Delta pfkA3$), que amplifican productos de mayor tamaño, con lo que se evita la ausencia de amplificación a partir de un genotipo silvestre por estar desfavorecida respecto del genotipo mutante. Además, se diseñaron cebadores para una tercera reacción en la que solo se produce amplificación al utilizar como molde ADN silvestre (CMO83-CMO85 para $\Delta pfkA1$ y CMO87-CMO88 para $\Delta pfkA3$). La motivación principal fue la de asegurar la detección de cromosomas silvestres minoritarios.

La composición de la mezcla de reacción fue la misma que la indicada para las reacciones con los cebadores CMOA5F-CMOA5R y CMOA6F-CMOA6R. El programa de termociclación utilizado con estas parejas se indica en el apartado anterior. Los programas de termociclación utilizados para el resto de parejas de cebadores se detallan en las tablas 3.18 y 3.19.

Temperatura (º C)	Duración (s)	Nº de ciclos
95	0	
95	120	1
95	30	
*	30	35
72	**	
72	600	1
4	0	

Tabla 3.18. Programa de termociclación utilizado en las reacciones de comprobación de los mutantes de *S. tsukubaensis* en *pfkA1* y *pfkA3* con las parejas de cebadores CM083-CM085, CM083-CM084 y CM087-CM088.

NOTA: La temperatura de hibridación utilizada (representada como *) en las reacciones fue de 58 °C con la pareja de cebadores CMO83-CMO85; 57 °C con la pareja de cebadores CMO83-CMO84 y 53 °C con la pareja CMO87-CMO88. El tiempo de extensión de la polimerización (representado como **) fue de 36 s con la pareja de cebadores CMO83-CMO85; 78 s con la pareja de cebadores CMO83-CMO85; 78 s con la pareja de cebadores CMO83-CMO88.

Duración (s)	Nº ciclos
0	
59	1
15	
15	22
186	
15	
15	13
186	
600	1
0	
	Duración (s) 0 59 15 15 186 15 15 186 600 0

Tabla 3.19. Programa de termociclación utilizado en la reacción de comprobación de los mutantes de *S. tsukubaensis* en *pfkA3* con la pareja de cebadores CM086-CM087.

Los clones 2 y 5 de los exconjugantes de *S. tsukubaensis* $\Delta pfkA1$ se descartaron para estudios posteriores ya que el 2 presentó un producto de amplificación de tamaño similar al del silvestre en la reacción con la pareja de cebadores CMOA6F-CMOA6R (figura 3.77 A) y el 5 no se pudo comprobar con la pareja de cebadores CMO83-CMO84 (figura 3.77 C). Por lo tanto, los candidatos 1, 3 y 4 para la deleción de *pfkA1* y el candidato 1 para la deleción de *pfkA3*, que presentaron el patrón correspondiente al genotipo mutante en las tres reacciones realizadas, se dieron por válidos.



Figura 3.77. PCR de comprobación de los candidatos ∆*pfkA1* (paneles A, B y C) y ∆*pfkA3* (paneles D, E y F). En el panel A se presentan las reacciones con la pareja de cebadores CMOA6F-CMOA6R; en el panel B se presentan las reacciones con la pareja de cebadores CMO83-CMO85 y en el panel C aparecen las reacciones con la pareja de cebadores CMO83-CMO84. Las reacciones con el ADN de los clones 1 y 3 se repitieron ya que en la primera reacción el ADN del clon 1 produjo una banda tenue y el ADN del clon 3 no produjo amplificación. En el panel D se presentan las reacciones con la pareja de cebadores CMOA5F-CMOA5R, en el panel E se indica la reacción con la pareja de cebadores CMO87-CMO88 y en el panel F se presentan las reacciones con la pareja de cebadores con una "t" presentan las reacciones en las que se utilizó la construcción como molde. En los carriles exteriores se cargó el marcador de pesos moleculares 1 kb Plus DNA Ladder™ (Invitrogen).

Para la caracterización fenotípica del mutante $\Delta pfkA2::Am^{R}$ se utilizó el clon kan44, ya que fue el único que presentó un fenotipo Kan^S en presencia de kanamicina a 50 µg/ml y una coloración gris de las colonias. En el caso del mutante $\Delta pfkA3$ se analizó el único candidato disponible y en el caso de los mutantes $\Delta pfkA1$ se analizaron los clones 1 y 3, que se indicarán en lo sucesivo entre corchetes tras el nombre de la cepa.

El éxito de la aplicación de pKC1139 frente a otras estrategias indica que la utilización de zonas homólogas relativamente pequeñas (de 1.2 kb) es suficiente para la recombinación homóloga en dicha especie, como muestran también los resultados de Goranovič y col. (2012). El éxito de la aplicación de este vector radica en que se trata de un plásmido replicativo, lo que favorece la obtención de exconjugantes y la aparición de recombinantes simples al existir múltiples copias de la construcción. Además, la realización de subcultivos (9 en medio líquido y uno en medio sólido) aumenta la proporción de genomas dobles recombinantes y, por tanto, las posibilidades de detectarlos durante el fenotipado.

III.3.5. Caracterización de los mutantes de S. tsukubaensis ApfkA

Ninguno de los mutantes presentó diferencias morfológicas con respecto a la cepa silvestre ni en medio sólido (TSA o ISP4) ni en medio líquido MGm-2.5 (resultados no mostrados). Para determinar el crecimiento y la producción de tacrolimus se realizaron fermentaciones en MGm-2.5 en las condiciones habituales. *S. tsukubaensis* $\Delta pfkA2$::Am^R, *S. tsukubaensis* $\Delta pfkA1$ [1] y *S. tsukubaensis* $\Delta pfkA1$ [3] se cultivaron por triplicado, mientras que de *S. tsukubaensis* $\Delta pfkA3$ y de la cepa silvestre se realizaron cuatro cultivos.

Cualquiera de las tres mutaciones mejora ligeramente el crecimiento de S. tsukubaensis con variaciones significativas ($p \le 0.05$ en una prueba t de Student) en t_{89 h}, t_{92 h}, t_{148 h}, t_{162.5 h} y t_{236 h} (figura 3.78). Las variaciones observadas en la producción volumétrica y específica de tacrolimus entre cepas no resultaron significativas en una prueba t de Student, a excepción de las disminuciones observadas en t_{148 h} en *S. tsukubaensis* $\Delta pfkA2$ y en $t_{236 h}$ en S. tsukubaensis $\Delta pfkA3$. Estos resultados indican una primera diferencia entre el efecto de la deleción de pfkA2 y pfkA3 (que son las secuencias con mayor similitud entre sí) con respecto a la deleción de *pfkA1*. La ausencia de efecto sobre la producción de tacrolimus indica que: 1) o bien no se produjo la estimulación de la ruta PP que se esperaba o 2) que si se produjo no tuvo un efecto positivo sobre la producción de tacrolimus. La deleción de un gen pfkA podría no tener un efecto drástico sobre los flujos metabólicos en S. tsukubaensis, ya que los parálogos remanentes podrían suplir su función. En el caso de S. coelicolor, el efecto de la deleción de pfkA2 es muy evidente debido a que codifica la actividad 6-fosfofructoquinasa principal (Borodina y col., 2008); sin embargo, en S. tsukubaensis puede ocurrir que una sola PfkA no sea la responsable de la actividad mayoritaria. Por otro lado, la disminución del flujo a través de la glucólisis a consecuencia de la deleción de un gen pfkA, en caso de producirse, puede conllevar una disminución de la formación de 1,3-bifosfoglicerato, que actúa como precursor del metoximalonil-CoA en la biosíntesis de tacrolimus. Esto explicaría la reducción de la producción observada en t_{148 h} en S. tsukubaensis $\Delta pfkA2$ y en t_{236 h} en S. tsukubaensis $\Delta pfkA3$.



Figura 3.78. Resultados de la caracterización de los mutantes de *S. tsukubaensis* $\Delta pfkA$ en MGm-2.5. A) Crecimiento. B) Producción volumétrica. C) Producción específica de tacrolimus en los caldos de cultivo.

III.3.6. Análisis de los perfiles transcripcionales de los genes pfkA en los experimentos transcriptómicos

Para presentar con claridad todos los resultados relacionados con los genes *pfkA* se incorporan en esta sección los resultados obtenidos mediante transcriptómica. Las respuestas transcripcionales a las adiciones de glucosa, glicerol, maltosa y N-acetilglucosamina se resumen en la tabla 3.20.

Tabla 3.20. Respuesta transcripcional de los genes pfkA a las adiciones realizadas en estudios transcriptómicos. Glc 70.7: ${}^{Glc}M_c{}^{70.7 h-70 h}$; Glc 72: ${}^{Glc}M_c{}^{72 h-70 h}$; Gol 70.7: ${}^{Gol}M_c{}^{70.7 h-70 h}$; Gol 72: ${}^{Gol}M_c{}^{72 h-70 h}$; Gol 70.7: ${}^{Gol}M_c{}^{70.7 h-70 h}$; Gol 72: ${}^{Gol}M_c{}^{72 h-70 h}$; Glc 70.5: ${}^{Glc}M_c{}^{70.7 h-70 h}$; Gol 72: ${}^{Gol}M_c{}^{70.7 h-70 h}$; Mal 72: ${}^{Mal}M_c{}^{72 h-70 h}$; GlcNAc 70.5: ${}^{Glc}M_c{}^{70.7 h-70 h}$; GlcNAc 72: ${}^{(GlcNAct70 h)}$ - ${}^{(Control}t70 h)$ y GlcNAc 72: ${}^{(GlcNAct72 h-GlcNAct70 h)}$ - ${}^{(Control}t72 h-Controlt70 h)$. Se indica el valor M_c de contraste solo en aquellos en los que el valor p_{FDR} fue inferior a 0.05.

Gen	Glc 70.7	Glc 72	Gol 70.7	Gol 72	Mal 70.7	Mal 72	GlcNAc 70.5	GlcNAc 72
pfkA2	1.16	1.06	-	0.50	0.74	0.66	-	-
pfkA1	-	-1	-	-0.82	-	-	-0.58	-1.48
pfkA3	2.78	3.16	-	-	-	-	1.91	2.42

La transcripción de *pfkA1* presentó un incremento durante la fase estacionaria en la serie temporal de la adición control (figura 3.79). Probablemente este gen no se transcribe durante las primeras 92 horas de cultivo o lo hace en niveles muy bajos. Siebring (2010) ha propuesto un papel gluconeogénico para su ortólogo en *S. coelicolor* (debido a que usa PPi como donador del grupo Pi), por lo que no se esperaría su expresión en presencia de glucosa. Sin embargo, el perfil transcripcional de *pfkA1* no se asemeja al de otros genes implicados en la gluconeogénesis (ver apartado III.1.3; pág. 173). Como se indicó en el apartado I.4.1.2 (pág. 60), la utilización de PfkA dependientes de PPi podría favorecer la conservación de ATP en organismos fermentadores obligados (Mertens, 1991), lo que explicaría su activación transcripcional en la fase estacionaria. Esto es coherente con la ausencia de transcripción de *pfkA1* en las condiciones de adición de glucosa y glicerol, en las que los cultivos pueden encontrarse en una situación de mayor disponibilidad de ATP.

Tanto *pfkA2* como *pfkA3* presentaron niveles de transcripción altos y comparables a lo largo de los cultivos, lo que podría explicar la ausencia de diferencias fenotípicas entre los mutantes de *S. tsukubaensis* $\Delta pfkA$, en los que el efecto de la deleción quedaría enmascarado por la actividad de PfkA3 y/o PfkA2. El perfil de *pfkA2* indica que su transcripción es constitutiva y que se induce en cierta medida por glucosa y maltosa mientras que el de *pfkA3* indica que se regula positivamente tras la adición de glucosa. Por este motivo, *pfkA3* podría codificar una PfkA con función de apoyo en determinadas condiciones nutricionales.



Figura 3.79. Perfiles transcripcionales de los genes *pfkA* en las series de adición de glucosa (línea roja), glicerol (línea azul) y control (línea negra). Panel A: *pfkA1*. Panel B: *pfkA2*. Panel C: *pfkA3*.

Los resultados obtenidos en el experimento de adición de N-acetilglucosamina indican que la transcripción de *pfkA2* no presentó variaciones significativas tras la adición ($p_{FDR} \le 0.05$) mientras que la de *pfkA1* disminuyó y la de *pfkA3* aumentó.

En el capítulo III.4 (pág. 292) se presenta un análisis transcripcional comparativo del mutante de *S. tsukubaensis* $\Delta fkbN$ respecto a su cepa parental silvestre (ambas cedidas por el doctor H. Petckovic) en MGm-2.5. El análisis de los perfiles transcripcionales de los genes *pfkA* en este mutante permite concluir que ninguno de ellos está sometido a una regulación por FkbN (figura 3.80). Al igual que en los cultivos en los que se añadió glucosa o glicerol, la transcripción de *pfkA2* se produjo de forma constitutiva. Por el contrario, los perfiles de *pfkA1* y *pfkA3* presentaron diferencias con respecto al perfil obtenido en la serie control de adición de maltosa. Esto indicaría que: 1) la adición de maltosa afecta al perfil transcripcional de *pfkA1* y *pfkA3* y/o 2) existen diferencias entre la cepa silvestre de nuestro laboratorio y la cedida por el doctor H. Petckovic.



Figura 3.80. Perfiles transcripcionales de los genes pfkA en *S. tsukubaensis* $\Delta fkbN$ (línea roja) y en la cepa silvestre (línea negra). Panel A: pfkA1. Panel B: pfkA2. Panel C: pfkA3.

III.3.7. Sobreexpresión de *glpX*

Durante el proceso de obtención de los mutantes *pfkA* se planteó como alternativa la sobreexpresión del gen que codifica la fructosa-1,6-bifosfatasa (*glpX*). Esta enzima gluconeogénica cataliza la hidrólisis de la fructosa-1,6-bifosfato y genera fructosa-6-fosfato y Pi (EC 3.1.3.11).

En *E. coli* forma parte del operón de utilización de glicerol *glpFKX* (donde *glpF* y *glpK* codifican un transportador de glicerol y una glicerol quinasa respectivamente; Weissenborn y col., 1992) y su transcripción se induce por esta fuente de carbono (Truniger y col., 1992). En *S. coelicolor* la producción de la enzima está sometida a CCR por glucosa dependiente de Glk (Gubbens y col., 2012).

El ortólogo de *glpX* de *S. coelicolor* (SCO5047) en *S. tsukubaensis* es STSU_11500. Ambas secuencias presentan una identidad nucleotídica del 85 % y una similitud aminoacídica del 95 % con el algoritmo de Needleman-Wunsch. Como se puede observar en la figura 3.81, la transcripción de *glpX* de *S. tsukubaensis* se produce a altos niveles y de forma constitutiva tras la adición de glicerol, lo que concuerda con lo observado en *E. coli*. Por el contrario, la adición de glucosa reguló negativamente y de forma significativa ($p_{FDR} \le 0.05$) su transcripción ($^{Glc}M_c^{70.7 h-70 h} = -2.67$). Mientras que la disminución de la transcripción tras la adición de glucosa tiene un carácter transitorio, en la condición control es prácticamente constante.



Figura 3.81. Perfil transcripcional de *glpX* (STSU_11500) en *S. tsukubaensis* en las condiciones de adición de glucosa (línea roja), glicerol (línea azul) y control (línea negra). La disminución de la transcripción tras la adición de maltosa no fue significativa ($p_{FDR} \le 0.05$).

III.3.7.1. Diseño de la construcción pIB139-glpX

Para sobreexpresar *glpX* se recurrió a la utilización del vector pIB139 (Wilkinson y col., 2002), que presenta el promotor fuerte constitutivo *ermE** y que ha sido aplicado con éxito en *S. tsukubaensis* anteriormente (Chen y col., 2012; Huang y col., 2013a; 2013b).

La región cromosómica que contiene *glpX* se amplificó con la ADN polimerasa de alta fidelidad Hybrid[®] (EURx) y los cebadores CMO80 y CMO81 (II.4.2.3; pág. 102). Se

amplificaron las 87 pb anteriores al inicio de traducción del gen para incorporar el sitio de unión al ribosoma. La composición de la mezcla de reacción y el programa de termociclación se detallan en la tabla 3.21.

Tabla 3.21. Composición de la mezcla de reacción y programa de termociclación para la amplificación de un inserto que contiene *glpX* de *S. tsukubaensis*.

Componente	Concentración final		
dNTP	0.2 mM		
Cebadores	0.5 μM de cada uno		
Molde	2.5 ng/μl		
DMSO	4 %		
Polimerasa Hybrid®	0.02 U/µl		
Tampón Hybrid® 10 ×	1 ×		

NOTA: El tampón viene suministrado con la enzima y contiene MgCl₂15 mM.

Temperatura (º C)	Duración (s)	Nº ciclos
95	0	
98	59	1
98	15	_
81	15	20
72	38	
98	15	_
61	15	11
72	38	
72	600	1
4	0	

El producto de 1295 pb se extrajo de un gel de agarosa y se digirió con EcoRI y Xbal. Tras clonarlo en el vector pUC19 digerido con las mismas enzimas y comprobar la secuencia del inserto por secuenciación con los cebadores CMO36 y reverso universal (II.4.2.3; pág. 102), se extrajo de pUC19 por digestión con EcoRI y Xbal y se clonó en pIB139 digerido con las mismas enzimas. La construcción final, denominada pIB139-*glpX* (7205 pb) se esquematiza en la figura 3.82.

Las construcciones pIB139-*glpX* y pIB139 se introdujeron en *E. coli* ET12567/pUZ8002 por transformación química (apartado II.7.11.2; pág. 132) y, posteriormente, en *S. tsukubaensis* mediante conjugación intergenérica siguiendo el protocolo habitual (apartado II.7.12.1; pág. 133). Dos exconjugantes de cada construcción (identificados en adelante como [1] y [2]) se sembraron en TSA con ácido nalidíxico y apramicina para confirmar su fenotipo Am^R y, posteriormente, se sembraron en ISP4 sin antibiótico para esporular.



Figura 3.82. Representación del vector pIB139-*glpX* utilizado para sobreexpresar *glpX* en *S. tsukubaensis*.

III.3.7.2. Comprobación del funcionamiento de la construcción pIB139-*glpX* mediante RT-qPCR y caracterización de *S. tsukubaensis*/pIB139-*glpX*

• Comprobación de la sobreexpresión de glpX mediante RT-qPCR

Para comprobar el funcionamiento de la construcción se realizó un cultivo en medio MGm-2.5 de las cepas de *S. tsukubaensis*/pIB139-*glpX* y *S. tsukubaensis*/pIB139. Se cultivaron los dos clones de cada cepa por duplicado, excepto en el caso de *S. tsukubaensis*/pIB139-*glpX* [1], que se cultivó por triplicado. Con la intención de realizar experimentos de adición de glucosa posteriormente, se decidió añadir maltosa a las 70 h de cultivo y a la concentración final habitual (111 mM) para facilitar la comparación de los resultados de ambos experimentos. Los resultados de crecimiento y producción de tacrolimus se detallan en el apartado posterior.

A las 70 h y 120 h se tomaron muestras para extraer ARN (II.8.1.1; pág. 140) de dos cultivos de S. tsukubaensis/pIB139-glpX [1] y de dos cultivos de S. tsukubaensis/pIB139 [1] (8 muestras en total). El ARN se extrajo siguiendo el protocolo indicado en el apartado II.8.1.2 (pág. 140), se purificó (II.8.4.4; pág. 158) y se utilizó como molde para la síntesis de ADNc (II.8.4.5; pág. 159). Para analizar la transcripción de glpX se utilizó la pareja de cebadores CMOq44 y CMOq45 y como ensayo normalizador se utilizó el de gyrB (cebadores CMOq105-CMOq106; II.4.2.3; pág. 102). Las reacciones de RT-qPCR se realizaron por triplicado en una misma placa multipocillo siguiendo las indicaciones del apartado II.8.4.6 (pág. 160). El análisis de los resultados se realizó con el programa MxPro-Mx3005P y se seleccionó como muestra calibradora la tomada en t_{70 h} de uno de los cultivos de S. tsukubaensis/pIB139 [1]. Como se puede observar en la figura 3.83, no se detectaron diferencias en los niveles de transcripción de glpX en t_{70 h} pero la disminución de la transcripción observada en t_{120 h} fue menor en la cepa S. tsukubaensis/pIB139-glpX [1] (valor logarítmico promedio de transcripción relativa al calibrador de -1.72), que en S. tsukubaensis/pIB139 [1] (valor logarítmico promedio de transcripción relativa al calibrador de -6.53). Este resultado indica que en $t_{70 h}$ la transcripción de *qlpX* desde su propio promotor es tan intensa que la sobreexpresión desde el promotor ermE* tiene un efecto imperceptible; sin embargo, en una fase más tardía de crecimiento, en la que la transcripción nativa disminuye, la

sobreexpresión tiene un efecto notorio (al menos cuatro unidades logarítmicas de diferencia).

Los resultados obtenidos en el caso de *S. tsukubaensis*/pIB139 [1] concuerdan con el perfil transcripcional de *glpX* observado en la condición control de adición de maltosa. En el experimento transcriptómico el valor logarítmico de transcripción de *glpX* pasó de 5.21 en $t_{70 h}$ a 0.87 en $t_{124 h}$ (ver figura 3.81).



Figura 3.83. Representación generada por MxPro-Mx3005P de la transcripción de *glpX* en los cultivos de las cepas *S. tsukubaensis*/pIB139-*glpX* [1] (línea continua) y *S. tsukubaensis*/pIB139 [1] (línea punteada). Con un asterisco se indica la muestra elegida como calibrador. Las barras de error representan la desviación típica de las réplicas técnicas de las reacciones de RT-qPCR.

• Caracterización de S. tsukubaensis/pIB139-glpX

Las colonias aisladas de las cepas S. tsukubaensis/pIB139-alpX y S. tsukubaensis/pIB139 no presentaron diferencias morfológicas respecto a la cepa silvestre en medio ISP4; sin embargo, el medio de cultivo presentó una coloración rosada intensa a partir del cuarto día de incubación en ambos casos (resultados no mostrados). Dicho pigmento rosado se produce especialmente en medio ISP2 y también se ha asociado a la presencia de agentes estresantes en medio ISP4 como DMSO (Martínez-Castro y col., 2013). La integración del vector pIB139 en S. tsukubaensis D852 no tuvo ningún efecto en las condiciones ensayadas por Huang y col. (2013a; 2013b), lo que sugiere que dicha cepa tiene un fondo genético diferente al de la NRRL 18488.

La determinación del crecimiento y producción de tacrolimus se llevó a cabo en medio MGm-2.5, siguiendo las condiciones habituales de cultivo. Como se indicó anteriormente, los cultivos de los cuatro clones se realizaron por duplicado, excepto el de *S. tsukubaensis*/pIB139-*glpX* [1], que se realizó por triplicado y a las 70 h se añadió maltosa a la concentración habitual. Se tomaron muestras para determinar el crecimiento a las 70 h,

89 h, 92 h, 100 h, 148 h, 162.5 h y 236 h y para extracción de tacrolimus a partir de las 92 horas.

En ambas cepas uno de los clones presentó un crecimiento más retrasado, pero los valores promedio de crecimiento indicaron que no se produjeron diferencias de crecimiento entre ambas (figura 3.84). La producción volumétrica de tacrolimus en $t_{162.5 h}$ fue mayor en la cepa de *S. tsukubaensis* pIB139-*glpX* que en la cepa control, aunque con un valor *p* no significativo (valor *p* = 0.07 en la prueba t de Student).



Figura 3.84. Resultados de la caracterización de *S. tsukubaensis*/pIB139 y *S. tsukubaensis*/pIB139-*glpX* en MGm-2.5 al que se añadió maltosa a las 70 h de cultivo. A) Crecimiento. B) Producción volumétrica. C) Producción específica de tacrolimus en los caldos de cultivo. La línea gris representa los datos de la cepa *S. tsukubaensis*/pIB139-*glpX* y la línea negra los de la cepa *S. tsukubaensis*/pIB139. Los datos representados son el promedio de los obtenidos a partir de dos clones de cada cepa, que se cultivaron por duplicado o triplicado (ver texto).

• Respuesta a la adición de glucosa de S. tsukubaensis/pIB139-glpX [1] y

S. tsukubaensis/pIB139 [1]

La sobreexpresión de glpX podría generar una reducción del flujo glucolítico a favor de la ruta PP, por lo que se planteó la posibilidad de que los niveles intracelulares de fructosa-1,6-bifosfato fueran inferiores en S. tsukubaensis/pIB139-glpX con respecto a S. tsukubaensis/pIB139. Puesto que la fructosa-1,6-bifosfato es uno de los intermediarios glucolíticos que podría mediar la CCR por glucosa en Streptomyces (Ramos y col., 2004), la sobreexpresión de glpX podría aliviar el efecto represor de la adición de glucosa. Para comprobar esta hipótesis se realizaron cultivos por duplicado de S. tsukubaensis/pIB139-qlpX [1] y S. tsukubaensis/pIB139 [1] en MGm-2.5 al que se añadió glucosa a las 70 h de crecimiento a la concentración final utilizada habitualmente (222 mM).

Como se puede observar en la figura 3.85, el crecimiento de ambas cepas fue similar. La cepa *S. tsukubaensis*/pIB139 [1] no produjo tacrolimus; sin embargo, en los cultivos de *S. tsukubaensis*/pIB139-*glpX* [1] se detectaron (3.43 ± 2.08) µg/ml y (0.78 ± 1.34) µg/ml (media y desviación típica) de tacrolimus en las muestras $t_{162.5 h}$ y $t_{236 h}$, respectivamente (resultados no mostrados). Estos resultados apoyan la hipótesis planteada, aunque sería necesario valorar las concentraciones intracelulares de fructosa-1,6-bifosfato para su comprobación.



Figura 3.85. Crecimiento de *S. tsukubaensis*/pIB139*-glpX* [1] (línea gris) y *S. tsukubaensis*/pIB139 [1] (línea negra) en medio MGm-2.5 al que se añadió glucosa a una concentración final de 222 mM a las 70 h de cultivo.

III.3.8. Expresión heteróloga de la agrupación de tacrolimus en *Streptomyces coelicolor* Δ*pfkA2*

Mientras que la deleción de *pfkA2* en *S. coelicolor* genera un incremento de la producción de antibióticos pigmentados (Borodina y col., 2008) no se obtuvo un efecto

equivalente en *S. tsukubaensis*, posiblemente debido a que dicha mutación no estimuló el flujo a través de la ruta PP y/o se redujo la formación del precursor 1,3-bifosfoglicerato. Para analizar si tal diferencia es debida a variaciones funcionales de PfkA2 entre ambas especies, se expresó heterólogamente la agrupación de tacrolimus en *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$ y en *S. coelicolor* M145 con el fin de comprobar el efecto de la deleción sobre la producción de tacrolimus.

III.3.8.1. Introducción de la agrupación biosintética de tacrolimus en *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* Δ*pfkA2*

Este procedimiento se realizó en el Instituto Farmacéutico de la Universidad de Tubinga (Alemania), bajo la supervisión de los doctores Adam Jones y Lutz Heide. El vector utilizado para transferir la agrupación biosintética de tacrolimus a *S. coelicolor* fue un cromosoma artificial derivado del fago P1 (denominado PAC20N, del inglés *phage P1-derived* <u>Artificial Chromosome</u>) de 130 kb que se había utilizado anteriormente con las cepas de *S. coelicolor* M512, *S. coelicolor* M1146, *S. coelicolor* M1152 y *S. coelicolor* M1154 (Jones y col., 2013). Este vector procede de la clonación de un inserto de 109.5 kb que contiene la agrupación de tacrolimus en el vector integrativo pESAC13 (*tsr, bla, kan,* integrasa φC31).

La transferencia de la construcción a *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$ (Am^R) se realizó por conjugación con la cepa *E. coli* ET12567/pR9406/PAC20N según el protocolo indicado en el apartado II.7.12.3 (pág. 135). Esta cepa se cultivó previamente en LB en presencia de cloranfenicol, kanamicina y carbenicilina (para mantener la mutación *dam*⁻, el cromosoma PAC20N y el plásmido guía pR9406, respectivamente). A los 4 días de incubación tras la aplicación de la cobertera de conjugación de ácido nalidíxico y tioestreptona, se sembraron 20 colonias de cada placa de conjugación en agar nutritivo de DifcoTM (DNA) con ácido nalidíxico y tioestreptona y se incubó a 30 °C durante 48 h para confirmar el fenotipo Tio^R. Se seleccionaron las tres colonias de exconjugantes que presentaron mejor crecimiento y se sembraron en TSA con tioestreptona (en el caso de *S. coelicolor* M145) o TSA con tioestreptona y apramicina (en el caso de *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$). A partir del micelio obtenido se sembraron placas con TBO sin antibióticos para obtener una suspensión de esporas.

III.3.8.2. Análisis de la producción de tacrolimus en S. coelicolor M145/PAC20N y S. coelicolor ΔpfkA2/PAC20N

Se realizó un cultivo de cada exconjugante (total 6 cultivos) en 100 ml de medio MGm-2.5, en matraces con hendiduras de 500 ml de capacidad inoculados con 10⁸ esporas e incubados a 30 °C y 300 r.p.m. La fermentación se prolongó hasta las 65 h, tiempo suficiente para detectar producción de actinorrodina y de undecilprodigiosina (Santos-Beneit y col., 2009a). Se tomaron muestras para la determinación del crecimiento por peso seco a las 41 h, 47 h y 65 h y para la extracción de tacrolimus a las 41 h y 65 h.

Como se puede observar en la figura 3.86, el crecimiento del exconjugante de *S. coelicolor* M145/PAC20N [1] fue muy reducido, por lo que se descartó su utilización en estudios posteriores.



Figura 3.86. Crecimiento de los seis exconjugantes de S. coelicolor M145 y S. coelicolor Δ*pfkA2*/PAC20N en MGm-2.5. Negro: *S. coelicolor* M145/PAC20N [1]; gris: S. coelicolor M145/PAC20N [2]; naranja: S. coelicolor M145/PAC20N [3]; azul: S. coelicolor Δ*pfkA2*/PAC20N [1]; $\Delta pfkA2$ /PAC20N [2]; rojo: S. coelicolor verde: S. coelicolor Δ*pfkA2*/PAC20N [3].

La valoración cualitativa de tacrolimus se realizó mediante bioensayo con *S. cerevisiae* TB23 (apartado II.6.3.2; pág. 110). No se obtuvo ningún halo de inhibición con ninguna de las muestras (resultados no mostrados). En el análisis HPLC no se identificaron picos de retención correspondientes a tacrolimus, de modo que se concentraron las muestras en una centrífuga de vacío hasta sequedad y se rediluyeron en metanol al 50 %, lo que aumentó su concentración en un factor de 4.45. Estas muestras, que presentaron un aspecto caramelizado probablemente debido al alto contenido en almidón del medio, tampoco presentaron actividad antibiótica frente a *S. cerevisiae* TB23. Cuando se inyectaron en el HPLC, los niveles de ruido basal de los cromatogramas fueron tan altos que impidieron discriminar algún pico correspondiente a tacrolimus.

También se realizaron cultivos siguiendo la metodología empleada por Jones y col. (2013), que consiste en la inoculación de 3 ml de medio MGm-2.5 con 75 µl de un homogeneizado de micelio y su incubación a 28 °C y 300 rpm en placas multipocillo durante 6 días exactos, con la recogida de una sola muestra a las 144 h (para la valoración del peso seco y de la producción de tacrolimus). Se realizaron 9 cultivos de cada exconjugante y 6 cultivos control con *S. tsukubaensis* y la extracción de tacrolimus se realizó con acetato de etilo en vez de metanol. Una vez evaporado el acetato mediante tratamiento en centrífuga de vacío, se rediluyó la muestra en metanol al 50 %, lo que supuso un factor de concentración de 85. En el análisis HPLC de estas muestras tampoco se detectaron picos de retención correspondientes a tacrolimus, por lo que se recogieron las fases correspondientes y se analizaron mediante LC-MS. Este análisis permitió determinar la existencia de tacrolimus en las muestras, pero en concentraciones muy inferiores al límite de detección del HPLC (resultados no mostrados). Aunque la presencia de tacrolimus en las muestras indica que se produjo expresión heteróloga de la agrupación biosintética de tacrolimus en *S. coelicolor*, la escasa producción obtenida podría ser debida a: 1) una débil expresión de la agrupación en

estas cepas o 2) al desvío de precursores de tacrolimus hacia la biosíntesis de antibióticos pigmentados. En todo caso, estos resultados no permitieron determinar el efecto de la deleción de *pfkA2* sobre la producción de tacrolimus en *S. coelicolor*.

III.3.8.3. Análisis transcriptómico de las cepas de S. coelicolor M145/PAC20N y S. coelicolor ΔpfkA2/PAC20N

Para determinar si la baja producción de tacrolimus en *S. coelicolor* se debe a una expresión pobre de la agrupación de tacrolimus se planteó un análisis transcriptómico comparativo entre *S. coelicolor* Δ*pfkA2*/PAC20N γ *S. coelicolor* M145/PAC20N, orientado principalmente al análisis de la transcripción de los genes biosintéticos.

Para ello se cultivaron por triplicado las cepas de *S. coelicolor* M145/PAC20N [2], *S. coelicolor* M145/PAC20N [3], *S. coelicolor* $\Delta pfkA2/PAC20N$ [1] y *S. coelicolor* M145/PAC20N [3], ya que fueron las que presentaron unas curvas de crecimiento más similares en experimentos anteriores. Los cultivos se realizaron en medio MGm-2.5 en las mismas condiciones que en el experimento anterior pero durante 120 h. Se recogieron muestras para la determinación del crecimiento mediante medida del peso seco (a las 35 h, 45 h, 50 h, 55 h, 75 h, 96 h y 120 h), extracción de ARN (de las 35 h y a las 96 h) y extracción de tacrolimus (96 h y 120 h).

De los 12 cultivos se seleccionaron, en base a la similitud de sus curvas de crecimiento, dos cultivos de *S. coelicolor* $\Delta pfkA2/PAC20N$ [3], un cultivo de *S. coelicolor* M145/PAC20N [1] y un cultivo de *S. coelicolor* M145/PAC20N [2]. Los valores de peso seco alcanzados por *S. coelicolor* $\Delta pfkA2/PAC20N$ fueron menores que los de *S. coelicolor* M145/PAC20N (ver figura 3.87), aunque solo fue estadísticamente significativa la diferencia detectada en t_{50 h} ($p \le 0.05$ en la prueba t de Student). A partir de éstos se extrajo ARN total de micelio según lo indicado en el apartado II.8.1 (pág. 139). El ARN obtenido a partir de las muestras t_{75 h} y t_{96 h}, presentó una mayor integridad que el obtenido en las muestras anteriores, al contrario de lo que ocurre normalmente. El ARN se utilizó como molde para obtener ADNc marcado con Cy^{T-}-3-dCTP (apartados II.8.3.3 y II.8.3.4; págs. 148 y 149) y como señal de referencia en las hibridaciones se utilizó ADNg de *S. coelicolor* M145/PAC20N [2] extraído por *salting out* y marcado con CyTM-5 (apartados II.7.2.1 y II.8.3.2; págs. 116 y 147).

En total se hibridaron 16 micromatrices de diseño 062686 (apartado II.8.3; pág. 145) que incluyeron las 6 muestras de un cultivo de cada cepa (en el caso de *S. coelicolor* M145 el del exconjugante [2]) y las muestras $t_{35 h}$ y $t_{50 h}$ de los cultivos. En consecuencia, solo los puntos $t_{35 h}$ y $t_{50 h}$ de las gráficas mostradas a continuación presentan barras de error. La cantidad de marcaje añadido en las hibridaciones y las condiciones de hibridación, lavados y detección de la fluorescencia se especifican en los apartados II.8.3.6, 3 y II.8.3.8 (págs. 151, 153 y 154).

Para valorar las diferencias en los niveles de transcripción se realizaron varios contrastes estadísticos con limma. Un primer tipo de contraste fue aquel en el que se comparó los valores de $t_{50 h}$ con respecto a $t_{35 h}$ de la misma cepa siguiendo la fórmula $t_{50 h}$ - $t_{35 h}$. Un segundo tipo de contrastes que permitieron comparar variaciones tempranas y tardías entre cepas fueron los realizados siguiendo las fórmulas $p^{fkA}t_{35 h}$ - $s^{l}t_{35 h}$ y $p^{fkA}t_{50 h}$ - $s^{l}t_{50 h}$.

Los resultados obtenidos se presentan en el archivo III.1 del Material Suplementario.



Figura 3.87. Crecimiento en los cultivos de *S. coelicolor* M145/PAC 20N (línea negra) y *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$ /PAC20N (línea gris) utilizados para la extracción de muestras en estudios transcriptómicos.

Perfil transcripcional de la agrupación biosintética de tacrolimus

La agrupación biosintética de tacrolimus presentó niveles de transcripción muy bajos en ambas cepas de *S. coelicolor* (valores M_g en torno a -1). Este resultado explica la escasa producción detectada. Las mayores diferencias entre cepas se produjeron en $t_{45 h}$ y $t_{50 h}$ y los niveles de transcripción fueron mayores en la cepa de *S. coelicolor* M145/PAC20N que en *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$ /PAC20N (ver figura 3.88). Esto implica que, desde un punto de vista transcripcional, la deleción de *pfkA2* afecta negativamente a la producción de tacrolimus en esta especie.



