

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**SINTESIS DE ANTIBIÓTICOS EN *Streptomyces* Y
SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO GLOBAL.**



Memoria presentada por Pedro Ribelles de la Vega
para optar al grado de Doctor por la Universidad
Autónoma de Madrid.

Madrid, Diciembre de 2008.

El trabajo recogido en la presente memoria se ha realizado en el Centro Nacional de Biotecnología bajo la dirección del Dr. Francisco Malpartida Romero (Investigador del CSIC) y en el laboratorio de la Dr. Hildgung Schrempf de la Osnabrück Universität.

Director de Tesis: **Dr. Francisco Malpartida Romero**

Tutor de Tesis: **Dr. José Luis Sanz Martín**

VºBº El Director de Tesis

VºBº El Tutor de Tesis

Fdo. Dr. Francisco Malpartida Romero

Fdo. Dr. José Luis Sanz Martín

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

ABSTRACT

Apart from oleandomycin and oviedomycin, *Streptomyces antibioticus* has a biosynthetic cluster that codes for an unidentified polyketide derived from the condensation of acetyl-CoA. In addition to the structural genes needed for the synthesis of the compound, this cluster contains a pathway specific regulator (*orfI*). In addition, the cluster contains a two component system (ORFD1/ORFD2) which specifically induces *orfI* transcription. In this work, by using footprint analysis we've elucidated the target sequence recognized by ORFD1 within the promoter sequence of *orfI*.

This regulatory mechanism has been used under heterologous conditions as a model system to study the regulatory process that leads to antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. For such purposes, genomic analysis has been conducted in the resulting strains. The studies undertaken led to the following conclusions: (a) the synthesis of the polyketide antibiotic actinorhodin goes together with an increase in the transcription rates of its pathway specific regulator: *actII-ORF4*; (b) there is a correlation between the synthesis of actinorhodin and the activation of the genes involved in the oxidative stress response.

The search for genes in *S. coelicolor* that are similar to *orfD1/orfD2* two component system in *S. antibioticus*, resulted in the characterization of the SCO2307/SCO2308 two component system. This proteins work as a possible regulator for the synthesis of actinorhodin, CDA, tha chaplins, the rodlinins y the nitrogen metabolism.

ABREVIATURAS

a.a-----	amino ácido
Act-----	actinorrodina
AHP-----	alquil hidroperóxido reductasas
Amp-----	ampicilina
Apra-----	apramicina
Asp-----	aspartato
ATCC-----	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP-----	adenosin trifosfato
cAMP-----	adenosin monofosfato cíclico
CDA-----	antibiótico dependiente de calcio
cDNA-----	DNA complementario
CoA-----	coenzima A
dATP-----	deoxi ATP
D.O.-----	densidad óptica
EDTA-----	ácido etilendiamino tetracético
EMSA-----	retraso en gel (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)
HEPES-----	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinathanesulfónico
His-----	histidina
HTH-----	hélice-giro-hélice
IPTG-----	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
Kb-----	kilobase
mRNA-----	ARN mensajero
NAD-----	nicotin adenin dinucleótido
Oligo-----	oligonucleótido
ORF-----	marco abierto de lectura
PCR-----	reacción en cadena de la polimerasa
PKS-----	poliquétido sintasa
ppGpp-----	guanidina polyfosfato
Red -----	prodigiosina

Abreviaturas

RNR-----	ribonucleótido reductasa
RR-----	regulador de respuesta
rRNA-----	ARN ribosómico
RT-PCR-----	PCR en tiempo real (<i>Real-Time PCR</i>)
S.-----	<i>Streptomyces</i>
SAM-----	s-adenosil metionina
SARP-----	proteínas reguladoras de antibióticos de <i>Streptomyces</i>
SCB-----	butirolactonas de <i>Streptomyces coelicolor</i>
SDS-----	sodio dodecil sulfato
SEM-----	microscopía electrónica de barrido
Ser-----	serina
Sigma ECF-----	factor sigma extracitoplasmático
SK-----	quinasa sensora
SOD-----	superóxido dismutasa
TBE -----	buffer Tris-Borato-EDTA
TCS-----	sistema de dos componentes
Tre-----	treonina
Tris-----	tris-2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propandiol
tRNA-----	ARN transferente
tsr-----	tioestreptona
Tyr-----	tirosina

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN-----	1
1.1.- Streptomyces-----	1
1.2.- Organización Genómica-----	1
1.3.- Ciclo de Vida-----	2
1.3.1.- Diferenciación Morfológica-----	3
1.3.1.1.- Desarrollo del Micelio Sustrato-----	3
1.3.1.2.- Desarrollo del Micelio Aéreo-----	4
1.3.1.2.1.- Genes <i>bld</i> -----	4
1.3.1.2.2.- SapB, las Chaplinas y las Rodlinas-----	6
1.3.1.3.- Esporulación-----	8
1.4.- Metabolismo Secundario-----	9
1.5.- Regulación del Metabolismo Secundario-----	10
1.5.1.- Los Sistemas de Dos Componentes-----	11
1.5.2.- Genes Implicados en la Diferenciación Morfológica y Bioquímica-----	12
1.5.3.- Genes Implicados en la Diferenciación Morfológica-----	13
1.5.4.- Genes Implicados en la Regulación de Varias Rutas Biosintéticas-----	13
1.5.5.- Genes Reguladores Específicos de Ruta-----	15
1.6.- Estrés Oxidativo-----	16
1.6.1.- Superóxido Dismutasas-----	17
1.6.2.- Catalasas-----	17
1.6.2.- Alquil Hidroperóxido Reductasas-----	18
1.6.3.- Tiorreductasas-----	19
1.7.- Acetil-CoA Carboxilasas-----	19

2.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS-----	21
3.- MATERIALES Y MÉTODOS-----	23
3.1.- Microorganismos Utilizados-----	23
3.2.- Crecimiento y Conservación-----	24
3.3.- Medios de Cultivo de <i>Streptomyces</i> -----	24
3.4.- Medios de Cultivo de <i>E. coli</i> -----	25
3.5.- Selección con Antibióticos-----	25
3.6.- Vectores-----	25
3.7.- Aislamiento de DNA-----	25
3.7.1.- Aislamiento de DNA Plasmídico de <i>E. coli</i> -----	25
3.7.2.- Aislamiento de DNA Plasmídico de <i>Streptomyces</i> -----	27
3.7.3.- Aislamiento de DNA Total de <i>Streptomyces</i> -----	27
3.7.4.- Aislamiento de DNA Plasmídico de Fagos de <i>Streptomyces</i> -----	27
3.7.5.- Obtención de Alto Título de Fagos de <i>Streptomyces</i> -----	27
3.8.- Introducción de DNA-----	27
3.8.1.- Transformación de <i>E. coli</i> -----	27
3.8.2.- Transformación de <i>Streptomyces</i> -----	27
3.8.3.- Transfección de <i>Streptomyces</i> -----	27
3.9.- Manipulación Enzimática del DNA: -----	27
3.9.1.-Digestión del DNA-----	27
3.9.2.-Desfosforilación de Extremos Cohesivos-----	27
3.9.3.-Relleno de Extremos Protuberantes-----	28
3.9.4.-Ligación de Fragmentos de DNA-----	28
3.9.5.-Amplificación de DNA por PCR-----	28
3.9.6.-Marcaje de Fragmentos con Extremos 5' Protuberantes-----	28
3.10.- Electroforesis de DNA-----	29
3.10.1.- Electroforesis en Geles de Agarosa no Desnaturalizantes-----	29
3.10.2.- Purificación de Fragmentos de DNA a Partir de de Geles de Agarosa-----	30