Figura 3.88. Valores M_g de transcripción de las sondas teseladas pertenecientes a la agrupación biosintética de tacrolimus en las cepas *S. coelicolor* M145/PAC20N (rojo) y *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$ /PAC20N (azul) a las 35 h, 50 h y 96 h de cultivo.

Los genes que presentaron mayores niveles de transcripción en ambas cepas fueron *fkbQ* (valores M_g en torno a 3), *fkbN* y *fkbG* (valores M_g en torno a 2).

Mientras que en *S. tsukubaensis* los genes *allS, allO, allP, allN* y *allM* presentaron un perfil común, en *S. coelicolor* se distinguieron dos subgrupos: *allO-allP* y *allM-allN-allS*. Del mismo modo, los genes *fkbM, fkbD, fkbA, fkbB, fkbC, fkbH, fkbI, fkbJ, fkbK, fkbL, fkbO* y *fkbP,* que en *S. tsukubaensis* presentaron un perfil común (grupo III), en *S. coelicolor* se subdividieron en cuatro grupos: *fkbM-fkbD, fkbA-fkbB-fkbC, fkbH-fkbI-fkbJ-fkbK-fkbL* y *fkbO-fkbP* (resultados no mostrados). La subdivisión de los grupos de genes realizados a partir de los datos transcripcionales de *S. tsukubaensis* en *S. coelicolor* indica posibles diferencias en la regulación de sus componentes.

• Perfiles transcripcionales de los genes pfkA en S. coelicolor

Los valores M_g de transcripción de *pfkA2* en *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$ /PAC20N fueron muy bajos como cabía esperar debido a la deleción del gen (valores M_c^{*pfkA-SI*} de -5.26 y -4.96 en t_{35 h} y t_{50 h}, respectivamente). En el trabajo original no se detectó una disminución de los niveles de transcrito de *pfkA2* en la cepa mutante en medio mínimo definido limitado en Pi y los autores propusieron una inducción de la transcripción de *pfkA1* y/o *pfkA3* como mecanismo compensatorio (Borodina y col., 2008); sin embargo, en nuestros resultados se observa que los niveles de transcripción de *pfkA1* y *pfkA3* fueron equivalentes en S. coelicolor $\Delta pfkA2/PAC20N$ y S. coelicolor M145/PAC20N y no presentaron variaciones significativas ni en t_{35 h} ni en t_{50 h} (ver figura 3.89). Por lo tanto, se descarta una inducción transcripcional de *pfkA1* y/o *pfkA3* como consecuencia de la deleción de *pfkA2* en medio MGm-2.5.

Al igual que en *S. tsukubaensis*, *pfkA2* y *pfkA3* presentaron niveles de transcripción altos, mientras que *pfkA1* presentó unos niveles de transcripción bajos. La transcripción de *pfkA2* presentó valores M_g superiores a los de *pfkA3*, lo que concuerda con su papel como gen codificante de la actividad PfkA principal en *S. coelicolor* (Borodina y col., 2008). Al contrario que en *S. tsukubaensis*, la transcripción de *pfkA1* no se indujo en fase estacionaria (variación no significativa de $t_{35 h}$ a $t_{50 h}$ en ninguna cepa), lo que podría indicar una diferente regulación transcripcional de ambos ortólogos o diferencias metabólicas entre las dos especies.



Figura 3.89. Perfiles transcripcionales de los genes *pfkA* de *S. coelicolor* M145/PAC20N y *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$ /PAC20N (representados en negro y verde, respectivamente). Cada punto representa el valor promedio de múltiples sondas y además, en t₃₅ h y t₅₀ h de dos réplicas biológicas. No se han representado las barras de error para simplificar la visualización de los perfiles. En la parte superior se representan los perfiles de los ortólogos de *S. tsukubaensis* obtenidos en el experimento de adición de fuentes de carbono para facilitar la comparación.

Perfiles transcripcionales de las agrupaciones de actinorrodina,

undecilprodigiosina y CDA

Aunque no se determinó cuantitativamente la producción de actinorrodina y undecilprodigiosina, se observó que los cultivos de *S. coelicolor* $\Delta pfkA2/PAC20N$ adelantaron la producción de actinorrodina con respecto a la cepa *S. coelicolor* M145/PAC20N (ver figura 3.90). Por este motivo y para comparar los resultados obtenidos por Borodina y col. (2008) con los de este experimento, se decidió analizar los perfiles de los genes de las agrupaciones de actinorrodina, undecilprodigiosina y CDA. Además, se empleó el contraste estadístico realizado con limma $pfkAt_{50 h}$. El análisis visual de los perfiles de las agrupaciones de actinorrodina, undecilprodigiosina y CDA distinguió dos grupos de genes: aquellos que presentaron niveles de transcripción equivalentes en ambas cepas y aquellos que

presentaron valores M_g de transcripción superiores en la cepa silvestre que en la mutante en la etapa inicial (hasta $t_{55 h}$).



Figura 3.90. Sobrenadantes y precipitados de las muestras de los cultivos de S. coelicolor $\Delta pfkA2/PAC20N$ (A) y S. coelicolor M145/PAC20N (B).

En la agrupación biosintética de actinorrodina (SCO5071-SCO5092) todos los genes incrementaron su transcripción de manera significativa entre $t_{35 h}$ y $t_{50 h}$ en la cepa de *S. coelicolor* M145/PAC20N, pero en *S. coelicolor* $\Delta pfkA2/PAC20N$ solo incrementaron su transcripción de forma significativa SCO5081 (*actVA6*), SCO5082 (*actII-1*) y SCO5083 (*actII-2*; ver figura 3.91). SCO5081-SCO5085 presentaron niveles de transcripción comparables en ambas cepas, sin diferencias significativas ($p_{FDR} \le 0.05$) en $t_{50 h}$, salvo en el caso de SCO5081 ($M_c^{pfkA-SI} = -0.78$). Mientras que Borodina y col. (2008) detectaron un incremento significativo de la transcripción del regulador codificado por *actII-orf4* (SCO5085) y de la cetoacil reductasa codificada por *actIII* (SCO5086) en la cepa mutante en medio mínimo definido limitado en Pi, en medio MGm-2.5 no se detectaron diferencias significativas entre estas cepas en $t_{50 h}$.



Figura 3.91. Perfiles transcripcionales de la agrupación biosintética de actinorrodina en *S. coelicolor* M145/PAC20N (negro) y en *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$ /PAC20N (verde). En el panel de la izquierda se representan los promedios de los genes considerados, en el panel del medio se representan los perfiles en la cepa silvestre y en el panel de la derecha los perfiles en la cepa mutante. Grupo A: SCO5071-SCO5080 y SCO5086-SCO5092; grupo B: SCO5081-SCO5085. Cada punto representa el valor promedio de múltiples sondas y en t_{35 h} y t_{50 h} los datos de dos réplicas biológicas. No se han representado las barras de error para simplificar la visualización de los perfiles.

En la agrupación biosintética de undecilprodigiosina (SCO5877-SCO5899) se detectaron dos tipos de perfiles diferentes entre los genes que presentaron niveles de transcripción mayores en la cepa silvestre (ver figura 3.92). Solo SCO5897 (*redG*) presentó un aumento significativo de la transcripción entre $t_{35 h}$ y $t_{50 h}$ en la cepa silvestre. Por el contrario, ningún gen varió significativamente su transcripción en la cepa mutante entre ambos tiempos. El regulador codificado por SCO5877 (*redD*) y el transportador de grupos acilo codificado por SCO5887 (*redQ*) se transcribieron al mismo nivel en ambas cepas, al igual que ocurrió en medio mínimo definido limitado en Pi (Borodina y col., 2008).



Figura 3.92. Perfiles transcripcionales de la agrupación biosintética de undecilprodigiosina en *S. coelicolor* M145/PAC20N (negro) y en *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$ /PAC20N (verde). En el panel de la izquierda se representan los promedios de los genes considerados, en el panel del medio se representan los perfiles en la cepa silvestre y en el panel de la derecha los perfiles en la cepa mutante. Grupo A1, SCO5878-SCO5081; grupo A2: SCO5882-SCO5883 y SCO5886-SCO5899 y grupo B: SCO5884-SCO5885 y SCO5877. Cada punto representa el valor promedio de múltiples sondas y en t_{35 h} y t_{50 h} los datos de dos réplicas biológicas. No se han representado las barras de error para simplificar la visualización de los perfiles.

En el caso de la agrupación de CDA, se analizaron los perfiles del regulador codificado por *cdaR* (SCO3217) y de las péptido sintetasas codificadas por SCO3230-SCO3232 (figura 3.93). La transcripción de *cdaR* incrementó de forma significativa entre $t_{35 h}$ y $t_{50 h}$ en ambas cepas y no existieron diferencias significativas en los niveles de transcripción en $t_{50 h}$ entre cepas. La transcripción de los genes estructurales aumentó de forma significativa entre
$t_{35 h}$ y $t_{50 h}$ en la cepa silvestre, pero no en la mutante y solo SCO3232 presentó una disminución significativa de la transcripción en $t_{50 h}$ en la cepa mutante ($M_c^{pfkA-SI} = -1.45$).



Figura 3.93. Perfiles transcripcionales del regulador *cdaR* y las péptido sintetasas de CDA (SC03230-SC03232) en *S. coelicolor* M145/PAC20N (negro) y en *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$ /PAC20N (verde). Cada punto representa el valor promedio de múltiples sondas y en t_{35 h} y t_{50 h} los datos de dos réplicas biológicas. No se han representado las barras de error para simplificar la visualización de los perfiles.

Los resultados obtenidos sobre la transcripción de genes de las agrupaciones de actinorrodina y CDA son equivalentes a los obtenidos con la agrupación biosintética de tacrolimus y sugieren que la deleción de *pfkA2* afecta negativamente a la transcripción de algunos de ellos en medio MGm-2.5. Además, se observaron algunas discrepancias en cuanto a la transcripción de *actII-orf4* y *actIII* con respecto a los resultados de Borodina y col. (2008), que seguramente se deben a la utilización de medios de cultivo diferentes.

Durante el análisis de los datos transcriptómicos de *S. coelicolor* se detectaron 17 genes cuya transcripción aumentó de forma significativa en $t_{50 h}$ con valores $M_c^{pfkA-SI} \ge 2 y$ que, además, se encuentran en la misma región cromosómica (SCO4672-SCO4694). En el trabajo de Borodina y col. (2008) se describe que el mutante $\Delta pfkA2$ se generó a partir de la cepa M145 procedente del John Innes Centre (Norwich, Reino Unido) y también a partir de una cepa cedida por Matthias Redenbach que presenta una duplicación de 20 genes (en la región SCO4672-SCO4695), por lo que se deduce que la cepa $\Delta pfkA2$ enviada a nuestro laboratorio fue la obtenida a partir de esta última. Aunque en dicho trabajo se indica que ambas cepas no presentan diferencias morfológicas en medio líquido o sólido (ni entre silvestres ni entre mutante; dos de los 17 genes detectados en nuestro estudio codifican una proteína de unión a ADN y un regulador transcripcional (SCO4680 y SCO4673), cuyos efectos podrían ser importantes.

También se detectaron 82 genes cuya transcripción disminuyó en la cepa de S. coelicolor $\Delta pfkA2/PAC20N$ en t_{50 h} con valores $M_c^{pfkA-SI} \leq -2$ y que se localizan en el inicio del brazo izquierdo, donde ocupan una región de 300 kb aproximadamente (SCO0038-SCO0324).

III.3.9. Sinopsis sobre el estudio de los genes *pfkA* y el efecto de la sobreexpresión de *glpX* en *Streptomyces tsukubaensis*

En el genoma de *S. tsukubaensis* se encuentran tres genes parálogos que codifican enzimas con actividad 6-fosfofructoquinasa (*pfkA1*, *pfkA2* y *pfkA3*). La naturaleza del residuo 104 indica que PfkA1 es dependiente de PPi, mientras que PfkA2 y PfkA3 (que son las que presentan mayor similitud entre sí) son dependientes de ATP. La deleción de cualquiera de los tres genes *pfkA* no afecta a la morfología de las colonias en medio sólido y favorece ligeramente el crecimiento de *S. tsukubaensis* en medio MGm-2.5; sin embargo, la producción de tacrolimus no se ve afectada negativamente por la deleción de ningún gen *pfkA*, salvo en t_{148 h} en el mutante en *pfkA2* y en t_{236 h} en el mutante en *pfkA3*.

El análisis de los perfiles transcripcionales de los genes *pfkA* en los diferentes experimentos transcriptómicos realizados puso de manifiesto características definitorias de cada gen:

- La transcripción de *pfkA2* en medio MGm-2.5 se produce de forma constitutiva y a altos niveles durante la fermentación y presenta una regulación positiva significativa tras la adición de glucosa y maltosa. Se propone como PfkA dependiente de ATP constitutiva en *S. tsukubaensis*.
- La transcripción de *pfkA1* se activa a partir de las 92 horas de cultivo en MGm-2.5 al que se añade maltosa, pero no cuando se añade glucosa o glicerol. Presenta una respuesta inmediata de regulación negativa tras la adición de N-acetilglucosamina. Puesto que su perfil transcripcional no se asemeja al de los genes específicos de la gluconeogénesis, su participación en dicha ruta anabólica no parece probable. La utilización de PPi como sustrato donador del grupo Pi en la fosforilación de la fructosa-6-fosfato permite a la célula conservar ATP, lo que podría explicar su activación transcripcional coincidiendo con el inicio de la fase estacionaria. Se propone como PfkA dependiente de PPi utilizada en condiciones de baja disponibilidad energética.
- La transcripción de *pfkA3* en medio MGm-2.5 se produce a niveles altos en todas las condiciones ensayadas. Su característica definitoria es la regulación positiva de su transcripción tras las adiciones de glucosa y N-acetilglucosamina. Se propone como PfkA dependiente de ATP con función de apoyo en determinadas condiciones nutricionales.
- Ninguno de los tres genes *pfkA* es dependiente del regulador transcripcional FkbN.

En *S. coelicolor pfkA2* codifica la actividad 6-fosfofructoquinasa principal y su deleción aumenta la producción de antibióticos pigmentados, tanto en medios ricos como en medio mínimo definido limitado en Pi (Borodina y col., 2008). En *S. tsukubaensis* no se produjo el mismo efecto en medio MGm-2.5, debido probablemente a la actividad de PfkA3, cuyo gen se transcribe a niveles altos.

Los estudios de expresión heteróloga de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus en *S. coelicolor* M145 y *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$ indican que la deleción de pfkA2 afecta negativamente a la transcripción de algunos genes de las agrupaciones de tacrolimus, actinorrodina y CDA en medio MGm-2.5. Este resultado se contrapone con lo observado por Borodina y col. (2008), que describen un aumento de la transcripción del regulador positivo de la agrupación de actinorrodina *actII-orf4* como consecuencia de la mutación. Tal diferencia podría estar más relacionada con la utilización de medios de cultivo diferentes que con diferencias funcionales de PfkA2. La diferencia más importante entre *S. tsukubaensis* y el organismo modelo en medio MGm-2.5 es la transcripción de *pfkA1*: en *S. coelicolor* no presenta la activación que se observa en *S. tsukubaensis* coincidiendo con el inicio de la fase estacionaria. Por otro lado, los niveles de transcripción de *pfkA3* son inferiores a los de *pfkA2* en *S. coelicolor*; mientras que en *S. tsukubaensis* son comparables.

Como alternativa a la deleción de genes *pfkA* en *S. tsukubaensis* para reducir el flujo a través de la glucólisis se recurrió a la sobreexpresión de *glpX*, que codifica una enzima con actividad fructosa-1,6-bifosfatasa. La transcripción de *glpX* en medio MGm-2.5 al que se añade maltosa disminuye a lo largo del cultivo en *S. tsukubaensis*. La sobreexpresión de este gen a partir del promotor *ermE** fue especialmente notable en $t_{120 h}$ ya que en $t_{70 h}$ la transcripción desde su promotor nativo fue muy elevada. La sobreexpresión no afectó a la morfología de las colonias en medio sólido ni al crecimiento o a la producción de tacrolimus en medio líquido. La fructosa-1,6-bifosfato se ha propuesto como metabolito implicado en la regulación catabólica por glucosa en *Streptomyces* (Ramos y col., 2004). Mientras que la adición de glucosa reprime la producción de tacrolimus en la cepa silvestre, en la cepa que sobreexpresa *glpX* se detectó producción de tacrolimus en presencia de glucosa. Este fenómeno podría explicarse como consecuencia de una reducción de la concentración de fructosa-1,6-bifosfato en la célula, lo que la haría menos sensible a la CCR por glucosa. La valoración de los niveles intracelulares de este metabolito es necesaria para comprobar dicha hipótesis.

III.4. Estudio transcriptómico de Streptomyces tsukubaensis ΔfkbN

Como se indicó en el apartado I.5.2.3 (pág. 70) la inactivación de *fkbN*, que codifica el regulador positivo de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus, bloquea la producción del macrólido pero no la transcripción de la agrupación en *S. tsukubaensis* NRRL 18488, lo que lo convierte en un regulador muy interesante. Considerando que sobre el mutante de *S. tsukubaensis* $\Delta fkbN$ solo existen estudios de RT-PCR de la expresión de algunos genes de la agrupación (Goranovič y col., 2012), se decidió realizar un estudio transcriptómico de esta cepa, cedida por el doctor H. Petckovic. Como cepa control se utilizó la parental de dicho mutante, procedente del mismo laboratorio.

Para ello se realizaron cultivos por duplicado de *S. tsukubaensis* Δ*fkbN* y de la cepa silvestre en MGm-2.5, siguiendo las condiciones habituales de cultivo de esta especie (II.2.2.1; pág. 91). Se recogieron muestras para la valoración del crecimiento mediante medida del peso seco, para la extracción de tacrolimus y para la extracción de ARN.

III.4.1. Crecimiento y producción de tacrolimus en los cultivos de la serie temporal

El crecimiento alcanzado por *S. tsukubaensis* Δ*fkbN* fue similar al de la cepa silvestre (ver figura 3.94). Como cabía esperar, no se detectó producción de tacrolimus mediante bioensayo o HPLC en dicha cepa, mientras que en el caso de la cepa silvestre se alcanzaron los niveles habituales (resultados no mostrados).



Figura 3.94. Crecimiento de los cultivos de *S. tsukubaensis* $\Delta fkbN$ (línea gris) y de la cepa silvestre (línea negra) en MGm-2.5. Los datos proceden de dos réplicas biológicas.

III.4.2. Metodología empleada y análisis de los resultados transcriptómicos

Se extrajo ARN total de micelio siguiendo las indicaciones y protocolos del apartado II.8.1 (pág. 139). El ARN obtenido presentó valores de RIN en el rango 8.9-9.9 y se utilizó como molde para obtener ADNc marcado con Cy[™]-3-dCTP (apartados II.8.3.3 y II.8.3.4; págs. 148 y 149). Como señal de referencia se empleó el ADNg de *S. tsukubaensis* marcado con Cy[™]-5 utilizado en hibridaciones anteriores (apartado III.1.2.3 y III.2.3; págs. 171 y 228).

Se hibridaron un total de 32 micromatrices (8 muestras de 4 cultivos) de diseño nº 1 (029522; ver apartado II.8.3; pág. 145). La cantidad de marcaje añadido en las hibridaciones, las condiciones de hibridación, lavados y lectura de la fluorescencia se especifican en los apartados II.8.3.6, II.8.3.7 y II.8.3.8 (págs. 151, 153 y 154). Los objetivos de estudio de este experimento transcriptómico fueron los siguientes:

- a) Determinar qué genes de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus son dependientes de FkbN y cuáles son independientes.
- b) Determinar si existen genes de otras agrupaciones relacionadas con el metabolismo secundario activados o reprimidos transcripcionalmente por FkbN.
- c) Determinar si existen genes del metabolismo primario relacionados con la formación de precursores de tacrolimus activados por FkbN.

Para analizar las diferencias entre la cepa mutante y la silvestre se realizaron 8 contrastes estadísticos con limma del tipo $\Delta fkbN_{tx}$ - Silvestre_{tx}, donde x fue 70 h, 80 h, 89 h, 92 h, 96 h, 100 h, 124 h y 148 h. Los resultados obtenidos se presentan en el archivo IV.1 del Material Suplementario. Como genes estadísticamente significativos (GES) se seleccionaron aquellos que presentaron un valor $p_{FDR} \leq 0.05$. La inactivación de fkbN afectó a la transcripción de otros genes especialmente desde las 89 horas de cultivo. En la mayoría de los contrastes se detectaron más genes reprimidos que activados, lo que es coherente con su papel como activador en *S. tsukubaensis*. Los resultados obtenidos en los 8 contrastes se resumen en la tabla 3.22.

	^{fkbN-SI} t _{70 h}		^{N-SI} t _{70 h} <i>fkbN-SI</i> t _{80 h}		fkbN-	^{fkbN-SI} t _{89 h} ^{fkbN-SI} t _{92 h}		^{il} t _{92 h}	^{fkbN-SI} t _{96 h} f		<i>fkbN-SI</i> t 100 h		^{fkbN-SI} t _{124 h}		^{<i>fkbN-SI</i>} t _{148 h}	
	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\uparrow	\checkmark	\uparrow	\downarrow
GES	0	0	3	3	97	118	31	30	26	97	44	100	8	28	3	22

Tabla 3.22. Resumen del número de GES ($p_{FDR} \le 0.05$) detectados en cada contraste.

• Efecto de la inactivación de *fkbN* sobre la transcripción de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus

A partir de la inspección de los perfiles se determinó que la inactivación de *fkbN* produjo una falta de activación transcripcional desde t_{89h} de todos los genes de la

agrupación a excepción de *allM, allN, allP, allO* y *allS* (ver figura 3.95). Los resultados de los contrastes estadísticos con limma permitieron comprobar que no se produjeron variaciones significativas de la transcripción de *allM, allN, allP* o *allO* entre estas dos cepas y que en el caso de *allS* solo se produjo una disminución significativa de la transcripción en la cepa mutante en $t_{89 h}$ y $t_{100 h}$. La transcripción de *fkbR* y *fkbQ* no se vio afectada de manera significativa por la deleción de *fkbN,* aunque los valores M_g de transcripción alcanzados fueron menores en la cepa mutante (ver figura 3.96).

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Goranovič y col. (2012) mediante estudios de RT-PCR y de actividad promotora con el sistema testigo basado en la chalcona sintasa codificada por *rppA*. En dicho trabajo se observó que la disrupción de *fkbN* reduce ligeramente la expresión de *fkbG* (*rppA* y RT-PCR) y que no afecta a la transcripción de *fkbB* (RT-PCR). En nuestro experimento transcriptómico se observa una falta de activación de la transcripción de ambos genes en la cepa mutante (figura 3.95; panel B). Por otro lado, Goranovič y col. (2012) no observaron diferencias de actividad promotora de los genes *allA* y *fkbR* entre la cepa silvestre y la mutante con el sistema testigo basado en la chalcona sintasa y, además, los resultados de *allA* se vio afectada negativamente y de forma significativa por la mutación. La transcripción de *fkbR* se produjo a bajos niveles y de forma más o menos constante en ambas cepas (valores M_g de transcripción en torno a 1; ver figura 3.96). Los niveles de transcripción bajos de *fkbR* también se observaron en el experimento de adición de fuentes de carbono (ver apartado III.1.8; pág. 218).

En el apartado III.1.8.1 (pág. 218) se planteó la posibilidad de una regulación común de *fkbN* y *fkbQ* o incluso una regulación directa de *fkbQ* por parte de FkbN debido a la similitud de sus perfiles transcripcionales. En este experimento se observó que existe transcripción de *fkbQ* en ausencia de FkbN (figura 3.96), aunque no se alcanzan los niveles de la cepa silvestre. Este resultado indica que la transcripción de *fkbQ* es independiente de FkbN.



Figura 3.95. Perfiles transcripcionales de la agrupación biosintética de tacrolimus en *S. tsukubaensis* $\Delta fkbN$ (línea roja) y *S. tsukubaensis* NRRL 18488 (línea negra). A: Perfiles transcripcionales de los genes *allM, allN, allO, allP* y *allS*. B: Perfiles transcripcionales del resto de genes de la agrupación excepto *fkbR* y *fkbQ*. En los paneles de la izquierda se representa el perfil promedio de los genes que componen el grupo (la línea roja representa la transcripción en la cepa mutante y la línea negra la transcripción en la cepa silvestre). En los paneles del medio se representan los perfiles transcripcionales de los genes del grupo en la cepa silvestre. En los paneles de la derecha se representan los perfiles transcripcionales de los genes del grupo en la cepa sulvestre. En los paneles de la derecha se representan los perfiles transcripcionales de los genes del grupo en la cepa sulvestre.



Figura 3.96. Perfiles transcripcionales de *fkbR* y *fkbQ* en *S. tsukubaensis* $\Delta fkbN$ (línea roja) y *S. tsukubaensis* NRRL 18488 (línea negra).

La combinación de los resultados obtenidos en este experimento transcriptómico con la búsqueda de codones TTA en los genes de la agrupación indicó que:

- *fkbH, fkbI, fkbI, fkbK, fkbL, fkbD, fkbM, fkbP, fkbA, allA, allR* y *allD* están activados por FkbN y su transcripción es dependiente de este regulador.
- *fkbO, fkbB, fkbC, fkbG* y *allK* están regulados por FkbN. Estos genes, al igual que *fkbN*, podrían estar regulados por BldA al contener codones TTA. Cabe destacar que la presencia de codones UUA en la secuencia de un ARN mensajero es condición necesaria pero no suficiente para que su traducción dependa de BldA (Trepanier y col., 2002).
- *fkbR* y *fkbQ* podrían estar regulados por BldA, ya que contienen codones TTA, y su transcripción es independiente de FkbN.
- *allM, allN, allP, allO* y *allS* no están regulados ni por FkbN ni por BldA.

• Efecto de la inactivación de *fkbN* sobre la transcripción de otros genes relacionados con el metabolismo secundario

Para identificar posibles agrupaciones de metabolitos secundarios se analizó la secuencia del genoma de *S. tsukubaensis* con el programa antiSMASH 2.0 (Medema y col., 2011b; disponible en <u>http://antismash.secondarymetabolites.org/</u>). Este análisis predijo la existencia de 39 agrupaciones para la biosíntesis de varios tipos de metabolitos (tabla 3.23) en contraposición con las 30 identificadas por Barreiro y col. (2012). Los 25 genes de la agrupación de tacrolimus se encuentran adscritos a las agrupaciones nº 33 y nº 34, que contienen 23 y 33 genes, respectivamente. En un paso posterior, se analizó que genes de estas agrupaciones presentaron una variación significativa de su transcripción ($p_{FDR} \le 0.05$) en alguno de los contrastes realizados con limma.

Tabla 3.23. Agrupaciones de metabolitos secundarios en *S. tsukubaensis* predichas con antiSMASH. Se indica el posible producto, las coordenadas de localización en el genoma y el número de genes de la agrupación afectados de forma significativa ($p_{FDR} \le 0.05$), ya sea positivamente (+) o negativamente (-). PKS: policétido sintasa; NRPS: sintetasa de péptidos no ribosomales.

Agrupación	Producto	Coord	enadas	Nº genes afectados (sentido)				
1	PKS I-NRPS-butirolactona	650	107445	2(+)				
2	Ectoína-PKS I-melanina	123001	243271	2(-)				
3	Terpeno	259190	281373	1(+)				
4	NRPS	337323	381501	2(-)				
5	PKS I	469129	516094	1(+)				
6	PKS I	565717	640798	1(-); 1(+)				
7	PKS I	627902	671723					
8	Terpeno	802543	828186	1(-); 1(+)				
9	Fosfonato-NRPS	925934	974051	2(-); 1(+)				
10	Terpeno	994354	1015169					
11	Terpeno	1148606	1175689					

Agrupación	Producto	Coord	enadas	Nº genes afectados (sentido)				
12	Terpeno	1493674	1515128	1(-); 1(+)				
13	PKS II	1524638	1567563	1(+)				
14	Bacteriocina	1606000	1616860					
15	Lantipéptido	1754014	1778569	1(+)				
16	Lantipéptido	2420366	2443427	2(-); 2(+)				
17	Otro	2464737	2505876	1(-); 2(+)				
18	Oligosacárido-PKS II	2915599	2973051	6(-); 1(+)				
19	Melanina	3002357	3012521					
20	Lantipéptido	3266807	3290902	1(-)				
21	Lantipéptido	3742771	3767830	3(-); 1(+)				
22	PKS I	3772438	3819937					
23	Sideróforo	4000282	4011787					
24	Terpeno	4110224	4131189	1(+)				
25	Terpeno	4610838	4631899	2(-)				
26	Terpeno	4964118	4985116	1(+)				
27	Sideróforo	5585520	5597319					
28	Ectoína	6557779	6568177					
29	Terpeno	7032309	7053391					
30	PKS III	7270258	7311298					
31	NRPS	7297504	7356585					
32	Tiopéptido-lantipéptido	7357467	7390233	2(-)				
33	PKS I-NRPS	7525752	7624587	10(-)				
34	NRPS	7610876	7657075	4(-)				
35	PKS I-PKS IV	7681194	7730714	1(+)				
36	PKS I	7720735	7763146					
37	Otro	7756293	7802601	1(-); 2(+)				
38	NRPS-PKS III	7824318	7963182	2(-); 1(+)				
39	Sideróforo	7975062	7988606	1(-)				

Como cabía esperar, los únicos genes que presentaron una regulación negativa en los contrastes ${}^{fkbN-SI}t_{89h}$, ${}^{fkbN-SI}t_{92h}$, ${}^{fkbN-SI}t_{96h}$, ${}^{fkbN-SI}t_{124h}$ y ${}^{fkbN-SI}t_{148h}$ correspondieron a las agrupaciones nº 33 y nº 34. Entre ellos se encuentran fkbM (STSU_31975), fkbD (STSU_31980), fkbP (STSU_31995), fkbO (STSU_32000), fkbL (STSU_32020), fkbK (STSU_32025), fkbJ (STSU_32030), fkbI (STSU_32035), fkbH (STSU_32040) y fkbG (STSU_32045) -incluidos en la agrupación nº 33- y allD (STSU_32075), allR (STSU_32080), allK (STSU_32085) y allA (STSU_32090) -incluidos en la agrupación nº 34-. La transcripción de fkbB (STSU_32005m), fkbA (STSU_31990m), fkbN (STSU_31970m) y fkbC (STSU_32015), que no fueron adscritos por antiSMASH a ninguna agrupación, también presentó una regulación negativa significativa en los contrastes ${}^{fkbN-SI}t_{89h}$, ${}^{fkbN-SI}t_{92h}$, ${}^{fkbN-SI}t_{100h}$, ${}^{fkbN-SI}t_{124h}$ y ${}^{fkbN-SI}t_{148h}$. Los resultados obtenidos a partir de estos contrastes corroboran lo expuesto en el apartado anterior.

Algunos genes de otras agrupaciones presentaron una disminución significativa en uno, dos o, a lo sumo, tres contrastes. La agrupación nº 18 (policétido sintasa de tipo II) fue la que presentó un mayor número de genes (6) regulados negativamente en algún contraste

después de las agrupaciones nº 33 y nº 34. En varias agrupaciones se detectaron genes regulados positivamente pero nunca más de dos o en más de dos contrastes, por lo que estas variaciones se consideran debidas a otros factores y no a la deleción de *fkbN*.

• Otros efectos de la inactivación de fkbN

Curiosamente, aunque cabría esperar que los perfiles transcripcionales de la serie control del experimento de adición de azúcares y de la cepa silvestre de este experimento fuesen equivalentes, se detectaron varios genes con perfiles diferentes como, por ejemplo, STSU_10721 (*prs*), STSU 10726 (*sigH*), STSU 18523 (*bldC*) o STSU 24896 (*hrdA*). Esto podría ser debido a variaciones genéticas entre las cepas utilizadas y/o a un efecto transcripcional de la adición de maltosa.

Para identificar genes que pudieran estar activados por FkbN, se filtraron aquellos genes que presentaron una regulación negativa en el contraste ^{*fkbN-Si*}t_{89 h} y en dos contrastes más de tiempos posteriores ($p_{FDR} \le 0.05$), excluyendo los de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus. Se eligió el contraste ^{*fkbN-Si*}t_{89 h} como primer punto de filtrado porque fue el primero en el que se manifestó el efecto de la deleción de *fkbN* sobre la transcripción de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus en la serie temporal. Se identificaron un total de 19 genes que se presentan en la tabla 3.24 y cuyos valores M_c pueden consultarse en el archivo IV.2 del Material Suplementario.

Tabla 3.24. Genes no pertenecientes a la agrupación biosintética de tacrolimus que presentaron una regulación negativa significativa en *S. tsukubaensis* $\Delta fkbN$ en tres o más contrastes a partir de t_{89 h}. Se indica el producto predicho y con "-1" aquellos tiempos en los cuales el contraste correspondiente presentó diferencias significativas. SAM: S-adenosilmetionina.

Gen	Producto		92	96	100	124	148
STSU_00310	acil transferasa		-1	-1	0	0	0
STSU_01075	acil-CoA deshidrogenasa		0	-1	-1	0	0
STSU_03180	hipotética	-1	0	-1	0	-1	0
STSU_03464	formil-CoA transferasa	-1	0	-1	0	-1	0
STSU_03754	metiltransferasa dependiente SAM	-1	0	-1	-1	0	0
STSU_05543	hipotética	-1	0	-1	-1	0	0
STSU_07598	tipo SimX4	-1	-1	-1	-1	-1	-1
STSU_07623	hipotética	-1	-1	-1	0	0	0
STSU_07628	4'-fosfopanteteinil transferasa	-1	-1	-1	-1	0	-1
STSU_09644	proteína con dominio HTH	-1	0	-1	-1	0	0
STSU_12385	hipotética		0	-1	-1	0	0
STSU_16083	hipotética		0	-1	-1	0	0
STSU_20182	hipotética		0	-1	-1	0	0
STSU_20627	acil-CoA deshidrogenasa	-1	-1	-1	-1	0	0
STSU_23936	regulador LuxR de sistema de dos componentes		0	-1	-1	0	0
STSU_25649	U_25649 hipotética		0	-1	0	-1	0
STSU_30215	regulador LysR	-1	0	-1	-1	0	0
STSU_32850	factor sigma función extracitoplasmática		0	-1	-1	0	0
stsu_c_contig00380_268_581	-	-1	0	0	-1	-1	0

Como se indicó en el apartado III.1.8.1 (pág. 218), el papel de las 4'-fosfopanteteinil transferasas es activar los dominios transportadores de las sintasas de policétidos (ACP) y de sintetasas de péptidos no ribosomales (PCP) y el ortólogo de STSU_07628 en *S. coelicolor* (SCO6673) está implicado en la producción de CDA (Lu y col., 2008).

Del mismo modo, para identificar genes que pudieran estar reprimidos por FkbN, se filtraron aquellos que presentaron una regulación positiva en el contraste ^{*fkbN-Sl*}t_{89 h} y en dos contrastes mas de tiempos posteriores ($p_{FDR} \le 0.05$). Se encontraron 5 genes que codifican: una proteína reguladora (STSU_02315), dos subunidades de una sintasa de policétido que no fueron asignadas a ninguna agrupación en el análisis con antiSMASH (STSU_02055-STSU_02060), un regulador de la familia LuxR (STSU_02610) y una proteína de protección del ADN (STSU_08634). Sus valores M_c pueden consultarse en el archivo IV.2 del Material Suplementario.

El resultado más interesante fue el efecto positivo de la inactivación de *fkbN* sobre los genes STSU_02055-STSU_02060 (ver figura 3.97), aunque con estos resultados no se puede determinar si se trata de un efecto directo o de una verdadera regulación por FkbN. STSU_02055 es ortólogo de *cpkA* de *S. coelicolor*, que forma parte de una agrupación de biosíntesis de un policétido críptico (Pawlik y col., 2007). En caso de que FkbN actuase como regulador negativo de esta sintasa de policétido, el mutante $\Delta fkbN$ sería de gran ayuda para la caracterización del metabolito producido.



Figura 3.97. Perfiles transcripcionales de los genes codificantes de una sintasa de policétido, STSU_02050-02060, en *S. tsukubaensis* $\Delta fkbN$ y en la cepa silvestre. Aunque STSU_02050 no presentó una variación significativa en t_{89 h} ni en t_{92 h}, su perfil se ha incluido en la representación por su similitud con los de STSU_02055 y STSU_02060. En el panel de la izquierda se representa el perfil promedio de los tres genes (la línea roja representa la transcripción en la cepa mutante y la línea negra la transcripción en la cepa silvestre). En el panel del medio se representan los perfiles transcripcionales de los genes en la cepa silvestre. En el panel de la derecha se representan los perfiles transcripcionales de los genes en la cepa mutante.

IV. ANEXO

IV.1. Expresión controlada de phoP de Streptomyces tsukubaensis en Streptomyces coelicolor M145 y Streptomyces coelicolor INB201 (ΔphoP)

Para analizar la importancia de los niveles de proteína PhoP y del agotamiento del Pi en el medio sobre la activación del regulón *pho* en *Streptomyces*, se decidió expresar *phoP* de forma controlada en las cepas de *S. coelicolor* M145 e INB201 (Δ*phoP*) que presentan la construcción pLUX-*glpQ1* integrada (Santos-Beneit y col., 2009b). Esta construcción contiene el sistema testigo *luxAB* bajo el control del promotor de *glpQ1*, que presenta una elevada activación dependiente de PhoP tras el agotamiento del Pi (Rodríguez-García y col., 2007; Santos-Beneit y col., 2009b; Fernández-Martínez y col., 2012; Martín y col., 2012b). Además GlpQ1 no parece estar implicado en el control recíproco de la activación del sistema PhoR-PhoP, al contrario que PstSCAB o PhoU (Hsieh y Wanner, 2010).

Como sistema de expresión controlada se utilizó un vector que consta de un promotor sintético inducible por tetraciclinas (*tcp830*) y una versión del regulador TetR adaptada al uso de codones de *Streptomyces* (*tetRiS*, del inglés *tetR adapted for expression in Streptomyces*; Rodríguez-García y col., 2005). Este sistema deriva del TetR/*tetO* del transposón Tn10 de *E. coli*, que se ha aplicado anteriormente en la regulación de la expresión génica en varias especies (Stebbins y col., 2001; Gossen y col., 1995). En ausencia de antibiótico el represor está unido a la región operadora e impide la transcripción a partir del promotor *tcp830*; mientras que en presencia de tetraciclinas, la afinidad del represor por el operador disminuye, lo que permite su disociación y la transcripción. Entre las ventajas del uso del promotor *tcp830* frente a otros promotores inducibles destacan las siguientes:

- Induce la transcripción del gen de interés 20-40 veces durante la fase de crecimiento rápida y hasta 270 veces durante la fase estacionaria (Rodríguez-García y col., 2005).
- Permite utilizar anhidrotetraciclina, que presenta baja actividad antibiótica (Oliva y Chopra, 1992), en lugar de la tetraciclina y, a concentraciones tan bajas (0.1 μg/ml-1 μg/ml) que no afectan al crecimiento (Rodríguez-García y col., 2005).

IV.1.1. Diseño de la construcción del vector pTCP-2-phoP

La construcción de este vector se esquematiza en la figura 4.1. El vector pMB1neo aportó a la construcción final el gen de resistencia a kanamicina (*neo*) y pAV11B aportó el origen de replicación pMB1, la región promotora *tcp830*, el gen de resistencia a higromicina (*hyg*), el sistema integrasa ϕ BT1 y el gen *tetRiS* fusionado al promotor fuerte SF14.

Se decidió clonar el gen *phoP* de *S. tsukubaensis* (STSU_19410) para comprobar su funcionamiento en *S. coelicolor* (88.3 % de identidad nucleotídica y 97.3 % de similitud aminoacídica según el algoritmo de Needleman-Wunsch).

Una vez obtenida la construcción pTCP-2-*phoP* se transfirió a *E. coli* ET12567/pUZ8002 por transformación (apartado II.7.11.2; pág. 132) y, posteriormente, a *S. coelicolor* M145/pLUX-*glpQ1* y *S. coelicolor* INB201/pLUX-*glpQ1* por conjugación (apartado II.7.12.2; pág. 134). La construcción pLUX-*glpQ1* contiene el sistema integrasa ϕ C31 y confiere resistencia a kanamicina, mientras que la construcción pTCP-2-*phoP* contiene el sistema integrasa ϕ BT1 y confiere resistencia a higromicina. En consecuencia, la cepa de *S. coelicolor* M145/pLUX-*glpQ1*/pTCP-2-*phoP* presenta un fenotipo Kan^R e Hyg^R, mientras que la cepa de *S. coelicolor* INB201/pLUX-*glpQ1*/pTCP-2-*phoP* presenta un fenotipo Am^R, Kan^R e Hyg^R.



Figura 4.1. Construcción de pTCP-2-*phoP.* Los fragmentos aportados en cada paso se señalan con un marco negro. pAV11B se digirió con AvrII y Acc65I, se rellenaron sus extremos y se religó para eliminar varios puntos de corte. El vector obtenido (pAV11B-N, 7073 pb) se digirió con Acc65I y XbaI, lo que generó el fragmento F1 (1276 pb), que aporta el origen de replicación pMB1. El vector pMB1neo (2528 pb) se digirió con las mismas enzimas de restricción para obtener el fragmento F2 (1376 pb), que aporta el gen *neo*. El resultado de la ligación de ambos fragmentos fue el vector pTCP-1 (2643 pb). La secuencia de *phoP* de *S. tsukubaensis* fue amplificada con la pareja de cebadores CAR106-CAR108 (II.4.2.3; pág. 102) y con la polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England BioLabs). El producto de amplificación se digirió con XbaI y SpeI (812 pb), se comprobó por secuenciación con los mismos cebadores y se clonó en pTCP-1 digerido con XbaI. Se seleccionó la construcción en la que la región promotora se situó en posición anterior al gen, denominada pTCP-1-*phoP*. Finalmente, pTCP-1-*phoP* se digirió con Acc65I y NsiI y el fragmento de 2072 pb obtenido se ligó con el fragmento de 5770 pb de pAV11B-N digerido con las mismas enzimas. En este último paso, pAV11B-N aportó a la construcción *hyg*, el sistema integrasa ϕ BT1 y el gen *tetRiS*. La construcción final obtenida se denominó pTCP-2-*phoP*.

IV.1.2. Expresión controlada de *phoP* en *Streptomyces coelicolor* (INB201)/pLUX-*glpQ1*

En un primer ensayo se cultivaron dos exconjugantes de *S. coelicolor* INB201/pLUX-*glpQ1*/pTCP-2-*phoP* por duplicado en medio MG 3.2, en matraces con hendiduras de 500 ml a 30 °C y 300 r.p.m. inoculados con 10⁸ esporas. A uno de los matraces de cada exconjugante se le añadió anhidrotetraciclina a las 41 h (momento en el que se conoce que ya se ha agotado el Pi) a una concentración final de 1 µg/ml. Se tomaron muestras para la medida del peso seco y de la actividad luciferasa a las 41 h, 42 h, 43 h, 44 h, 46.5 h y 48 h.

El crecimiento de los dos exconjugantes no fue sincronizado, de manera que el Pi se agotó en diferentes momentos: en el caso del exconjugante [1] se agotó antes de la adición de anhidrotetraciclina (concentraciones de Pi a las 41 h de 78.3 μ M y 10 μ M en el cultivo inducido y en el cultivo control, respectivamente); en los cultivos del exconjugante [2] se agotó entre las 44 h y las 46.5 h, aunque no se pudo precisar el momento exacto (concentraciones de Pi a las 46.5 h de 27.8 μ M y 8.7 μ M en el cultivo inducido y en el cultivo control, respectivamente).

Como se puede observar en la figura 4.2, los valores máximos de luminiscencia fueron más de 20 veces superiores en los cultivos inducidos que en los cultivos control: $(738 \pm 15) \cdot 10^{-3}$ ULR \cdot mg⁻¹ y (37 ± 8) $\cdot 10^{-3}$ ULR \cdot mg⁻¹, respectivamente. En ningún caso se produjo inducción del promotor hasta que no se agotó el Pi y en el caso del exconjugante [1] se pudo observar que la activación se produjo dos horas después del agotamiento. La expresión de *phoP* genera proteína que no se activa hasta que PhoR la fosforila. PhoR es la única quinasa capaz de fosforilar a PhoP (Fernández-Martínez y col., 2012) y solamente lo haría en condiciones de escasez de Pi. De este experimento se concluyó que: 1) PhoP de *S. tsukubaensis* fue funcional en *S. coelicolor*, 2) el sistema funcionó correctamente y 3) no existió activación del promotor de *glpQ1* hasta que no se agotó el Pi.



Figura 4.2. Actividad luciferasa del promotor de *glpQ1* y agotamiento del Pi en cultivos de dos exconjugantes de *S. coelicolor* INB201/pLUX-*glpQ1*/pTCP-2-*phoP* a los que se ha añadido anhidrotetraciclina a las 41 h y sus respectivos controles. A) exconjugante [1] y B) exconjugante [2]. El momento de la adición se representa con una flecha negra. La actividad luciferasa basal calculada a partir de los cultivos no inducidos fue de $(37 \pm 8) \cdot 10^{-3}$ ULR · mg⁻¹.

En una segunda fermentación, se trató de sincronizar los cultivos, para lo que se utilizaron réplicas técnicas de un mismo exconjugante. En concreto se utilizaron 9 cultivos del exconjugante [1] y la adición de anhidrotetraciclina se realizó a las 24 h, 36 h o 44 h (3 réplicas de cada condición). El muestreo se realizó cada dos horas, desde las 36 h a las 60 h. El resto de condiciones se mantuvieron igual que en el experimento anterior. Se decidió no incorporar controles sin anhidrotetraciclina en este experimento porque el valor de actividad residual se había determinado en el experimento anterior.

Todos los cultivos presentaron curvas de crecimiento similares a excepción de uno de la serie inducida a las 24 h, de manera que este último se eliminó para la representación gráfica de la actividad luciferasa y del agotamiento del Pi. Como se puede observar en la figura 4.3, cuando la anhidrotetraciclina se añadió antes del agotamiento del Pi (que tuvo lugar en torno a las 40 h), la actividad máxima alcanzada fue mayor en la serie inducida a las 24 h que en la inducida a las 36 h. Este resultado es lógico si se considera que hay una mayor abundancia de proteína PhoP en los cultivos inducidos a las 24 h que en los inducidos a las 36 h.

Cuando la anhidrotetraciclina se añadió a las 44 h (es decir, cuatro horas después del agotamiento del Pi) no se detectó activación del promotor de *glpQ1*. Podrían existir tres explicaciones para este fenómeno: 1) reducción de la incorporación de anhidrotetraciclina al interior celular en esta fase de crecimiento; 2) disminución de la capacidad promotora de *tcp830*; 3) insuficiente actividad quinasa de PhoR, que se activa por PhoP y autoregula el sistema positivamente; 4) insuficiente activación o presencia de algún factor necesario para la transcripción del promotor de *glpQ1* o 5) agotamiento del FMNH₂ intracelular necesario para la reacción enzimática de la luciferasa. Aunque a partir de las 46 h (tiempo en el que se detectaría la respuesta a la inducción) la actividad luciferasa disminuyó en los cultivos inducidos a las 24 h y 36 h, si se detectó actividad luciferasa en ese punto temporal (46 h), por lo cual la opción 5 parece improbable.



Figura 4.3. Actividad del promotor de *glpQ1* y agotamiento del Pi en los cultivos de *S. coelicolor* INB201/pLUX-*glpQ1*/pTCP-2-*phoP* [1] a los que se añadió anhidrotetraciclina (aTc) a las 24 h, 36 h o 44 h. Los tiempos en que se realizó la adición se indican con una flecha del color correspondiente a la serie de datos. Los datos de la serie +aTc 24 h proceden de dos réplicas y los de +aTc 36 h y +aTc 44 h proceden de tres réplicas.

IV.1.3. Expresión controlada de *phoP* en *Streptomyces coelicolor* M145/pLUX-*glpQ1*

Una vez comprobado el funcionamiento del sistema se valoró el efecto de la expresión controlada de *phoP* en la cepa silvestre, que contiene otra copia de *phoP* bajo el control de su promotor nativo. Para ello se cultivó *S. coelicolor* pLUX-*glpQ1*/pTCP-2-*phoP* [1] en las condiciones habituales y se le añadió anhidrotetraciclina a las 34 h y 41 h (situaciones de disponibilidad y de agotamiento de Pi, respectivamente). Cada condición se realizó por triplicado (12 cultivos en total teniendo en cuenta los controles sin adición). Se recogieron muestras para peso seco y actividad luciferasa cada hora y se inició la toma de muestras inmediatamente antes de las adiciones.

Como se puede observar en la figura 4.4, el patrón de actividad luciferasa fue el mismo en la condición de inducción que en la condición control, independientemente del momento de la adición. Este resultado podría indicar que en la cepa silvestre el sistema alcanzó un punto de saturación y que el incremento de la transcripción de *phoP* no aumentó la intensidad de la respuesta del promotor de *glpQ1*. Además, la activación del sistema nativo fue más de 5 veces superior a la del sistema artificial, por lo que el efecto de la inducción podría haberse diluido en la cepa silvestre. Esto indicaría que la transcripción de *phoP* desde su propio promotor es mucho más fuerte que desde el *tcp830* o que PhoP de *S. tsukubaensis* no fue capaz de activar el promotor de *glpQ1* de *S. coelicolor* en la misma medida que su propio PhoP o ambas explicaciones.



Figura 4.4. Actividad del promotor de *glpQ1* en cultivos de *S. coelicolor* pLUX-*glpQ1*/pTCP-2-*phoP* a los que se añadió anhidrotetraciclina (aTc) a las 34 h o a las 41 h y sus respectivos controles sin adición. Con una flecha negra se indican los tiempos de la adición.

V. DISCUSIÓN GENERAL



Este capítulo comprende un resumen de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo. Los apartados en que se subdivide no se corresponden directamente con los que aparecen en el capítulo III, sino que corresponden a los principales temas de estudio de esta tesis. De esta manera se pretende dar una visión de conjunto y facilitar la interpretación de los resultados.

Regulación por catabolito de carbono en *S. tsukubaensis*: respuesta transcripcional a las adiciones de glucosa y glicerol

La represión por catabolito de carbono (CCR) es un fenómeno extendido en bacterias que consiste en la utilización de fuentes de carbono fácilmente asimilables en detrimento de otras cuya asimilación es más lenta. Este fenómeno supone la represión de sistemas de transporte y de enzimas implicados en el aprovechamiento de las fuentes de carbono secundarias. Los mecanismos efectores comprenden desde la represión de la transcripción hasta la inhibición enzimática. Por otro lado, la CCR afecta negativamente a la producción de antibióticos, por lo que se trata de un mecanismo muy interesante en el campo de la microbiología industrial. En los organismos modelo *E. coli* y *B. subtilis* se ha definido el mecanismo molecular de la CCR; sin embargo, en el género *Streptomyces* parece existir más de un mecanismo implicado y ninguno de los estudiados se ha logrado definir completamente.

El primer objetivo de esta tesis fue determinar qué fuentes de carbono producen represión de la producción de tacrolimus en S. tsukubaensis cuando se añaden a mitad de la fase exponencial de crecimiento en cultivos en MGm-2.5. En un experimento exploratorio se determinó que la adición de glucosa o glicerol a una concentración final del 2.8 % p/v (155 mM y 304 mM, respectivamente) reduce la producción de tacrolimus en esta especie por debajo de los niveles detectables mediante bioensayo (1.9 µg/ml), al menos hasta las 161 horas de cultivo. Por el contrario, la adición de fructosa, maltosa, xilosa, sacarosa, lactosa o manitol a la misma concentración (2.8 % p/v) no tiene efecto sobre la producción. La glucosa es la principal fuente de carbono represora, por lo que el resultado no fue llamativo; sin embargo la presencia de glucosa al 2 % (111 mM) en medio ISP4 desde el inicio del cultivo no produce represión de la producción de tacrolimus en esta especie (Martínez-Castro y col., 2013). Cabe destacar que, además de la influencia de la concentración final de glucosa utilizada y del medio de cultivo empleado, el efecto represor podría perderse cuando la fuente de carbono está presente desde el inicio de la fermentación. En consonancia con esto, Yoon y Choi (1997) no observaron represión de la producción de tacrolimus en Streptomyces sp. MA6858 (ATCC 55098) en medios con glucosa a una concentración de 166.5 mM.

Para profundizar sobre el efecto de la adición de glucosa y glicerol se planteó un experimento transcriptómico en el que se reprodujeron en parte las condiciones anteriores. Se realizó una adición de glucosa o glicerol a una concentración final de 222 mM (4 % y 2 % p/v, respectivamente) y se utilizó como condición control una adición de maltosa a una concentración final de 111 mM (3.8 % p/v). Se eligió este disacárido como control porque el almidón es la fuente de carbono principal del medio MGm-2.5 y su metabolización genera

maltosa entre otros productos. De este experimento se concluyó que la adición de glucosa a una concentración final de 222 mM (4 % p/v) bloquea totalmente la producción de tacrolimus y que la adición de glicerol a la misma concentración (2 % p/v) la retrasa y reduce, pero no la bloquea totalmente. Aunque en la interpretación de los resultados transcriptómicos se estableció un filtro estricto (valores $M_c \ge 2$ y ≤ -2 con un valor $p_{FDR} \le 0.05$), se pudo determinar que la adición de glucosa genera regulación positiva y negativa en un número semejante de genes, mientras que el efecto del glicerol es principalmente positivo. Las respuestas generadas a los 40 minutos de la adición se mantienen en un 50 % aproximadamente de los casos a las dos horas, salvo en el caso de la regulación negativa por glucosa, en la que la respuesta se mantiene en un 94 % de los casos.

El análisis de los genes filtrados refleja que la adición de glucosa genera unas condiciones nutricionales positivas, ya que estimula la transcripción de genes implicados en la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina y de aminoácidos. Como cabe esperar, regula positivamente la transcripción de algunos genes implicados en la glucólisis y negativamente la transcripción de genes gluconeogénicos y que codifican sistemas de transporte de fuentes de carbono alternativas como, por ejemplo, el transportador de quitobiosa DasABC. S. tsukubaensis presenta un solo gen anotado como glucosa permeasa cuya transcripción no se regula positivamente tras la adición y que presenta valores de transcripción (M_g) bajos a lo largo del cultivo, lo que sugiere la existencia de un transportador alternativo de glucosa en esta especie o su dependencia de un factor sigma no constitutivo. La adición de glucosa estimula la asimilación de amonio, ya que se produce una regulación positiva de la transcripción de dos genes que codifican una glutamina sintetasa y de genes implicados en la síntesis de glutamato. Mientras que algunos autores proponen que el L-glutamato es una fuente de carbono de uso preferente respecto a la glucosa en S. coelicolor, existen resultados que apuntan a un consumo simultáneo y no secuencial de ambas fuentes. Los resultados obtenidos en S. tsukubaensis sugieren que hasta el momento de la adición se utiliza el L-glutamato del medio como fuente de carbono y nitrógeno, con la consecuente liberación de amonio al medio de cultivo. Tras la adición se frena el consumo de L-glutamato y se inicia la incorporación del amonio liberado anteriormente.

El efecto negativo de la adición de glucosa sobre la producción de tacrolimus puede ser una consecuencia indirecta de un retraso de la diferenciación morfológica, ya que se detecta una regulación negativa de la transcripción de reguladores clave de la diferenciación (p. ej., *bldN* y *wblA*) y ambos procesos están íntimamente ligados en *Streptomyces*. Un resultado interesante de este trabajo es la regulación negativa por glucosa de la transcripción de los genes que codifican un sistema de transporte de oligopéptidos que es necesario para la correcta esporulación de *S. coelicolor* y que presenta en común con el transportador BldK su inducción por la acumulación de S-adenosilmetionina. BldK es un transportador de oligopéptidos que se sitúa en la base de la cascada Bld de transmisión de la señal de diferenciación, aunque la molécula transportada aún no se conoce. Por tanto, la glucosa podría bloquear el desarrollo morfológico al bloquear la producción de los sistemas de transporte que captan la señal de diferenciación y desencadenan el proceso.

El efecto de la adición de glicerol sobre la producción de tacrolimus es diferente al de la adición de glucosa, como también lo es su respuesta transcripcional. La mayor parte de los

genes se regulan de forma positiva pero estas variaciones son de naturaleza transitoria en la mayoría de los casos. Los principales efectos observados consisten en la estimulación de la transcripción de genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos y en el transporte y metabolismo del glicerol. Así mismo, se observa una estimulación de la transcripción de genes implicados en el transporte de compuestos azufrados, en la reducción del sulfato a sulfito y en las respuestas al estrés por disulfuro y al estrés oxidativo.

Ambas adiciones generan una regulación negativa de algunos componentes del operón *nuo*, que codifica la NADH deshidrogenasa I encargada de regenerar el poder reductor en la cadena de transporte de electrones. En *E. coli*, el operón *nuo* se reprime en condiciones de anaerobiosis, pero un flujo intenso a través de la glucólisis puede generar la misma respuesta. Por este motivo, se considera que ambas adiciones estimulan flujos metabólicos que resultan en la disminución de la capacidad reductora de la célula, lo que finalmente se traduce en un estrés oxidativo. En consonancia con esta hipótesis, se observa una regulación positiva significativa de varios genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo (en concreto del regulador codificado por *oxyR* y de las reductasas de hidroperóxidos de alquilo codificadas por *ahpC* y *ahpD*) a los 40 minutos de la adición de glicerol y a las dos horas tras la adición de glucosa.

Aunque no se identificó ningún regulador transcripcional cuyo perfil indique que puede mediar de forma directa en la CCR por glucosa en *S. tsukubaensis,* los resultados obtenidos permiten comprender cuales son los genes sobre los que la glucosa ejerce su efecto y cómo se produce el bloqueo de la diferenciación morfológica y bioquímica. Como se indicó en la introducción, el papel regulador de la Glk en la CCR por glucosa podría depender de una modificación postraduccional y este nivel de regulación no se puede analizar mediante transcriptómica.

• Respuesta transcripcional a la adición de N-acetilglucosamina en cultivos de

S. tsukubaensis

La N-acetilglucosamina, monómero de la quitina, presenta un efecto regulador dual en *Streptomyces* que depende de la composición del medio de cultivo. En condiciones de escasez nutricional estimula la diferenciación morfológica y la producción de antibióticos, mientras que en condiciones de abundancia bloquea ambos procesos (Rigali y col., 2006; 2008). El mecanismo regulador que opera en condiciones de escasez nutricional es bien conocido e implica al regulador DasR. Por el contrario, el mecanismo represor que se produce en condiciones de abundancia nutricional es desconocido. Por este motivo se decidió realizar un experimento transcriptómico de adición de N-acetilglucosamina a mitad de la fase exponencial de crecimiento (a una concentración final del 0.5 % p/v; 22.6 mM) en cultivos de *S. tsukubaensis* en MGm-2.5. La adición no afectó al crecimiento de forma significativa pero si redujo la producción de tacrolimus, aunque no la bloqueó totalmente.

La adición de N-acetilglucosamina regula negativamente la transcripción de los genes ortólogos que codifican el transportador dual de N-acetilglucosamina y quitobiosa NgcEFG de *S. olivaceoviridis* y del componente IIB del sistema PTS de N-acetilglucosamina, lo que sugiere que en estas condiciones el transporte se realiza por un sistema alternativo. Se ha propuesto que el efecto de la N-acetilglucosamina viene determinado por el sistema de transporte utilizado, que permite a la célula discernir si la molécula procede de la degradación de la pared celular bacteriana o de la quitina de artrópodos. En este sentido, la regulación negativa de genes que codifican quitinasas y de los genes que codifican el transportador de quitobiosa Das es coherente, ya que en condiciones de abundancia nutricional se frenaría la transcripción de sistemas que puedan captar una señal de diferenciación; sin embargo, la regulación negativa de la transcripción del gen que codifica el componente IIB del sistema PTS de N-acetilglucosamina (que sería el transportador utilizado en estas condiciones) no es fácil de interpretar. Además, la transcripción del ortólogo de *nagB*, que en *S. coelicolor* se induce tras la adición de N-acetilglucosamina y cuyo producto participa en su metabolización, no varía de forma significativa en *S. tsukubaensis*. Ello sugiere que en condiciones de disponibilidad nutricional la adición de N-acetilglucosamina no supone una liberación de DasR de sus dianas o que la célula carece de algún factor transcripcional en esta etapa y condiciones de cultivo necesario para la transcripción de estos genes.

El efecto de la adición de N-acetilglucosamina es muy amplio y 2883 genes presentaron variaciones significativas en alguno de los tiempos analizados (30 minutos, una hora y dos horas tras la adición). El análisis se centró en aquellos que presentaron variaciones significativas en los tres tiempos y en los dos últimos tiempos (1386 genes en total). Los principales efectos positivos observados son la estimulación de la transcripción de genes relacionados con la síntesis de aminoácidos y nucleótidos, con los procesos de replicación y traducción y con las rutas de la glucólisis, de las pentosas fosfato y del metabolismo del piruvato. Entre los efectos negativos se detecta una regulación negativa de la transcripción de genes implicados en el transporte y metabolismo de fuentes de carbono alternativas, de genes para la gluconeogénesis y de genes relacionados con la diferenciación morfológica. Al igual que tras las adiciones de glucosa y glicerol, se produce un aumento de la transcripción de genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo y una regulación positiva de varios genes del operón *nuo* que se interpreta del mismo modo que en los casos anteriores.

El mecanismo represor de la N-acetilglucosamina en medios de abundancia nutricional propuesto por Rigali y col. (2006) implica la participación del sistema PTS. Las concentraciones elevadas del monómero evitarían que el sistema PTS transfiera grupos fosfato a reguladores del desarrollo como WhiG o algún componente Bld. La adición de N-acetilglucosamina en cultivos de *S. tsukubaensis* regula negativamente la transcripción de varios genes que codifican reguladores de la diferenciación como, por ejemplo, *bldC, bldM, bldG, bldN, whiH, wblA* y *wbll*. Se detecta una regulación negativa de la transcripción de todos los genes del operón *bldK,* que, al igual que en el caso de la represión por glucosa, podría tener como finalidad frenar la captación de señales que inducen la diferenciación morfológica. Las respuestas a la adición de glucosa y N-acetilglucosamina son muy semejantes, lo que no es de extrañar ya que en *S. coelicolor* existen pruebas de la interrelación entre las rutas de utilización de quitina, N-acetilglucosamina y glucosa, como, por ejemplo, el incremento de la CCR por glucosa a causa de la inactivación de DasR (Colson y col., 2008).

• Estudio de los genes pfkA en S. tsukubaensis

En el género *Streptomyces* la presencia de múltiples parálogos que codifican una misma actividad enzimática es un fenómeno extendido. Un ejemplo son los genes codificantes de 6-fosfofructoquinasas, enzimas que catalizan la fosforilación de la fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bifosfato durante la glucólisis. En *S. tsukubaensis* se encuentran tres genes que codifican 6-fosfofructoquinasas, al igual que en *S. coelicolor*, *S. avermitilis, S. scabies, S. lividans* y *S. clavuligerus*: STSU_09924 (*pfkA2*), STSU_26589 (*pfkA1*) y STSU_30615 (*pfkA3*). Por la naturaleza del residuo 104 se considera que PfkA2 y PfkA3 utilizan ATP como sustrato donador del grupo fosfato, mientras que PfkA1 utiliza pirofosfato.

La respuesta transcripcional de cada *pfkA* a las cuatro adiciones realizadas (glucosa, glicerol, maltosa y N-acetilglucosamina) y el perfil transcripcional observado en los cultivos de adición de glucosa, glicerol y maltosa permite caracterizar cada uno de los genes de la siguiente manera:

- *pfkA1* no se transcribe, o lo hace con muy poca intensidad, durante el crecimiento vegetativo en MGm-2.5 con maltosa. La activación de su transcripción coincide con el inicio de la fase estacionaria en este medio y no se produce en aquellos medios en los que se ha añadido glucosa o glicerol. La transcripción de este gen solo responde de forma significativa a la adición de N-acetilglucosamina y lo hace de forma negativa. En *S. coelicolor* su promotor presenta una secuencia *dre*, aunque su regulación por DasR no ha sido comprobada. Para poder comprobar si en *S. tsukubaensis pfkA1* está regulado por DasR, la adición de N-acetilglucosamina debe realizarse en condiciones de limitación nutricional, que es en las que se manifiesta la liberación de DasR de sus dianas y la activación de la transcripción.
- *pfkA2* se transcribe de forma constitutiva y a niveles altos durante todo el cultivo en MGm-2.5 con maltosa. Responde de forma significativa y positiva a las adiciones de glucosa y de maltosa, aunque la variación de su transcripción no es muy elevada.
- *pfkA3* se transcribe de forma constitutiva y a niveles altos durante todo el cultivo en MGm-2.5 con maltosa y responde de forma significativa y positiva a las adiciones de glucosa y N-acetilglucosamina. Su respuesta a la adición de glucosa es muy intensa.

En *S. coelicolor* la deleción de *pfkA2*, que codifica la actividad 6-fosfofructoquinasa principal de esta especie, produce un aumento de la biosíntesis de antibióticos pigmentados a causa de la estimulación de la ruta de las pentosas fosfato y de la generación de poder reductor. Puesto que en *S. tsukubaensis* existe una correlación positiva entre la producción de tacrolimus y el flujo a través de dicha ruta, se planteó la posibilidad de que la deleción de *pfkA2* tuviera un efecto equivalente. Por otro lado, *pfkA1* presenta un perfil transcripcional semejante al de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus, por lo que se planteó la posibilidad de que la fructosa-1,6-bifosfato generada por PfkA1 se dirigiese a la ruta de

producción de tacrolimus. Para comprobar ambas hipótesis y caracterizar el efecto de la deleción de los genes *pfkA* en *S. tsukubaensis* se obtuvieron cepas mutantes en cada uno de estos genes.

Ninguna de las mutaciones afecta a la morfología de *S. tsukubaensis*, ni en medio sólido (TSA, ISP4) ni líquido (MGm-2.5). El crecimiento en MGm-2.5 se favorece ligeramente por cualquiera de las mutaciones pero no lo hace la producción de tacrolimus. La inactivación de un gen *pfkA* podría no haber estimulado la ruta de las pentosas fosfato, como ocurre en *S. coelicolor*, y esto podría ser debido a que en nuestro microorganismo y condiciones de estudio no existe una PfkA principal. En este contexto, la ausencia de cualquier PfkA quedaría enmascarada por la actividad de los parálogos remanentes.

Con respecto a la segunda hipótesis planteada, *pfkA1* no es crucial para la producción de tacrolimus, que, de hecho, no se ve afectada por su deleción. Las reacciones catalizadas por las 6-fosfofructoquinasas dependientes de pirofosfato permiten conservar ATP en situaciones de escasez energética como, por ejemplo, la anaerobiosis. Si tenemos en cuenta que la transcripción de este gen se activa coindiciendo con la fase estacionaria de crecimiento en medio MGm-2.5 con maltosa, éste parece ser el papel más probable de PfkA1.

La diferencia entre los efectos de la deleción de pfkA2 sobre la producción de metabolitos secundarios en *S. coelicolor* y *S. tsukubaensis* podría deberse a diferencias funcionales de PfkA2 entre especies o a la utilización de medios de cultivo diferentes. Para profundizar en este hecho se decidió expresar heterólogamente la agrupación de biosíntesis de tacrolimus en *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$ (cepa que fue cedida por la Dra. Borodina) y en *S. coelicolor* M145. En ninguna de las cepas se detectó producción de tacrolimus a niveles detectables mediante HPLC. Posteriormente, se comprobó que la transcripción de la agrupación de los caldos de cultivo solo mediante LC-MS. Este experimento permitió comparar la transcripción de los genes pfkA de ambas especies en un mismo medio de cultivo (MGm-2.5). La principal diferencia observada fue la falta de activación transcripcional de pfkA2 en *S. coelicolor* no estimula la transcripción de los otros parálogos como proponen Borodina y col. (2008).

El incremento de la producción de actinorrodina en el mutante de *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$ se correlaciona con un aumento de la transcripción del regulador *actII-orf4*, entre otros (Borodina y col., 2008). En medio MGm-2.5 la transcripción de los genes de la agrupación de undecilprodigiosina no se ve afectada por la mutación; sin embargo, algunos genes de las agrupaciones de actinorrodina y CDA presentaron una disminución significativa de su transcripción en la cepa de *S. coelicolor* $\Delta pfkA2$. Estos resultados apuntan a que los efectos de la deleción de *pfkA2* observados por Borodina y col. (2008) fueron en cierta medida dependientes del medio de cultivo utilizado.

Por último, como alternativa a la deleción de genes *pfkA* en *S. tsukubaensis* se planteó la sobreexpresión de *glpX*, que codifica una fructosa-1,6-bifosfatasa que cataliza la reacción contraria a la de las PfkA. Su sobreexpresión a partir del promotor fuerte

constitutivo *ermE** no afectó a la producción de tacrolimus ni produjo variaciones fenotípicas ni en medio sólido ni en líquido, aunque en medio ISP4 se detectó producción de un pigmento rosa que también se produce en medio ISP2 y que se ha relacionado con la presencia de agentes estresantes (p. ej., DMSO) en el medio de cultivo (Martínez-Castro y col., 2013).

En el género *Streptomyces* la fructosa-1,6-bifosfato podría participar en la CCR por glucosa ya que la adición de este azúcar al medio de cultivo de *S. peucetius* var. *caesius* reduce la producción de antraciclina en más de un 50 % (Ramos y col., 2004). La sobreexpresión de *glpX* podría reducir los niveles intracelulares de fructosa-1,6-bifosfato, lo que a su vez podría aliviar el efecto represor de la adición de glucosa. Para comprobar esta hipótesis se añadió glucosa a una concentración represora de la producción de tacrolimus (222 mM) a mitad de la fase de crecimiento exponencial de cultivos de la cepa de *S. tsukubaensis* que sobreexpresa *glpX*. Se detectó producción de tacrolimus, aunque en baja concentración, lo que apoya la hipótesis planteada. Sin embargo, para comprobarla sería necesaria la valoración de los niveles intracelulares de fructosa-1,6-bifosfato.

El análisis de los genes *pfkA* corrobora la idea extendida de que la presencia de múltiples copias de un gen no es un fenómeno aleatorio y que cada una de ellas sirve a un fin determinado o en determinadas condiciones. Los perfiles transcripcionales de los genes *gap* en los cultivos en los que de añadió glucosa, glicerol o maltosa son otro ejemplo y apoyan los resultados proteómicos de Gubbens y col. (2012).

• Estudio del regulón pho en S. tsukubaensis

El estudio del regulón *pho* en *Streptomyces* ha sido uno de los objetivos de nuestro grupo de trabajo durante años. En el caso de *S. tsukubaensis* los trabajos previos a esta tesis abarcan la búsqueda de cajas PHO en el genoma y la comprobación de la unión de PhoP a algunas de ellas mediante ensayos de retraso en gel. En ellos se logró determinar la regulación por PhoP de genes del regulón como *pitH2*, *pstS*, *ppK*, *phoU* y *phoRP*, aunque también de genes del metabolismo del nitrógeno como *glnA* y *amtB* o del regulador del metabolismo secundario *afsS*.

Los perfiles de *phoU*, *phoRP* y del operón *pstSCAB* en los experimentos transcriptómicos realizados evidencian una regulación positiva transitoria de la transcripción de todos ellos tras cualquiera de las cuatro adiciones realizadas (glucosa, glicerol, maltosa y N-acetilglucosamina). Esta activación se interpreta como una escasez puntual de fosfato debido a su utilización en el transporte de la fuente adicionada, aunque podría ser debida también a la necesidad de alguna molécula fosforilada. La respuesta de genes del regulón *pho* a la presencia de ciertas fuentes de carbono ha sido puesta de manifiesto en trabajos anteriores: en *S. lividans* PstS se acumula en el medio en presencia de ciertas fuentes de carbono, pero esto solo ocurre cuando el fosfato ya se ha agotado (Díaz y col., 2005). La aportación más interesante del análisis transcriptómico al estudio del regulón *pho* en *S. tsukubaensis* es su activación en condiciones de disponibilidad de fosfato.

La búsqueda de perfiles transcripcionales semejantes al de *phoP* en el experimento de adición de glucosa y glicerol puso de manifiesto la existencia de 11 genes con un perfil

muy similar que no presentan un ortólogo recíproco en *S. coelicolor* o que, en caso de tenerlo, no pertenece al regulón *pho* en el organismo modelo. Entre ellos destaca un sistema de dos componentes cuyo regulador de respuesta presenta un dominio relacionado con la resistencia a metales pesados; sin embargo, debido a su similitud con el perfil de *phoP* también podría tratarse de un segundo sistema de respuesta a la escasez de fosfato.

• Estudio de la transcripción de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus y efecto de la inactivación de *fkbN*

La agrupación de biosíntesis de tacrolimus en *S. tsukubaensis* presenta dos reguladores positivos: *fkbR* y *fkbN*. La observación de sus perfiles transcripcionales en medio MGm-2.5 al que se añadió maltosa corrobora los resultados descritos por Goranovič y col. (2012). La transcripción de *fkbR* se produce de forma continua durante el cultivo y a bajos niveles mientras que la de *fkbN* coincide con el inicio de la fase estacionaria de crecimiento (a partir de las 89 horas de cultivo).

A excepción de *fkbR* y de *fkbG*, que presentan perfiles muy característicos, los genes de la agrupación se clasifican en tres grupos en base a la similitud de sus perfiles en *S. tsukubaensis* en medio MGm-2.5 con maltosa. La expresión heteróloga de la agrupación en *S. coelicolor* permitió subdividir los grupos formados en varios subgrupos en base a sus perfiles de transcripción. De este modo se propone que los siguientes grupos de genes presentan una regulación común:

- A. allO y allP
- B. allM, allN y allS
- C. fkbM y fkbD
- D. fkbA, fkbB y fkbC
- E. fkbH, fkbI, fkbJ, fkbK y fkbL
- F. fkbO y fkbP
- G. fkbN y fkbQ
- H. allA, allK, allR y allD

Los grupos formados son coherentes con el hecho de que *fkbM* y *fkbD* y *allA* y *allK* forman una unidad transcripcional.