Índice

3.11.- Hibridación de DNA-----	30
3.11.1.- Transferencia de DNA desde Geles de Agarosa: Southern Blot-----	30
3.11.2.- Prehibridación, Hibridación y Marcaje del DNA Transferido-----	30
3.11.3.- Secuenciación del DNA-----	30
3.12.- Aislamiento y Manipulación de RNA: -----	30
3.12.1.- Condiciones de Cultivo y Purificación de RNA-----	30
3.12.2.- Hibridación y Procesado de Microarrays-----	31
3.12.3.- RT-PCR (Real-Time PCR) -----	32
3.13.- Soporte Informático para Secuencias de DNA y Proteínas-----	33
3.14.- Purificación y Manejo de Proteínas-----	34
3.14.1.- Electroforesis de Proteínas en Geles de Acrilamida Desnaturalizantes (SDS-PAGE)-----	34
3.14.2.-Purificación de Proteínas con His-Tag-----	34
3.14.2.1.- Purificación de la Proteína His-tag-ORFI a Partir del Sistema <i>E. coli</i> BL21 pLysS/ pLV4306-----	34
3.14.2.2.- Purificación de la Proteína ORFI-His-tag a Partir del Sistema <i>E. coli</i> BL21 pLysS/ pLV4622.-----	35
3.14.2.3.- Purificación de la Proteína His-tag- ORFD1 a Partir del Sistema <i>E. coli</i> BL21 pLysS/ pLV4831-----	35
3.14.3.-Desalado de las Proteínas ORFI-His-Tag y His-Tag-ORFD1-----	35
3.14.3.1.-Diálisis-----	35
3.14.3.2.-Cromatografía de Exclusión-----	35
3.14.4.- Ensayos de Retraso en Gel (EMSA)-----	35
3.14.4.1.- Hibridación de la Sonda-----	35
3.14.4.2.- Resolución del Retardo-----	35
3.14.5.-Ensayos de Protección a la DNAasa I (footprinting)-----	36
3.15.- Cuantificación de la Producción de Actinorrodina-----	36

4.- RESULTADOS-----	37
4.1.- Análisis Funcional del Regulador Específico de Ruta de <i>S. antibioticus</i> , ORFI-----	37
4.1.1.- Purificación de la Proteína ORFI.-----	37
4.1.2. Ensayos de Retraso en Gel (EMSA) y “ <i>footprinting</i> ” de ORFI.-----	38
4.2.- Análisis Funcional del Regulador de Respuesta de <i>S. antibioticus</i> ORFD1.-----	39
4.2.1.- Purificación de la Proteína ORFD1.-----	39
4.2.2.- Ensayos de actividad de ORD1-his por Retraso en Gel (EMSA) y “ <i>footprinting</i> ”-----	40
4.3.- Análisis de Expresión Génica en el Contexto del Metabolismo Global de <i>S. coelicolor</i> -----	42
4.3.1.- Análisis de Expresión Génica en Pares de Recombinantes, Utilizando Arrays de DNA-----	42
4.3.2.- Comparación de los Genes Expresados Diferencialmente entre Los Diversos Experimentos-----	58
4.3.3.- Validación de la Transcripción Diferencial de Ciertos Genes Mediante RT-PCR Semicuantitativa-----	61
4.4.- Sistemas de Dos Componentes Similares a ORFD1/ORD2 en <i>S. coelicolor</i> -----	63
4.5.- Construcción de Mutantes Nulos para Caracterizar los TCSs Seleccionados por su Alta Similitud a ORD1/ORD2 de <i>S. antibioticus</i> -----	64
4.5.1.- Construcción de los Vectores Necesarios para la Posterior Delección de los Diferentes Genes en <i>S. coelicolor</i> M145-----	64
4.5.2.- Obtención del Mutante <i>S. coelicolor</i> M145 Δ SCO2307-----	67
4.6.- Análisis Fenotípico del Mutante <i>S. coelicolor</i> M145 Δ SCO2307-----	68
4.6.1.- Producción de Actinorrodina en Medio Sólido-----	68
4.6.2.- Producción de Actinorrodina en Medio Líquido-----	68
4.7.- Análisis Genómico del Mutante <i>S. coelicolor</i> M145 Δ SCO2307-----	69
4.8.- Capacidad Anaeróbica del Mutante <i>S. coelicolor</i> M145 Δ SCO2307-----	75
4.9.- Análisis de la Transcripción Diferencial de Ciertos Genes Mediante RT-PCR Semicuantitativa-----	76

5.- DISCUSIÓN-----	77
5.1.- Regulación del Cluster Biosintético de <i>S. antibioticus</i> -----	77
5.2.- Cambios Metabólicos Asociados al “onset” de la Producción de Antibióticos-----	78
5.2.1.- Inducción de la Síntesis de Actinorrodina-----	78
5.2.2.- Respuesta al Estrés Oxidativo-----	79
5.2.3.- Regulación del Flujo Metabólico-----	80
5.2.4.- Consideraciones Finales-----	81
5.3.- Sistemas de Dos Componentes Similares a ORFD1/ORD2 en <i>S. coelicolor</i> -----	82
5.4.- Posibles Dianas de la Quinasa Sensora SCO2307-----	82
5.4.1.- Efectos en el Metabolismo Secundario-----	83
5.4.2.- ¿De qué Manera Actúa SCO2307 Sobre la Diferenciación Morfológica?-----	83
5.4.3.- SCO2307 y la Respiración Anaeróbica-----	84
5.4.4.- ¿Es SCO2307 un Regulador Pleiotrópico?-----	84
6.- CONCLUSIONES-----	86
7.- BIBLIOGRAFÍA-----	87
8.- Anexo 1-----	101
9.- Anexo 2-----	114
10.- Anexo 3-----	121

1.- INTRODUCCIÓN

1.1- Streptomyces:

El género *Streptomyces* pertenece a la familia Streptomycetaceae y al orden de los Actinomycetales. Engloba bacterias filamentosas, miceliales, Gram-positivas, aerobias, capaces de utilizar un gran número de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía y con un elevado contenido en guaninas y citosinas (74% G + C) en su genoma (Woese, 1987). Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo el suelo su hábitat más común, aunque también se han hallado en lechos marinos (Zhong et al., 2002). Estas bacterias son capaces de colonizar la rizosfera y tejidos vegetales (Tokala et al., 2002; Castillo et al., 2002) donde aprovechando su producción de antibióticos, podría establecer relaciones simbióticas con la planta.

Se parecen a los hongos por ser pleomórficos y producir un micelio normalmente diferenciado en micelio vegetativo y micelio aéreo. Pero presentan características típicas de procariotas tales como la carencia de núcleo, mitocondrias y cloroplastos (Stackebrandt et al., 1992.).

La importancia de estos organismos radica en su capacidad de producir una gran diversidad de metabolitos secundarios, la mayoría de ellos con actividad biológica, lo que hace de esta bacteria una pieza fundamental de la industria farmacéutica y biotecnológica.

Dentro de estos metabolitos secundarios se encuentran desde análogos de metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos o polipéptidos) hasta antibióticos. Las bacterias del género *Streptomyces* son productoras de más de la mitad de los antibióticos conocidos.

Las bacterias del género *Streptomyces* también son productoras de gran cantidad de enzimas extracelulares de gran interés en el sector industrial, entre las que destacan: proteasas, celulasas, nucleasas, amilasas, lipasas, quitinasas y xilanasas.

Streptomyces coelicolor es una bacteria representativa del género. Es muy útil como modelo de estudio de la biosíntesis de metabolitos secundarios; por una parte esporula bien, es relativamente fácil de transformar y hay una gran cantidad de herramientas genéticas desarrolladas para su manipulación. Su genoma ha sido secuenciado (Bentley et al., 2002) y produce cuatro tipos de antibióticos: actinorrodina (codificada en el *act cluster*); undecilprodigiosina: (*red cluster*); metilenomicina (*mmr cluster*) y antibiótico dependiente de calcio (CDA, del inglés “*cluster dependent antibiotic*”; codificado por el *cda cluster*).

Es interesante destacar que en 40 años de experimentos de genética molecular clásica solo se descubrieron esos cuatro *clusters* de biosíntesis y desde que se ha publicado el genoma, simples búsquedas de homología con poliquétido sintetasas y péptido sintetasas, han desvelado otros 18 metabolitos secundarios (poliquétidos, terpenos, esteroides, butirrolactonas) (Thomson et al., 2002)

1.2.- Organización Genómica:

Mediante electroforesis de campo pulsado, de cromosomas de diferentes especies de *Streptomyces* como *S. coelicolor*, *S. ambofaciens*, *S. lividans*, *S. griseus* o *S. rimosus*, se ha llegado a demostrar la linealidad de su genoma así como su tamaño aproximado de 8Mb. Se ha detectado la presencia de secuencias repetidas invertidas en los extremos de los cromosomas que tienden a ser muy inestables y pueden inducir deleciones de hasta 2 Mb. Se cree que estas regiones funcionan como telómeros, que incluso poseen proteínas unidas al extremo 5', evitando la deleción de otras regiones

del cromosoma que sean imprescindibles y asegurándose la replicación completa del cromosoma (Hopwood et al., 1986).