El regulador FkbN es indispensable para la producción de tacrolimus; sin embargo, Goranovič y col. (2012) detectaron transcritos de genes estructurales en el mutante en *fkbN*. Para profundizar en el estudio del papel de *fkbN* se desarrolló un experimento transcriptómico comparativo entre la cepa de *S. tsukubaensis* que presenta *fkbN* inactivado y con su cepa silvestre parental, ambas cedidas por el Dr. H. Petckovic. Como cabía esperar, los efectos de la inactivación de *fkbN* se manifiestan a partir de las 89 horas de cultivo y consisten en una ausencia de activación de la transcripción de todos los genes de la agrupación salvo de allS, allO, allP, allN, allM, fkbR y fkbQ, que se proponen, por tanto, como independientes de FkbN.

Entre los genes que presentan un perfil semejante al de *fkbN* en MGm-2.5 con maltosa destaca STSU_07628, que codifica una 4'-fosfopanteteinil transferasa. Estas enzimas activan los dominios transportadores de las sintasas de policétido y de las sintetasas de péptidos no ribosomales. La interrupción del ortólogo de STSU_07628 en *S. coelicolor* bloquea la producción de CDA (Lu y col., 2008), por lo que en *S. tsukubaensis* podría estar implicado en la producción de tacrolimus. Además, su transcripción en el mutante en *fkbN* se ve reducida significativamente, lo que apoya esta hipótesis. Entre los genes cuya transcripción se regula positivamente por la inactivación de *fkbN* en tres o más tiempos destacan STSU_02055 y STSU_02060, que codifican subunidades de una sintasa de policétido. STSU_02055 es ortólogo de *cpkA* de *S. coelicolor*, cuyo producto participa en la producción de un policétido críptico (Pawlik y col., 2007). El mutante de *S. tsukubaensis* en *fkbN* podría ser útil para el aislamiento e identificación del producto de estas sintasas, ya que su producción podría aumentar como consecuencia del aumento de la transcripción de sus genes biosintéticos.

Varios genes que codifican factores sigma como por ejemplo *sigU*, *sigH*, *hrdA* y *hrdB* presentaron perfiles muy similares al de *fkbN* en el experimento transcriptómico de adición de fuentes de carbono; sin embargo, tal similitud entre perfiles no se observó cuando se analizaron en el estudio de *S. tsukubaensis* $\Delta fkbN$. Las diferencias detectadas podrían deberse a variaciones entre las cepas silvestres utilizadas y/o a la ausencia de adición de maltosa en el caso del experimento con *S. tsukubaensis* $\Delta fkbN$.

VI. CONCLUSIONES



- La adición de glucosa a una concentración final de 222 mM a las 70 horas de crecimiento en medio MGm-2.5 reprime la producción de tacrolimus en *S. tsukubaensis*; mientras que la adición de glicerol en las mismas condiciones retrasa el inicio de la producción y la reduce a un 40 % de la producción máxima alcanzada en la condición control. Ambas adiciones suponen una ausencia de activación transcripcional de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus al menos hasta las 148 horas de cultivo.
- 2. La adición de glucosa a una concentración final de 222 mM a las 70 horas de crecimiento en medio MGm-2.5 regula de forma específica y en sentido positivo la transcripción de 46 genes y en sentido negativo la de 50 genes 40 minutos después de la adición ($M_c \ge 2 \text{ o} \le -2$, respectivamente; $p_{FDR} \le 0.05$). Dicha adición estimula la transcripción de varios genes relacionados con el metabolismo del carbono, la biosíntesis de nucleótidos y aminoácidos y la asimilación de amonio. Reduce la transcripción de varios genes relacionados con el transporte de fuentes de carbono alternativas y oligopéptidos y de varios reguladores de la diferenciación morfológica.
- 3. La adición de glicerol a una concentración final de 222 mM a las 70 h de crecimiento en medio MGm-2.5 regula de forma específica y en sentido positivo la transcripción de 106 genes y en sentido negativo la de 14 genes 40 minutos después de la adición ($M_c \ge 2 \text{ o} \le -2$, respectivamente; $p_{FDR} \le 0.05$). Dicha adición estimula la transcripción de genes relacionados con el transporte y metabolismo del glicerol, la biosíntesis de ácidos grasos, el transporte de compuestos azufrados, la reducción del sulfato y de varios genes relacionados con la respuesta al estrés oxidativo y al estrés por disulfuro.
- 4. El efecto producido por las adiciones anteriores sobre la transcripción se mantiene a las dos horas de la adición en un 40 %-50 % de los casos, salvo cuando se trata de regulación negativa por glucosa, donde el efecto se mantiene en el 94 % de los casos.
- 5. El espectro de genes afectados por las adiciones de glucosa y glicerol es muy diferente y solo se detectan 7 genes regulados positivamente y 4 genes regulados negativamente que sean comunes a la respuesta de ambas adiciones.
- 6. La adición de N-acetilglucosamina a una concentración final del 0.5 % p/v (22.6 mM) a las 70 horas de crecimiento en medio MGm-2.5 reduce la producción de tacrolimus en *S. tsukubaensis* en más de un 50 % respecto a la condición control sin afectar significativamente al crecimiento.
- 7. La adición de N-acetilglucosamina a una concentración final del 0.5 % p/v (22.6 mM) a las 70 horas de crecimiento en medio MGm-2.5 afecta significativamente a un total de 2883 genes ($p_{FDR} \le 0.05$), de los cuales 1386 varían significativamente en t_{70.5 h}, t_{71 h} y t_{72 h} o en t_{71 h} y t_{72 h}. Dicha adición estimula la transcripción de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos, con procesos de replicación y traducción del ADN y con el metabolismo del carbono. Reduce la transcripción de genes relacionados con el transporte de fuentes de carbono alternativas y de varios reguladores clave de la diferenciación morfológica.
- 8. Las respuestas a la adición de glucosa a una concentración final de 222 mM y a la adición de N-acetilglucosamina a una concentración final del 0.5 % p/v (22.6.mM) a

las 70 horas de cultivo en MGm-2.5 presentan un espectro similar de genes regulados.

- 9. La transcripción de los genes *phoRP* y *pstSCAB*, pertenecientes al regulón *pho*, presenta una regulación positiva tras la adición de glucosa, glicerol, maltosa o N-acetilglucosamina en *S. tsukubaensis*.
- 10. La transcripción de varios componentes del operón *nuo*, que codifica una NADH deshidrogenasa I, presenta una regulación negativa tras la adición de glucosa, glicerol o N-acetilglucosamina en *S. tsukubaensis*.
- 11. La inactivación de *fkbN* en *S. tsukubaensis,* que codifica un regulador positivo de la producción de tacrolimus, provoca la ausencia de activación transcripcional a partir de las 89 horas de cultivo en MGm-2.5 de todos los genes de la agrupación, salvo *allS, allO, allP, allN, allM, fkbQ* y *fkbR*.
- 12. *S. tsukubaensis* presenta tres genes codificantes de 6-fosfofructoquinasas (*pfkA1*, *pfkA2* y *pfkA3*) cuya deleción no afecta a la morfología de las colonias en los medios sólidos TSA e ISP4 y mejora ligeramente el crecimiento sin afectar a la producción de tacrolimus en el medio líquido MGm-2.5.
- 13. Los tres genes *pfkA* de *S. tsukubaensis* no presentan la misma regulación transcripcional. La transcripción de estos genes depende de la fase de cultivo y de las condiciones nutricionales ensayadas.
- 14. La represión de la producción de tacrolimus por glucosa se alivia mediante la sobreexpresión de *glpX*, gen que codifica una fructosa-1,6-bifosfatasa, lo que indica un posible papel de la fructosa-1,6-bifosfato en la regulación por catabolito de carbono en esta especie
- 15. La introducción de la agrupación de biosíntesis de tacrolimus en *S. coelicolor* M145 no conlleva la producción de concentraciones detectables de tacrolimus en medio MGm-2.5, lo que es debido, al menos, a los bajos niveles de transcripción heteróloga de los genes de la agrupación.
VII. REFERENCIAS

- Aceti, D. J. y Champness, W. C. (1998), 'Transcriptional regulation of *Streptomyces coelicolor* pathway-specific antibiotic regulators by the *absA* and *absB* loci.', *J Bacteriol* 180(12), 3100--3106.
- Adamidis, T.; Riggle, P. y Champness, W. (1990), 'Mutations in a new Streptomyces coelicolor locus which globally block antibiotic biosynthesis but not sporulation.', J Bacteriol 172(6), 2962-2969.
- Aguilar, A. y Hopwood, D. A. (1982), 'Determination of methylenomycin A synthesis by the pSV1 plasmid from *Streptomyces* violaceus-ruber SANK 95570.', *J Gen Microbiol* 128(8), 1893--1901.

Aharonowitz, Y. (1980), 'Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis.', Annu Rev Microbiol 34, 209-233.

- Ahn, B.-E.; Cha, J.; Lee, E.-J.; Han, A.-R.; Thompson, C. J. y Roe, J.-H. (2006), 'Nur, a nickel-responsive regulator of the Fur family, regulates superoxide dismutases and nickel transport in *Streptomyces coelicolor.*', *Mol Microbiol* **59**(6), 1848--1858.
- Aínsa, J. A.; Bird, N.; Ryding, N. J.; Findlay, K. C. y Chater, K. F. (2010), 'The complex whil locus mediates environmentally sensitive repression of development of Streptomyces coelicolor A3(2).', Antonie Van Leeuwenhoek 98(2), 225--236.
- Aínsa, J. A.; Parry, H. D. y Chater, K. F. (1999), 'A response regulator-like protein that functions at an intermediate stage of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Mol Microbiol* 34(3), 607–619.
- Aínsa, 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(19), 5470--5478.
- Akimoto, K.; Kusunoki, Y.; Nishio, S.; Takagi, K. y Kawai, S. (2008), 'Safety profile of tacrolimus in patients with rheumatoid arthritis.', *Clin Rheumatol* 27(11), 1393--1397.
- Alam, M. T.; Merlo, M. E.; Takano, E. y Breitling, R. (2010), 'Genome-based phylogenetic analysis of Streptomyces and its relatives.', Mol Phylogenet Evol 54(3), 763--772.
- Al-Bassam, M. M.; Bibb, M. J.; Bush, M. J.; Chandra, G. y Buttner, M. J. (2014), 'Response regulator heterodimer formation controls a key stage in *Streptomyces* development.', *PLoS Genet* 10(8), e1004554.
- Allen, M. P.; Zumbrennen, K. B. y McCleary, W. R. (2001), 'Genetic evidence that the alpha5 helix of the receiver domain of PhoB is involved in interdomain interactions.', J Bacteriol 183(7), 2204--2211.
- Allenby, N. E. 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(19), 9543–9556.
- Alvarez-Álvarez, R.; Rodríguez-García, A.; Santamarta, I.; Pérez-Redondo, R.; Prieto-Domínguez, A.; Martínez-Burgo, Y. y Liras, P. (2014), 'Transcriptomic analysis of Streptomyces clavuligerus ΔccaR::tsr: effects of the cephamycin C-clavulanic acid cluster regulator CcaR on global regulation.', Microb Biotechnol 7(3), 221--231.
- Alves, A. M.; Euverink, G. J.; Bibb, M. J. y Dijkhuizen, L. (1997), 'Identification of ATP-dependent phosphofructokinase as a regulatory step in the glycolytic pathway of the actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2).', Appl Environ Microbiol 63(3), 956-961.
- Alves, A. M.; Euverink, G. J.; Santos, H. y Dijkhuizen, L. (2001), 'Different physiological roles of ATP- and PP(i)-dependent phosphofructokinase isoenzymes in the methylotrophic actinomycete *Amycolatopsis methanolica*.', J Bacteriol 183(24), 7231--7240.
- Alves, A. M.; Meijer, W. G.; Vrijbloed, J. W. y Dijkhuizen, L. (1996), 'Characterization and phylogeny of the *pfp* gene of *Amycolatopsis* methanolica encoding PPi-dependent phosphofructokinase.', J Bacteriol 178(1), 149--155.

American Public Health Association (1917), 'Standard Methods of Water Analysis, 3rd edition'. Washington DC: AHPA.

- 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**(3), 553--566.
- Anderson, A. S. y Wellington, E. M. (2001), 'The taxonomy of *Streptomyces* and related genera.', *Int J Syst Evol Microbiol* 51(Pt 3), 797--814.
- Andexer, J. N.; Kendrew, S. G.; Nur-e-Alam, M.; Lazos, O.; Foster, T. A.; Zimmermann, A.-S.; Warneck, T. D.; Suthar, D.; Coates, N. J.; Koehn, F. E.; Skotnicki, J. S.; Carter, G. T.; Gregory, M. A.; Martin, C. J.; Moss, S. J.; Leadlay, P. F. y Wilkinson, B.

(2011), 'Biosynthesis of the immunosuppressants FK506, FK520, and rapamycin involves a previously undescribed family of enzymes acting on chorismate.', *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(12), 4776--4781.

- Angell, S.; Lewis, C. G.; Buttner, M. J. y Bibb, M. J. (1994), 'Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase.', *Mol Gen Genet* 244(2), 135--143.
- Angell, S.; Schwarz, E. y Bibb, M. J. (1992), 'The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression.', *Mol Microbiol* 6(19), 2833--2844.
- Antelmann, H.; Scharf, C. y Hecker, M. (2000), 'Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis.', *J Bacteriol* 182(16), 4478--4490.
- Apel, A. K.; Sola-Landa, A.; Rodríguez-García, A. y Martín, J. F. (2007), 'Phosphate control of phoA, phoC and phoD gene expression in Streptomyces coelicolor reveals significant differences in binding of PhoP to their promoter regions.', Microbiology 153(Pt 10), 3527–3537.
- Arabolaza, A.; Banchio, C. y Gramajo, H. (2006), 'Transcriptional regulation of the macs1-fadD1 operon encoding two acyl-CoA synthases involved in the physiological differentiation of Streptomyces coelicolor.', Microbiology 152(Pt 5), 1427--1439.
- Arabolaza, A.; D'Angelo, M.; Comba, S. y Gramajo, H. (2010), 'FasR, a novel class of transcriptional regulator, governs the activation of fatty acid biosynthesis genes in *Streptomyces coelicolor.*', *Mol Microbiol* **78**(1), 47--63.
- Arias, P.; Fernández-Moreno, M. A. y Malpartida, F. (1999), 'Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein.', *J Bacteriol* 181(22), 6958--6968.
- Arndt, C.; Cruz, M. C.; Cardenas, M. E. y Heitman, J. (1999), 'Secretion of FK506/FK520 and rapamycin by *Streptomyces* inhibits the growth of competing *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans.*', *Microbiology* 145 (Pt 8), 1989--2000.
- Atlas, R. M. (1997), 'Principles of Microbiology.', McGraw-Hill Higher Education.
- Auesukaree, C.; Homma, T.; Tochio, H.; Shirakawa, M.; Kaneko, Y. y Harashima, S. (2004), 'Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.', *J Biol Chem* 279(17), 17289--17294.
- Ausmees, N.; Wahlstedt, H.; Bagchi, S.; Elliot, M. A.; Buttner, M. J. y Flärdh, K. (2007), 'SmeA, a small membrane protein with multiple functions in *Streptomyces* sporulation including targeting of a SpolIIE/FtsK-like protein to cell division septa.', *Mol Microbiol* 65(6), 1458--1473.

В

- Bachhawat, P.; Swapna, G. V. T.; Montelione, G. T. y Stock, A. M. (2005), 'Mechanism of activation for transcription factor PhoB suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states.', *Structure* 13(9), 1353--1363.
- Bagwell, C. E.; Bhat, S.; Hawkins, G. M.; Smith, B. W.; Biswas, T.; Hoover, T. R.; Saunders, E.; Han, C. S.; Tsodikov, O. V. y Shimkets,
 L. J. (2008), 'Survival in nuclear waste, extreme resistance, and potential applications gleaned from the genome sequence of *Kineococcus radiotolerans* SRS30216.', *PLoS One* 3(12), e3878.
- Ban, Y. H.; Lee, J. H.; Gu, G. R.; Lee, B.; Mo, S.; Kwon, H. J. y Yoon, Y. J. (2013b), 'Mutational biosynthesis of a FK506 analogue containing a non-natural starter unit.', *Mol Biosyst* 9(5), 944--947.
- Ban, Y. H.; Shinde, P. B.; Hwang, J.-Y.; Song, M.-C.; Kim, D. H.; Lim, S.-K.; Sohng, J. K. y Yoon, Y. J. (2013a), 'Characterization of FK506 biosynthetic intermediates involved in post-PKS elaboration.', *J Nat Prod* 76(6), 1091--1098.
- Banchio, C. y Gramajo, H. (2002), 'A stationary-phase acyl-coenzyme A synthetase of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is necessary for the normal onset of antibiotic production.', *Appl Environ Microbiol* 68(9), 4240--4246.
- Barreiro, C. y Martínez-Castro, M. (2014), 'Trends in the biosynthesis and production of the immunosuppressant tacrolimus (FK506).', Appl Microbiol Biotechnol 98(2), 497--507.
- Barreiro, C.; Prieto, C.; Sola-Landa, A.; Solera, E.; Martínez-Castro, M.; Pérez-Redondo, R.; García-Estrada, C.; Aparicio, J. F.; Fernández-Martínez, L. T.; Santos-Aberturas, J.; Salehi-Najafabadi, Z.; Rodríguez-García, A.; Tauch, A. y Martín, J. F. (2012), 'Draft genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the producer of the clinically important immunosuppressant tacrolimus (FK506).', *J Bacteriol* 194(14), 3756--3757.
- 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(7), 1625–1634.

- Bate, N.; Stratigopoulos, G. y Cundliffe, E. (2002), 'Differential roles of two SARP-encoding regulatory genes during tylosin biosynthesis.', *Mol Microbiol* 43(2), 449--458.
- Baumann, K. y Emmer, G. (1999), 'Heteroatoms-containing tricyclic compounds', US Patent 5,912,238.
- Becker, J. W.; Rotonda, J.; McKeever, B. M.; Chan, H. K.; Marcy, A. I.; Wiederrecht, G.; Hermes, J. D. y Springer, J. P. (1993), 'FK-506binding protein: three-dimensional structure of the complex with the antagonist L-685,818.', J Biol Chem 268(15), 11335--11339.
- Bedford, D. J.; Lewis, C. G. y Buttner, M. J. (1991), 'Characterization of a gene conferring bialaphos resistance in *Streptomyces* coelicolor A3(2).', Gene 104(1), 39--45.
- Beever, R. E. y Burns, D. J. W. (1980), 'Phosphorus Uptake, Storage and Utilization by Fungi. ', En Woolhouse H. W. (Ed), 'Advances in Botanical Research' (vol 8; pp. 127–192). London: Academic Press.
- Beisel, C. L. y Storz, G. (2011), 'The base-pairing RNA spot 42 participates in a multioutput feedforward loop to help enact catabolite repression in *Escherichia coli*.', *Mol Cell* 41(3), 286--297.
- Belfaquih y Penninckx (2000), 'A bifunctional beta-xylosidase-xylose isomerase from *Streptomyces* sp. EC 10.', *Enzyme Microb Technol* 27(1-2), 114--121.
- Benjamini, Y. y Hochberg, Y. (1995), 'Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing', Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) 57(1), pp. 289-300.
- Benson, A.; Barrett, T.; Sparberg, M. y Buchman, A. L. (2008), 'Efficacy and safety of tacrolimus in refractory ulcerative colitis and Crohn's disease: a single-center experience.', Inflamm Bowel Dis 14(1), 7--12.
- Bentley, S. D.; Chater, K. F.; Cerdeño-Tárraga, A.-M.; Challis, G. L.; Thomson, N. R.; James, K. D.; Harris, D. E.; Quail, M. A.; Kieser, H.; Harper, D.; Bateman, A.; Brown, S.; Chandra, G.; Chen, C. W.; Collins, M.; Cronin, A.; Fraser, A.; Goble, A.; Hidalgo, J.; Hornsby, T.; Howarth, S.; Huang, C.-H.; Kieser, T.; Larke, L.; Murphy, L.; Oliver, K.; O'Neil, S.; Rabbinowitsch, E.; Rajandream, M.-A.; Rutherford, K.; Rutter, S.; Seeger, K.; Saunders, D.; Sharp, S.; Squares, R.; Squares, S.; Taylor, K.; Warren, T.; Wietzorrek, A.; Woodward, J.; Barrell, B. G.; Parkhill, J. y Hopwood, D. A. (2002), 'Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolar* A3(2).', *Nature* 417(6885), 141--147.
- Bentley, S. D.; Maiwald, M.; Murphy, L. D.; Pallen, M. J.; Yeats, C. A.; Dover, L. G.; Norbertczak, H. T.; Besra, G. S.; Quail, M. A.; Harris, D. E.; von Herbay, A.; Goble, A.; Rutter, S.; Squares, R.; Squares, S.; Barrell, B. G.; Parkhill, J. y Relman, D. A. (2003), 'Sequencing and analysis of the genome of the Whipple's disease bacterium *Tropheryma whipplei*.', *Lancet* 361(9358), 637--644.
- Berg, J. M. (2002), 'Glucose can be synthesized from noncarbohydrate precursors.'. En Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. y Stryer L. (Eds), 'Biochemistry'. New York: W.H. Freeman.
- Bettenbrock, K.; Sauter, T.; Jahreis, K.; Kremling, A.; Lengeler, J. W. y Gilles, E.-D. (2007), 'Correlation between growth rates, EIIA^{Crr} phosphorylation, and intracellular cyclic AMP levels in *Escherichia coli* K-12.', *J Bacteriol* 189(19), 6891–6900.
- Bibb, M. (1996), '1995 Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Microbiology* 142 (Pt 6), 1335--1344.
- Bibb, M. J. (2005), 'Regulation of secondary metabolism in Streptomycetes.', Curr Opin Microbiol 8(2), 208--215.
- **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 o^{BidM} and a cognate anti-sigma factor, RsbN.', *Mol Microbiol* **84**(6), 1033--1049.
- Bibb, M. J.; Molle, V. y Buttner, M. J. (2000), 'o^{BldN}, an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *J Bacteriol* **182**(16), 4606--4616.
- 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(1), 43--49.
- Bignell, D. R.; Warawa, J. L.; Strap, J. L.; Chater, K. F. y Leskiw, B. K. (2000), 'Study of the *bldG* locus suggests that an anti-sigma factor and an anti-sigma factor may be involved in *Streptomyces coelicolor* antibiotic production and sporulation.', *Microbiology* 146 (Pt 9), 2161--2173.
- Birck, C.; Chen, Y.; Hulett, F. M. y Samama, J.-P. (2003), 'The crystal structure of the phosphorylation domain in PhoP reveals a functional tandem association mediated by an asymmetric interface.', J Bacteriol 185(1), 254--261.

Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979), 'A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.', Nucleic Acids Res

- Bischoff, V.; Cookson, S. J.; Wu, S. y Scheible, W.-R. (2009), 'Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings.', J Exp Bot 60(3), 955--965.
- Bishop, A.; Fielding, S.; Dyson, P. y Herron, P. (2004), 'Systematic insertional mutagenesis of a streptomycete genome: a link between osmoadaptation and antibiotic production.', *Genome Res* 14(5), 893--900.
- Blazic, M.; Starcevic, A.; Lisfi, M.; Baranasic, D.; Goranovic, D.; Fujs, S.; Kuščer, E.; Kosec, G.; Petkovic, H.; Cullum, J.; Hranueli, D. y Zucko, J. (2012), 'Annotation of the modular polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase gene clusters in the genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488.', *Appl Environ Microbiol* 78(23), 8183--8190.
- Blencke, H.-M.; Homuth, G.; Ludwig, H.; Mäder, U.; Hecker, M. y Stülke, J. (2003), 'Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways.', *Metab Eng* 5(2), 133--149.
- Bongaerts, J.; Zoske, S.; Weidner, U. y Unden, G. (1995), 'Transcriptional regulation of the proton translocating NADH dehydrogenase genes (*nuoA-N*) of *Escherichia coli* by electron acceptors, electron donors and gene regulators.', *Mol Microbiol* 16(3), 521--534.
- Boos, W. y Shuman, H. (1998), 'Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation.', *Microbiol Mol Biol Rev* 62(1), 204-229.
- Borodina, I.; Siebring, J.; Zhang, J.; Smith, C. P.; van Keulen, G.; Dijkhuizen, L. y Nielsen, J. (2008), 'Antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) mediated by phosphofructokinase deletion.', *J Biol Chem* 283(37), 25186--25199.
- Braña, A. F.; Manzanal, M. B. y Hardisson, C. (1982), 'Characterization of intracellular polysaccharides of *Streptomyces.*', *Can J Microbiol* 28(12), 1320--1323.
- Braña, A. F.; Méndez, C.; Díaz, L. A.; Manzanal, M. B. y Hardisson, C. (1986a), 'Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus.*', *J Gen Microbiol* 132(5), 1319--1326.
- Braña, A. F.; Wolfe, S. y Demain, A. L. (1986b), 'Relationship between nitrogen assimilation and cephalosporin synthesis in Streptomyces clavuligerus.', Arch Microbiol 146(1), 46--51.
- Brekasis, D. y Paget, M. S. B. (2003), 'A novel sensor of NADH/NAD+ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *EMBO J* 22(18), 4856--4865.
- Breuder, T.; Hemenway, C. S.; Movva, N. R.; Cardenas, M. E. y Heitman, J. (1994), 'Calcineurin is essential in cyclosporin A- and FK506-sensitive yeast strains.', Proc Natl Acad Sci U S A 91(12), 5372--5376.
- Briggs, C. J.; Ott, D. E.; Coren, L. V.; Oroszlan, S. y Tözsér, J. (1999), 'Comparison of the effect of FK506 and cyclosporin A on virus production in H9 cells chronically and newly infected by HIV-1.', *Arch Virol* 144(11), 2151--2160.
- Brocker, M.; Schaffer, S.; Mack, C. y Bott, M. (2009), 'Citrate utilization by Corynebacterium glutamicum is controlled by the CitAB two-component system through positive regulation of the citrate transport genes citH and tctCBA.', J Bacteriol 191(12), 3869--3880.
- Brückner, R. y Titgemeyer, F. (2002), 'Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization.', *FEMS Microbiol Lett* 209(2), 141–148.
- Brzoska, P. y Boos, W. (1988), 'Characteristics of a *ugp*-encoded and *phoB*-dependent glycerophosphoryl diester phosphodiesterase which is physically dependent on the ugp transport system of *Escherichia coli*.', *J Bacteriol* 170(9), 4125--4135.
- Bullock, W. O., F. J. M. y Short, J. M. (1987), 'XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with betagalactosidase selection', *Biotechniques* 5 4, 376–378.
- Busby, S. y Ebright, R. H. (1999), 'Transcription activation by catabolite activator protein (CAP).', J Mol Biol 293(2), 199--213.
- Butler, A. R.; Bate, N. y Cundliffe, E. (1999), 'Impact of thioesterase activity on tylosin biosynthesis in Streptomyces fradiae.', Chem Biol 6(5), 287--292.
- Butler, A. R. y Cundliffe, E. (2001), 'Influence of dimethylsulfoxide on tylosin production in *Streptomyces fradiae*.', *J Ind Microbiol Biotechnol* 27(1), 46–51.
- Butler, A. R.; Gandecha, A. R. y Cundliffe, E. (2001), 'Influence of ancillary genes, encoding aspects of methionine metabolism, on tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae.*', *J Antibiot (Tokyo)* **54**(8), 642--649.

- Butler, M. J.; Bruheim, P.; Jovetic, S.; Marinelli, F.; Postma, P. W. y Bibb, M. J. (2002), 'Engineering of primary carbon metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces lividans*.', *Appl Environ Microbiol* 68(10), 4731--4739.
- Butler, M. J.; Deutscher, J.; Postma, P. W.; Wilson, T. J.; Galinier, A. y Bibb, M. J. (1999), 'Analysis of a *ptsH* homologue from Streptomyces coelicolor A3(2).', FEMS Microbiol Lett 177(2), 279--288.
- 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(6), 3367--3378.
- Buttner, M. J. y Lewis, C. G. (1992), 'Construction and characterization of *Streptomyces coelicolor* A3(2) mutants that are multiply deficient in the nonessential *hrd*-encoded RNA polymerase sigma factors.', *J Bacteriol* 174(15), 5165-5167.
- Byrne, K.; Shafiee, A.; Nielsen, J.; Arison, B.; Monaghan, R. y Kaplan, L. (1993), 'The biosynthesis and enzymology of an immunosuppressant, immunomycin, produced by *Streptomyces hygroscopicus* var. *ascomyceticus*', *Dev Ind Microbiol* 32, 29--45.

С

- Cabrera, R.; Ambrosio, A. L. B.; Garratt, R. C.; Guixé, V. y Babul, J. (2008), 'Crystallographic structure of phosphofructokinase-2 from Escherichia coli in complex with two ATP molecules. Implications for substrate inhibition.', J Mol Biol 383(3), 588--602.
- Cabri, W.; Paissoni, P.; Roletto, J. y Morra, L. (2006), 'Process for the purification of tacrolimus', WO Patent App. PCT/EP2005/011,393.
- Capstick, D. S.; Willey, J. M.; Buttner, M. J. y Elliot, M. A. (2007), 'SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in *Streptomyces coelicolor.*', *Mol Microbiol* 64(3), 602--613.
- Carmany, D. O.; Hollingsworth, K. y McCleary, W. R. (2003), 'Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR.', J Bacteriol 185(3), 1112--1115.
- Carroll, B. J.; Moss, S. J.; Bai, L.; Kato, Y.; Toelzer, S.; Yu, T.-W. y Floss, H. G. (2002), 'Identification of a set of genes involved in the formation of the substrate for the incorporation of the unusual "glycolate" chain extension unit in ansamitocin biosynthesis.', J Am Chem Soc 124(16), 4176-4177.
- Cases, I.; Velázquez, F. y de Lorenzo, V. (2007), 'The ancestral role of the phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system (PTS) as exposed by comparative genomics.', *Res Microbiol* **158**(8-9), 666--670.
- Castillo, U. F.; Strobel, G. A.; Ford, E. J.; Hess, W. M.; Porter, H.; Jensen, J. B.; Albert, H.; Robison, R.; Condron, M. A. M.; Teplow, D.
 B.; Stevens, D. y Yaver, D. (2002), 'Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans.*', *Microbiology* 148(Pt 9), 2675--2685.
- Castro, L.; Feucht, B. U.; Morse, M. L. y Saier, Jr, M. (1976), 'Regulation of carbohydrate permeases and adenylate cyclase in Escherichia coli. Studies with mutant strains in which enzyme I of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system is thermolabile.', J Biol Chem 251(18), 5522--5527.
- Chakraburtty, R. y Bibb, M. (1997), 'The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation.', *J Bacteriol* 179(18), 5854--5861.
- Chakraburtty, R.; White, J.; Takano, E. y Bibb, M. (1996), 'Cloning, characterization and disruption of a (p)ppGpp synthetase gene (relA) of Streptomyces coelicolor A3(2).', Mol Microbiol 19(2), 357--368.
- Champness, W. (2000), 'Actinomycete Development, Antibiotic Production, and Phylogeny: Questions and Challenges.'. En Brun Y. y Shimkets L. (Eds), 'Prokaryotic Development' (pp. 11—31). Washington: American Society of Microbiology Press.
- Chandra, G. y Chater, K. F. (2008), 'Evolutionary flux of potentially *bldA*-dependent *Streptomyces* genes containing the rare leucine codon TTA.', *Antonie Van Leeuwenhoek* 94(1), 111--126.
- Chandra, G. y Chater, K. F. (2014), 'Developmental biology of *Streptomyces* from the perspective of 100 actinobacterial genome sequences.', *FEMS Microbiol Rev* 38(3), 345--379.
- Chang, P. C. y Cohen, S. N. (1994), 'Bidirectional replication from an internal origin in a linear streptomyces plasmid.', *Science* 265(5174), 952--954.
- Chang, H. M.; Chen, M. Y.; Shieh, Y. T.; Bibb, M. J. y Chen, C. W. (1996), 'The *cutRS* signal transduction system of *Streptomyces lividans* represses the biosynthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin.', *Mol Microbiol* 21(5), 1075--1085.

- Chang, S. A.; Bralley, P. y Jones, G. H. (2005), 'The *absB* gene encodes a double strand-specific endoribonuclease that cleaves the read-through transcript of the *rpsO-pnp* operon in *Streptomyces coelicolor.*', *J Biol Chem* 280(39), 33213--33219.
- Chaphalkar, S. R. y Dey, S. (1998), 'Thermostable alkaline metalloprotease from newly isolated alkalophilic Streptomyces diastaticus strain SS1.', Indian J Biochem Biophys 35(1), 34--40.
- Chater, K. F. (1972), 'A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor.*', *J Gen Microbiol* 72(1), 9--28.
- Chater, K. F. (2000), 'Developmental Decisions during Sporulation in the Aerial Mycelium in Streptomyces.'. En Brun Y., Shimkets L. (Eds), 'Prokaryotic Development' (pp 33—48). Washington DC: ASM Press.
- Chater, K. F. (2001), 'Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex?', *Curr Opin Microbiol* 4(6), 667--673.
- Chater, K. F. (2003), 'Camels act on a hump. ', The Guardian. Recuperado de: http://www.theguardian.com/science/2003/mar/06/science.research.
- Chater, K. F. (2006), 'Streptomyces inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics.', Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 361(1469), 761--768.
- Chater, K. F. (2011), 'Differentiation in Streptomyces: The Properties and Programming of Diverse Cell-types.'. En Dyson P. (Ed), 'Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology' (pp. 43–86). Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Chater, K. F.; Biró, S.; Lee, K. J.; Palmer, T. y Schrempf, H. (2010), 'The complex extracellular biology of Streptomyces.', FEMS Microbiol Rev 34(2), 171--198.
- 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**(1), 133--143.
- Chater, K. F. y Chandra, G. (2006), 'The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons.', *FEMS Microbiol Rev* 30(5), 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), 1--11.
- Chater, K. F. y Merrick, M. J. (1979), 'Streptomycetes.'. En Parish, J. H. (Ed), 'Developmental Biology of Prokaryotes' (pp. 93-114). Oxford: Blackwell.
- Chauvaux, S.; Paulsen, I. T. y Saier, Jr, M. (1998), 'CcpB, a novel transcription factor implicated in catabolite repression in Bacillus subtilis.', J Bacteriol 180(3), 491--497.
- Chávez, A.; Forero, A.; Sánchez, M.; Rodríguez-Sanoja, R.; Mendoza-Hernández, G.; Servín-Gonzalez, L.; Sánchez, B.; García-Huante, Y.; Rocha, D.; Langley, E.; Ruiz, B. y Sánchez, S. (2011), 'Interaction of SCO2127 with BldKB and its possible connection to carbon catabolite regulation of morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor.*', *Appl Microbiol Biotechnol* 89(3), 799--806.
- Chávez, A.; García-Huante, Y.; Ruiz, B.; Langley, E.; Rodríguez-Sanoja, R. y Sanchez, S. (2009), 'Cloning and expression of the sco2127 gene from Streptomyces coelicolor M145.', J Ind Microbiol Biotechnol 36(5), 649--654.
- Chekabab, S. M.; Harel, J. y Dozois, C. M. (2014), 'Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence.', *Virulence* 5(5).
- 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(10), 522--529.
- Chen, D.; Zhang, L.; Pang, B.; Chen, J.; Xu, Z.; Abe, I. y Liu, W. (2013), 'FK506 maturation involves a cytochrome p450 proteincatalyzed four-electron C-9 oxidation in parallel with a C-31 o-methylation.', *J Bacteriol* **195**(9), 1931--1939.
- Chen, D.; Zhang, Q.; Zhang, Q.; Cen, P.; Xu, Z. y Liu, W. (2012), 'Improvement of FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by genetic enhancement of the supply of unusual polyketide extender units via utilization of two distinct site-specific recombination systems.', *Appl Environ Microbiol* 78(15), 5093--5103.
- Chen, G.; Wang, G. Y.; Li, X.; Waters, B. y Davies, J. (2000), 'Enhanced production of microbial metabolites in the presence of dimethyl sulfoxide.', J Antibiot (Tokyo) 53(10), 1145--1153.