Debido a la similitud entre los replicones de plásmidos lineales y el cromosoma de *Streptomyces* se postula que la linearización de los cromosomas es debido a la integración de los plásmidos lineales que a su vez derivarían de bacteriófagos (Volf et al., 2000).

En la actualidad se encuentran secuenciados en su totalidad los genomas de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley et al., 2002) y el de *Streptomyces avermitilis* (Omura et al., 2001; Ikeda et al., 2003) y está próximo a concluir el de *S. clavuligerus*, lo que ha aportado un gran avance en el conocimiento de la organización génica de *Streptomyces*.

El genoma de *Streptomyces coelicolor* es un cromosoma lineal de 8.667.507 pb con la presencia de 7.825 genes probables (Bentley et al., 2002), dentro de los cuales se incluyen más de 20 *clusters* implicados en la síntesis de metabolitos secundarios. El genoma de *Streptomyces avermitilis* también es un cromosoma lineal, en este caso su tamaño es de 9.025.608 pb que codifican al menos 7.574 regiones abiertas de lectura, dentro de las cuales se han identificado 30 *clusters* relacionados con el metabolismo secundario, aproximadamente un 6,6% de todo el genoma.

La distribución de los genes en el genoma no es aleatoria, se ha visto que los genes que resultan esenciales, “*housekeeping*”, se encuentran en el centro del cromosoma, mientras que los genes codificantes para funciones tales como la síntesis de metabolitos secundarios o enzimas hidrolíticas, se localizan en los brazos del cromosoma. Se cree que con esta organización génica se evita la pérdida de genes esenciales a causa de deleciones que puedan ocurrir en los extremos de los brazos (Hopwood, 2007).

Los elementos extracromosomales son frecuentes en *Streptomyces*. Se han encontrado plásmidos circulares y lineales con proteínas asociadas a sus extremos (Kinashi y Shimaji-Murayama, 1987), así como plásmidos capaces de integrarse en sitios específicos del cromosoma de *Streptomyces* (Brown et al., 1988; Combes et al., 2002). También se ha descrito la existencia de fagos (Lomovskaya et al., 1980) y elementos genéticos transponibles.

1.3.- Ciclo de Vida:

Los streptomicetos presentan un ciclo de vida complejo que implica procesos de diferenciación morfológica y fisiológica. Estas bacterias son capaces de colonizar sustratos con restos de materia orgánica, formando una red de hifas ramificadas y tabicadas que dan lugar al micelio sustrato. Estas hifas obtienen los nutrientes de la degradación del material orgánico insoluble gracias a numerosas enzimas hidrolíticas (Chater, 1984). En una primera fase, las zonas más alejadas de la fuente de nutrientes empiezan a acumular sustancias de reserva (lípidos, glucógeno,...) hasta que en un determinado momento, debido a la carencia de turgentes, se reciben una serie de señales en esta zona que disparan la expresión de genes implicados en la formación del micelio aéreo. Se produce así, el desarrollo de hifas que emergen del micelio sustrato para dar lugar al micelio aéreo. Estas hifas se van a nutrir de los productos de degradación del micelio sustrato “viejo”, y en una segunda etapa van a sufrir un proceso de curvatura, enrollamiento, formación de septos y engrosamiento de la pared celular para dar lugar a una cadena de esporas uninucleares, que se liberarán al medio y que con las condiciones adecuadas, germinarán y desarrollarán un nuevo micelio sustrato (Hopwood, 2007) (Figura 1).

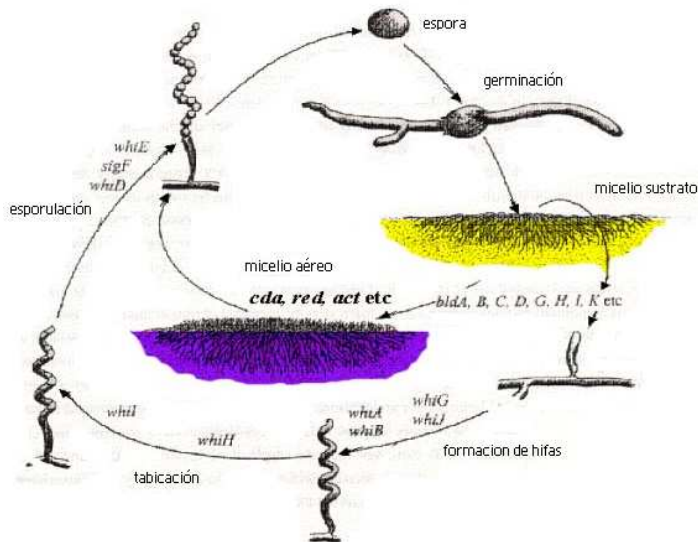


Figura 1: ciclo biológico de *Streptomyces coelicolor*, indicando algunos genes implicados en el proceso (Kieser et al., 2000)

La producción de metabolitos secundarios, por lo general, coincide con el inicio de la diferenciación morfológica, una vez terminado el desarrollo vegetativo (Champness y Chater, 1994).

1.3.1.- Diferenciación Morfológica:

El interés científico en las bacterias del género *Streptomyces* radica fundamentalmente en dos puntos: 1.- Su rico metabolismo secundario y 2.- La diferenciación morfológica que acompaña al primero y está basada en el desarrollo secuencial de un micelio aéreo, hifas y finalmente esporas (Figura 2). Cuando una espora de *S. coelicolor* es liberada al medio y se dan las condiciones necesarias para su germinación, se pone en marcha una compleja maquinaria molecular capaz de llevar a cabo un control genético temporal y espacial en la colonia que culmina con la formación de varios tejidos: micelio sustrato, micelio aéreo y esporas. Todas estas características están asociadas a organismos eucariotas multicelulares. Debido a la abundante información genética disponible, durante mucho tiempo la *Streptomyces coelicolor* ha sido usada como sistema modelo en el estudio del desarrollo bacteriano.

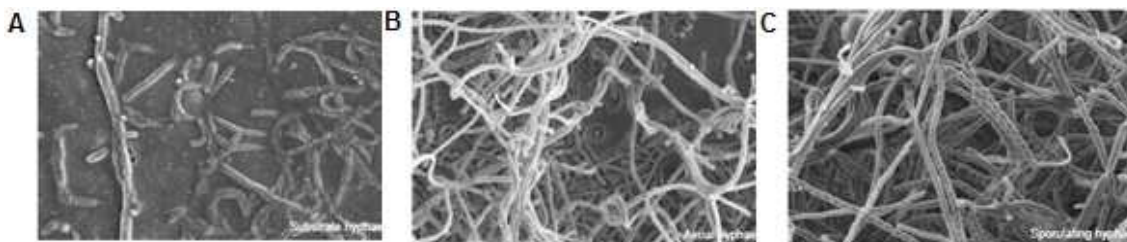


Figura 2: Ciclo vital de *Streptomyces* en medio sólido. (a) Inicialmente un micelio filamentososo coloniza su sustrato. (b) Tras un periodo de crecimiento asimilativo, las hifas aéreas crecen hacia la atmósfera y (c) Posteriormente se septan para formar cadenas de esporas pigmentadas. (Claessen et al., 2006)

1.3.1.1.- Desarrollo del Micelio Sustrato:

Cuando germina una espora unigenómica se forma un tubo de germinación mediante crecimiento apical de la pared celular. En esta primera etapa a falta de un control eficaz, con cada duplicación del cromosoma se dobla la tasa de crecimiento del tubo germinativo. Este crecimiento desmesurado podría tener consecuencias funestas

para la bacteria, pero tras varias replicaciones del DNA empiezan a desarrollarse ramificaciones laterales y se estabiliza la tasa de crecimiento.

Otro fenómeno comienza: la septación. Las partes de micelio más viejas comienzan a septarse, formando zonas apicales y subapicales; en las segundas a pesar de que aún hay síntesis de DNA el crecimiento de la pared celular se ha detenido (en ocasiones, nuevas ramificaciones pueden aparecer en los compartimentos subapicales, lo que lleva consigo la recuperación de ciertas características de la región apical). Poco a poco el micelio sustrato se va expandiendo, la región más vieja se va apiñando y empiezan a ocurrir cambios en la colonia que llevarán a la creación de micelio aéreo.

1.3.1.2.- Desarrollo del Micelio Aéreo:

En este momento tenemos una maraña de hifas de micelio sustrato, multinucleado y muy compacto en la zona central (y ancestral) donde se han agotado las reservas de nutrientes del medio y varios tipos de estrés comienzan a ejercer una presión selectiva sobre determinados genes. La aclimatación a estos fenómenos está probablemente mediada por *relA* y nucleótidos polifosforilados como ppGpp (Chakraborty et al., 1997; Hesketh et al., 2007a), es conocida como respuesta astringente y se basa en: i) una ralentización del metabolismo primario; ii) la inducción del metabolismo secundario (proteínas extracelulares, antibióticos, etc.); iii) metabolismo acumulativo en la superficie de la colonia; iv) lisis de ciertas regiones del micelio sustrato e inicio del crecimiento aéreo.

La muerte celular programada de parte de su micelio sustrato y la síntesis de diversas enzimas extracelulares, permiten a la colonia degradar el micelio sustrato muerto así como otra materia orgánica que aún haya en el medio. Estos nutrientes se acumularán en la superficie de la colonia, permitiendo un crecimiento casi parasítico de las hifas aéreas, que surgen de los segmentos aún viables del micelio sustrato (Manteca et al., 2007) y la posterior formación de esporas con las que podrá colonizar nuevas áreas y el desarrollo de los compuestos biocidas del metabolismo secundario que le darán una importante ventaja a la hora de dominar su nicho.

1.3.1.2.1.- Genes *bld*

La formación de hifas aéreas, que darán lugar al llamado micelio aéreo, es un mecanismo complejo, donde el papel fundamental en su regulación lo lleva a cabo una serie de genes denominados *bld* (por “*bald*”, calvo en inglés, debido al fenotipo sin micelio aéreo que presentan sus mutantes nulos) y que actúan de una forma secuencial. Esta cascada *bld* regula los puntos de control que permiten iniciar el crecimiento aéreo provocando la producción de compuestos que reducen la tensión superficial del medio acuoso en el que se encuentra la bacteria y hacen posible que las hifas crezcan hacia la atmósfera. Los genes *bld* parecen también necesarios para un desarrollo total de las hifas.

Uno de los aspectos más llamativos de la diferenciación morfológica de los Streptomycetos es la aparente necesidad de la comunicación intercelular. La formación de micelio aéreo en los mutantes *bld* puede ser restaurada si se crecen estos mutantes cerca de una cepa silvestre de *S. coelicolor*. Cada señal actuaría como punto de control asegurándose la bacteria que todas las condiciones son las idóneas para iniciar el proceso de crecimiento del micelio aéreo (Chater and Horinouchi 2003, Takano et al., 2003).

Esta complementación extracelular parece ser resultado (al menos en parte) de la difusión de la cepa silvestre a la mutante de una pequeña proteína hidrofóbica llamada SapB. Todos los mutantes *bld*, excepto *bldM* y *bldN*, son incapaces de sintetizar SapB (Willey et al., 1991 y 1993). La complementación extracelular de los mutantes *bld* implica que la regulación directa de gen a gen no existe en la ruta *bld*; esta observación resulta paradójica ya que año a año se refuerza la certeza de que la mayoría de genes de la cascada *bld* son regulatorios y no están implicados directamente en la síntesis de una molécula extracelular señalizadora (Bibb et al., 2000; Chater, 2001; Takano et al., 2003; Nguyen et al., 2003; Hunt et al., 2005) (Tabla 1). La única molécula señalizadora relacionada con la ruta *bld* que ha sido descrita es la S-adenosilmetionina (SAM), que controla la diferenciación morfológica y fisiológica en *Streptomyces*. La SAM exógena induce la biosíntesis de antibióticos e inhibe el desarrollo morfológico de *S. coelicolor*; este efecto sobre la diferenciación morfológica es debido en gran parte a *bldK*, locus compuesto por un *cluster* de cinco genes (*bldKA-bldKE*) que codifican para un transportador ABC de oligopéptidos. La adición de SAM exógeno induce la transcripción de *metK* (SAM sintetasa) y de *bldK* (Kim et al., 2003; Okamoto et al., 2003; Park et al., 2005). Varios estudios llevados a cabo en el año 2006 y 2007 parecen arrojar algo de luz sobre el mecanismo de acción de SAM en la diferenciación bioquímica (Zhao et al., 2006; Lee et al., 2007) ya que muestran que SAM se una a AfsK y así induce su fosforilación.

Gen	Producto Génico	Grupo de Complementación Extracelular ¹
<i>bldA</i>	tRNA _{UUA}	3
<i>bldB</i>	Proteína de unión a DNA	Aberrante
<i>bldC</i>	?	5
<i>bldD</i>	Proteína de unión a DNA	6
<i>bldG</i>	Posible antagonista anti-sigma	4
<i>bldH</i>	?	3
<i>bldI</i>	?	Aberrante
<i>bldJ</i>	?	1
<i>bldK</i>	Transportador de oligopéptido	2
<i>bldL</i>	?	2
<i>bldM (=whiK)</i>	Posible regulador de respuesta	6
<i>bldN (=whiN)</i>	Factor sigma ECF ²	Aberrante

Tabla 1: Genes descubiertos mediante el análisis de mutantes *bld* en *S. coelicolor*. 1.-Los mutantes de cualquier grupo son inducidos a esporular cuando se crecen cerca de mutantes con un número de complementación mayor. Los mutantes aberrantes son aquellos que no caen en esta jerarquía. 2.- ECF: *Extra Cellular Function*. (Chater, 2001).

El gen *bldK*, actúa sobre *bldA*; este último, interfiere en tanto en el metabolismo secundario como en el desarrollo morfológico, ya que los mutantes en este gen no producen los pigmentos rojizos y azulados característicos de la bacteria y son incapaces de formar micelio aéreo y esporas. *bldA*, codifica el tRNA de la leucina UUA, el cual tiene un uso extremadamente reducido (Wright and Bibb, 1992): de los 7825 genes de la bacteria sólo 145 contienen un codón TTA y ninguno de ellos es del tipo “housekeeping” (Li et al., 2007). Entre estos genes se encuentran el regulador específico de ruta de actinorrodina *actII-ORF4*, un gen regulador del *cluster* de biosíntesis de prodigiosina *redZ* y el factor sigma *bldH* (*adpA*), lo que explica muchos aspectos del fenotipo $\Delta bldA$ (Hopwood, 2007).

La ruta de regulación *bld*, que culmina con las síntesis de SapB, resulta esencial para la formación de micelio aéreo en medio completo. Sin embargo, existe una ruta alternativa capaz de formar micelio aéreo en medio mínimo ante la falta de SapB y con

la que solo *bldB* ha podido ser relacionada, se piensa que en esta ruta la función surfactante de SapB es llevada a cabo por las chaplinas (Capstick et al., 2007)

1.3.1.2.2.- SapB, las Chaplinas y las Rodlinas:

La superficie de las hifas vegetativas es hidrofílica, mientras que la de las aéreas y las esporas es muy hidrofóbica y para poder romper la barrera entre ambos elementos es necesario reducir la tensión superficial entre el agua y el aire. Hay tres grupos de proteínas involucrados en la modulación de la superficie celular durante la formación de las hifas aéreas en *Streptomyces coelicolor*: 1.- SapB; 2.- las chaplinas y 3.- las rodlinas. Se cree que estas proteínas funcionan de manera similar a las hidrofobinas fúngicas, que también juegan un papel preponderante en la formación de hifas aéreas en hongos.

SapB es un pequeño péptido morfogenético con una estructura anfifílica y que actúa como surfactante, reduciendo la tensión superficial en la interfase aire-agua, lo que permite a las hifas escapar hacia la atmósfera (Willey et al., 1991). La estructura y origen de SapB depende del operón *ramCSAB* y el gen *ramR* (que se transcribe convergentemente) (Nguyen et al., 2002; Kodani et al., 2004)

Las hifas aéreas y las esporas poseen una superficie muy peculiar llamada capa fibrosa (del inglés *fibrous sheath*); esta capa otorga hidrofobicidad, consistencia y evita la amalgama de las hifas aéreas. La formación de esta capa resulta de la interacción de dos tipos de proteínas: las chaplinas y las rodlinas.