- Chen, Y.; Birck, C.; Samama, J.-P. y Hulett, F. M. (2003), 'Residue R113 is essential for PhoP dimerization and function: a residue buried in the asymmetric PhoP dimer interface determined in the PhoPN three-dimensional crystal structure.', J Bacteriol 185(1), 262--273.
- Chi, A. y Kemp, R. G. (2000), 'The primordial high energy compound: ATP or inorganic pyrophosphate?', J Biol Chem 275(46), 35677--35679.
- Cho, Y.-H.; Kim, E.-J.; Chung, H.-J.; Choi, J.-H.; Chater, K. F.; Ahn, B.-E.; Shin, J.-H. y Roe, J.-H. (2003), 'The pqrAB operon is responsible for paraquat resistance in Streptomyces coelicolor.', J Bacteriol 185(23), 6756--6763.
- Choi, B.; Ham, Y.; Yu, S.; Jeong, K. y Kim, B. (2013), 'Method for refining of high purity of tacrolimus', US Patent 8,362,238.
- Chouayekh, H.; Nothaft, H.; Delaunay, S.; Linder, M.; Payrastre, B.; Seghezzi, N.; Titgemeyer, F. y Virolle, M. J. (2007), 'Phosphoinositides are involved in control of the glucose-dependent growth resumption that follows the transition phase in *Streptomyces lividans*.', *J Bacteriol* **189**(3), 741--749.
- Chouayekh, H. y Virolle, M.-J. (2002), 'The polyphosphate kinase plays a negative role in the control of antibiotic production in *Streptomyces lividans.*', *Mol Microbiol* **43**(4), 919–930.
- Claessen, D.; Rink, R.; de Jong, W.; Siebring, J.; de Vreugd, P.; Boersma, F. G. H.; Dijkhuizen, L. y Wosten, H. A. B. (2003), 'A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils.', *Genes Dev* 17(14), 1714--1726.
- Claessen, D.; Stokroos, I.; Deelstra, H. J.; Penninga, N. A.; Bormann, C.; Salas, J. A.; Dijkhuizen, L. y Wösten, H. A. B. (2004), 'The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlins and chaplins.', *Mol Microbiol* 53(2), 433--443.
- Cohn, F. (1875), 'Untersuchungen ueber Bakterien.', Beitraege zur Biologie der Planzen 1(127--222).
- Coisne, S.; Béchet, M. y Blondeau, R. (1999), 'Actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) in iron-restricted media.', Lett Appl Microbiol 28(3), 199--202.
- Collier, D. N.; Hager, P. W. y Phibbs, Jr, P. (1996), 'Catabolite repression control in the Pseudomonads.', *Res Microbiol* 147(6-7), 551--561.
- Colson, S.; Stephan, J.; Hertrich, T.; Saito, A.; van Wezel, G. P.; Titgemeyer, F. y Rigali, S. (2007), 'Conserved cis-acting elements upstream of genes composing the chitinolytic system of streptomycetes are DasR-responsive elements.', *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**(1-2), 60--66.
- Colson, S.; van Wezel, G. P.; Craig, M.; Noens, E. E. F.; Nothaft, H.; Mommaas, A. M.; Titgemeyer, F.; Joris, B. y Rigali, S. (2008), 'The chitobiose-binding protein, DasA, acts as a link between chitin utilization and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor.*', *Microbiology* 154(Pt 2), 373--382.
- Corre, C.; Song, L.; O'Rourke, S.; Chater, K. F. y Challis, G. L. (2008), '2-Alkyl-4-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acids, antibiotic production inducers discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining.', *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(45), 17510--17515.
- Crawford, D. L.; Lynch, J. M.; Whipps, J. M. y Ousley, M. A. (1993), 'Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen.', *Appl Environ Microbiol* 59(11), 3899--3905.
- Cvak, L.; Buchta, M.; Jegorov, A.; Blatny, P.; Keri, V.; Csorvasi, A.; Simon, A. y Mako, G. (2007), 'Process for purifying tacrolimus', WO Patent App. PCT/US2007/006,642.

D

- 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(2), 239--251.
- D'Alia, D.; Nieselt, K.; Steigele, S.; Müller, J.; Verburg, I. y Takano, E. (2010), 'Noncoding RNA of glutamine synthetase I modulates antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *J Bacteriol* **192**(4), 1160--1164.
- Dalton, K. A.; Thibessard, A.; Hunter, J. I. B. y Kelemen, G. H. (2007), 'A novel compartment, the 'subapical stem' of the aerial hyphae, is the location of a sigN-dependent, developmentally distinct transcription in Streptomyces coelicolor.', Mol Microbiol 64(3), 719--737.

- Darbon, E.; Martel, C.; Nowacka, A.; Pegot, S.; Moreau, P. L. y Virolle, M.-J. (2012), 'Transcriptional and preliminary functional analysis of the six genes located in divergence of *phoR/phoP* in *Streptomyces lividans.*', *Appl Microbiol Biotechnol* 95(6), 1553--1566.
- Darbon, E.; Servant, P.; Poncet, S. y Deutscher, J. (2002), 'Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA and inducer exclusion triggered by P-GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis glpFK* expression.', *Mol Microbiol* 43(4), 1039--1052.
- Dary, A.; Martin, 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(1), 29--34.
- Dary, A.; Martin, P.; Wenner, T.; Leblond, P. y Decaris, B. (1999), 'Evolution of the linear chromosomal DNA in Streptomyces: is genomic variability developmentally modulated?', Res Microbiol 150(7), 439--445.
- Datsenko, K. A. y Wanner, B. L. (2000), 'One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products.', *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12), 6640--6645.
- Davis, J. R.; Brown, B. L.; Page, R. y Sello, J. K. (2013), 'Study of PcaV from *Streptomyces coelicolor* yields new insights into ligandresponsive MarR family transcription factors.', *Nucleic Acids Res* 41(6), 3888--3900.
- Davis, N. K. y Chater, K. F. (1990), 'Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics.', *Mol Microbiol* **4**(10), 1679--1691.
- De Crécy-Lagard, V.; Servant-Moisson, P.; Viala, J.; Grandvalet, C. y Mazodier, P. (1999), 'Alteration of the synthesis of the Clp ATPdependent protease affects morphological and physiological differentiation in *Streptomyces.*', *Mol Microbiol* 32(3), 505--517.
- De Jong, W.; Manteca, A.; Sanchez, J.; Bucca, G.; Smith, C. P.; Dijkhuizen, L.; Claessen, D. y Wösten, H. A. B. (2009), 'NepA is a structural cell wall protein involved in maintenance of spore dormancy in *Streptomyces coelicolor.*', *Mol Microbiol* 71(6), 1591--1603.
- De La Fuente, A.; Cisneros, E. y Talavera, A. (1994), 'Restriction end-converting vectors with tandem repeated multiple cloning sites.', Gene 139(1), 83--86.
- De Mot, R.; Schoofs, G. y Nagy, I. (2007), 'Proteome analysis of *Streptomyces coelicolor* mutants affected in the proteasome system reveals changes in stress-responsive proteins.', *Arch Microbiol* **188**(3), 257--271.
- Dedrick, R. M.; Wildschutte, H. y McCormick, J. R. (2009), 'Genetic interactions of *smc*, *ftsK*, and *parB* genes in *Streptomyces coelicolor* and their developmental genome segregation phenotypes.', J Bacteriol 191(1), 320--332.
- Del Sol, R.; Mullins, J. G. L.; Grantcharova, N.; Flärdh, K. y Dyson, P. (2006), 'Influence of CrgA on assembly of the cell division protein FtsZ during development of *Streptomyces coelicolor.*', *J Bacteriol* **188**(4), 1540--1550.
- Demain, A. L. (1989), 'Carbon source regulation of idiolite biosynthesis.'. En Shapiro S. (Ed), '*Regulation of Secondary Metabolism in Actinomycetes*' (pp. 127-34). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Demain, A. L. y Inamine, E. (1970), 'Biochemistry and regulation of streptomycin and mannosidostreptomycinase (alpha-D-mannosidase) formation.', *Bacteriol Rev* 34(1), 1--19.
- 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(2), 361--379.
- Destombes, P.; Rannou, M. y Nell, R. (1965), 'Mycetoma due to *Streptomyces somaliensis* seen in Algeria in the South area of the Atlas mountains.', *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 58(6), 1017--1020.
- Deutscher, J.; Küster, E.; Bergstedt, U.; Charrier, V. y Hillen, W. (1995), 'Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria.', *Mol Microbiol* **15**(6), 1049--1053.
- Díaz, M.; Esteban, A.; Fernández-Abalos, J. M. y Santamaría, R. I. (2005), 'The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans.*', *Microbiology* 151(Pt 8), 2583--2592.
- Dietmair, S.; Hodson, M. P.; Quek, L.-E.; Timmins, N. E.; Chrysanthopoulos, P.; Jacob, S. S.; Gray, P. y Nielsen, L. K. (2012), 'Metabolite profiling of CHO cells with different growth characteristics.', *Biotechnol Bioeng* **109**(6), 1404--1414.

Ditkowski, B.; Troć, P.; Ginda, K.; Donczew, M.; Chater, K. F.; Zakrzewska-Czerwińska, J. y Jakimowicz, D. (2010), 'The

actinobacterial signature protein ParJ (SCO1662) regulates ParA polymerization and affects chromosome segregation and cell division during *Streptomyces* sporulation.', Mol Microbiol 78(6), 1403–1415.

- Dominy, Jr, J. E.; Simmons, C. R.; Karplus, P. A.; Gehring, A. M. y Stipanuk, M. H. (2006), 'Identification and characterization of bacterial cysteine dioxygenases: a new route of cysteine degradation for eubacteria.', *J Bacteriol* 188(15), 5561--5569.
- Doull, J. L. y Vining, L. C. (1989), 'Culture conditions promoting dispersed growth and biphasic production of actinorhodin in shaken cultures of *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *FEMS Microbiol Lett* **53**(3), 265--268.
- Du, W.; Huang, D.; Xia, M.; Wen, J. y Huang, M. (2014), 'Improved FK506 production by the precursors and product-tolerant mutant of *Streptomyces tsukubaensis* based on genome shuffling and dynamic fed-batch strategies.', *J Ind Microbiol Biotechnol* 41(7), 1131--1143.
- Dubeau, M.-P.; Ghinet, M. G.; Jacques, P.-E.; Clermont, N.; Beaulieu, C. y Brzezinski, R. (2009), 'Cytosine deaminase as a negative selection marker for gene disruption and replacement in the genus *Streptomyces* and other actinobacteria.', *Appl Environ Microbiol* 75(4), 1211--1214.
- Dutta, S. y Ahmad, Y. (2011), 'The efficacy and safety of tacrolimus in rheumatoid arthritis.', Ther Adv Musculoskelet Dis 3(6), 283--291.

Ε

- Eccleston, M.; Willems, A.; Beveridge, A. y Nodwell, J. R. (2006), 'Critical residues and novel effects of overexpression of the Streptomyces coelicolor developmental protein BldB: evidence for a critical interacting partner.', J Bacteriol 188(23), 8189--8195.
- Elliot, M. A.; Bibb, M. J.; Buttner, M. J. y Leskiw, B. K. (2001), 'BldD is a direct regulator of key developmental genes in *Streptomyces* coelicolor A3(2).', Mol Microbiol 40(1), 257--269.
- Elliot, M. A.; Damji, F.; Passantino, R.; Chater, K. y Leskiw, B. (1998), 'The *bldD* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production.', *J Bacteriol* 180(6), 1549--1555.
- Elliot, M. A. y Leskiw, B. K. (1999), 'The BldD protein from *Streptomyces coelicolor* is a DNA-binding protein.', *J Bacteriol* 181(21), 6832--6835.
- Elliot, M. A.; Locke, T. R.; Galibois, C. M. y Leskiw, B. K. (2003), 'BldD from *Streptomyces coelicolor* is a non-essential global regulator that binds its own promoter as a dimer.', *FEMS Microbiol Lett* **225**(1), 35--40.
- Embley, T. M. y Stackebrandt, E. (1994), 'The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes.', Annu Rev Microbiol 48, 257--289.
- Engel, P.; Scharfenstein, L. L.; Dyer, J. M. y Cary, J. W. (2001), 'Disruption of a gene encoding a putative gamma-butyrolactonebinding protein in *Streptomyces tendae* affects nikkomycin production.', *Appl Microbiol Biotechnol* 56(3-4), 414--419.
- Enomoto, T.; Kakihara, K.; Miyatake, K. y Kitaoka, S. (1989), 'Occurrence and characterization of fructose 6-phosphate, 2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase in *Euglena gracilis.*', *Comp Biochem Physiol B* 92(3), 477--480.
- Ensign, J. C. (1978), 'Formation, properties, and germination of actinomycete spores.', Annu Rev Microbiol 32, 185--219.
- Epand, R. F. y Epand, R. M. (1991), 'The new potent immunosuppressant FK-506 reverses multidrug resistance in Chinese hamster ovary cells.', Anticancer Drug Des 6(3), 189--193.
- Esteban, A.; Díaz, M.; Yepes, A. y Santamaría, R. I. (2008), 'Expression of the *pstS* gene of *Streptomyces lividans* is regulated by the carbon source and is partially independent of the PhoP regulator.', *BMC Microbiol* 8, 201.
- Evans, D. R. y Guy, H. I. (2004), 'Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway.', J Biol Chem 279(32), 33035--33038.
- Evans, G. A.; Lewis, K. y Rothenberg, B. E. (1989), 'High efficiency vectors for cosmid microcloning and genomic analysis.', *Gene* 79(1), 9--20.

F

Facey, P. D.; Hitchings, M. D.; Saavedra-Garcia, P.; Fernandez-Martinez, L.; Dyson, P. J. y Del Sol, R. (2009), 'Streptomyces coelicolor Dps-like proteins: differential dual roles in response to stress during vegetative growth and in nucleoid condensation during reproductive cell division.', Mol Microbiol 73(6), 1186--1202.

- Facey, P. D.; Sevciková, B.; Novakova, R.; Hitchings, M. D.; Crack, J. C.; Kormanec, J.; Dyson, P. J. y Del Sol, R. (2011), 'The dpsA gene of Streptomyces coelicolor: induction of expression from a single promoter in response to environmental stress or during development.', PLoS One 6(9), e25593.
- Feitelson, J. S.; Malpartida, F. y Hopwood, D. A. (1985), 'Genetic and biochemical characterization of the red gene cluster of Streptomyces coelicolor A3(2).', J Gen Microbiol 131(9), 2431--2441.
- Fernández-Martínez, L. T.; Santos-Beneit, F. y Martín, J. F. (2012), 'Is PhoR-PhoP partner fidelity strict? PhoR is required for the activation of the *pho* regulon in *Streptomyces coelicolor.*', *Mol Genet Genomics* 287(7), 565--573.
- Fernández-Moreno, M. A.; Martín-Triana, A. J.; Martínez, E.; Niemi, J.; Kieser, H. M.; Hopwood, D. A. y Malpartida, F. (1992), 'abaA, a new pleiotropic regulatory locus for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor.*', J Bacteriol 174(9), 2958--2967.
- 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(2), 331--347.
- Fischer, G.; Decaris, B. y Leblond, P. (1997), 'Occurrence of deletions, associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA.', *J Bacteriol* **179**(14), 4553--4558.
- Fischer, G.; Wenner, T.; Decaris, B. y Leblond, P. (1998), 'Chromosomal arm replacement generates a high level of intraspecific polymorphism in the terminal inverted repeats of the linear chromosomal DNA of *Streptomyces ambofaciens.*', *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(24), 14296--14301.
- 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(5), 340--348.
- Fisher, S. H. (1989), 'Glutamate synthesis in Streptomyces coelicolor.', J Bacteriol 171(5), 2372--2377.
- Flärdh, K. (2003), 'Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Mol Microbiol* 49(6), 1523--1536.
- Flärdh, K. y Buttner, M. J. (2009), 'Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium.', Nat Rev Microbiol 7(1), 36--49.
- Flärdh, K.; Findlay, K. C. y Chater, K. F. (1999), 'Association of early sporulation genes with suggested developmental decision points in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Microbiology* 145 (Pt 9), 2229--2243.
- 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(73-74), 223--228.
- Folcher, M.; Gaillard, H.; Nguyen, L. T.; Nguyen, K. T.; Lacroix, P.; Bamas-Jacques, N.; Rinkel, M. y Thompson, C. J. (2001), 'Pleiotropic functions of a *Streptomyces pristinaespiralis* autoregulator receptor in development, antibiotic biosynthesis, and expression of a superoxide dismutase.', J Biol Chem 276(47), 44297--44306.
- Foor, F.; Parent, S. A.; Morin, N.; Dahl, A. M.; Ramadan, N.; Chrebet, G.; Bostian, K. A. y Nielsen, J. B. (1992), 'Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from alpha-factor arrest in yeast.', *Nature* 360(6405), 682--684.

Fothergill-Gilmore, L. A. y Michels, P. A. (1993), 'Evolution of glycolysis.', Prog Biophys Mol Biol 59(2), 105-235.

- Fowler-Goldsworthy, K.; Gust, B.; Mouz, S.; Chandra, G.; Findlay, K. C. y Chater, K. F. (2011), 'The actinobacteria-specific gene *wblA* controls major developmental transitions in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Microbiology* **157**(Pt 5), 1312--1328.
- Fox, G. E.; Stackebrandt, E.; Hespell, R. B.; Gibson, J.; Maniloff, J.; Dyer, T. A.; Wolfe, R. S.; Balch, W. E.; Tanner, R. S.; Magrum, L. J.; Zablen, L. B.; Blakemore, R.; Gupta, R.; Bonen, L.; Lewis, B. J.; Stahl, D. A.; Luehrsen, K. R.; Chen, K. N. y Woese, C. R. (1980), 'The phylogeny of prokaryotes.', *Science* 209(4455), 457--463.
- Fridlyand, L. E. y Philipson, L. H. (2004), 'Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic beta-cells?', *Diabetes* 53(8), 1942--1948.

Fujita, Y. y Miwa, Y. (1994), 'Catabolite repression of the *Bacillus subtilis gnt* operon mediated by the CcpA protein.', *J Bacteriol* 176(2), 511--513.

Fujita, Y. (2009), 'Carbon catabolite control of the metabolic network in Bacillus subtilis.', Biosci Biotechnol Biochem 73(2), 245--259.

- Gagnat, J.; Chouayekh, H.; Gerbaud, C.; Francou, F. y Virolle, M. J. (1999), 'Disruption of *sblA* in *Streptomyces lividans* permits expression of a heterologous alpha-amylase gene in the presence of glucose.', *Microbiology* **145** (Pt 9), 2303--2312.
- Gajzlerska, W.; Kurkowiak, J. y Turlo, J. (2014), 'Use of three-carbon chain compounds as biosynthesis precursors to enhance tacrolimus production in *Streptomyces tsukubaensis.*', N Biotechnol.
- Gao, B.; Paramanathan, R. y Gupta, R. S. (2006), 'Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups.', Antonie Van Leeuwenhoek 90(1), 69–91.
- García-Dominguez, M.; Martin, J. F. y Liras, P. (1989), 'Characterization of sugar uptake in wild-type *Streptomyces clavuligerus*, which is impaired in glucose uptake, and in a glucose-utilizing mutant.', *J Bacteriol* **171**(12), 6808--6814.
- Garrity G. M.; Bell J. A. y Lilburn T. (2005). 'The Revised Road Map to the Manual. '. En Brenner, D. J; Krieg, N. R.; Staley, J. T. y Garrity, G. M., 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition, The Proteobacteria, Part A, Introductory Essays.', (vol. 2; pp. 159–220). New York: Springer.
- Garrity, G. M.; Heimbuch, B. K.; Motamedi, H. y Shafiee, A. (1993), 'Genetic relationships among actinomycetes that produce the immunosuppressant macrolides FK506, FK520/FK523 and rapamycin.', *J Ind Microbiol* 12(1), 42--47.
- Garrity, G. M. y Holt, J.G. (2001), 'The Road Map to the Manual.'. En Boone, D.R.; Castenholz, R.W y Garrity, G. M. (Eds), 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriolology Second Edition.' (vol. 1; pp 119--166). New York: Springer-Verlag.
- Gassner, M.; Stehlik, D.; Schrecker, O.; Hengstenberg, W.; Maurer, W. y Rüterjans, H. (1977), 'The phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*. 2. 1H and 31P-nuclear-magnetic-resonance studies on the phosphocarrier protein HPr, phosphohistidines and phosphorylated HPr.', *Eur J Biochem* 75(1), 287–296.
- Gatewood, M. L.; Bralley, P.; Weil, M. R. y Jones, G. H. (2012), 'RNA-Seq and RNA immunoprecipitation analyses of the transcriptome of *Streptomyces coelicolor* identify substrates for RNase III.', *J Bacteriol* **194**(9), 2228--2237.
- Gatto, Jr, G. J.; Boyne, 2nd, M. T.; Kelleher, N. L. y Walsh, C. T. (2006), 'Biosynthesis of pipecolic acid by RapL, a lysine cyclodeaminase encoded in the rapamycin gene cluster.', J Am Chem Soc 128(11), 3838-3847.
- Gatto, Jr, G. J.; McLoughlin, S. M.; Kelleher, N. L. y Walsh, C. T. (2005), 'Elucidating the substrate specificity and condensation domain activity of FkbP, the FK520 pipecolate-incorporating enzyme.', *Biochemistry* 44(16), 5993--6002.
- Gehring, A. M.; Nodwell, J. R.; Beverley, S. M. y Losick, R. (2000), 'Genomewide insertional mutagenesis in *Streptomyces coelicolor* reveals additional genes involved in morphological differentiation.', *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17), 9642--9647.
- Gehring, A. M.; Yoo, N. J. y Losick, R. (2001), 'RNA polymerase sigma factor that blocks morphological differentiation by Streptomyces coelicolor.', J Bacteriol 183(20), 5991--5996.
- Ghorbel, S.; Kormanec, J.; Artus, A. y Virolle, M.-J. (2006), 'Transcriptional studies and regulatory interactions between the *phoR*phoP operon and the *phoU*, *mtpA*, and *ppk* genes of *Streptomyces lividans* TK24.', *J Bacteriol* **188**(2), 677--686.
- Goodfellow, M.; Ferguson, E. V. y Sanglier, J. J. (1992), 'Numerical classification and identification of *Streptomyces* species–a review.', *Gene* 115(1-2), 225--233.
- Goodfellow, M. y Williams, S. T. (1983), 'Ecology of actinomycetes.', Annu Rev Microbiol 37, 189--216.
- Goranovič, D. A.; Blažič I, M.; Magdevska, V.; Horvat, J.; Kuščer, E.; Polak, T.; Santos-Aberturas, J.; Martínez-Castro, M.; Barreiro, C.; Mrak, P.; Kopitar, G.; Kosec, G.; Fujs, T.; Martín, J. F. y Petković, H. (2012), 'FK506 biosynthesis is regulated by two positive regulatory elements in *Streptomyces tsukubaensis.*', *BMC Microbiol* 12(1), 238.
- Goranovič, D.; Kosec, G.; Mrak, P.; Fujs, S.; Horvat, J.; Kuščer, E.; Kopitar, G. y Petković, H. (2010), 'Origin of the allyl group in FK506 biosynthesis.', J Biol Chem 285(19), 14292--14300.
- Görke, B.; Fraysse, L. y Galinier, A. (2004), 'Drastic differences in Crh and HPr synthesis levels reflect their different impacts on catabolite repression in *Bacillus subtilis*.', *J Bacteriol* 186(10), 2992--2995.
- Görke, B. y Rak, B. (1999), 'Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BgIG activity by antagonistically acting phosphorylations.', *EMBO J* 18(12), 3370--3379.
- Görke, B. y Stülke, J. (2008), 'Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients.', Nat Rev Microbiol 6(8), 613--624.

- Gossen, M.; Freundlieb, S.; Bender, G.; Müller, G.; Hillen, W. y Bujard, H. (1995), 'Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells.', *Science* 268(5218), 1766--1769.
- Goulet, M. T.; Rupprecht, K. M.; Sinclair, P. J.; Wyvratt, M. J. y Parsons, W. H. (1994), 'The medicinal chemistry of FK-506', Perspectives in Drug Discovery and Design 2, 145-162.
- Gramajo, H. C.; Takano, E. y Bibb, M. J. (1993), 'Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated.', *Mol Microbiol* **7**(6), 837--845.
- Groth, A. C.; Fish, M.; Nusse, R. y Calos, M. P. (2004), 'Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31.', *Genetics* 166(4), 1775--1782.
- Grundy, F. J.; Waters, D. A.; Allen, S. H. y Henkin, T. M. (1993), 'Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA.', J Bacteriol 175(22), 7348--7355.
- Gubbens, J.; Janus, M.; Florea, B. I.; Overkleeft, H. S. y van Wezel, G. P. (2012), 'Identification of glucose kinase-dependent and independent pathways for carbon control of primary metabolism, development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by quantitative proteomics.', *Mol Microbiol*.
- 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(2), e31475.
- Gust, B.; Kieser, T. y Chater, K. F. (2002), 'REDIRECT[®] technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*'. John Innes Centre.
- Guthrie, E. P.; Flaxman, C. S.; White, J.; Hodgson, D. A.; Bibb, M. J. y Chater, K. F. (1998), 'A response-regulator-like activator of antibiotic synthesis from *Streptomyces coelicolor* A3(2) with an amino-terminal domain that lacks a phosphorylation pocket.', *Microbiology* 144 (Pt 3), 727-738.
- Guzmán, S.; Carmona, A.; Escalante, L.; Imriskova, I.; López, R.; Rodríguez-Sanoja, R.; Ruiz, B.; Servín-González, L.; Sánchez, S. y Langley, E. (2005a), 'Pleiotropic effect of the SCO2127 gene on the glucose uptake, glucose kinase activity and carbon catabolite repression in *Streptomyces peucetius* var. *caesius.*', *Microbiology* 151(Pt 5), 1717--1723.
- Guzmán, S.; Ramos, I.; Moreno, E.; Ruiz, B.; Rodríguez-Sanoja, R.; Escalante, L.; Langley, E. y Sanchez, S. (2005b), 'Sugar uptake and sensitivity to carbon catabolite regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius.*', *Appl Microbiol Biotechnol* 69(2), 200--206.

Н

- Hahn, J.-S.; Oh, S.-Y. y Roe, J.-H. (2002), 'Role of OxyR as a peroxide-sensing positive regulator in Streptomyces coelicolor A3(2).', J Bacteriol 184(19), 5214--5222.
- Haiser, H. J.; Yousef, M. R. y Elliot, M. A. (2009), 'Cell wall hydrolases affect germination, vegetative growth, and sporulation in Streptomyces coelicolor.', J Bacteriol 191(21), 6501--6512.
- Hamoen, L. W.; Meile, J.-C.; de Jong, W.; Noirot, P. y Errington, J. (2006), 'SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division.', Mol Microbiol 59(3), 989--999.
- Han, L.; Lobo, S. y Reynolds, K. A. (1998), 'Characterization of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from *Streptomyces glaucescens* and its role in initiation of fatty acid biosynthesis.', *J Bacteriol* 180(17), 4481--4486.
- Hanahan, D. (1983), 'Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.', J Mol Biol 166(4), 557--580.
- Hanahan, D. (1985), 'Techniques for transformation of *E. coli*.'. En Glover, D. M. (Ed), '*DNA cloning: a practical approach* '(pp. 109–135). Oxford: IRL Press.
- Hara, H.; Ohnishi, Y. y Horinouchi, S. (2009), 'DNA microarray analysis of global gene regulation by A-factor in *Streptomyces griseus*.', *Microbiology* 155(Pt 7), 2197--2210.
- Harding, M. W.; Galat, A.; Uehling, D. E. y Schreiber, S. L. (1989), 'A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase.', *Nature* 341(6244), 758--760.
- Harvey, B. M.; Mironenko, T.; Sun, Y.; Hong, H.; Deng, Z.; Leadlay, P. F.; Weissman, K. J. y Haydock, S. F. (2007), 'Insights into polyether biosynthesis from analysis of the nigericin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM4137.', *Chem Biol* 14(6), 703-714.

- Haseltine, W. A. y Block, R. (1973), 'Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes.', *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(5), 1564--1568.
- Hatanaka, H.; Kino, T.; Asano, M.; Goto, T.; Tanaka, H. y Okuhara, M. (1989), 'FK-506 related compounds produced by *Streptomyces* tsukubaensis No. 9993.', J Antibiot (Tokyo) 42(4), 620--622.

Haydon, D. J. y Guest, J. R. (1991), 'A new family of bacterial regulatory proteins.', FEMS Microbiol Lett 63(2-3), 291--295.

- Heckman, D. S.; Geiser, D. M.; Eidell, B. R.; Stauffer, R. L.; Kardos, N. L. y Hedges, S. B. (2001), 'Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants.', *Science* 293(5532), 1129--1133.
- Heinisch, J. (1986), 'Construction and physiological characterization of mutants disrupted in the phosphofructokinase genes of Saccharomyces cerevisiae.', Curr Genet 11(3), 227--234.
- Heinisch, J.; Ritzel, R. G.; von Borstel, R. C.; Aguilera, A.; Rodicio, R. y Zimmermann, F. K. (1989), 'The phosphofructokinase genes of yeast evolved from two duplication events.', *Gene* 78(2), 309--321.
- Hempel, A. M.; Cantlay, S.; Molle, V.; Wang, S.-B.; Naldrett, M. J.; Parker, J. L.; Richards, D. M.; Jung, Y.-G.; Buttner, M. J. y Flärdh, K. (2012), 'The Ser/Thr protein kinase AfsK regulates polar growth and hyphal branching in the filamentous bacteria Streptomyces.', Proc Natl Acad Sci U S A 109(35), E2371--E2379.
- Hempel, A. M.; Wang, S.-b.; Letek, M.; Gil, J. A. y Flärdh, K. (2008), 'Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor.*', *J Bacteriol* **190**(22), 7579--7583.
- Hertweck, C. (2009), 'The biosynthetic logic of polyketide diversity.', Angew Chem Int Ed Engl 48(26), 4688--4716.
- Hesketh, A. R.; Chandra, G.; Shaw, A. D.; Rowland, J. J.; Kell, D. B.; Bibb, M. J. y Chater, K. F. (2002), 'Primary and secondary metabolism, and post-translational protein modifications, as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor.*', *Mol Microbiol* 46(4), 917--932.
- Hesketh, A.; Chen, W. J.; Ryding, J.; Chang, S. y Bibb, M. (2007), 'The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Genome Biol* 8(8), R161.
- Hesketh, A.; Kock, H.; Mootien, S. y Bibb, M. (2009), 'The role of *absC*, a novel regulatory gene for secondary metabolism, in zincdependent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Mol Microbiol* 74(6), 1427–1444.
- Hesketh, A.; Sun, J. y Bibb, M. (2001), 'Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits *actII-ORF4* transcription and actinorhodin biosynthesis.', *Mol Microbiol* **39**(1), 136--144.
- Heueis, N.; Vockenhuber, M.-P. y Suess, B. (2014), 'Small non-coding RNAs in streptomycetes.', RNA Biol 11(5), 464--469.
- Higgens, 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(4), 298--300.
- Higo, A.; Hara, H.; Horinouchi, S. y Ohnishi, Y. (2012), 'Genome-wide distribution of AdpA, a global regulator for secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces*, revealed the extent and complexity of the AdpA regulatory network.', *DNA Res* 19(3), 259--273.
- Higo, A.; Horinouchi, S. y Ohnishi, Y. (2011), 'Strict regulation of morphological differentiation and secondary metabolism by a positive feedback loop between two global regulators AdpA and BldA in *Streptomyces griseus.*', *Mol Microbiol* 81(6), 1607--1622.
- Hindle, Z. y Smith, C. P. (1994), 'Substrate induction and catabolite repression of the *Streptomyces coelicolor* glycerol operon are mediated through the GyIR protein.', *Mol Microbiol* 12(5), 737--745.
- Hinsinger, P. (2001), 'Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review', Plant and Soil 237(2), 173-195.
- Hirsch, C. F. y Ensign, J. C. (1978), 'Some properties of Streptomyces viridochromogenes spores.', J Bacteriol 134(3), 1056--1063.
- Hobbs, G.; Frazer, C.; Gardner, D.; Cullum, J. y Oliver, S. (1989), 'Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture', *Applied Microbiology and Biotechnology* **31**(3), 272-277.
- Hobbs, G.; Frazer, C. M.; Gardner, D. C. J.; Flett, F. y Oliver, S. G. (1990), 'Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): kinetics and the influence of nutrients', *Microbiology* **136**, 2291-2296.

- Hodgson, D. A. (1982), 'Glucose Repression of Carbon Source Uptake and Metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its Perturbation in Mutants Resistant to 2-Deoxyglucose', *Microbiology* **128**, 2417-2430.
- Hogema, B. M.; Arents, J. C.; Bader, R.; Eijkemans, K.; Inada, T.; Aiba, H. y Postma, P. W. (1998a), 'Inducer exclusion by glucose 6phosphate in *Escherichia coli*.', *Mol Microbiol* 28(4), 755--765.
- Hogema, B. M.; Arents, J. C.; Bader, R.; Eijkemans, K.; Yoshida, H.; Takahashi, H.; Aiba, H. y Postma, P. W. (1998b), 'Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIA^{GIC}.', *Mol Microbiol* 30(3), 487--498.
- Hojati, Z.; Milne, C.; Harvey, B.; Gordon, L.; Borg, M.; Flett, F.; Wilkinson, B.; Sidebottom, P. J.; Rudd, B. A. M.; Hayes, M. A.; Smith,
 C. P. y Micklefield, J. (2002), 'Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor.*', *Chem Biol* 9(11), 1175--1187.
- Holmes, D. S. y Quigley, M. (1981), 'A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.', Anal Biochem 114(1), 193--197.
- Hopwood, D. A. (2007), 'Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. ', Oxford University Press, New York, USA.
- Hopwood, D. y Kieser, T. (1993), 'Conjugative Plasmids of *Streptomyces*.'. En Clewell, D. B. (Ed), '*Bacterial Conjugation*' (pp. 239–311). USA: Springer.
- Hopwood, D. A.; Wildermuth, H. y Palmer, H. M. (1970), 'Mutants of *Streptomyces coelicolor* defective in sporulation.', *J Gen Microbiol* 61(3), 397--408.
- Hopwood, D. A. y Wright, H. M. (1978), 'Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*.', Mol Gen Genet 162(3), 307--317.
- Hopwood, D. A. y Wright, H. M. (1983), 'CDA is a new chromosomally-determined antibiotic from Streptomyces coelicolor A3(2).', J Gen Microbiol 129(12), 3575--3579.
- Horinouchi, S. (2003), 'AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *J Ind Microbiol Biotechnol* **30**(8), 462--467.
- Horinouchi, S.; Kito, M.; Nishiyama, M.; Furuya, K.; Hong, S. K.; Miyake, K. y Beppu, T. (1990), 'Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Gene* **95**(1), 49--56.
- Hsieh, Y.-J. y Wanner, B. L. (2010), 'Global regulation by the seven-component Pi signaling system.', Curr Opin Microbiol 13(2), 198--203.
- Huang, D.; Li, S.; Xia, M.; Wen, J. y Jia, X. (2013a), 'Genome-scale metabolic network guided engineering of Streptomyces tsukubaensis for FK506 production improvement.', Microb Cell Fact 12(1), 52.
- Huang, D.; Xia, M.; Li, S.; Wen, J. y Jia, X. (2013b), 'Enhancement of FK506 production by engineering secondary pathways of Streptomyces tsukubaensis and exogenous feeding strategies.', J Ind Microbiol Biotechnol.
- Huang, J.; Shi, J.; Molle, V.; Sohlberg, B.; Weaver, D.; Bibb, M. J.; Karoonuthaisiri, N.; Lih, C.-J.; Kao, C. M.; Buttner, M. J. y Cohen, S. N. (2005), 'Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor.*', *Mol Microbiol* 58(5), 1276--1287.
- Hughes, T. R.; Mao, M.; Jones, A. R.; Burchard, J.; Marton, M. J.; Shannon, K. W.; Lefkowitz, S. M.; Ziman, M.; Schelter, J. M.; Meyer, M. R.; Kobayashi, S.; Davis, C.; Dai, H.; He, Y. D.; Stephaniants, S. B.; Cavet, G.; Walker, W. L.; West, A.; Coffey,
 E.; Shoemaker, D. D.; Stoughton, R.; Blanchard, A. P.; Friend, S. H. y Linsley, P. S. (2001), 'Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer.', Nat Biotechnol 19(4), 342--347.
- Hulett, F. M. (1996), 'The signal-transduction network for Pho regulation in Bacillus subtilis.', Mol Microbiol 19(5), 933--939.
- Hulett, F. M.; Lee, J.; Shi, L.; Sun, G.; Chesnut, R.; Sharkova, E.; Duggan, M. F. y Kapp, N. (1994), 'Sequential action of twocomponent genetic switches regulates the PHO regulon *in Bacillus subtilis.*', *J Bacteriol* 176(5), 1348--1358.
- Hunt, A. C.; Servín-González, L.; Kelemen, G. H. y Buttner, M. J. (2005), 'The *bldC* developmental locus of *Streptomyces coelicolor* encodes a member of a family of small DNA-binding proteins related to the DNA-binding domains of the MerR family.', J *Bacteriol* 187(2), 716--728.
- Hurtubise, Y.; Shareck, F.; Kluepfel, D. y Morosoli, R. (1995), 'A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins.', *Mol Microbiol* 17(2), 367--377.

340

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(Pt 9), 2795--2806.

Hutchinson, C. R. (1983), 'Biosynthetic studies of macrolide and polyether antibiotics', Accounts of Chemical Research 16(1), 7-14.