Las chaplinas se identificaron como un tipo de proteínas hidrofóbicas que formaban parte de las hifas aéreas, no solo como soporte estructural, sino también como surfactantes (Claessen et al., 2003; Elliot et al., 2003). Este grupo de proteínas está formado por ocho miembros: ChpA-H (*coelicolor hydrophobic protein*), que se subdividen en dos grupos:

- Chaplina largas: contienen dos dominios chaplina y un péptido señal para la unión a la pared celular, ChpA-D
- Chaplinas cortas: contienen un dominio chaplina, ChpE-H

El dominio chaplina es hidrofóbico e incluye dos residuos cisteína muy conservados en todas las chaplinas excepto en ChpE (todas estas características están conservadas en sus ortólogos de *S. griseus*, *S. avermitilis* y *S. scabies*). Se ha propuesto un modelo para el ensamblaje de chaplinas en el que las chaplinas largas actúan como anclajes en la pared celular que permiten la unión y polimerización de las chaplinas cortas en fibrillas que conlleva la formación de una capa hidrofóbica que envuelve a las hifas aéreas, probablemente con la ayuda de SapB (Capstick et al., 2007).

La inactivación de genes chaplina individualmente o en pares no tiene un fenotipo marcado en el crecimiento o desarrollo de la colonia, sin embargo, la delección de seis de estos genes (Claessen et al., 2003) y de todos los ocho (Claessen et al., 2004) da lugar a un micelio aéreo escaso y aberrante (Figura 3). Esto muestra la considerable redundancia existente en las chaplinas, entonces, ¿qué genes *chp* son absolutamente necesarios para obtener una cepa que produzca una cantidad abundante de micelio aéreo con una morfología no aberrante? Los genes *chpC*, *chpE* y *chpH* son los únicos de chaplinas conservados en todas las especies de *Streptomyces* secuenciadas a día de hoy, además son los únicos expresados previamente al inicio de la formación de las hifas aéreas y en el caso de *chpE* y *chpH* se expresan en altos niveles durante todo el ciclo de desarrollo (Manteca et al., 2007). En una cepa con todos los genes *chp* eliminados, únicamente la presencia del gen *chpE*, el gen de la chaplina larga *chpC* y la chaplina

corta *chpH* dio lugar a una cepa con un micelio aéreo abundante y de aspecto normal, con fibrillas pareadas similares a los bastoncillos (Figura 4).

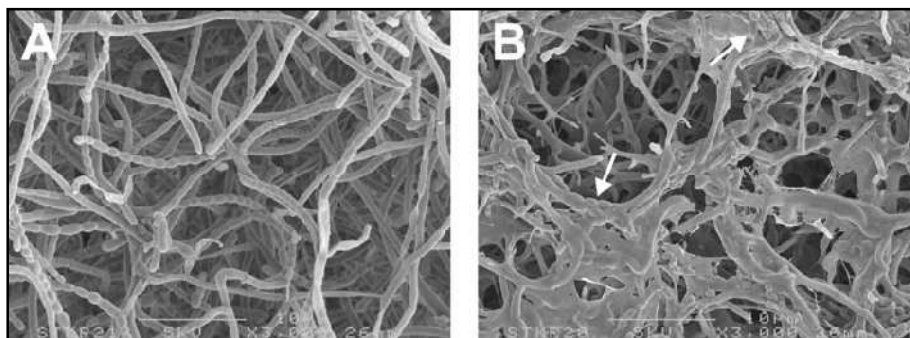


Figura 3: El crecimiento de hifas aéreas está muy afectado en el mutante *ΔchpABCDEFHG* (B) comparado con la silvestre (A). Nótese el apelmazamiento de las hifas. Las flechas muestran las cadenas de esporas.

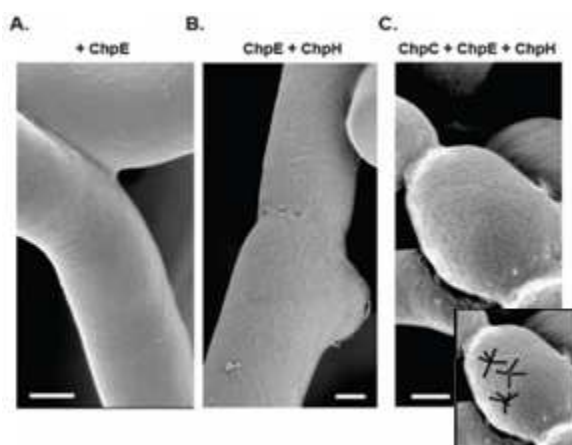


Figura 4: En un mutante con todas las chaplinas excepto *chpE* deleccionadas, la formación de micelio aéreo y la presencia de las fibrillas y bastoncillos es casi nula (A); Al introducir *chpH* se aprecia una mayor cantidad de micelio aéreo y las hifas presentes únicamente muestran fibrillas (B). Con la introducción de *chpC* se obtiene una cepa capaz de formar gran cantidad de micelio aéreo y cuya ultra estructura apenas difiere de la de una cepa silvestre. El recuadro muestra como los bastoncillos irradian de un punto central a semejanza de una estrella.

Parece que para obtener micelio aéreo, es necesario la presencia de tres proteínas: ChpE, una chaplina larga y una corta. En el caso de una cepa portadora de *chpA*, *chpD* y *chpE*, que cumple los requisitos anteriormente expuestos, muestra una cantidad de micelio aéreo considerable, aunque no tan abundante como en la cepa *chpCEH*, lo que puede ser debido a una menor expresión de estos genes.

Esta cepa “mínima” brinda la posibilidad de estudiar ciertos aspectos del funcionamiento de las chaplinas, al evitar el enmascaramiento fenotípico que llevaba consigo su redundancia. Un ejemplo de esto es el estudio del papel jugado por los residuos de cisteína en las chaplinas. Hay dos residuos cisteína que se encuentran muy conservados en el dominio chaplina de todas las chaplinas (a excepción de ChpE). Micrografías de SEM (*Scanning Electron Microscope*) de una cepa *chpEC* con *chpH* modificado en los residuos cisteína mostraron deficiencia en la formación de micelio aéreo y una ausencia total de bastoncillos (DiBerardo et al., 2008).

La estructura característica de ChpE y su conservación interespecífica, la hacen una candidata a desempeñar una función primordial en la capa fibrosa. Tanto es así que los esfuerzos por conseguir una cepa con el gen *chpE* deleccionado fueron infructuosos, mostrando que dicho gen es esencial; sin embargo si es posible deleccionar *chpE* en cepas que sean defectuosas en otros genes *chp*. (DiBerardo et al., 2008). La esencialidad de *chpE* en un fondo genético silvestre, podría deberse a una función de coordinación en el ensamblaje o polimerización de chaplinas y rodlinas y que la falta de esta función fuese letal (DiBerardo et al., 2008).

Las rodlinas (RdIA y RdIB) son proteínas con perfil anfipático que se encuentran en las superficies de las hifas aéreas y las esporas, en donde forman una capa de gran hidrofobicidad (a pesar de no tener capacidad surfactante). Si bien el papel de las rodlinas no es esencial para la formación y desarrollo de las hifas aéreas, juegan un papel importante en la ultraestructura de la “capa fibrosa”. Los genes *rdlAB* se encuentran codificados en un *cluster*, donde se transcriben divergentemente. Tanto su arquitectura como secuencia están bastante conservadas en el género, de tal forma que el mutante de *S. coelicolor* defectivo en *rldA* y *rldB* puede ser revertido heterológicamente con los ortólogos de *rldA* y *rldB* de *S. tendae* y *S. griseus* (Claessen et al., 2004). La ausencia de ambas rodlinas ($\Delta rdlAB$) muestra un fenotipo no condicional en el que la formación y diferenciación de las hifas aéreas no se ve afectada. Los mutantes en una sola de las rodlinas ($\Delta rdlA$ y $\Delta rdlB$) mostraron que estos genes no son redundantes, ya que es necesaria la presencia de ambas proteínas para obtener bastoncillos en la superficie de las hifas. El mutante simple muestra el mismo fenotipo que el mutante doble (Claessen et al., 2004).

Los estudios genéticos determinaron que la expresión de ambas rodlinas se vio dramáticamente reducida en un mutante en *bldN*, sugiriendo que la expresión de estos genes está controlada o por *bldN* o por cualquiera de sus predecesores en la ruta *bld* (Elliot et al., 2003). Si la expresión de las rodlinas fuese dependiente únicamente de los genes *bld*, cabría esperar que las rodlinas se expresasen con un perfil similar al de las chaplinas. La cantidad de mRNA de *rdlA* encontrada en una cepa $\Delta chpABCDEFGH$ (cepa que apenas genera hifas aéreas aberrantes) estaba seriamente reducida en comparación con el silvestre, pero al analizar la expresión de RdIA *per hipae*, se vio que la traducción de los escasos mRNAs se veían destinadas a las poquísimas hifas formadas en el mutante y que los niveles de rodlinas en estas eran similares a los de la silvestre (Claessen et al., 2004). Estas observaciones sugieren que la expresión de las rodlinas depende no solo de la ruta *bld*, como ocurre con las chaplinas, sino también de cierto mecanismo de regulación que permite la expresión de dichas proteínas una vez que la hifa ha abandonado el medio acuoso.

Por todo lo anteriormente expuesto podemos concluir que la formación de los bastoncillos depende tanto de la presencia de las rodlinas como de las chaplinas. La polimerización de las chaplinas da lugar a unos filamentos que denominamos fibrillas y que en ausencia de las rodlinas aparecen en la superficie de las hifas y esporas. Al entrar en juego las rodlinas, estas permiten que las fibrillas se alineen de dos en dos formando los bastoncillos que posteriormente aparecen también pareados (Figura 5). El conseguir evidencias bioquímicas que avalen esta teoría parece ser complejo ya que el método de extracción de las chaplinas, que utiliza ácido trifluoroacético, las desnatura y la expresión en *Escherichia coli* no produce complejos poliméricos estructurados, mostrando la posible necesidad de alguna chaperona aún desconocida (Claessen et al., 2004).

1.3.1.3.- Esporulación:

El último evento en la diferenciación morfológica de *Streptomyces* es la esporulación, donde las hifas aéreas multigenómicas se tabican dando lugar a largas cadenas de esporas unigenómicas. Estas se mantienen en el suelo, en estado latente hasta que las condiciones son buenas para el crecimiento micelial e incrementando al máximo la capacidad de colonizar lugares lejanos.

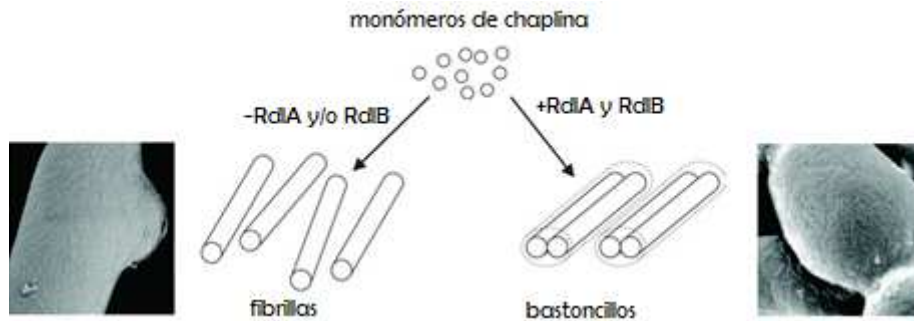


Figura 5: Las chaplinas forman fibrillas que se distribuyen aleatoriamente sobre las hifas. La presencia de las rodlinas resulta en pares de bastoncillos: dos fibrillas unidas paralelamente.

Una vez que los genes *bld* han iniciado el crecimiento de las hifas aéreas, aún es necesaria la intervención de otra ruta reguladora que controle los eventos que se han de seguir, esta ruta y los genes que la componen se denominan *whi* (de *white*, blanco en inglés, debido a que los mutantes que no esporulan tienen un micelio aéreo con un característico color blanco en vez del gris de la silvestre; esto es debido a que no se expresan una serie de genes de la región *whiE* que producen un poliquétido de color grisáceo que tiñe la esporas dándoles su color característico y visible macroscópicamente).

Uno de los últimos pasos en la cascada reguladora de los genes *bld* es la inhibición que BldD (factor anti sigma) ejerce sobre BldN y WhiG (ambos, factores sigma), BldD libera a BldN y WhiG, que ahora son libres para inducir sus respectivos paquetes de genes: *bldM* en el caso de BldN y *whiH* y *whiI* en el caso de WhiG; este parece ser el punto de conexión entre la ruta *bld* y la ruta *whi*. En este momento se inicia el crecimiento del micelio aéreo. WhiH y WhiI, con función autoreguladora, se fosforilan y junto con WhiA y WhiB detienen el crecimiento de las hifas y comienza la septación (Aínsa et al., 2000). Finalmente genes tardíos de la cascada como *whiD* y *whiE* culminan el proceso de esporulación mediante la maduración y pigmentación de las esporas.

1.4.- Metabolismo Secundario:

Quizás, la principal característica del género *Streptomyces*, junto con la diferenciación morfológica, es la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas: antibacteriana (Tabla 2), antiviral, antitumoral, antifúngica, herbicida, antihelmíntica e incluso inmunosupresora (Demain, 1999) (Tabla 3).

Antibiótico	Organismo productor	Diana
Cloranfenicol	<i>S. venezuelae</i>	Ribosoma bacteriano
Ácido Clavulánico	<i>S. clavuligerus</i>	Inhibidor β -lactamasa
Fosfomicina	<i>S. wedmorensis</i>	Pared celular bacteriana
Kanamicina	<i>S. kanamyceticus</i>	Ribosoma bacteriano
Novomicina	<i>S. niveus</i>	Girasa bacteriana
Oleandomicina	<i>S. antibioticus</i>	Ribosoma bacteriano
Oxitetraciclina	<i>S. rimosus</i>	Ribosoma bacteriano
Streptomicina	<i>S. griseus</i>	Ribosoma bacteriano

Tabla 2: Ejemplos de algunos antibióticos producidos por el género *Streptomyces*

Producto	Organismo Productor	Diana	Aplicación
Doxorubicina	<i>S. peucetius</i>	Replicación del DNA	Anticancerígeno
Anfotericina	<i>S. nataensis</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Avermectina	<i>S. avermitilis</i>	Neurotrans. invertebrados	Antiparasítico
Avoparcina	<i>S. candidus</i>	Pared celular bacteriana	Supl. alimenticio ganado
Bialafos	<i>S. hygrosopicus</i>	Metabolismo del N	Herbicida
Kasugamicina	<i>S. kasugaensis</i>	Síntesis de proteínas	Pesticida
Mitomicina	<i>S. caespitosus</i>	Replicación del DNA	Anticancerígeno
Monensina	<i>S. cinnamomensis</i>	Membrana celular	Supl. alimenticio ganado
Nistatina	<i>S. noursei</i>	Esteroles de membrana	Antifúngico
Polioxina	<i>S. cacaoi</i>	Síntesis de quitina	Pesticida
Rapamicina	<i>S. hygrosopicus</i>	Linfocitos	Inmunosupresor

Tabla 3: Productos naturales del género *Streptomyces* con otras aplicaciones distintas a la de antibióticos. Neurotrans.: neurotransmisión; Supl.: suplemento; N. Nitrógeno.

La definición de metabolitos secundarios es muy compleja ya que tiene que dar cabida a un grupo amplio y heterogéneo de compuesto. El término se utiliza, de forma casi universal, para aquellos compuestos que no forman parte de procesos vitales críticos y cuya ausencia no genera inviabilidad celular. La cantidad, variedad, especificidad y el abanico de actividades y dianas (desde virus a eucariotas) que cubren los metabolitos secundarios son cuanto menos sorprendentes.

Los metabolitos secundarios de mayor importancia producidos por *Streptomyces* y que además sirven como punto de partida de este proyecto de investigación son los antibióticos. Estos son productos químicos de bajo peso molecular capaces de eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos a concentraciones bajas (Demain, 1999).

Los genes implicados en biosíntesis, resistencia y regulación de antibióticos suelen encontrarse asociados en agrupaciones génicas, denominadas “clusters” (Martin y Liras 1989); aunque haya casos como el cluster de la puromicina, donde no existen genes reguladores dentro del propio cluster.