- Ikeda, H.; Ishikawa, J.; Hanamoto, A.; Shinose, M.; Kikuchi, H.; Shiba, T.; Sakaki, Y.; Hattori, M. y Omura, S. (2003), 'Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism Streptomyces avermitilis.', Nat Biotechnol 21(5), 526--531.
- Ikeda, H.; Seno, E. T.; Bruton, C. J. y Chater, K. F. (1984), 'Genetic mapping, cloning and physiological aspects of the glucose kinase gene of Streptomyces coelicolor.', Mol Gen Genet 196(3), 501--507.
- Imamura, N.; Nishijima, M.; Adachi, K. y Sano, H. (1993), 'Novel antimycin antibiotics, urauchimycins A and B, produced by marine actinomycete.', J Antibiot (Tokyo) 46(2), 241–246.
- Ingram, J. R.; Martin, J. A. y Finlay, A. Y. (2009), 'Impact of topical calcineurin inhibitors on quality of life in patients with atopic dermatitis.', Am J Clin Dermatol 10(4), 229-237.

Inoue, H.; Nojima, H. y Okayama, H. (1990), 'High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids.', Gene 96(1), 23--28.

Ireland, R. E.; Gleason, J. L.; Gegnas, L. D. y Highsmith, T. K. (1996), 'A Total Synthesis of FK-506(1).', J Org Chem 61(20), 6856--6872.

J

- Jakimowicz, D.; Gust, B.; Zakrzewska-Czerwinska, J. y Chater, K. F. (2005), 'Developmental-stage-specific assembly of ParB complexes in *Streptomyces coelicolor* hyphae.', *J Bacteriol* 187(10), 3572--3580.
- Jakimowicz, D.; Zydek, P.; Kois, A.; Zakrzewska-Czerwinska, J. y Chater, K. F. (2007), 'Alignment of multiple chromosomes along helical ParA scaffolding in sporulating *Streptomyces* hyphae.', *Mol Microbiol* 65(3), 625--641.
- Jensen, K. K.; Sharkova, E.; Duggan, M. F.; Qi, Y.; Koide, A.; Hoch, J. A. y Hulett, F. M. (1993), 'Bacillus subtilis transcription regulator, Spo0A, decreases alkaline phosphatase levels induced by phosphate starvation.', J Bacteriol 175(12), 3749--3756.
- Jensen, V. J. y Rugh, S. (1987), 'Industrial scale production and application of immobilized glucose isomerase.', *Methods on Enzymol.* 136 (356–370).
- Jiang, H. y Kendrick, K. E. (2000), 'Characterization of *ssfR* and *ssgA*, two genes involved in sporulation of *Streptomyces griseus*.', J Bacteriol 182(19), 5521--5529.
- Jiang, H. y Kobayashi, M. (1999), 'Differences between cyclosporin A and tacrolimus in organ transplantation.', *Transplant Proc* 31(5), 1978--1980.
- Jones, A. C.; Gust, B.; Kulik, A.; Heide, L.; Buttner, M. J. y Bibb, M. J. (2013), 'Phage p1-derived artificial chromosomes facilitate heterologous expression of the FK506 gene cluster.', *PLoS One* 8(7), e69319.
- Jonsbu, E.; Christensen, B. y Nielsen, J. (2001), 'Changes of in vivo fluxes through central metabolic pathways during the production of nystatin by *Streptomyces noursei* in batch culture.', *Appl Microbiol Biotechnol* **56**(1-2), 93--100.
- Joshi, M.; Rong, X.; Moll, S.; Kers, J.; Franco, C. y Loria, R. (2007), 'Streptomyces turgidiscables secretes a novel virulence protein, Nec1, which facilitates infection.', Mol Plant Microbe Interact 20(6), 599--608.
- Jourlin-Castelli, C.; Mani, N.; Nakano, M. M. y Sonenshein, A. L. (2000), 'CcpC, a novel regulator of the LysR family required for glucose repression of the citB gene in *Bacillus subtilis*.', *J Mol Biol* **295**(4), 865--878.
- Joyet, P.; Bouraoui, H.; Aké, F. M. D.; Derkaoui, M.; Zébré, A. C.; Cao, T. N.; Ventroux, M.; Nessler, S.; Noirot-Gros, M.-F.; Deutscher, J. y Milohanic, E. (2013), 'Transcription regulators controlled by interaction with enzyme IIB components of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system.', *Biochim Biophys Acta* 1834(7), 1415--1424.
- Joyet, P.; Derkaoui, M.; Poncet, S. y Deutscher, J. (2010), 'Control of *Bacillus subtilis mtl* operon expression by complex phosphorylation-dependent regulation of the transcriptional activator MtlR.', *Mol Microbiol* **76**(5), 1279--1294.

Jung, S.; Lee, K.; Park, Y.-J.; Yoon, S. y Yoo, Y. (2011), 'Process development for purifying tacrolimus from Streptomyces sp. using

adsorption', Biotechnology and Bioprocess Engineering 16(6), 1208-1213.

- Jung, S.; Moon, S.; Lee, K.; Park, Y.-J.; Yoon, S. y Yoo, Y. J. (2009), 'Strain development of *Streptomyces* sp. for tacrolimus production using sequential adaptation.', *J Ind Microbiol Biotechnol* 36(12), 1467--1471.
- Jyothikumar, V.; Klanbut, K.; Tiong, J.; Roxburgh, J. S.; Hunter, I. S.; Smith, T. K. y Herron, P. R. (2012), 'Cardiolipin synthase is required for *Streptomyces coelicolor* morphogenesis.', *Mol Microbiol* 84(1), 181--197.

К

- Kaiser, R. y Tollsten, L. (1995), 'An introduction to the scent of cacti', Flavour and Fragrance Journal 10(3), 153--164.
- Kane, M. D.; Jatkoe, T. A.; Stumpf, C. R.; Lu, J.; Thomas, J. D. y Madore, S. J. (2000), 'Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays.', Nucleic Acids Res 28(22), 4552--4557.
- Kanehisa, M.; Goto, S.; Sato, Y.; Kawashima, M.; Furumichi, M. y Tanabe, M. (2014), 'Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG.', *Nucleic Acids Res* 42(Database issue), D199--D205.
- Kang, S.-H.; Huang, J.; Lee, H.-N.; Hur, Y.-A.; Cohen, S. N. y Kim, E.-S. (2007), 'Interspecies DNA microarray analysis identifies WbIA as a pleiotropic down-regulator of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces.*', *J Bacteriol* **189**(11), 4315--4319.
- Karpas, A.; Lowdell, M.; Jacobson, S. K. y Hill, F. (1992), 'Inhibition of human immunodeficiency virus and growth of infected T cells by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK 506.', *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(17), 8351--8355.
- Kasahara, M.; Makino, K.; Amemura, M.; Nakata, A. y Shinagawa, H. (1991), 'Dual regulation of the *ugp* operon by phosphate and carbon starvation at two interspaced promoters.', *J Bacteriol* **173**(2), 549--558.
- Kato, J.-Y.; Funa, N.; Watanabe, H.; Ohnishi, Y. y Horinouchi, S. (2007), 'Biosynthesis of gamma-butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces.*', *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(7), 2378--2383.
- Kato, J.-Y.; Ohnishi, Y. y Horinouchi, S. (2005), 'Autorepression of AdpA of the AraC/XylS family, a key transcriptional activator in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus.*', *J Mol Biol* **350**(1), 12–26.
- Kato, Y.; Bai, L.; Xue, Q.; Revill, W. P.; Yu, T.-W. y Floss, H. G. (2002), 'Functional expression of genes involved in the biosynthesis of the novel polyketide chain extension unit, methoxymalonyl-acyl carrier protein, and engineered biosynthesis of 2desmethyl-2-methoxy-6-deoxyerythronolide B.', J Am Chem Soc 124(19), 5268--5269.
- Kawamoto, S.; Watanabe, M.; Saito, N.; Hesketh, A.; Vachalova, K.; Matsubara, K. y Ochi, K. (2001), 'Molecular and functional analyses of the gene (*eshA*) encoding the 52-kilodalton protein of *Streptomyces coelicolor* A3(2) required for antibiotic production.', *J Bacteriol* 183(20), 6009--6016.
- Keijser, B. J. F.; van Wezel, G. P.; Canters, G. W. y Vijgenboom, E. (2002), 'Developmental regulation of the *Streptomyces lividans* ram genes: involvement of RamR in regulation of the ramCSAB operon.', J Bacteriol **184**(16), 4420--4429.
- Kelemen, G. H.; Brian, P.; Flärdh, K.; Chamberlin, L.; Chater, K. F. y Buttner, M. J. (1998), 'Developmental regulation of transcription of whiE, a locus specifying the polyketide spore pigment in Streptomyces coelicolor A3 (2)', J Bacteriol 180(9), 2515--2521.
- Kelemen, G. H.; Brown, G. L.; Kormanec, J.; Potúcková, L.; Chater, K. F. y Buttner, M. J. (1996), 'The positions of the sigma-factor genes, whiG and sigF, in the hierarchy controlling the development of spore chains in the aerial hyphae of Streptomyces coelicolor A3(2).', Mol Microbiol 21(3), 593--603.
- Kengen, S. W.; de Bok, F. A.; van Loo, N. D.; Dijkema, C.; Stams, A. J. y de Vos, W. M. (1994), 'Evidence for the operation of a novel Embden-Meyerhof pathway that involves ADP-dependent kinases during sugar fermentation by Pyrococcus furiosus.', J Biol Chem 269(26), 17537--17541.
- Khodakaramian, G.; Lissenden, S.; Gust, B.; Moir, L.; Hoskisson, P. A.; Chater, K. F. y Smith, M. C. M. (2006), 'Expression of Cre recombinase during transient phage infection permits efficient marker removal in *Streptomyces.*', *Nucleic Acids Res* 34(3), e20.
- Kieser, T., Bibb, M., Buttner, M., Chater, K. y Hopwood, D.A. (2000) 'Practical *Streptomyces* Genetics. '. Norwich, UK: The John Innes Foundation.
- Kim, D. H.; Ryu, J. H.; Lee, K. S.; Lee, B. M.; Lee, M. O.; Lim, S.-K. y Maeng, P. J. (2013), 'Mutational biosynthesis of tacrolimus analogues by *fkbO* deletion mutant of *Streptomyces* sp. KCTC 11604BP.', *Appl Microbiol Biotechnol* 97(13), 5881--5892.

- Kim, D.-W.; Chater, K. F.; Lee, K.-J. y Hesketh, A. (2005a), 'Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*.', J Bacteriol 187(9), 2957-2966.
- Kim, D.-W.; Chater, K. F.; Lee, K.-J. y Hesketh, A. (2005b), 'Effects of growth phase and the developmentally significant *bldA*-specified tRNA on the membrane-associated proteome of *Streptomyces coelicolor.*', *Microbiology* **151**(Pt 8), 2707--2720.
- Kim, H. S. y Park, Y. I. (2008), 'Isolation and identification of a novel microorganism producing the immunosuppressant tacrolimus.', J Biosci Bioeng 105(4), 418--421.
- Kim, H.-J.; Jourlin-Castelli, C.; Kim, S.-I. y Sonenshein, A. L. (2002), 'Regulation of the *Bacillus subtilis ccpC* gene by *ccpA* and *ccpC*.', Mol Microbiol 43(2), 399--410.
- Kim, S.-H.; Lee, H.-N.; Kim, H.-J. y Kim, E.-S. (2011), 'Transcriptome analysis of an antibiotic downregulator mutant and synergistic Actinorhodin stimulation via disruption of a precursor flux regulator in *Streptomyces coelicolor.*', *Appl Environ Microbiol* 77(5), 1872--1877.
- 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(11), 1484--1490.
- King, R. R. y Calhoun, L. A. (2009), 'The thaxtomin phytotoxins: sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity.', *Phytochemistry* 70(7), 833--841.
- Kino, T. y Goto, T. (1993), 'Discovery of FK-506 and update.', Ann N Y Acad Sci 685, 13--21.
- Kino, T.; Hatanaka, H.; Hashimoto, M.; Nishiyama, M.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H. y Imanaka, H. (1987a), 'FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics.', J Antibiot (Tokyo) 40(9), 1249--1255.
- Kino, T.; Hatanaka, H.; Miyata, S.; Inamura, N.; Nishiyama, M.; Yajima, T.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M. y Aoki, H. (1987b), 'FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro.', J Antibiot (Tokyo) 40(9), 1256–1265.
- Kirby, R. y Chen, C. W. (2011), 'Genome Architecture.'. En Dyson P. (Ed), 'Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology' (pp. 5–26). Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Kirby, R.; Wright, L. F. y Hopwood, D. A. (1975), 'Plasmid-determined antibiotic synthesis and resistance in *Streptomyces coelicolor.*', *Nature* 254(5497), 265--267.
- Kitani, S.; Miyamoto, K. T.; Takamatsu, S.; Herawati, E.; Iguchi, H.; Nishitomi, K.; Uchida, M.; Nagamitsu, T.; Omura, S.; Ikeda, H. y Nihira, T. (2011), 'Avenolide, a Streptomyces hormone controlling antibiotic production in Streptomyces avermitilis.', Proc Natl Acad Sci U S A 108(39), 16410--16415.
- Kleinschnitz, E.-M.; Heichlinger, A.; Schirner, K.; Winkler, J.; Latus, A.; Maldener, I.; Wohlleben, W. y Muth, G. (2011), 'Proteins encoded by the mre gene cluster in Streptomyces coelicolor A3(2) cooperate in spore wall synthesis.', Mol Microbiol 79(5), 1367--1379.
- Klettner, A. y Herdegen, T. (2003), 'FK506 and its analogs therapeutic potential for neurological disorders.', Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 2(3), 153--162.
- Kodani, S.; Hudson, M. E.; Durrant, M. C.; Buttner, M. J.; Nodwell, J. R. y Willey, J. M. (2004), 'The SapB morphogen is a lantibioticlike peptide derived from the product of the developmental gene ramS in Streptomyces coelicolor.', Proc Natl Acad Sci U S A 101(31), 11448--11453.
- Koglin, A. y Walsh, C. T. (2009), 'Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines.', Nat Prod Rep 26(8), 987--1000.
- Kois, A.; Swiatek, M.; Jakimowicz, D. y Zakrzewska-Czerwinska, J. (2009), 'SMC protein-dependent chromosome condensation during aerial hyphal development in *Streptomyces.*', *J Bacteriol* **191**(1), 310--319.
- Kormanec, J. y Farkasovský, M. (1993), 'Differential expression of principal sigma factor homologues of *Streptomyces aureofaciens* correlates with the developmental stage.', *Nucleic Acids Res* 21(16), 3647--3652.
- **Kormanec, J. y Sevciková, B. (2002a),** 'The stress-response sigma factor σ^H controls the expression of *ssgB*, a homologue of the sporulation-specific cell division gene *ssgA*, in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Mol Genet Genomics* **267**(4), 536--543.

Kormanec, J. y Sevciková, B. (2002b), 'Stress-response sigma factor σ^{H} directs expression of the *gltB* gene encoding glutamate

synthase in Streptomyces coelicolor A3(2).', Biochim Biophys Acta 1577(1), 149--154.

- Kormanec, J.; Sevcíková, B.; Halgasová, N.; Knirschová, R. y Rezuchová, B. (2000), 'Identification and transcriptional characterization of the gene encoding the stress-response sigma factor σ^H in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *FEMS Microbiol Lett* 189(1), 31–38.
- Kosec, G.; Goranovič, D.; Mrak, P.; Fujs, S.; Kuščer, E.; Horvat, J.; Kopitar, G. y Petković, H. (2012), 'Novel chemobiosynthetic approach for exclusive production of FK506.', Metab Eng 14(1), 39--46.
- Kost, C.; Lakatos, T.; Böttcher, I.; Arendholz, W.-R.; Redenbach, M. y Wirth, R. (2007), 'Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants.', *Naturwissenschaften* 94(10), 821--828.
- Kotowska, M.; Pawlik, K.; Butler, A. R.; Cundliffe, E.; Takano, E. y Kuczek, K. (2002), 'Type II thioesterase from *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Microbiology* 148(Pt 6), 1777--1783.
- Kraus, A.; Hueck, C.; Gärtner, D. y Hillen, W. (1994), 'Catabolite repression of the *Bacillus subtilis xyl* operon involves a cis element functional in the context of an unrelated sequence, and glucose exerts additional *xylR*-dependent repression.', *J Bacteriol* 176(6), 1738--1745.
- Kravanja, M.; Engelmann, R.; Dossonnet, V.; Blüggel, M.; Meyer, H. E.; Frank, R.; Galinier, A.; Deutscher, J.; Schnell, N. y Hengstenberg, W. (1999), 'The hprK gene of Enterococcus faecalis encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase.', Mol Microbiol 31(1), 59--66.
- Krol, E. y Becker, A. (2004), 'Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in Sinorhizobium meliloti strains 1021 and 2011.', Mol Genet Genomics 272(1), 1--17.
- Kumada, Y.; Anzai, H.; Takano, E.; Murakami, T.; Hara, O.; Itoh, R.; Imai, S.; Satoh, A. y Nagaoka, K. (1988), 'The bialaphos resistance gene (bar) plays a role in both self-defense and bialaphos biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*.', J Antibiot (Tokyo) 41(12), 1838--1845.
- Kumar, P.; Sharma, S.; Shukla, A.; Kumar, S.; Maurya, R.; Katial, V.; Mitra, A. y Gigras, P. (2007), 'Production of tacrolimus (fk-506) using new Streptomyces species', US Patent App. 10/575,444.
- Kumar, V.; de la Fuente, J. L.; Leitão, A. L.; Liras, P. y Martín, J. F. (1996), 'Effect of amplification or targeted disruption of the betalactamase gene of *Nocardia lactamdurans* on cephamycin biosynthesis.', *Appl Microbiol Biotechnol* 45(5), 621--628.
- Kumon, Y.; Sasaki, Y.; Kato, I.; Takaya, N.; Shoun, H. y Beppu, T. (2002), 'Codenitrification and denitrification are dual metabolic pathways through which dinitrogen evolves from nitrate in *Streptomyces antibioticus.*', *J Bacteriol* **184**(11), 2963--2968.
- Kunz, J. y Hall, M. N. (1993), 'Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression.', Trends Biochem Sci 18(9), 334-338.
- Kuščer, E.; Coates, N.; Challis, I.; Gregory, M.; Wilkinson, B.; Sheridan, R. y Petković, H. (2007), 'Roles of rapH and rapG in positive regulation of rapamycin biosynthesis in Streptomyces hygroscopicus.', J Bacteriol 189(13), 4756--4763.
- Kwak, J.; Dharmatilake, A. J.; Jiang, H. y Kendrick, K. E. (2001a), 'Differential regulation of *ftsZ* transcription during septation of *Streptomyces griseus.'*, *J Bacteriol* **183**(17), 5092--5101.
- Kwak, J.; McCue, L. A.; Trczianka, K. y Kendrick, K. E. (2001), 'Identification and characterization of a developmentally regulated protein, EshA, required for sporogenic hyphal branches in *Streptomyces griseus*.', *J Bacteriol* **183**(10), 3004–3015.
- Kwakman, J. H. y Postma, P. W. (1994), 'Glucose kinase has a regulatory role in carbon catabolite repression in *Streptomyces coelicolor.*', J Bacteriol 176(9), 2694--2698.

L

- Lai, C.; Xu, J.; Tozawa, Y.; Okamoto-Hosoya, Y.; Yao, X. y Ochi, K. (2002), 'Genetic and physiological characterization of *rpoB* mutations that activate antibiotic production in *Streptomyces lividans.*', *Microbiology* **148**(Pt 11), 3365--3373.
- Lanzetta, P. A.; Álvarez, L. J.; Reinach, P. S. y Candia, O. A. (1979), 'An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate.', Anal Biochem 100(1), 95--97.
- Lechevalier, M. P. y Lechevalier, H. (1970), 'Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes', International Journal of Systematic Bacteriology 20(4), 435-443.
- Lechner, A.; Wilson, M. C.; Ban, Y. H.; Hwang, J.-Y.; Yoon, Y. J. y Moore, B. S. (2013), 'Designed biosynthesis of 36-methyl-FK506 by

polyketide precursor pathway engineering.', ACS Synth Biol 2(7), 379--383.

- Lee, H.-N.; Huang, J.; Im, J.-H.; Kim, S.-H.; Noh, J.-H.; Cohen, S. N. y Kim, E.-S. (2010), 'Putative TetR family transcriptional regulator SC01712 encodes an antibiotic downregulator in *Streptomyces coelicolor.*', *Appl Environ Microbiol* 76(9), 3039--3043.
- Lee, H.-N.; Kim, J.-S.; Kim, P.; Lee, H.-S. y Kim, E.-S. (2013), 'Repression of antibiotic downregulator WblA by AdpA in *Streptomyces* coelicolor.', Appl Environ Microbiol **79**(13), 4159--4163.
- Lee, L.-F.; Chen, Y.-J.; Kirby, R.; Chen, C. y Chen, C. W. (2007), 'A multidrug efflux system is involved in colony growth in *Streptomyces lividans.*', *Microbiology* 153(Pt 4), 924--934.
- Lee, P.-C.; Umeyama, T. y Horinouchi, S. (2002), 'afsS is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', Mol Microbiol 43(6), 1413--1430.
- Lee, S.-K.; Mo, S. y Suh, J.-W. (2012), 'An ABC transporter complex containing S-adenosylmethionine (SAM)-induced ATP-binding protein is involved in antibiotics production and SAM signaling in *Streptomyces coelicolor* M145.', *Biotechnol Lett* **34**(10), 1907--1914.
- Leskiw, B. K.; Mah, R.; Lawlor, E. J. y Chater, K. F. (1993), 'Accumulation of *bldA*-specified tRNA is temporally regulated in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *J Bacteriol* 175(7), 1995--2005.
- Li, C.; Florova, G.; Akopiants, K. y Reynolds, K. A. (2004), 'Crotonyl-coenzyme A reductase provides methylmalonyl-CoA precursors for monensin biosynthesis by *Streptomyces cinnamonensis* in an oil-based extended fermentation.', *Microbiology* 150(Pt 10), 3463--3472.
- Li, M.; Chen, Z.; Zhang, X.; Song, Y.; Wen, Y. y Li, J. (2010), 'Enhancement of avermectin and ivermectin production by overexpression of the maltose ATP-binding cassette transporter in *Streptomyces avermitilis*.', *Bioresour Technol* 101(23), 9228--9235.
- Li, R. y Townsend, C. A. (2006), 'Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus.*', *Metab Eng* 8(3), 240--252.
- Li, W.; Ying, X.; Guo, Y.; Yu, Z.; Zhou, X.; Deng, Z.; Kieser, H.; Chater, K. F. y Tao, M. (2006), 'Identification of a gene negatively affecting antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *J Bacteriol* 188(24), 8368--8375.
- Lian, W.; Jayapal, K. P.; Charaniya, S.; Mehra, S.; Glod, F.; Kyung, Y.-S.; Sherman, D. H. y Hu, W.-S. (2008), 'Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *BMC Genomics* 9, 56.
- Lin, Y. S. y Chen, C. W. (1997), 'Instability of artificially circularized chromosomes of *Streptomyces lividans*.', *Mol Microbiol* 26(4), 709--719.
- Lin, Y. S.; Kieser, H. M.; Hopwood, D. A. y Chen, C. W. (1993), 'The chromosomal DNA of Streptomyces lividans 66 is linear.', Mol Microbiol 10(5), 923--933.
- Lindner, C.; Hecker, M.; Le Coq, D. y Deutscher, J. (2002), 'Bacillus subtilis mutant LicT antiterminators exhibiting enzyme I- and HPrindependent antitermination affect catabolite repression of the bgIPH operon.', J Bacteriol 184(17), 4819--4828.
- Lister, J. A. (2011), 'Use of phage ϕ C31 integrase as a tool for zebrafish genome manipulation.', Methods Cell Biol 104, 195--208.
- 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(1), 112--143.
- Liu, J.; Farmer, Jr, J.; Lane, W. S.; Friedman, J.; Weissman, I. y Schreiber, S. L. (1991), 'Calcineurin is a common target of cyclophilincyclosporin A and FKBP-FK506 complexes.', *Cell* 66(4), 807--815.
- Liu, W.; Eder, S. y Hulett, F. M. (1998), 'Analysis of *Bacillus subtilis tagAB* and *tagDEF* expression during phosphate starvation identifies a repressor role for PhoP-P.', *J Bacteriol* 180(3), 753-758.
- Liu, W. y Hulett, F. M. (1997), 'Bacillus subtilis PhoP binds to the phoB tandem promoter exclusively within the phosphate starvationinducible promoter.', J Bacteriol 179(20), 6302--6310.
- Liu, W. y Hulett, F. M. (1998), 'Comparison of PhoP binding to the *tuaA* promoter with PhoP binding to other Pho-regulon promoters establishes a *Bacillus subtilis* Pho core binding site.', *Microbiology* 144 (Pt 5), 1443–1450.

Lodder, J. (1970), 'The Yeasts, a Taxonomic Study'. Amsterdam: North Holland Publishing Co.

- Lounès, A.; Lebrihi, A.; Benslimane, C.; Lefebvre, G. y Germain, P. (1996), 'Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces* ambofaciens: effects of glucose and inorganic phosphate.', *Appl Microbiol Biotechnol* 45(1-2), 204--211.
- Lu, Y.; Wang, W.; Shu, D.; Zhang, W.; Chen, L.; Qin, Z.; Yang, S. y Jiang, W. (2007), 'Characterization of a novel two-component regulatory system involved in the regulation of both actinorhodin and a type I polyketide in *Streptomyces coelicolor.*', *Appl Microbiol Biotechnol* 77(3), 625--635.
- Lu, Y.-W.; San Roman, A. K. y Gehring, A. M. (2008), 'Role of phosphopantetheinyl transferase genes in antibiotic production by Streptomyces coelicolor.', J Bacteriol 190(20), 6903--6908.
- Ludwig, H.; Rebhan, N.; Blencke, H.-M.; Merzbacher, M. y Stülke, J. (2002), 'Control of the glycolytic gapA operon by the catabolite control protein A in Bacillus subtilis: a novel mechanism of CcpA-mediated regulation.', Mol Microbiol 45(2), 543--553.
- Ludwig W., Euzéby J., Schumann P., Busse H. J., Trujillo M. E., Kämpfer P y Whitman W. B. (2012), 'Road map of the Actinobacteria. '. En Goodfellow, M.; Kämpfer, P.; Busse, H. J.; Trujillo, M. E.; Suzuki, K-S.; Ludwig W. y Whitman, W. B., (Eds). 'Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, The Actinobacteria, Part A'. (vol. 2; pp. 1–31). New York: Springer.

Μ

- MacNeil, D. J. (1988), 'Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*.', *J Bacteriol* 170(12), 5607--5612.
- MacNeil, D. J.; Gewain, K. M.; Ruby, C. L.; Dezeny, G.; Gibbons, P. H. y MacNeil, T. (1992), 'Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector.', *Gene* 111(1), 61--68.
- Madry, N.; Sprinkmeyer, R. y Pape, H. (1979), 'Regulation of tylosin synthesis in *Streptomyces*: Effects of glucose analogs and inorganic phosphate', *European journal of applied microbiology and biotechnology* 7(4), 365-370.

Magasanik, B. (1961), 'Catabolite repression.', Cold Spring Harb Symp Quant Biol 26, 249--256.

- Maharjan, S.; Oh, T.-J.; Lee, H. C. y Sohng, J. K. (2009), 'Identification and functional characterization of an *afsR* homolog regulatory gene from *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439.', *J Microbiol Biotechnol* **19**(2), 121--127.
- Mahr, K.; van Wezel, G. P.; Svensson, C.; Krengel, U.; Bibb, M. J. y Titgemeyer, F. (2000), 'Glucose kinase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): large-scale purification and biochemical analysis.', *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**(3-4), 253--261.
- Makino, K.; Amemura, M.; Kawamoto, T.; Kimura, S.; Shinagawa, H.; Nakata, A. y Suzuki, M. (1996), 'DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase.', *J Mol Biol* 259(1), 15--26.
- Makino, K.; Amemura, M.; Kim, S. K.; Nakata, A. y Shinagawa, H. (1993), 'Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*.', *Genes Dev* 7(1), 149--160.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M. y Nakata, A. (1986), 'Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12. ', *J Mol Biol* 190, 37–44.
- Malan, T. P.; Kolb, A.; Buc, H. y McClure, W. R. (1984), 'Mechanism of CRP-cAMP activation of *lac* operon transcription initiation activation of the P1 promoter.', *J Mol Biol* 180(4), 881--909.
- Manteca, A.; Álvarez, R.; Salazar, N.; Yagüe, P. y Sanchez, J. (2008), 'Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor.*', *Appl Environ Microbiol* **74**(12), 3877--3886.
- Manteca, A.; Claessen, D.; López-Iglesias, C. y Sanchez, 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(1), 118--125.
- Manteca, A.; Fernández, M. y Sánchez, J. (2005a), 'A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus.*', *Microbiology* **151**(Pt 11), 3689--3697.
- Manteca, A.; Fernández, M. y Sánchez, J. (2005b), 'Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves.', *BMC Microbiol* 5, 51.
- Manteca, A.; Sánchez, J.; Jung, H. R.; Schwämmle, V. y Jensen, O. N. (2010), 'Quantitative proteomics analysis of Streptomyces coelicolor development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation.', Mol Cell Proteomics 9(7), 1423–1436.

- Marcos, A. T.; Gutiérrez, S.; Díez, B.; Fernández, F. J.; Oguiza, J. A. y Martín, J. F. (1995), 'Three genes hrdB, hrdD and hrdT of Streptomyces griseus IMRU 3570, encoding sigma factor-like proteins, are differentially expressed under specific nutritional conditions.', Gene 153(1), 41--48.
- 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**(16), 5197--5201.
- Martín, J. F. y Demain, A. L. (1980), 'Control of antibiotic biosynthesis.', Microbiol Rev 44(2), 230-251.
- Martín, J. F. y Liras, P. (2010), 'Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces.*', *Curr Opin Microbiol* 13(3), 263--273.
- Martín, J. F. y Liras, P. (2014), 'Novel Antimicrobial and other Bioactive Metabolites obtained from Silent Gene Clusters. '. En Demain, A. L. y Sánchez, S. (Eds), 'Antibiotics: Current Innovations and Future Trends' (pp. 275—292). Horizon Scientific Press y Caister Academic Press.
- Martín, J. F.; Santos-Beneit, F.; Rodríguez-García, A.; Sola-Landa, A.; Smith, M. C. M.; Ellingsen, T. E.; Nieselt, K.; Burroughs, N. J. y Wellington, E. M. H. (2012b), 'Transcriptomic studies of phosphate control of primary and secondary metabolism in Streptomyces coelicolor.', Appl Microbiol Biotechnol 95(1), 61--75.
- Martín J. F., Sola-Landa A. y Rodríguez-García, A. (2012a), 'Two-component systems in *Streptomyces*. '. En Gross R. (Ed), '*Two* component systems in Bacteria.'. (pp- 315–331). Norkfolk: Horizon Sci Press.
- Martínez, A.; Kolvek, S. J.; Hopke, J.; Yip, C. L. T. y Osburne, M. S. (2005), 'Environmental DNA fragment conferring early and increased sporulation and antibiotic production in *Streptomyces* species.', *Appl Environ Microbiol* **71**(3), 1638--1641.
- Martínez Castro, M. (2011), 'Control por fosfato en la biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus en dos especies del género *Streptomyces'*. (Tesis doctoral). Universidad de León. España.
- Martínez-Castro, M.; Barreiro, C.; Romero, F.; Fernández-Chimeno, R. I. y Martín, J. F. (2011), 'Streptomyces tacrolimicus sp. nov., a low producer of the immunosuppressant tacrolimus (FK506).', Int J Syst Evol Microbiol 61(Pt 5), 1084--1088.
- Martínez-Castro, M.; Salehi-Najafabadi, Z.; Romero, F.; Pérez-Sanchiz, R.; Fernández-Chimeno, R. I.; Martín, J. F. y Barreiro, C. (2013), 'Taxonomy and chemically semi-defined media for the analysis of the tacrolimus producer 'Streptomyces tsukubaensis'.', Appl Microbiol Biotechnol 97(5), 2139--2152.
- Martínez-Castro, M.; Solera, E.; Martín, J. F. y Barreiro, C. (2009), 'Efficient pyramidal arrangement of an ordered cosmid library: Rapid screening of genes of the tacrolimus-producer *Streptomyces* sp. ATCC 55098.', *J Microbiol Methods* 78(2), 150--154.
- Martínez-Costa, O. H.; Arias, P.; Romero, N. M.; Parro, V.; Mellado, R. P. y Malpartida, F. (1996), 'A *relA/spoT* homologous gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) controls antibiotic biosynthetic genes.', *J Biol Chem* 271(18), 10627--10634.
- Martínez-Costa, O. H.; Fernández-Moreno, M. A. y Malpartida, F. (1998), 'The relA/spoT-homologous gene in Streptomyces coelicolor encodes both ribosome-dependent (p)ppGpp-synthesizing and -degrading activities.', J Bacteriol 180(16), 4123--4132.
- Matsumoto, A.; Hong, S. K.; Ishizuka, H.; Horinouchi, S. y Beppu, T. (1994), 'Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase.', *Gene* **146**(1), 47--56.
- McBride, M. J. y Ensign, J. C. (1987), 'Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores.', J Bacteriol 169(11), 4995--5001.
- McCarthy, A. J. y Williams, S. T. (1992), 'Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment–a review.', Gene 115(1-2), 189--192.
- McCleary, W. R. y Stock, J. B. (1994), 'Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators.', J Biol Chem 269(50), 31567--31572.
- McCormack, P. L. y Keating, G. M. (2006), 'Tacrolimus: in heart transplant recipients.', Drugs 66(17), 2269--79; discussion 2280-2.
- McCormick, J. R. (2009), 'Cell division is dispensable but not irrelevant in Streptomyces.', Curr Opin Microbiol 12(6), 689--698.
- McCormick, J. R.; Su, E. P.; Driks, A. y Losick, R. (1994), 'Growth and viability of *Streptomyces coelicolor* mutant for the cell division gene *ftsZ*.', *Mol Microbiol* 14(2), 243--254.

McKenzie, N. L. y Nodwell, J. R. (2007), 'Phosphorylated AbsA2 negatively regulates antibiotic production in Streptomyces coelicolor

through interactions with pathway-specific regulatory gene promoters.', J Bacteriol 189(14), 5284--5292.

Medema, M. H.; Blin, K.; Cimermancic, P.; de Jager, V.; Zakrzewski, P.; Fischbach, M. A.; Weber, T.; Takano, E. y Breitling, R. (2011b), 'antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences.', *Nucleic Acids Res* **39**(Web Server issue), W339--W346.

Medema, M. H.; Breitling, R. y Takano, E. (2011a), 'Synthetic biology in Streptomyces bacteria.', Methods Enzymol 497, 485--502.