1.5.- Regulación del Metabolismo Secundario:

En su ambiente natural las bacterias del género *Streptomyces* están expuestas a variaciones físico-químicas del suelo, disponibilidad de agua y nutrientes y la presencia de moléculas tóxicas con orígenes bióticos o abióticos (incluso, aquellas producidas por ellas mismas). Estos cambios, añadidos a la falta de motilidad que les impide desplazarse a regiones más propicias, crean situaciones en las que las condiciones de sus nichos están lejos de ser óptimas; éstas se consideran situaciones de estrés. La supervivencia en un ambiente tan cambiante y tan competitivo requiere de una gran cantidad de respuestas adaptativas que puedan conferirle las propiedades necesarias para sobreponerse al nuevo ambiente o dotarle de ciertas ventajas ecológicas (como puede ser la producción de bactericidas y fungicidas) (Challis and Hopwood, 2003)

La diferenciación bioquímica a la que está sometida *S. coelicolor*, se encuentra estrechamente relacionada con el proceso de diferenciación morfológica (Martín y Liras, 1989). Prueba de esta interrelación, es la existencia de una serie de genes que modulan simultáneamente los dos procesos. En principio parece ser que existe una regulación jerarquizada, que controla ambos procesos en niveles superiores (Chater y Bibb., 1997) y específicamente a cada proceso en niveles inferiores (Bate et al., 2002), pero estudios recientes (Sawai et al., 2004; Huang et al., 2005) que serán discutidos posteriormente y la cierta ambigüedad de muchos reguladores parecen mostrar que esta jerarquía sea poco o muy poco estricta.

Una consecuencia de esto es que la clasificación de los sistemas de regulación es muy compleja. En principio existen distintos tipos de regulación: transcripcional, traduccional o post-traduccional y, además distintos tipos de reguladores: específicos de ruta o pleiotrópicos.

Los mecanismos por los cuales la célula lleva a cabo estos cambios son muchos y muy diversos: controlando los niveles de ciertos metabolitos como nitratos, fosfatos, glucosa, cAMP, ppGpp y la respuesta astringente; factores sigma que interactúan con la holoenzima de la RNA polimerasa; factores autorreguladores; moléculas de bajo peso molecular similares a las hormonas; tRNAs que codifican para codones de uso poco frecuente y que se encuentran en ciertos genes reguladores; modificaciones post-traduccionales, como son los sistemas de dos componentes (TCS) y que por su importancia para este trabajo van a ser discutidos en mayor detalle en el siguiente punto.

1.5.1.- Los Sistemas de Dos Componentes:

Hace ya varias décadas se describió una nueva clase de sistemas reguladores en bacterias que se dio por llamar “de dos componentes” (Nixon et al., 1986). A día de hoy ya se han encontrado cientos de estos sistemas en eubacterias, arqueas y algunos eucariotas. Los sistemas de dos componentes consisten en una quinasa (SK, del inglés *sensor kinase*) y un regulador de respuesta (RR) y sirven como un mecanismo básico para coordinar estímulos recibidos y sus repuestas celulares específicas, lo que permite a los organismos muestrear y responder a posibles cambios en multitud de condiciones medioambientales diferentes. Estos sofisticados sistemas de señalización se caracterizan por poseer una arquitectura modular que se ha adaptado e integrado a una gran cantidad de circuitos celulares de señalización.

Las SK están compuestas por un dominio sensor extracitoplasmático que responde a estímulos externos específicos; esta señal induce un cambio conformacional en el dominio citoplasmático de la SK que lleva consigo una autofosforilación en un residuo His. Posteriormente en una reacción catalizada por el propio RR, este grupo fosfato en la H box de la SK se transfiere a un aspartato del RR. La fosforilación del dominio receptor lleva consigo un cambio conformacional en un segundo dominio del RR, el efector. Ahora, el RR en su estado activo se unirá a los diversos promotores de sus genes diana induciendo o reprimiendo así su transcripción. En algunos casos, sobre todo en aquellos en los que la ruta de señalización ha de ser anulada rápidamente se ha encontrado actividad fosfatasa en las propias SKs que utilizan para modular la actividad de sus RR (Figura 6).

Como dijimos antes, los TCSs se encuentran en todos los *phylum*, pero su distribución entre ellos difiere sustancialmente. Los sistemas de transferencia de fosfato His-Asp son mayoría en eubacterias y sin embargo, son poco frecuentes en eucariotas, donde abundan las fosforilaciones de los residuos Ser-Tre y Tyr. Está claro que ambos modelos de fosforilación pueden funcionar tanto en procariotas como en eucariotas. Dos ejemplos de esto son: la cascada de señalización de las MAP quinastas en eucariotas, la cual, está basada en reacciones de transferencia de fosfato en residuos His-Asp y, en bacterias, el sistema de señalización de *S. coelicolor* mediante transferencia de fosfato de residuos Ser-Tre denominado AfsK/AfsR.

Hasta ahora hemos descrito el prototipo de TCS, donde una SK con un dominio extracitoplasmático, un dominio transmembrana y otro efector transfiere un fosfato a su RR específico. Sin embargo, una de las características más importantes de los TCS es su constitución modular y adaptable que hace posible que existan TCS sin dominio extracelular que respondan a señales citoplasmáticas o bien a otras SK. También existen

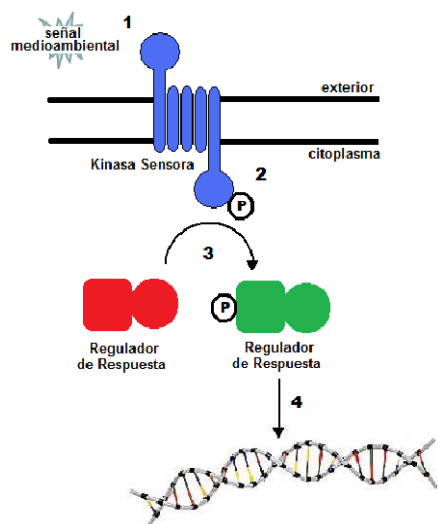


Figura 6: Mecanismo de acción típico de un sistema de dos componentes. 1.- una señal medioambiental sobre el dominio extracelular de la SK induce un cambio conformacional que se manifiesta en el dominio intracelular. 2.- el dominio intracelular se autofosforila, activándose 3.- este induce la fosforilación del dominio receptor del RR, que activa al efector 4.- el dominio efector activo se unirá o liberará a sus posibles dianas en el DNA.

SKs con múltiples dominios de donación de fosfato, lo que implica que puedan modular la actividad de varios RR. A su vez los RR pueden tener más de un dominio de fosforilación, pudiendo ser regulados por varias SKs. Esta adaptabilidad confiere a los organismos los mecanismos necesarios para amoldarse a multitud de variaciones en el medio, haciendo de los TCS un mecanismo fundamental para comprender la regulación en bacterias.

El genoma de *Streptomyces coelicolor*, en particular, posee hasta 67 sistemas de dos componentes, a los que hay que unir 17 SKs y 13 RRs huérfanos. Se considera que en bacterias el rango de señales medioambientales al que cierta especie puede responder está directamente relacionado al número de SKs que contiene su genoma. A su vez el número de SKs codificados por un genoma es proporcional al tamaño de este, de tal forma que en bacterias patógenas facultativas que generalmente tienen genomas menores el porcentaje de SKs y RRs en relación con el número total de genes es bastante pequeño, 0.26% comparado con el 0.65% de bacterias de vida libre. En *S. coelicolor* este porcentaje se dispara hasta el 0.86%, un 25% más que las bacterias no patógenas (Hutchings et al., 2004).

1.5.2.- Genes Implicados en la Diferenciación Morfológica y Bioquímica:

Estos genes de acción pleiotrópica implicados tanto en la producción de antibióticos como en el proceso de diferenciación morfológica, operarían a distintos niveles en una cascada de señales cuya diana final sería toda una serie de genes implicados en ambos procesos.

Los genes *bld*, ya mencionados anteriormente, son un claro ejemplo de genes pleiotrópicos. Los mutantes *bld* no son capaces de desarrollar micelio aéreo ni esporas y, además, la mayoría de ellos (excepto *bldC*) carecen de la capacidad de sintetizar antibióticos.

Hay que indicar, no obstante, que algunas deficiencias fenotípicas de los mutantes *bldA*, *bldD*, *bldG* y *bldH* pueden corregirse al crecer las cepas en diferentes fuentes de carbono, lo cual indica la existencia de rutas alternativas en el desarrollo morfológico de *S. coelicolor*.

La literatura sobre *Streptomyces* parece indicar una relación entre la activación del metabolismo secundario y la respuesta astringente (ayuno y reducción de la tasa de crecimiento). Esta relación podría deberse a las variaciones de los niveles de calcio intracelular, cAMP, nitrógeno o fosfato (Champness y Chater, 1994).