- Medema, M. H.; Trefzer, A.; Kovalchuk, A.; van den Berg, M.; Müller, U.; Heijne, W.; Wu, L.; Alam, M. T.; Ronning, C. M.; Nierman, W. C.; Bovenberg, R. A. L.; Breitling, R. y Takano, E. (2010), 'The sequence of a 1.8-mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways.', *Genome Biol Evol* 2, 212--224.
- Meier-Kriesche, H.-U.; Li, S.; Gruessner, R. W. G.; Fung, J. J.; Bustami, R. T.; Barr, M. L. y Leichtman, A. B. (2006), 'Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004.', *Am J Transplant* 6(5 Pt 2), 1111--1131.
- 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 pimaricin biosynthesis.', *Metab Eng* 9(2), 217--227.
- Merrick, M. J. (1976), 'A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor.*', *J Gen Microbiol* 96(2), 299--315.
- Mertens, E. (1991), 'Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anaerobic glycolytic enzyme?', FEBS Lett 285(1), 1--5.
- Mertens, E. (1993), 'ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists.', Parasitol Today 9(4), 122--126.
- Mertens, E.; Ladror, U. S.; Lee, J. A.; Miretsky, A.; Morris, A.; Rozario, C.; Kemp, R. G. y Müller, M. (1998), 'The pyrophosphatedependent phosphofructokinase of the protist, *Trichomonas vaginalis*, and the evolutionary relationships of protist phosphofructokinases.', J Mol Evol 47(6), 739--750.
- Michels, P. A.; Chevalier, N.; Opperdoes, F. R.; Rider, M. H. y Rigden, D. J. (1997), 'The glycosomal ATP-dependent phosphofructokinase of *Trypanosoma brucei* must have evolved from an ancestral pyrophosphate-dependent enzyme.', *Eur J Biochem* 250(3), 698--704.
- Mijakovic, I.; Poncet, S.; Galinier, A.; Monedero, V.; Fieulaine, S.; Janin, J.; Nessler, S.; Marquez, J. A.; Scheffzek, K.; Hasenbein, S.; Hengstenberg, W. y Deutscher, J. (2002), 'Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinase/phosphorylase: a relic of early life?', Proc Natl Acad Sci U S A 99(21), 13442--13447.
- Miller, J. (1972), 'Experiments in molecular genetics.'. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Mishra, A. y Verma, S. (2012), 'Optimization of process parameters for tacrolimus (FK 506) production by new isolate of *Streptomyces* sp. using response surface methodology', *Journal of Biochemical Technology* **3**, 419.
- Mitchell, A.; Romano, G. H.; Groisman, B.; Yona, A.; Dekel, E.; Kupiec, M.; Dahan, O. & Pilpel, Y. (2009), 'Adaptive prediction of environmental changes by microorganisms.', *Nature* 460(7252), 220--224.
- Miwa, Y.; Nakata, A.; Ogiwara, A.; Yamamoto, M. y Fujita, Y. (2000), 'Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*.', *Nucleic Acids Res* 28(5), 1206--1210.
- Miyashita, K.; Fujii, T. y Saito, A. (2000), 'Induction and repression of a *Streptomyces lividans* chitinase gene promoter in response to various carbon sources.', *Biosci Biotechnol Biochem* 64(1), 39--43.
- Mo, S.; Ban, Y.-H.; Park, J. W.; Yoo, Y. J. y Yoon, Y. J. (2009), 'Enhanced FK506 production in *Streptomyces clavuligerus* CKD1119 by engineering the supply of methylmalonyl-CoA precursor.', *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**(12), 1473--1482.
- Mo, S.; Kim, D. H.; Lee, J. H.; Park, J. W.; Basnet, D. B.; Ban, Y. H.; Yoo, Y. J.; Chen, S.-w.; Park, S. R.; Choi, E. A.; Kim, E.; Jin, Y.-Y.; Lee, S.-K.; Park, J. Y.; Liu, Y.; Lee, M. O.; Lee, K. S.; Kim, S. J.; Kim, D.; Park, B. C.; Lee, S.-g.; Kwon, H. J.; Suh, J.-W.; Moore, B. S.; Lim, S.-K. y Yoon, Y. J. (2011), 'Biosynthesis of the allylmalonyl-CoA extender unit for the FK506 polyketide synthase proceeds through a dedicated polyketide synthase and facilitates the mutasynthesis of analogues.', J Am Chem Soc 133(4), 976–985.
- Mo, S.; Yoo, Y. J.; Ban, Y. H.; Lee, S.-K.; Kim, E.; Suh, J.-W. y Yoon, Y. J. (2012), 'Roles of *fkbN* in positive regulation and *tcs7* in negative regulation of FK506 biosynthesis in *Streptomyces* sp. strain KCTC 11604BP.', *Appl Environ Microbiol* 78(7), 2249--2255.
- Mochizuki, S.; Hiratsu, K.; Suwa, M.; Ishii, T.; Sugino, F.; Yamada, K. y Kinashi, H. (2003), 'The large linear plasmid pSLA2-L of Streptomyces rochei has an unusually condensed gene organization for secondary metabolism.', Mol Microbiol 48(6),

1501--1510.

- Molle, V. y Buttner, M. J. (2000), 'Different alleles of the response regulator gene *bldM* arrest *Streptomyces coelicolor* development at distinct stages.', *Mol Microbiol* 36(6), 1265--1278.
- Molle, V.; Palframan, W. J.; Findlay, K. C. y Buttner, M. J. (2000), 'WhiD and WhiB, homologous proteins required for different stages of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *J Bacteriol* **182**(5), 1286--1295.
- Monod, J. (1942), 'Microbiologie: Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.'. París: Hermann & cie.
- Moraleda-Muñoz, A.; Carrero-Lérida, J.; Pérez, J. y Muñoz-Dorado, J. (2003), 'Role of two novel two-component regulatory systems in development and phosphatase expression in *Myxococcus xanthus.*', J Bacteriol **185**(4), 1376--1383.
- Mortola, E.; Endo, Y.; Ohno, K.; Watari, T.; Tsujimoto, H. y Hasegawa, A. (1998), 'The use of two immunosuppressive drugs, cyclosporin A and tacrolimus, to inhibit virus replication and apoptosis in cells infected with feline immunodeficiency virus.', Vet Res Commun 22(8), 553--563.
- Motamedi, H.; Cai, S. J.; Shafiee, A. y Elliston, K. O. (1997), 'Structural organization of a multifunctional polyketide synthase involved in the biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506.', *Eur J Biochem* 244(1), 74–80.
- Motamedi, H. y Shafiee, A. (1998), 'The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506.', Eur J Biochem 256(3), 528--534.
- Motamedi, H.; Shafiee, A.; Cai, S. J.; Streicher, S. L.; Arison, B. H. y Miller, R. R. (1996), 'Characterization of methyltransferase and hydroxylase genes involved in the biosynthesis of the immunosuppressants FK506 and FK520.', *J Bacteriol* 178(17), 5243--5248.
- Moura, R. S.; Martín, J. F.; Martín, A. y Liras, P. (2001), 'Substrate analysis and molecular cloning of the extracellular alkaline phosphatase of *Streptomyces griseus.*', *Microbiology* **147**(Pt 6), 1525--1533.
- Mukamolova, G. V.; Kaprelyants, A. S.; Young, D. I.; Young, M. y Kell, D. B. (1998), 'A bacterial cytokine.', Proc Natl Acad Sci U S A 95(15), 8916--8921.
- Muramatsu, H.; Mokhtar, S. I.; Katsuoka, M. y Ezaki, M. (2005), 'Phylogenetic Analysis of Immunosuppressant FK506-Producing Streptomycete Strains', Actinomycetologica 19(2), 33-39.
- Muramatsu, H. y Nagai, K. (2013), 'Streptomyces tsukubensis sp. nov., a producer of the immunosuppressant tacrolimus.', J Antibiot (Tokyo) 66(4), 251--254.
- Musialowski, M. S.; Flett, F.; Scott, G. B.; Hobbs, G.; Smith, C. P. y Oliver, S. G. (1994), 'Functional evidence that the principal DNA replication origin of the *Streptomyces coelicolor* chromosome is close to the *dnaA-gyrB* region.', *J Bacteriol* 176(16), 5123--5125.

Ν

- Nah, J.-H.; Park, S.-H.; Yoon, H.-M.; Choi, S.-S.; Lee, C.-H. y Kim, E.-S. (2012), 'Identification and characterization of *wblA*-dependent *tmcT* regulation during tautomycetin biosynthesis in *Streptomyces* sp. CK4412.', *Biotechnol Adv* **30**(1), 202--209.
- Nakatsuka, M.; Ragan, J. A.; Sammakia, T.; Smith, D. B.; Uehling, D. E. y Schreiber, S. L. (1990), 'Total synthesis of FK506 and an FKBP probe reagent, [C(8),C(9)-13C2]-FK506', Journal of the American Chemical Society 112(14), 5583-5601.
- Nam, T. W.; Cho, S. H.; Shin, D.; Kim, J. H.; Jeong, J. Y.; Lee, J. H.; Roe, J. H.; Peterkofsky, A.; Kang, S. O.; Ryu, S. y Seok, Y. J. (2001), 'The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB^{Gic} recruits the global repressor Mlc.', *EMBO J* 20(3), 491--498.
- 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**(2), 409--419.
- Nett, M.; Ikeda, H. y Moore, B. S. (2009), 'Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes.', Nat Prod Rep 26(11), 1362--1384.
- Nguyen, K. T.; Tenor, J.; Stettler, H.; Nguyen, L. T.; Nguyen, L. D. y Thompson, C. J. (2003), 'Colonial differentiation in *Streptomyces* coelicolor depends on translation of a specific codon within the *adpA* gene.', *J Bacteriol* **185**(24), 7291--7296.
- Nicholson, T. L.; Chiu, K. y Stephens, R. S. (2004), 'Chlamydia trachomatis lacks an adaptive response to changes in carbon source availability.', Infect Immun 72(7), 4286--4289.

Nikaido, H. (2009), 'Multidrug resistance in bacteria.', Annu Rev Biochem 78, 119--146.

- Nindita, Y.; Nishikawa, T.; Arakawa, K.; Wang, G.; Ochi, K.; Qin, Z. y Kinashi, H. (2013), 'Chromosomal circularization of the model Streptomyces species, Streptomyces coelicolor A3(2).', FEMS Microbiol Lett 347(2), 149--155.
- Nodwell, J. R. y Losick, R. (1998), 'Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by Streptomyces coelicolor.', J Bacteriol 180(5), 1334--1337.
- Nodwell, J. R.; McGovern, K. y Losick, R. (1996), 'An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor.*', *Mol Microbiol* 22(5), 881--893.
- 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(2), 569--584.
- Noens, E. E. ; Mersinias, V.; Traag, B. A.; Smith, C. P.; Koerten, H. K. y van Wezel, G. P. (2005), 'SsgA-like proteins determine the fate of peptidoglycan during sporulation of *Streptomyces coelicolor.*', Mol Microbiol 58(4), 929--944.
- Noens, E. E.; Mersinias, V.; Willemse, J.; Traag, B. A.; Laing, E.; Chater, K. F.; Smith, C. P.; Koerten, H. K. y van Wezel, G. P. (2007), 'Loss of the controlled localization of growth stage-specific cell-wall synthesis pleiotropically affects developmental gene expression in an ssgA mutant of Streptomyces coelicolor.', Mol Microbiol 64(5), 1244--1259.
- Noh, J.-H.; Kim, S.-H.; Lee, H.-N.; Lee, S. Y. y Kim, E.-S. (2010), 'Isolation and genetic manipulation of the antibiotic down-regulatory gene, wblA ortholog for doxorubicin-producing Streptomyces strain improvement.', Appl Microbiol Biotechnol 86(4), 1145--1153.
- Nothaft, H.; Dresel, D.; Willimek, A.; Mahr, K.; Niederweis, M. y Titgemeyer, F. (2003b), 'The phosphotransferase system of Streptomyces coelicolor is biased for N-acetylglucosamine metabolism.', J Bacteriol 185(23), 7019--7023.
- Nothaft, H.; Parche, S.; Kamionka, A. y Titgemeyer, F. (2003a), 'In vivo analysis of HPr reveals a fructose-specific phosphotransferase system that confers high-affinity uptake in *Streptomyces coelicolor.*', J Bacteriol 185(3), 929--937.
- Nothaft, H.; Rigali, S.; Boomsma, B.; Swiatek, M.; McDowall, K. J.; van Wezel, G. P. y Titgemeyer, F. (2010), 'The permease gene nagE2 is the key to N-acetylglucosamine sensing and utilization in *Streptomyces coelicolor* and is subject to multi-level control.', *Mol Microbiol* 75(5), 1133--1144.

Nyström, T. (1999), 'Starvation, cessation of growth and bacterial aging.', Curr Opin Microbiol 2(2), 214--219.

0

- Obanye, A. I. C.; Hobbs, G.; Gardner, D. C. J. y Oliver, S. G. (1996), 'Correlation between carbon flux through the pentose phosphate pathway and production of the antibiotic methylenomycin in *Streptomyces coelicolor* A3(2)', *Microbiology* 142, 133-137.
- Ochi, K. (1990), 'A relaxed (*rel*) mutant of *Streptomyces coelicolor* A3(2) with a missing ribosomal protein lacks the ability to accumulate ppGpp, A-factor and prodigiosin.', *J Gen Microbiol* **136**(12), 2405--2412.
- Oh, S.-Y.; Shin, J.-H. y Roe, J.-H. (2007), 'Dual role of OhrR as a repressor and an activator in response to organic hydroperoxides in Streptomyces coelicolor.', J Bacteriol 189(17), 6284--6292.
- Ohnishi, Y.; Ishikawa, J.; Hara, H.; Suzuki, H.; Ikenoya, M.; Ikeda, H.; Yamashita, A.; Hattori, M. y Horinouchi, S. (2008), 'Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350.', *J Bacteriol* 190(11), 4050--4060.
- Ohnishi, Y.; 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**(1), 102--111.
- Okamoto, S. y Ochi, K. (1998), 'An essential GTP-binding protein functions as a regulator for differentiation in *Streptomyces* coelicolor.', Mol Microbiol **30**(1), 107--119.
- Okanishi, M.; Suzuki, K. y Umezawa, H. (1974), 'Formation and reversion of Streptomycete protoplasts: cultural condition and morphological study.', J Gen Microbiol 80(2), 389-400.
- Okuhara, M.; Tanaka, H.; Goto, T.; Kino, T. y Hatanaka, H. (1990), 'Tricyclo compounds, a process for their production and a pharmaceutical composition containing the same', US Patent 4,894,366.
- Olano, C.; Lombó, F.; Méndez, C. y Salas, J. A. (2008), 'Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering.', *Metab Eng* 10(5), 281--292.

- Oliva, B. y Chopra, I. (1992), 'Tet determinants provide poor protection against some tetracyclines: further evidence for division of tetracyclines into two classes.', Antimicrob Agents Chemother **36**(4), 876--878.
- Olsson, O.; Koncz, C. y Szalay, A. A. (1988), 'The use of the *luxA* gene of the bacterial luciferase operon as a reporter gene.', *Mol Gen Genet* 215(1), 1--9.
- Onaka, H. y Horinouchi, S. (1997), 'DNA-binding activity of the A-factor receptor protein and its recognition DNA sequences.', *Mol Microbiol* 24(5), 991--1000.
- Onaka, H.; Nakagawa, T. y Horinouchi, S. (1998), 'Involvement of two A-factor receptor homologues in *Streptomyces coelicolor* A3(2) in the regulation of secondary metabolism and morphogenesis.', *Mol Microbiol* 28(4), 743--753.
- O'Rourke, S.; Wietzorrek, A.; Fowler, K.; Corre, C.; Challis, G. L. y Chater, K. F. (2009), 'Extracellular signalling, translational control, two repressors and an activator all contribute to the regulation of methylenomycin production in *Streptomyces coelicolor.*', *Mol Microbiol* **71**(3), 763--778.
- Ortiz de Orué Lucana, D. y Groves, M. R. (2009), 'The three-component signalling system HbpS-SenS-SenR as an example of a redox sensing pathway in bacteria.', *Amino Acids* **37**(3), 479--486.
- Ou, X.; Zhang, B.; Zhang, L.; Zhao, G. y Ding, X. (2009), 'Characterization of *rrdA*, a TetR family protein gene involved in the regulation of secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor.*', *Appl Environ Microbiol* **75**(7), 2158–2165.

Ρ

- Paget, M. S.; Chamberlin, L.; Atrih, A.; Foster, S. J. y Buttner, M. J. (1999), 'Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor σ^R is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *J Bacteriol* 181(1), 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 σ^R regulon.', *Mol Microbiol* 42(4), 1007--1020.
- Pahl, A. y Keller, U. (1992), 'FK-506-binding proteins from streptomycetes producing immunosuppressive macrolactones of the FK-506 type.', J Bacteriol 174(18), 5888-5894.
- Panhorst, M.; Sorger-Herrmann, U. y Wendisch, V. F. (2011), 'The *pstSCAB* operon for phosphate uptake is regulated by the global regulator GlxR in *Corynebacterium glutamicum.*', *J Biotechnol* **154**(2-3), 149--155.
- Parajuli, N.; Viet, H. T.; Ishida, K.; Tong, H. T.; Lee, H. C.; Liou, K. y Sohng, J. K. (2005), 'Identification and characterization of the *afsR* homologue regulatory gene from *Streptomyces peucetius* ATCC 27952.', *Res Microbiol* **156**(5-6), 707--712.
- Parche, S.; Beleut, M.; Rezzonico, E.; Jacobs, D.; Arigoni, F.; Titgemeyer, F. y Jankovic, I. (2006), 'Lactose-over-glucose preference in Bifidobacterium longum NCC2705: glcP, encoding a glucose transporter, is subject to lactose repression.', J Bacteriol 188(4), 1260--1265.
- Parche, S.; Schmid, R. y Titgemeyer, F. (1999), 'The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor* identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene *ptsH.*', *Eur J Biochem* **265**(1), 308--317.
- Park, H.-S.; Shin, S.-K.; Yang, Y.-Y.; Kwon, H.-J. y Suh, J.-W. (2005), 'Accumulation of S-adenosylmethionine induced oligopeptide transporters including BldK to regulate differentiation events in *Streptomyces coelicolor* M145.', *FEMS Microbiol Lett* 249(2), 199--206.
- Park, J. W.; Mo, S.-J.; Park, S. R.; Ban, Y.-H.; Yoo, Y. J. y Yoon, Y. J. (2009), 'Liquid chromatography-mass spectrometry characterization of FK506 biosynthetic intermediates in *Streptomyces clavuligerus* KCTC 10561BP.', *Anal Biochem* 393(1), 1--7.
- Park, S.-S.; Yang, Y.-H.; Song, E.; Kim, E.-J.; Kim, W. S.; Sohng, J. K.; Lee, H. C.; Liou, K. K. y Kim, B.-G. (2009), 'Mass spectrometric screening of transcriptional regulators involved in antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *J Ind Microbiol Biotechnol* 36(8), 1073--1083.
- Park U. M.; Suh J. W. y Hong S. K. (2000), 'Genetic Analysis of *absR*, a new abs locus of *Streptomyces coelicolor'*, *J Microbiol Biotechnol* 10, 169-175.
- Parker, C.; Peekhaus, N.; Zhang, X. y Conway, T. (1997), 'Kinetics of Sugar Transport and Phosphorylation Influence Glucose and Fructose Cometabolism by Zymomonas mobilis.', Appl Environ Microbiol 63(9), 3519--3525.
- Pasti, M. B.; Pometto, 3rd, A.; Nuti, M. P. y Crawford, D. L. (1990), 'Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (Termitidae) gut.', Appl Environ Microbiol 56(7), 2213--2218.

- Paul, S.; Birkey, S.; Liu, W. y Hulett, F. M. (2004), 'Autoinduction of *Bacillus subtilis phoPR* operon transcription results from enhanced transcription from Eσ^A- and Eσ^E-responsive promoters by phosphorylated PhoP.', *J Bacteriol* 186(13), 4262--4275.
- Pawlik, K.; Kotowska, M.; Chater, K. F.; Kuczek, K. y Takano, E. (2007), 'A cryptic type I polyketide synthase (cpk) gene cluster in Streptomyces coelicolor A3(2).', Arch Microbiol 187(2), 87--99.
- Perera, I. C. y Grove, A. (2010), 'Molecular mechanisms of ligand-mediated attenuation of DNA binding by MarR family transcriptional regulators.', J Mol Cell Biol 2(5), 243--254.
- 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(6), 2053--2059.
- 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(2), 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(Pt 5), 1527--1537.
- Periyasamy, S.; Warrier, M.; Tillekeratne, M. P. M.; Shou, W. y Sanchez, E. R. (2007), 'The immunophilin ligands cyclosporin A and FK506 suppress prostate cancer cell growth by androgen receptor-dependent and -independent mechanisms.', Endocrinology 148(10), 4716--4726.
- Pfaffl, M. W. (2001), 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.', Nucleic Acids Res 29(9), e45.
- Pfaffl, M. W.; Horgan, G. W. y Dempfle, L. (2002), 'Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.', *Nucleic Acids Res* **30**(9), e36.
- Piette, A.; Derouaux, A.; Gerkens, P.; Noens, E. E. E.; Mazzucchelli, G.; Vion, S.; Koerten, H. K.; Titgemeyer, F.; De Pauw, E.; Leprince, P.; van Wezel, G. P.; Galleni, M. y Rigali, S. (2005), 'From dormant to germinating spores of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new perspectives from the *crp* null mutant.', *J Proteome Res* 4(5), 1699--1708.
- Pirsch, J. D.; Miller, J.; Deierhoi, M. H.; Vincenti, F. y Filo, R. S. (1997), 'A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group.', Transplantation 63(7), 977--983.
- Plumbridge, J. (2001), 'Regulation of PTS gene expression by the homologous transcriptional regulators, Mlc and NagC, in *Escherichia coli* (or how two similar repressors can behave differently).', J Mol Microbiol Biotechnol **3**(3), 371--380.
- Polman, J. y Larkin, J. (1989), 'Purification of DNA from agarose gels', Biotechnology Techniques 3(5), 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(3), 285--292.
- Pope, M. K.; Green, B. D. y Westpheling, J. (1996), 'The bld mutants of Streptomyces coelicolor are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell–cell signalling.', Mol Microbiol 19(4), 747--756.
- Pospiech, A. y Neumann, B. (1995), 'A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria.', Trends Genet 11(6), 217--218.
- Postma, P. W.; Lengeler, J. W. y Jacobson, G. R. (1993), 'Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria.', *Microbiol Rev* 57(3), 543--594.
- Potúcková, L.; Kelemen, G. H.; Findlay, K. C.; Lonetto, M. A.; Buttner, M. J. y Kormanec, J. (1995), 'A new RNA polymerase sigma factor, σ^F, is required for the late stages of morphological differentiation in *Streptomyces* spp.', *Mol Microbiol* 17(1), 37-48.
- Prágai, Z. y Harwood, C. R. (2002), 'Regulatory interactions between the Pho and sigma(B)-dependent general stress regulons of Bacillus subtilis.', Microbiology 148(Pt 5), 1593--1602.
- Price, B.; Adamidis, T.; Kong, R. y Champness, W. (1999), 'A Streptomyces coelicolor antibiotic regulatory gene, *absB*, encodes an RNase III homolog.', J Bacteriol 181(19), 6142--6151.
- Pridham, T. G. y Tresner, H. G. (1974), 'Genus I. Streptomyces Waksman and Henrici 1943, 339. '. En Buchanan, R. E. y Gibbons, N. E.

(Eds), 'Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edn'. (pp 748-829). Baltimore: Williams y Wilkins.

- Procópio, R. E. d. L.; Silva, I. R. d.; Martins, M. K.; Azevedo, J. L. d. y Araújo, J. M. d. (2012), 'Antibiotics produced by Streptomyces.', Braz J Infect Dis 16(5), 466--471.
- Puri-Taneja, A.; Paul, S.; Chen, Y. y Hulett, F. M. (2006), 'CcpA causes repression of the *phoPR* promoter through a novel transcription start site, P(A6).', J Bacteriol 188(4), 1266--1278.
- Puttikhunt, C.; Okamoto, S.; Nakamura, T.; Nihira, T. y Yamada, Y. (1993), 'Distribution in the genus *Streptomyces* of a homolog to *nusG*, a gene encoding a transcriptional antiterminator.', *FEMS Microbiol Lett* **110**(2), 243--248.

Q

- Qi, Y.; Kobayashi, Y. y Hulett, F. M. (1997), 'The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the *pho* regulon.', *J Bacteriol* **179**(8), 2534--2539.
- Quintana, E. T.; Wierzbicka, K.; Mackiewicz, P.; Osman, A.; Fahal, A. H.; Hamid, M. E.; Zakrzewska-Czerwinska, J.; Maldonado, L. A. y Goodfellow, M. (2008), 'Streptomyces sudanensis sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma.', Antonie Van Leeuwenhoek 93(3), 305--313.

R

- Raaijmakers, J. M. y Mazzola, M. (2012), 'Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria.', *Annu Rev Phytopathol* 50, 403--424.
- Rabyk, M.; Ostash, B.; Rebets, Y.; Walker, S. y Fedorenko, V. (2011), 'Streptomyces ghanaensis pleiotropic regulatory gene wblA_{gh} influences morphogenesis and moenomycin production.', *Biotechnol Lett* **33**(12), 2481--2486.
- Ramos, I.; Guzmán, S.; Escalante, L.; Imriskova, I.; Rodríguez-Sanoja, R.; Sanchez, S. y Langley, E. (2004), 'Glucose kinase alone cannot be responsible for carbon source regulation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius.*', *Res Microbiol* 155(4), 267--274.
- Recio, E.; Colinas, A.; Rumbero, A.; Aparicio, J. F. y Martín, J. F. (2004), 'PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimaricin production in *Streptomyces natalensis*.', *J Biol Chem* **279**(40), 41586--41593.
- Redenbach, M.; Flett, F.; Piendl, W.; Glocker, I.; Rauland, U.; Wafzig, O.; Kliem, R.; Leblond, P. y Cullum, J. (1993), 'The Streptomyces lividans 66 chromosome contains a 1 MB deletogenic region flanked by two amplifiable regions.', Mol Gen Genet 241(3-4), 255-262.
- Reeves, A. R.; Cernota, W. H.; Brikun, I. A.; Wesley, R. K. y Weber, J. M. (2004), 'Engineering precursor flow for increased erythromycin production in *Aeromicrobium erythreum.*', *Metab Eng* 6(4), 300--312.
- Reeves, R. E.; South, D. J.; Blytt, H. J. y Warren, L. G. (1974), 'Pyrophosphate:D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase. A new enzyme with the glycolytic function of 6-phosphofructokinase.', J Biol Chem 249(24), 7737--7741.
- Reis, S. A.; Moussatché, N. y Damaso, C. R. A. (2006), 'FK506, a secondary metabolite produced by *Streptomyces*, presents a novel antiviral activity against Orthopoxvirus infection in cell culture.', *J Appl Microbiol* **100**(6), 1373--1380.
- Remitz, A. y Reitamo, S. (2009), 'Long-term safety of tacrolimus ointment in atopic dermatitis.', Expert Opin Drug Saf 8(4), 501--506.
- Revill, W. P.; Bibb, M. J.; Scheu, A. K.; Kieser, H. J. y Hopwood, D. A. (2001), 'Beta-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for fatty acid biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *J Bacteriol* 183(11), 3526--3530.
- Rexer, H. U.; Schäberle, T.; Wohlleben, W. y Engels, A. (2006), 'Investigation of the functional properties and regulation of three glutamine synthetase-like genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Arch Microbiol* **186**(6), 447–458.
- Rice, C. D.; Pollard, J. E.; Lewis, Z. T. y McCleary, W. R. (2009), 'Employment of a promoter-swapping technique shows that PhoU modulates the activity of the *PstSCAB2* ABC transporter in *Escherichia coli*.', *Appl Environ Microbiol* **75**(3), 573--582.
- Rigali, S.; Nothaft, H.; Noens, E. E. E.; Schlicht, M.; Colson, S.; Müller, M.; Joris, B.; Koerten, H. K.; Hopwood, D. A.; Titgemeyer, F. y van Wezel, G. P. (2006), 'The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development.', *Mol Microbiol* 61(5), 1237--1251.
- Rigali, S.; Schlicht, M.; Hoskisson, P.; Nothaft, H.; Merzbacher, M.; Joris, B. y Titgemeyer, F. (2004), 'Extending the classification of

bacterial transcription factors beyond the helix-turn-helix motif as an alternative approach to discover new cis/trans relationships.', *Nucleic Acids Res* **32**(11), 3418--3426.

- 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(7), 670--675.
- 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(9), 4166--4176.
- Rodríguez, E.; Navone, L.; Casati, P. y Gramajo, H. (2012), 'Impact of malic enzymes on antibiotic and triacylglycerol production in Streptomyces coelicolor.', Appl Environ Microbiol 78(13), 4571--4579.
- Rodríguez, H. y Fraga, R. (1999), 'Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion.', *Biotechnol Adv* 17(4-5), 319–339.
- **Rodríguez-García, A.; Barreiro, C.; Santos-Beneit, F.; Sola-Landa, A. y Martín, J. F. (2007),** 'Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a Δ*phoP* mutant.', *Proteomics* **7**(14), 2410–2429.
- Rodríguez-García, A.; Combes, P.; Pérez-Redondo, R.; Smith, M. C. A. y Smith, M. C. M. (2005), 'Natural and synthetic tetracyclineinducible promoters for use in the antibiotic-producing bacteria *Streptomyces.*', *Nucleic Acids Res* **33**(9), e87.
- Rodríguez-García, A.; Santamarta, I.; Pérez-Redondo, R.; Martín, J. F. y Liras, P. (2006), 'Characterization of a two-gene operon epeRA involved in multidrug resistance in *Streptomyces clavuligerus.*', *Res Microbiol* **157**(6), 559--568.
- 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**(10), 3230--3242.
- Rokas, A.; Williams, B. L.; King, N. y Carroll, S. B. (2003), 'Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies.', *Nature* 425(6960), 798--804.
- Roller, C.; Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1992), 'Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes.', *J Gen Microbiol* **138**(6), 1167--1175.
- Romano, A.; Jensen, M. R. y McAlpine, J. (2010), 'Toward the optimization of stent-based treatment for coronary artery disease.', Curr Opin Drug Discov Devel 13(2), 157--158.
- Ronimus, R. S. y Morgan, H. W. (2001), 'The biochemical properties and phylogenies of phosphofructokinases from extremophiles.', Extremophiles 5(6), 357--373.
- Ronimus R. S.; Morgan, H. W. y Ding, Y. R. (1999), 'Phosphofructokinase activities within the order spirochaetales and the characterisation of the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from *Spirochaeta thermophila*', *Arch Microbiol* 172(6), 401--406.
- Rosenberg, H.; Gerdes, R. G. y Chegwidden, K. (1977), 'Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*.', *J Bacteriol* 131(2), 505--511.
- Rueda, B.; Miguélez, E. M.; Hardisson, C. y Manzanal, M. B. (2001), 'Changes in glycogen and trehalose content of Streptomyces brasiliensis hyphae during growth in liquid cultures under sporulating and non-sporulating conditions.', FEMS Microbiol Lett 194(2), 181--185.
- Ruiz, B.; Chávez, A.; Forero, A.; García-Huante, Y.; Romero, A.; Sánchez, M.; Rocha, D.; Sánchez, B.; Rodríguez-Sanoja, R.; Sánchez, S. y Langley, E. (2010), 'Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source.', Crit Rev Microbiol 36(2), 146--167.
- Russell, L. M. y Rosenberg, H. (1979), 'Linked transport of phosphate, potassium ions and protons in *Escherichia coli*.', *Biochem J* 184(1), 13--21.
- 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**(3), 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(17), 5419--5425.
- Ryding, N. J.; Kelemen, G. H.; Whatling, C. A.; Flärdh, K.; Buttner, M. J. y Chater, K. F. (1998), 'A developmentally regulated gene encoding a repressor-like protein is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Mol Microbiol* 29(1), 343--

357.

- Ryu, Y.-G.; Butler, M. J.; Chater, K. F. y Lee, K. J. (2006), 'Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor.*', *Appl Environ Microbiol* **72**(11), 7132--7139.
- Ryu, Y.-G.; Kim, E.-S.; Kim, D.-W.; Kim, S.-K. y Lee, K. J. (2007), 'Differential stringent responses of *Streptomyces coelicolor* M600 to starvation of specific nutrients.', *J Microbiol Biotechnol* 17(2), 305--312.

S

- Saier, Jr, M. y Ramseier, T. M. (1996), 'The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria.', J Bacteriol 178(12), 3411--3417.
- Saito, A.; Fujii, T.; Shinya, T.; Shibuya, N.; Ando, A. y Miyashita, K. (2008), 'The msik gene, encoding the ATP-hydrolysing component of N,N'-diacetylchitobiose ABC transporters, is essential for induction of chitinase production in Streptomyces coelicolor A3(2).', Microbiology 154(Pt 11), 3358--3365.
- Saito, A.; Fujii, T.; Yoneyama, T. y Miyashita, K. (1998), 'g/kA is involved in glucose repression of chitinase production in Streptomyces lividans.', J Bacteriol 180(11), 2911--2914.
- Saito, A.; Shinya, T.; Miyamoto, K.; Yokoyama, T.; Kaku, H.; Minami, E.; Shibuya, N.; Tsujibo, H.; Nagata, Y.; Ando, A.; Fujii, T. y Miyashita, K. (2007), 'The dasABC gene cluster, adjacent to dasR, encodes a novel ABC transporter for the uptake of N,N'diacetylchitobiose in Streptomyces coelicolor A3(2).', Appl Environ Microbiol 73(9), 3000--3008.
- Saito, N.; Matsubara, K.; Watanabe, M.; Kato, F. y Ochi, K. (2003), 'Genetic and biochemical characterization of EshA, a protein that forms large multimers and affects developmental processes in *Streptomyces griseus.*', *J Biol Chem* 278(8), 5902--5911.
- 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**(13), 4952--4961.
- Salas, J. A.; Quiros, L. M. y Hardisson, C. (1984), 'Pathways of glucose catabolism during germination of *Streptomyces* spores', *FEMS Microbiology Letters* 22(3), 229–233.
- Salehghamari, E.; Hamedi, J.; Elahi, E.; Sepehrizadeh, Z.; Sadeghi, M. y Muth, G. (2012), 'Prediction of the *pho* regulon in Streptomyces clavuligerus DSM 738.', New Microbiol 35(4), 447--457.
- Salerno, P.; Larsson, J.; Bucca, G.; Laing, E.; Smith, C. P. y Flärdh, K. (2009), 'One of the two genes encoding nucleoid-associated HU proteins in *Streptomyces coelicolor* is developmentally regulated and specifically involved in spore maturation.', *J Bacteriol* 191(21), 6489--6500.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001), 'Molecular Cloning: A Laboratory Manual'. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- San Paolo, S.; Huang, J.; Cohen, S. N. y Thompson, C. J. (2006), 'rag genes: novel components of the RamR regulon that trigger morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor.*', *Mol Microbiol* **61**(5), 1167--1186.
- Sanger, F.; Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977), 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.', Proc Natl Acad Sci U S A 74(12), 5463--5467.
- Santos-Beneit, F. (2015), 'The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria.', Front Microbiol 6, 402.
- Santos-Beneit, F.; Barriuso-Iglesias, M.; Fernández-Martínez, L. T.; Martínez-Castro, M.; Sola-Landa, A.; Rodríguez-García, A. y Martín, J. F. (2011a), 'The RNA polymerase omega factor RpoZ is regulated by PhoP and has an important role in antibiotic biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor.*', *Appl Environ Microbiol* 77(21), 7586–7594.
- Santos-Beneit, F.; Rodríguez-García, A.; Apel, A. K. y Martín, J. F. (2009b), 'Phosphate and carbon source regulation of two Phopdependent glycerophosphodiester phosphodiesterase genes of *Streptomyces coelicolor*.', *Microbiology* 155(Pt 6), 1800-1811.
- Santos-Beneit, F.; Rodríguez-García, A.; Franco-Domínguez, E. y Martín, J. F. (2008), 'Phosphate-dependent regulation of the lowand high-affinity transport systems in the model actinomycete Streptomyces coelicolor.', *Microbiology* 154(Pt 8), 2356-2370.
- Santos-Beneit, F.; Rodríguez-García, A. y Martín, J. F. (2011b), 'Complex transcriptional control of the antibiotic regulator *afsS* in *Streptomyces*: PhoP and AfsR are overlapping, competitive activators.', *J Bacteriol* **193**(9), 2242--2251.

- Santos-Beneit, F.; Rodríguez-García, A.; Sola-Landa, A. y Martín, J. F. (2009a), 'Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription.', *Mol Microbiol* 72(1), 53--68.
- 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.
- Sawyer, E. B.; Claessen, D.; Haas, M.; Hurgobin, B. y Gras, S. L. (2011), 'The assembly of individual chaplin peptides from Streptomyces coelicolor into functional amyloid fibrils.', PLoS One 6(4), e18839.
- Schäfer, A.; Konrad, R.; Kuhnigk, T.; Kämpfer, P.; Hertel, H. y König, H. (1996), 'Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut.', *J Appl Bacteriol* 80(5), 471--478.
- Schau, M.; Eldakak, A. y Hulett, F. M. (2004), 'Terminal oxidases are essential to bypass the requirement for ResD for full Pho induction in *Bacillus subtilis.*', *J Bacteriol* **186**(24), 8424--8432.
- Schlösser, A.; Kampers, T. y Schrempf, H. (1997), 'The Streptomyces ATP-binding component MsiK assists in cellobiose and maltose transport.', J Bacteriol 179(6), 2092--2095.
- Schlösser, A.; Weber, A. y Schrempf, H. (2001), 'Synthesis of the *Streptomyces lividans* maltodextrin ABC transporter depends on the presence of the regulator MalR.', *FEMS Microbiol Lett* **196**(1), 77--83.
- 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(3), 543--553.
- Schrempf, H. (2001), 'Recognition and degradation of chitin by streptomycetes.', Antonie Van Leeuwenhoek 79(3-4), 285--289.
- Schumacher, M. A.; Seidel, G.; Hillen, W. y Brennan, R. G. (2006), 'Phosphoprotein Crh-Ser46-P displays altered binding to CcpA to effect carbon catabolite regulation.', *J Biol Chem* 281(10), 6793--6800.
- Schumacher, M. A.; Seidel, G.; Hillen, W. y Brennan, R. G. (2007), 'Structural mechanism for the fine-tuning of CcpA function by the small molecule effectors glucose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate.', J Mol Biol 368(4), 1042--1050.
- Schwedock, J.; McCormick, J. R.; Angert, E. R.; Nodwell, J. R. y Losick, R. (1997), 'Assembly of the cell division protein FtsZ into ladder-like structures in the aerial hyphae of *Streptomyces coelicolor.*', *Mol Microbiol* 25(5), 847--858.
- Scopes, R. K.; Testolin, V.; Stoter, A.; Griffiths-Smith, K. y Algar, E. M. (1985), 'Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from Zymomonas mobilis.', Biochem J 228(3), 627--634.
- Seidel, G.; Diel, M.; Fuchsbauer, N. y Hillen, W. (2005), 'Quantitative interdependence of coeffectors, CcpA and *cre* in carbon catabolite regulation of *Bacillus subtilis.*', *FEBS J* 272(10), 2566--2577.
- Seki, T.; Yoshikawa, H.; Takahashi, H. y Saito, H. (1988), 'Nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis phoR* gene.', *J Bacteriol* 170(12), 5935--5938.
- Servant, P.; Le Coq, D. y Aymerich, S. (2005), 'CcpN (YqzB), a novel regulator for CcpA-independent catabolite repression of *Bacillus* subtilis gluconeogenic genes.', *Mol Microbiol* 55(5), 1435--1451.
- Sevciková, B.; Benada, O.; Kofronova, O. y Kormanec, J. (2001), 'Stress-response sigma factor sigma(H) is essential for morphological differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Arch Microbiol* **177**(1), 98--106.
- Sevciková, B.; Rezuchova, B.; Homerova, D. y Kormanec, J. (2010), 'The anti-anti-sigma factor BldG is involved in activation of the stress response sigma factor σ^{H} in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *J Bacteriol* **192**(21), 5674--5681.
- Sexton, D. L.; St-Onge, R. J.; Haiser, H. J.; Yousef, M. R.; Brady, L.; Gao, C.; Leonard, J. y Elliot, M. A. (2015), 'Resuscitation-promoting factors are cell wall-lytic enzymes with important roles in the germination and growth of *Streptomyces coelicolor.*', J Bacteriol 197(5), 848--860.
- Shafiee, A.; Motamedi, H. y Chen, T. (1994), 'Enzymology of FK-506 biosynthesis. Purification and characterization of 31-0desmethylFK-506 O:methyltransferase from *Streptomyces* sp. MA6858.', *Eur J Biochem* 225(2), 755--764.
- Shafiee, A.; Motamedi, H.; Dumont, F. J.; Arison, B. H. y Miller, R. R. (1997), 'Chemical and biological characterization of two FK506 analogs produced by targeted gene disruption in *Streptomyces* sp. MA6548.', *J Antibiot (Tokyo)* 50(5), 418--423.
- Shin, S.-K.; Park, H.-S.; Kwon, H.-J.; Yoon, H.-J. y Suh, J.-W. (2007), 'Genetic characterization of two S-adenosylmethionine-induced

ABC transporters reveals their roles in modulations of secondary metabolism and sporulation in *Streptomyces coelicolor* M145.', *J Microbiol Biotechnol* **17**(11), 1818–1825.

- Shirling, E. B. y Gottlieb, D. (1966), 'Methods for characterization of Streptomyces species', Int. J. Syst. Bacteriol 16, 313-340.
- Shirling, E. B. y Gottlieb, D. (1968a), 'Cooperative description of type cultures of Streptomyces.: II. Species descriptions from first study', International Journal of Systematic Bacteriology 18(2), 69-189.
- Shirling, E. B. y Gottlieb, D. (1968b), 'Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* III. Additional Species Descriptions from First and Second Studies', *International Journal of Systematic Bacteriology* **18**(4), 279-392.
- Shirling, E. B. y Gottlieb, D. (1969), 'Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies', *International Journal of Systematic Bacteriology* **19**(4), 391-512.
- Shirling, E. B. y Gottlieb, D. (1972), 'Cooperative description of type strains of *Streptomyces*: V. Additional Descriptions', *International Journal of Systematic Bacteriology* 22(4), 265-394.
- Shu, D.; Chen, L.; Wang, W.; Yu, Z.; Ren, C.; Zhang, W.; Yang, S.; Lu, Y. y Jiang, W. (2009), 'afsQ1-Q2-sigQ is a pleiotropic but conditionally required signal transduction system for both secondary metabolism and morphological development in Streptomyces coelicolor.', Appl Microbiol Biotechnol 81(6), 1149--1160.
- Sia, E. A.; Kuehner, D. M. y Figurski, D. H. (1996), 'Mechanism of retrotransfer in conjugation: prior transfer of the conjugative plasmid is required.', *J Bacteriol* 178(5), 1457--1464.
- Siebers, B.; Klenk, H. P. y Hensel, R. (1998), 'PPi-dependent phosphofructokinase from *Thermoproteus tenax*, an archaeal descendant of an ancient line in phosphofructokinase evolution.', *J Bacteriol* 180(8), 2137--2143.
- Siebring, J. (2010), 'The phosphofructokinases of Streptomyces coelicolor A3(2)'. (Tesis doctoral). Universidad de Groningen. Holanda.
- Sierra-Paredes, G. y Sierra-Marcuño, G. (2008), 'Ascomycin and FK506: pharmacology and therapeutic potential as anticonvulsants and neuroprotectants.', CNS Neurosci Ther 14(1), 36--46.
- Sigmund, J. M.; Clark, D. C.; Rainey, F. A. y Anderson, A. S. (2003), 'Detection of eubacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductases from natural populations of actinomycetes.', *Microb Ecol* 46(1), 106--112.
- Singh, B. P. y Behera, B. K. (2009), 'Regulation of tacrolimus production by altering primary source of carbons and amino acids.', Lett Appl Microbiol 49(2), 254--259.
- Smith, C. P. y Chater, K. F. (1988), 'Structure and regulation of controlling sequences for the Streptomyces coelicolor glycerol operon.', J Mol Biol 204(3), 569--580.
- Smyth, G. K. (2004), 'Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments.', Stat Appl Genet Mol Biol 3, Article3.

Smyth, G. K. y Speed, T. (2003), 'Normalization of cDNA microarray data.', Methods 31(4), 265--273.

- 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**(10), 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**(3), 1767--1782.
- Sola-Landa, A.; Rodríguez-García, A.; Apel, A. K. y Martín, J. F. (2008), 'Target genes and structure of the direct repeats in the DNAbinding sequences of the response regulator PhoP in *Streptomyces coelicolor.*', *Nucleic Acids Res* 36(4), 1358--1368.
- Sola-Landa, A.; Rodríguez-García, A.; Franco-Domínguez, E. y Martín, J. F. (2005), 'Binding of PhoP to promoters of phosphateregulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes.', *Mol Microbiol* 56(5), 1373--1385.
- Soliveri, J. A.; Gomez, J.; Bishai, W. R. y 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.
- Southern, E. M. (1975), 'Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.', J Mol Biol 98(3), 503-517.

Starcevic, A.; Zucko, J.; Simunkovic, J.; Long, P. F.; Cullum, J. y Hranueli, D. (2008), 'ClustScan: an integrated program package for the

semi-automatic annotation of modular biosynthetic gene clusters and in silico prediction of novel chemical structures.', *Nucleic Acids Res* **36**(21), 6882--6892.

- Stebbins, M. J.; Urlinger, S.; Byrne, G.; Bello, B.; Hillen, W. y Yin, J. C. (2001), 'Tetracycline-inducible systems for Drosophila.', Proc Natl Acad Sci U S A 98(19), 10775--10780.
- Steed, P. M. y Wanner, B. L. (1993), 'Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon.', *J Bacteriol* 175(21), 6797--6809.
- Stevenson, C. E. M.; Kock, H.; Mootien, S.; Davies, S. C.; Bibb, M. J. y Lawson, D. M. (2007), 'Crystallization and preliminary X-ray analysis of AbsC, a novel regulator of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor.*', Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 63(Pt 3), 233-235.
- Strakova, E.; Zikova, A. y Vohradsky, J. (2014), 'Inference of sigma factor controlled networks by using numerical modeling applied to microarray time series data of the germinating prokaryote.', *Nucleic Acids Res* 42(2), 748--763.
- Strauch, M.; Webb, V.; Spiegelman, G. y Hoch, J. A. (1990), 'The SpoOA protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene.', *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(5), 1801--1805.
- Stutzman-Engwall, K. J.; Otten, S. L. y Hutchinson, C. R. (1992), 'Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* spp. and overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius.*', *J Bacteriol* 174(1), 144--154.
- Sun, G.; Birkey, S. M. y Hulett, F. M. (1996), 'Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus* subtilis.', Mol Microbiol 19(5), 941--948.
- Sun, J.; Hesketh, A. y Bibb, M. (2001), 'Functional analysis of *relA* and *rshA*, two *relA/spoT* homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *J Bacteriol* 183(11), 3488--3498.
- Sun, J.; Kelemen, G. H.; Fernández-Abalos, J. M. y Bibb, M. J. (1999), 'Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Microbiology* 145 (Pt 9), 2221--2227.
- Swiatek, M. A.; Gubbens, J.; Bucca, G.; Song, E.; Yang, Y.-H.; Laing, E.; Kim, B.-G.; Smith, C. P. y van Wezel, G. P. (2013), 'The ROK family regulator Rok7B7 pleiotropically affects xylose utilization, carbon catabolite repression, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor.*', J Bacteriol 195(6), 1236--1248.
- Swiatek, M. A.; Tenconi, E.; Rigali, S. y van Wezel, G. P. (2012b), 'Functional analysis of the N-acetylglucosamine metabolic genes of Streptomyces coelicolor and role in control of development and antibiotic production.', J Bacteriol 194(5), 1136--1144.
- Swiatek, M. A.; Urem, M.; Tenconi, E.; Rigali, S. y van Wezel, G. P. (2012a), 'Engineering of N-acetylglucosamine metabolism for improved antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and an unsuspected role of NagA in glucosamine metabolism.', *Bioengineered* 3(5), 280--285.
- Swiercz, J. P.; Hindra; Bobek, J.; Bobek, J.; Haiser, H. J.; Di Berardo, C.; Tjaden, B. y Elliot, M. A. (2008), 'Small non-coding RNAs in Streptomyces coelicolor.', Nucleic Acids Res 36(22), 7240--7251.

Т

- Tagami, H. y Aiba, H. (1998), 'A common role of CRP in transcription activation: CRP acts transiently to stimulate events leading to open complex formation at a diverse set of promoters.', *EMBO J* 17(6), 1759--1767.
- Takano, E. (2006), 'Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation.', *Curr Opin Microbiol* 9(3), 287--294.
- Takano, E.; Chakraburtty, R.; Nihira, T.; Yamada, Y. 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**(5), 1015--1028.
- Takano, E.; Gramajo, H. C.; Strauch, E.; Andres, N.; White, J. y Bibb, M. J. (1992), 'Transcriptional regulation of the *redD* transcriptional activator gene accounts for growth-phase-dependent production of the antibiotic undecylprodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Mol Microbiol* 6(19), 2797--2804.
- Takano, E.; Tao, M.; Long, F.; Bibb, M. J.; Wang, L.; Li, W.; Buttner, M. J.; Bibb, M. J.; Deng, Z. X. y Chater, K. F. (2003), 'A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor.*', *Mol Microbiol* 50(2), 475--486.
- Takano, H.; Fujimoto, M.; Urano, H.; Beppu, T. y Ueda, K. (2011), 'Cross-interaction of anti-o^H factor RshA with BldG, an anti-sigma

factor antagonist in Streptomyces griseus.', FEMS Microbiol Lett 314(2), 158--163.

- **Takano, H.; Hosono, K.; Beppu, T. y Ueda, K. (2003),** 'Involvement of σ^H and related sigma factors in glucose-dependent initiation of morphological and physiological development of *Streptomyces griseus.*', *Gene* **320**, 127–135.
- Takemaru, K.; Mizuno, M. y Kobayashi, Y. (1996), 'A Bacillus subtilis gene cluster similar to the Escherichia coli phosphate-specific transport (pst) operon: evidence for a tandemly arranged pstB gene.', Microbiology 142 (Pt 8), 2017--2020.
- Tan, H.; Yang, H.; Tian, Y.; Wu, W.; Whatling, C. A.; Chamberlin, L. C.; Buttner, M. J.; Nodwell, J. y Chater, K. F. (1998), 'The Streptomyces coelicolor sporulation-specific sigma WhiG form of RNA polymerase transcribes a gene encoding a ProX-like protein that is dispensable for sporulation.', Gene 212(1), 137--146.
- 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(2), 322--333.
- Tang, L.; Zhang, Y. X. y Hutchinson, C. R. (1994), 'Amino acid catabolism and antibiotic synthesis: valine is a source of precursors for macrolide biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae.*', *J Bacteriol* **176**(19), 6107--6119.
- Tartoff 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(1), 127--143.
- Thomas, L.; Hodgson, D. A.; Wentzel, A.; Nieselt, K.; Ellingsen, T. E.; Moore, J.; Morrissey, E. R.; Legaie, R.; Consortium, T. S.; Wohlleben, W.; Rodríguez-García, A.; Martín, J. F.; Burroughs, N. J.; Wellington, E. M. H. y Smith, M. C. M. (2012), 'Metabolic switches and adaptations deduced from the proteomes of *Streptomyces coelicolor* wild type and *phoP* mutant grown in batch culture.', *Mol Cell Proteomics*.
- Titgemeyer, F.; Reizer, J.; Reizer, A. y Saier, Jr, M. (1994), 'Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria.', *Microbiology* 140 (Pt 9), 2349--2354.
- Titgemeyer, F.; Walkenhorst, J.; Reizer, J.; Stuiver, M. H.; Cui, X. y Saier, Jr, M. (1995), 'Identification and characterization of phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species.', *Microbiology* 141 (Pt 1), 51--58.
- Tobisch, S.; Stülke, J. y Hecker, M. (1999), 'Regulation of the *lic* operon of *Bacillus subtilis* and characterization of potential phosphorylation sites of the LicR regulator protein by site-directed mutagenesis.', *J Bacteriol* **181**(16), 4995--5003.
- Tocci, M. J.; Matkovich, D. A.; Collier, K. A.; Kwok, P.; Dumont, F.; Lin, S.; Degudicibus, S.; Siekierka, J. J.; Chin, J. y Hutchinson, N. I. (1989), 'The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes.', J Immunol 143(2), 718--726.
- Tokala, R. K.; Strap, J. L.; Jung, C. M.; Crawford, D. L.; Salove, M. H.; Deobald, L. A.; Bailey, J. F. y Morra, M. J. (2002), 'Novel plantmicrobe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*).', *Appl Environ Microbiol* 68(5), 2161--2171.

Tommassen, J. y Lugtenberg, B. (1982), 'PHO-regulon of Escherichia coli K12: a minireview.', Ann Microbiol (Paris) 133(2), 243--249.

- Tommassen, J.; de Geus, P.; Lugtenberg, B.; Hackett, J. y Reeves, P. (1982), 'Regulation of the *pho* regulon of *Escherichia coli* K-12. Cloning of the regulatory genes *phoB* and *phoR* and identification of their gene products.', *J Mol Biol* **157**(2), 265--274.
- Tomono, A.; Tsai, Y.; Ohnishi, Y. y Horinouchi, S. (2005), 'Three chymotrypsin genes are members of the AdpA regulon in the Afactor regulatory cascade in *Streptomyces griseus.*', *J Bacteriol* **187**(18), 6341--6353.
- Torriani, A. (1990), 'From cell membrane to nucleotides: the phosphate regulon in Escherichia coli.', Bioessays 12(8), 371--376.
- Traag, B. A. y van Wezel, G. P. (2008), 'The SsgA-like proteins in actinomycetes: small proteins up to a big task.', Antonie Van Leeuwenhoek 94(1), 85--97.
- Trede, N. S.; Warwick, A. B.; Rosoff, P. M.; Rohrer, R.; Bierer, B. E. y Guinan, E. (1997), 'Tacrolimus (FK506) in allogeneic bone marrow transplantation for severe aplastic anemia following orthotopic liver transplantation.', *Bone Marrow Transplant* 20(3), 257--260.
- Trepanier, N. K.; Jensen, S. E.; Alexander, D. C. y Leskiw, B. K. (2002), 'The positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* is mistranslated in a *bldA* mutant.', *Microbiology* **148**(Pt 3), 643--656.

- Truniger, V.; Boos, W. y Sweet, G. (1992), 'Molecular analysis of the glpFKX regions of Escherichia coli and Shigella flexneri.', J Bacteriol 174(21), 6981--6991.
- 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**(6), 2165--2174.
- Tseng, H. C. y Chen, C. W. (1991), 'A cloned *ompR*-like gene of *Streptomyces lividans* 66 suppresses defective *melC1*, a putative copper-transfer gene.', *Mol Microbiol* 5(5), 1187--1196.
- Tunca, S.; Barreiro, C.; Sola-Landa, A.; Coque, J. J. R. y Martín, J. F. (2007), 'Transcriptional regulation of the desferrioxamine gene cluster of *Streptomyces coelicolor* is mediated by binding of DmdR1 to an iron box in the promoter of the *desA* gene.', *FEBS J* 274(4), 1110--1122.
- Turlo, J.; Gajzlerska, W.; Klimaszewska, M.; Król, M.; Dawidowski, M. y Gutkowska, B. (2012), 'Enhancement of tacrolimus productivity in *Streptomyces tsukubaensis* by the use of novel precursors for biosynthesis.', *Enzyme Microb Technol* 51(6-7), 388–395.

U

- Ueda, K.; Endo, K.; Takano, H.; Nishimoto, M.; Kido, Y.; Tomaru, Y.; Matsuda, K. y Beppu, T. (2000), 'Carbon-source-dependent transcriptional control involved in the initiation of cellular differentiation in *Streptomyces griseus.*', *Antonie Van Leeuwenhoek* 78(3-4), 263–268.
- Uguru, G. C.; Stephens, K. E.; Stead, J. A.; Towle, J. E.; Baumberg, S. y McDowall, K. J. (2005), 'Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor.*', *Mol Microbiol* 58(1), 131--150.
- Umeyama, T. y Horinouchi, S. (2001), 'Autophosphorylation of a bacterial serine/threonine kinase, AfsK, is inhibited by KbpA, an AfsK-binding protein.', J Bacterial 183(19), 5506--5512.

Ureta, T. (1991), 'The role of isozymes in metabolite channelling.', J Theor Biol 152(1), 81--84.

Uyeda, K. (1979), 'Phosphofructokinase.', Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 48, 193--244.

V

- van den Bogaard, P. T.; Kleerebezem, M.; Kuipers, O. P. y de Vos, W. M. (2000), 'Control of lactose transport, beta-galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: evidence for carbon catabolite repression by a nonphosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar.', *J Bacteriol* 182(21), 5982--5989.
- van Duyne, G. D.; Standaert, R. F.; Karplus, P. A.; Schreiber, S. L. y Clardy, J. (1991), 'Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex.', *Science* 252(5007), 839--842.
- 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(12), 3143–3149.
- van Keulen, G.; Siebring, J. y Dijkhuizen, L. (2011), ' Central Carbon Metabolic Pathways in *Streptomyces*.'. En Dyson P. (Ed), 'Streptomyces: *Molecular Biology and Biotechnology'* (pp. 105–124). Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- van Veen, H. W.; Abee, T.; Kortstee, G. J.; Konings, W. N. y Zehnder, A. J. (1994), 'Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*.', *Biochemistry* **33**(7), 1766--1770.
- van Wezel, G. P.; König, M.; Mahr, K.; Nothaft, H.; Thomae, A. W.; Bibb, M. y Titgemeyer, F. (2007), 'A new piece of an old jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *J Mol Microbiol Biotechnol* 12(1-2), 67--74.
- van Wezel, G. P.; Krabben, P.; Traag, B. A.; Keijser, B. J. F.; Kerste, R.; Vijgenboom, E.; Heijnen, J. J. y Kraal, B. (2006), 'Unlocking Streptomyces spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering.', Appl Environ Microbiol 72(8), 5283--5288.
- van Wezel, G. P.; Mahr, K.; König, M.; Traag, B. A.; Pimentel-Schmitt, E. F.; Willimek, A. y Titgemeyer, F. (2005), 'GlcP constitutes the major glucose uptake system of *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Mol Microbiol* 55(2), 624--636.
- van Wezel, G. P. y McDowall, K. J. (2011), 'The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances.', *Nat Prod Rep* 28(7), 1311--1333.
- van Wezel, G. P.; McKenzie, N. L. y Nodwell, J. R. (2009), 'Chapter 5. Applying the genetics of secondary metabolism in model actinomycetes to the discovery of new antibiotics.', *Methods Enzymol* **458**, 117--141.
- van Wezel, G. P.; van der Meulen, J.; Kawamoto, S.; Luiten, R. G.; Koerten, H. K. y Kraal, B. (2000), 'ssgA is essential for sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and affects hyphal development by stimulating septum formation.', *J Bacteriol* **182**(20), 5653--5662.
- van Wezel, G. P.; White, J.; Bibb, M. J. y Postma, P. W. (1997), 'The *malEFG* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): characterization, disruption and transcriptional analysis.', *Mol Gen Genet* **254**(5), 604--608.
- VanBogelen, R. A.; Olson, E. R.; Wanner, B. L. y Neidhardt, F. C. (1996), 'Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli.*', J Bacteriol 178(15), 4344--4366.
- Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A. y Speleman, F. (2002), 'Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.', *Genome Biol* 3(7), RESEARCH0034.
- Vemuri, G. N.; Altman, E.; Sangurdekar, D. P.; Khodursky, A. B. y Eiteman, M. A. (2006), 'Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio.', *Appl Environ Microbiol* 72(5), 3653--3661.
- 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**(3), 495--548.
- Verma, M.; Lal, D.; Kaur, J.; Saxena, A.; Kaur, J.; Anand, S. y Lal, R. (2013), 'Phylogenetic analyses of phylum Actinobacteria based on whole genome sequences.', *Res Microbiol* 164(7), 718--728.
- Vicente, C. M.; Santos-Aberturas, J.; Guerra, S. M.; Payero, T. D.; Martín, J. F. y Aparicio, J. F. (2009), 'PimT, an amino acid exporter controls polyene production via secretion of the quorum sensing pimaricin-inducer PI-factor in *Streptomyces natalensis.*', *Microb Cell Fact* 8, 33.
- Vinuselvi, P.; Kim, M. K.; Lee, S. K. y Ghim, C.-M. (2012), 'Rewiring carbon catabolite repression for microbial cell factory.', *BMB Rep* 45(2), 59--70.
- Viollier, P. H.; Minas, W.; Dale, G. E.; Folcher, M. y Thompson, C. J. (2001), 'Role of acid metabolism in *Streptomyces coelicolor* morphological differentiation and antibiotic biosynthesis.', *J Bacteriol* **183**(10), 3184--3192.
- Vockenhuber, M.-P. y Suess, B. (2012), 'Streptomyces coelicolor sRNA scr5239 inhibits agarase expression by direct base pairing to the dagA coding region.', Microbiology 158(Pt 2), 424--435.
- Vögtli, M.; Chang, P. C. y Cohen, S. N. (1994), 'afsR2: a previously undetected gene encoding a 63-amino-acid protein that stimulates antibiotic production in *Streptomyces lividans.*', *Mol Microbiol* 14(4), 643--653.
- Volff, J. N. y Altenbuchner, J. (1998), 'Genetic instability of the Streptomyces chromosome.', Mol Microbiol 27(2), 239--246.
- Vujaklija, D.; Horinouchi, S. y Beppu, T. (1993), 'Detection of an A-factor-responsive protein that binds to the upstream activation sequence of strR, a regulatory gene for streptomycin biosynthesis in Streptomyces griseus.', J Bacteriol 175(9), 2652--2661.

W

- Waksman, S. A. y Henrici, A. T. (1943), 'The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes.', J Bacteriol 46(4), 337--341.
- Wallemacq, P. E. y Reding, R. (1993), 'FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects.', *Clin Chem* **39**(11 Pt 1), 2219--2228.
- Walsh, C. T. y Wencewicz, T. A. (2014), 'Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective.', J Antibiot (Tokyo) 67(1), 7--22.
- 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*', *Biologia* 62(5), 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(28), 8908–8909.
- 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(Pt 8), 1991--2004.

- Wang, R.; Mast, Y.; Wang, J.; Zhang, W.; Zhao, G.; Wohlleben, W.; Lu, Y. y Jiang, W. (2013), 'Identification of two-component system AfsQ1/Q2 regulon and its cross-regulation with GlnR in *Streptomyces coelicolor.*', *Mol Microbiol* 87(1), 30--48.
- Wang, X.-J.; Yan, Y.-J.; Zhang, B.; An, J.; Wang, J.-J.; Tian, J.; Jiang, L.; Chen, Y.-H.; Huang, S.-X.; Yin, M.; Zhang, J.; Gao, A.-L.; Liu, C.-X.; Zhu, Z.-X. y Xiang, W.-S. (2010), 'Genome sequence of the milbemycin-producing bacterium Streptomyces bingchenggensis.', J Bacteriol 192(17), 4526--4527.
- Wang, X.-K. y Jin, J.-L. (2014), 'Crucial factor for increasing the conjugation frequency in Streptomyces netropsis SD-07 and other strains.', FEMS Microbiol Lett 357(1), 99--103.
- Wanner, B. L. (1993), 'Gene regulation by phosphate in enteric bacteria.', J Cell Biochem 51(1), 47--54.
- Wanner, B. L. (1996), 'Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of Escherichia coli.', Kidney Int 49(4), 964--967.
- Wanner, B. L. (1998), 'Phosphate Signaling and the Control of Gene Expression in Escherichia coli. '. En Silver S. y Walden, W. (Eds), 'Metal Ions in Gene Regulation.'. (pp. 104–128). USA: Springer.
- Wanner, B. L. y Wilmes-Riesenberg, M. R. (1992), 'Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli.*', J Bacteriol 174(7), 2124--2130.
- Warner, J. B. y Lolkema, J. S. (2003), 'A Crh-specific function in carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*.', *FEMS Microbiol Lett* 220(2), 277--280.
- 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(5), 386--390.
- Wei, W.; Wang, W.; Cao, Z.; Yu, H.; Wang, X.; Zhao, J.; Tan, H.; Xu, H.; Jiang, W. y Li, Y. (2007), 'Comparative analysis of twocomponent signal transduction system in two streptomycete genomes.', Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 39(5), 317--325.
- Weickert, M. J. y Adhya, S. (1993), 'Control of transcription of gal repressor and isorepressor genes in *Escherichia coli*.', J Bacteriol 175(1), 251--258.
- Weisschuh, N.; Fink, D.; Vierling, S.; Bibb, M. J.; Wohlleben, W. y Engels, A. (2000), 'Transcriptional analysis of the gene for glutamine synthetase II and two upstream genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *Mol Gen Genet* **264**(4), 461--469.
- Weissenborn, D. L.; Wittekindt, N. y Larson, T. J. (1992), 'Structure and regulation of the glpFK operon encoding glycerol diffusion facilitator and glycerol kinase of Escherichia coli K-12.', J Biol Chem 267(9), 6122--6131.
- Weisser, P.; Krämer, R.; Sahm, H. y Sprenger, G. A. (1995), 'Functional expression of the glucose transporter of Zymomonas mobilis leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action.', J Bacteriol 177(11), 3351--3354.
- Wendisch, V. F.; de Graaf, A. A.; Sahm, H. y Eikmanns, B. J. (2000), 'Quantitative determination of metabolic fluxes during coutilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose.', J Bacteriol 182(11), 3088--3096.
- Wentzel, A.; Bruheim, P.; Øverby, A.; Jakobsen, Ø. M.; Sletta, H.; Omara, W. A. M.; Hodgson, D. A. y Ellingsen, T. E. (2012), 'Optimized submerged batch fermentation strategy for systems scale studies of metabolic switching in *Streptomyces coelicolor* A3(2).', *BMC Syst Biol* 6, 59.
- Werner, G.; Hagenmaier, H.; Drautz, H.; Baumgartner, A. y Zähner, H. (1984), 'Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity.', J Antibiot (Tokyo) 37(2), 110--117.
- 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**(6), 1181--1184.

Wildermuth, H. y Hopwood, D. A. (1970), 'Septation during sporulation in Streptomyces coelicolor.', J Gen Microbiol 60(1), 51--59.

- Wilkinson, C. J.; Hughes-Thomas, Z. A.; Martin, C. J.; Böhm, I.; Mironenko, T.; Deacon, M.; Wheatcroft, M.; Wirtz, G.; Staunton, J. y Leadlay, P. F. (2002), 'Increasing the efficiency of heterologous promoters in actinomycetes.', J Mol Microbiol Biotechnol 4(4), 417–426.
- Wilkinson, S. P. y Grove, A. (2006), 'Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins.', *Curr Issues Mol Biol* 8(1), 51--62.

- 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(1), 89--99.
- Willey, J.; Santamaria, R.; Guijarro, J.; Geistlich, M. y Losick, R. (1991), 'Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor.*', *Cell* 65(4), 641--650.
- Williams, S. T.; Godfellow, M. y Alderson, G. (1989), 'Genus Streptomyces Waksman and Henrici 1943, 339^{AL}.'. En Williams, S. T.; Sharpey, M. E. y Holt, J. G. (Eds), 'Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Edition.', (vol. 4; pp. 2452–2492). Baltimore: Williams & Willkins.
- 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(6), 1743--1813.
- Wilson, D. J.; Xue, Y.; Reynolds, K. A. y Sherman, D. H. (2001), 'Characterization and analysis of the PikD regulatory factor in the pikromycin biosynthetic pathway of *Streptomyces venezuelae.*', J Bacteriol 183(11), 3468–3475.
- Wolanski, M.; Donczew, R.; Kois-Ostrowska, A.; Masiewicz, P.; Jakimowicz, D. y Zakrzewska-Czerwinska, J. (2011), 'The level of AdpA directly affects expression of developmental genes in *Streptomyces coelicolor.*', J Bacteriol 193(22), 6358--6365.
- Wong, H. C.; Ting, Y.; Lin, H. C.; Reichert, F.; Myambo, K.; Watt, K. W.; Toy, P. L. y Drummond, R. J. (1991), 'Genetic organization and regulation of the xylose degradation genes in *Streptomyces rubiginosus*.', *J Bacteriol* 173(21), 6849--6858.
- Wösten, H. A. y Willey, J. M. (2000), 'Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air.', *Microbiology* 146 (Pt 4), 767--773.
- Wray, Jr, L. y Fisher, S. H. (1988), 'Cloning and nucleotide sequence of the Streptomyces coelicolor gene encoding glutamine synthetase.', Gene 71(2), 247--256.
- Wright, G. (2014), 'Perspective: Synthetic biology revives antibiotics.', Nature 509(7498), S13.
- Wu, K.; Chung, L.; Revill, W. P.; Katz, L. y Reeves, C. D. (2000), 'The FK520 gene cluster of Streptomyces hygroscopicus var. ascomyceticus (ATCC 14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units.', Gene 251(1), 81--90.
- Wu, L. F.; Reizer, A.; Reizer, J.; Cai, B.; Tomich, J. M. y Saier, Jr, M. (1991), 'Nucleotide sequence of the *Rhodobacter capsulatus fruK* gene, which encodes fructose-1-phosphate kinase: evidence for a kinase superfamily including both phosphofructokinases of *Escherichia coli*.', J Bacteriol 173(10), 3117--3127.

Х

- Xia, M.; Huang, D.; Li, S.; Wen, J.; Jia, X. y Chen, Y. (2013), 'Enhanced FK506 production in *Streptomyces tsukubaensis* by rational feeding strategies based on comparative metabolic profiling analysis.', *Biotechnol Bioeng*.
- Xiao, X.; Wang, F.; Saito, A.; Majka, J.; Schlösser, A. y Schrempf, H. (2002), 'The novel *Streptomyces olivaceoviridis* ABC transporter Ngc mediates uptake of N-acetylglucosamine and N,N'-diacetylchitobiose.', *Mol Genet Genomics* 267(4), 429--439.
- Xu, D.; Kim, T.-J.; Park, Z.-Y.; Lee, S.-K.; Yang, S. H.; Kwon, H.-J. y Suh, J.-W. (2009), 'A DNA-binding factor, ArfA, interacts with the bldH promoter and affects undecylprodigiosin production in Streptomyces lividans.', Biochem Biophys Res Commun 379(2), 319–323.
- Xu, D.; Seghezzi, N.; Esnault, C. y Virolle, M.-J. (2010), 'Repression of antibiotic production and sporulation in *Streptomyces coelicolor* by overexpression of a TetR family transcriptional regulator.', *Appl Environ Microbiol* 76(23), 7741--7753.
- Xu, W.; Huang, J.; Lin, R.; Shi, J. y Cohen, S. N. (2010), 'Regulation of morphological differentiation in *S. coelicolor* by RNase III (AbsB) cleavage of mRNA encoding the AdpA transcription factor.', *Mol Microbiol* **75**(3), 781--791.

Υ

- Yagüe, P.; Lopez-Garcia, M. T.; Rioseras, B.; Sanchez, J. y Manteca, A. (2012), 'New insights on the development of *Streptomyces* and their relationships with secondary metabolite production.', *Curr Trends Microbiol* 8, 65--73.
- Yagüe, P.; Rodríguez-García, A.; López-García, M. T.; Rioseras, B.; Martín, J. F.; Sánchez, J. y Manteca, A. (2014), 'Transcriptomic analysis of liquid non-sporulating *Streptomyces coelicolor* cultures demonstrates the existence of a complex differentiation comparable to that occurring in solid sporulating cultures.', *PLoS One* 9(1), e86296.

Yamamoto, S.; Jiang, H. y Kato, R. (1994), 'Stimulation of hair growth by topical application of FK506, a potent immunosuppressive

agent.', J Invest Dermatol 102(2), 160--164.

- Yamasaki, M. y Kinashi, H. (2004), 'Two chimeric chromosomes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) generated by single crossover of the wild-type chromosome and linear plasmid SCP1.', *J Bacteriol* **186**(19), 6553--6559.
- Yamazaki, H.; Ohnishi, Y. y Horinouchi, S. (2000), 'An A-factor-dependent extracytoplasmic function sigma factor (o^{AdsA}) that is essential for morphological development in *Streptomyces griseus.*', J Bacteriol 182(16), 4596--4605.
- Yang, Y.-H.; Kim, J.-N.; Song, E.; Kim, E.; Oh, M.-K. y Kim, B.-G. (2008), 'Finding new pathway-specific regulators by clustering method using threshold standard deviation based on DNA chip data of *Streptomyces coelicolor.*', *Appl Microbiol Biotechnol* 80(4), 709–717.
- Yang, Y.-H.; Song, E.; Kim, E.-J.; Lee, K.; Kim, W.-S.; Park, S.-S.; Hahn, J.-S. y Kim, B.-G. (2009), 'NdgR, an IcIR-like regulator involved in amino-acid-dependent growth, quorum sensing, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor.*', *Appl Microbiol Biotechnol* 82(3), 501--511.
- Yanisch-Perron, C.; Vieira, J. y Messing, J. (1985), 'Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.', Gene 33(1), 103--119.
- Yeoman, C. J.; Yildirim, S.; Thomas, S. M.; Durkin, A. S.; Torralba, M.; Sutton, G.; Buhay, C. J.; Ding, Y.; Dugan-Rocha, S. P.; Muzny, D. M.; Qin, X.; Gibbs, R. A.; Leigh, S. R.; Stumpf, R.; White, B. A.; Highlander, S. K.; Nelson, K. E. y Wilson, B. A. (2010), 'Comparative genomics of *Gardnerella vaginalis* strains reveals substantial differences in metabolic and virulence potential.', *PLoS One* 5(8), e12411.
- Yin, X. y Zabriskie, T. M. (2006), 'The enduracidin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fungicidicus*.', *Microbiology* 152(Pt 10), 2969--2983.
- Yoon, Y. J. y Choi, C. Y. (1997), 'Nutrient Effects on FK-506, a New Immunosuppressant, Production by *Streptomyces* sp. in a Defined Medium', *Journal of Fermentation and Bioengineering*.
- You, C.; Okano, H.; Hui, S.; Zhang, Z.; Kim, M.; Gunderson, C. W.; Wang, Y.-P.; Lenz, P.; Yan, D. y Hwa, T. (2013), 'Coordination of bacterial proteome with metabolism by cyclic AMP signalling.', *Nature* 500(7462), 301--306.

Ζ

- Zhang, G.; Tian, Y.; Hu, K.; Feng, C. y Tan, H. (2010), 'SCO3900, co-transcripted with three downstream genes, is involved in the differentiation of *Streptomyces coelicolor.*', *Curr Microbiol* **60**(4), 268--273.
- Zhang, H.; Zhang, W.; Jin, Y.; Jin, M. y Yu, X. (2008), 'A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species.', *Antonie Van Leeuwenhoek* 93(3), 241--248.
- Zhang, L.; Li, W.-C.; Zhao, C.-H.; Chater, K. F. y Tao, M.-F. (2007), 'NsdB, a TPR-like-domain-containing protein negatively affecting production of antibiotics in *Streptomyces coelicolor* A3 (2).', *Wei Sheng Wu Xue Bao* 47(5), 849--854.
- Zhu, X.; Zhang, W.; Chen, X.; Wu, H.; Duan, Y. y Xu, Z. (2010), 'Generation of high rapamycin producing strain via rational metabolic pathway-based mutagenesis and further titer improvement with fed-batch bioprocess optimization.', *Biotechnol Bioeng* 107(3), 506--515.
- Zhuo, Y.; Zhang, W.; Chen, D.; Gao, H.; Tao, J.; Liu, M.; Gou, Z.; Zhou, X.; Ye, B.-C.; Zhang, Q.; Zhang, S. y Zhang, L.-X. (2010), 'Reverse biological engineering of *hrdB* to enhance the production of avermectins in an industrial strain of *Streptomyces avermitilis.*', *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(25), 11250--11254.
- Zhuo, Y.; Zhang, T.; Wang, Q.; Cruz-Morales, P.; Zhang, B.; Liu, M.; Barona-Gómez, F. y Zhang, L. (2014), 'Synthetic biology of avermectin for production improvement and structure diversification.', *Biotechnol J* 9(3), 316--325.