La proteína asociada al ribosoma ppGpp sintetasa (RelA), es un regulador pleiotrópico necesario para activar la respuesta astringente debido a concentraciones limitantes de nitrógeno. En *S. coelicolor* y *S. clavuligerus* la síntesis de ppGpp está relacionada con la producción de antibióticos y una correcta formación del micelio aéreo (Hesketh et al., 2007a) aunque no está claro si ppGpp está directamente relacionado con el aumento en la transcripción de los genes biosintéticos o esto se debe a una consecuencia indirecta de la reducción en el crecimiento impuesta por ppGpp (Bibb, 2003). Estudios recientes utilizando *arrays* de DNA, han mostrado que la inducción de la síntesis de ppGpp mediada por RelA controla la transcripción del factor sigma *hrdB* (relacionado con el metabolismo primario), de *actII-ORF4*, *cdar* y sus respectivos *clusters* (diferenciación metabólica) y también modula los niveles de SapB, de las chaplinas y las rodlinas (diferenciación morfológica) (Hesketh et al., 2007a).

1.5.3.- Genes Implicados en la Diferenciación Morfológica:

Existen genes que están únicamente involucrados en procesos de diferenciación morfológica. La proliferación de *Streptomyces coelicolor* ocurre gracias a la formación de largas cadenas de esporas derivadas de hifas aéreas. Un paso crucial en este proceso es la subdivisión del compartimento multigenómico apical en muchos compartimentos unigenómicos precedentes a las esporas. Seis ORFs del genoma han sido identificadas como indispensables para la septación de las esporas (*whiA*, *whiB*, *whiG*, *whiH*, *whiI* y *whiJ*) aparte de los genes responsables del crecimiento vegetativo como *fts* (Aínsa et al., 2000).

Aínsa et al. (1999) propusieron un modelo secuencial por el cual las nuevas hifas entran en un proceso de crecimiento específico para la esporulación inducido por *whiG*, (codifica el factor sigma σ^{whiG}) que finalmente cesa debido a la acción de WhiA y WhiB, los cuales también inducirían el fin de la replicación del DNA (disruptantes simples en *whiA* y *whiB* así como los disruptantes dobles *whiA-whiB*, muestran unas cadenas de esporas más largas de lo normal con DNA sin condensar y sin septación aparente (Aínsa, 2000). Posteriormente el cese del crecimiento dispararía otras señales que activarían *whiH* y *whiI* que a su vez inducirían la septación.

1.5.4.- Genes Implicados en la Regulación de Varias Rutas Biosintéticas:

Otro aspecto de la regulación está marcado por los genes que únicamente están implicados en la producción de antibióticos. Estos genes pueden estar involucrados en varias rutas de biosíntesis (pleiotrópicos) o afectar únicamente a la síntesis de una de ellas (específicos de ruta, Tabla 4). Los primeros tienden a encontrarse en regiones del cromosoma fuera de los *clusters* biosintéticos y se les denomina genes reguladores de alto nivel, los segundos sin embargo se ubican dentro de los *clusters* biosintéticos y reciben el nombre de genes reguladores de bajo nivel.

Regulador	Antibiótico
<i>actII-ORF4</i>	Actinorrodina
<i>mmyR</i>	Metilenomicina
<i>redD</i> , <i>redZ</i>	Prodigiosina

Tabla 4: genes reguladores específicos de ruta de *S. coelicolor*

Trabajos más recientes parecen mostrar que estos reguladores específicos de ruta pueden también controlar otros *clusters* biosintéticos y por lo tanto tener efectos pleiotrópicos. Se ha observado que los reguladores específicos de ruta pueden controlar

a miembros de la cascada reguladora de una jerarquía “alta” como puede ser *afsR/afsS* (Huang et al., 2005). Conforme aumentan los datos respecto a la regulación en *Streptomyces* se va apreciando cada vez más su complejidad y la idea de una regulación de tipo jerárquico va dando lugar a la de una red donde la transregulación, la retroalimentación y la “poligamia” (Sawai et al., 2004) parecen ser las que permiten a la bacteria adaptarse de una forma muy precisa a los cambios que se producen en su medio ambiente.

Entre los genes que regulan a varias rutas de síntesis de antibióticos nos encontramos con el operón *absA* (Adamidis et al., 1990) que consiste en los marcos abiertos de lectura (ORF) *absA1* (que codifica una quinasa sensora) y *absA2* (que codifica un regulador de respuesta). La delección tanto de *absA1* como de *absA2* en *S. coelicolor* crea un fenotipo sobreproductor de los cuatro antibióticos producidos por la cepa pero no afecta a su esporulación, lo que indica que el operón *absA* ejerce un control negativo únicamente sobre los genes de síntesis de antibióticos (Anderson et al., 2001). La mayoría de los sistemas de dos componentes inducen la activación de sus genes diana (Hutchings et al., 2004), lo que hace de AbsA1/A2, un sistema de dos componentes peculiar. Los experimentos llevados a cabo por Ryding et al. (2002) mostraron como el sistema de dos componentes AbsA1/A2 llevaba a cabo una regulación transcripcional negativa en *cdaR*, regulador específico de ruta del antibiótico dependiente de calcio (CDA) y *cluster* en el que se encuentra el operón *absA*. Posteriormente Sheeler et al. (2005) observaron que si bien ambos genes inducían un control negativo sobre los *clusters* de biosíntesis anteriormente mencionados, el producto fosforilado de *absA2* (AbsA2-P) ofrecía un fenotipo más dramático, dejando entrever la posibilidad de que a pesar de ser AbsA1 la principal quinasa del regulador de respuesta AbsA2, otras quinasas podrían estar fosforilando a AbsA2. Se ha demostrado que *absA* y *absB* regulan la expresión de los genes de biosíntesis de actinorrodina y prodigiosina a través de sus respectivos reguladores específicos de ruta (Aceti y Champness, 1998), pero el mecanismo exacto por el cual este sistema de dos componentes ejerce su influjo ha sido una incógnita durante multitud de años. Finalmente McKenzie y Nodwell (2007), han revelado mediante experimentos de EMSA que AbsA2-P se une a una región poco usual de los promotores de los reguladores específicos de ruta de los *clusters* de biosíntesis de la actinorrodina, la prodigiosina y el CDA, mostrando que la represión puede ser debida a un cambio en la estructura secundaria del DNA.

Otros integrantes de este grupo de reguladores es el sistema de dos componentes AfsK/AfsR. AfsK fue la primera Ser-Tre quinasa encontrada en *S. coelicolor* (Umeyama y Horinouchi, 2001). Estas quinasas siempre han sido consideradas de menor importancia en procariotas que las His quinasas por ser menos comunes, pero la secuenciación del genoma de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley et al., 2002) ha desvelado 40 proteínas de este tipo, reflejando que probablemente sean un grupo de quinasas de mayor importancia para los procariotas de lo que hasta entonces se creía.

El sistema AfsK/AfsR/AfsS en *S. coelicolor* ha sido considerado durante mucho tiempo como un regulador pleiotrópico del metabolismo secundario, ya que la delección de *afsS* daba como resultado un fenotipo no productor de actinorrodina y una producción ligeramente reducida de prodigiosina (Matsumoto et al., 1994). Los mecanismos de activación del sistema han sido estudiados y se conocen gran cantidad de detalles al respecto (Lee et al., 2002), sin embargo, una vez se inducía la transcripción de *afsS*, se desconocía la manera en que la proteína provocaba la síntesis de los antibióticos. Recientemente, Liam et al. (2008), mediante el uso de *arrays* de

DNA y RT-PCR han mostrado que el sistema AfsK/AfsR/AfsS, también podría estar regulando la respuesta al estrés por inanición y que a través de la maquinaria de señalización de falta de fosfato el sistema AfsK/AfsR/AfsS podría inducir la síntesis de la actinorrodina.

Llama la atención el hecho de que AfsR puede ser fosforilada por un extracto acelular de un mutante nulo en *afsK*, los cuales producen antibióticos pigmentados en menor medida que los mutantes en *afsR*, lo que llevó a sospechar que AfsR podía ser fosforilado por otras quinasas. Mediante búsquedas de similitud en el genoma de *S. coelicolor* A3(2), encontraron hasta 30 proteínas con cierta similitud a AfsK y dos de las más similares (PkaG y AfsL) eran capaces de fosforilar AfsR *in vitro*. Mutantes nulos de estos dos genes tenían una producción más tardía de actinorrodina comparado con la cepa silvestre (Sawai et al., 2004).

Zhao et al. (2006), basándose en la idea de que SAM (importado al citoplasma por BldK) influye en el metabolismo secundario y que AfsK actúa como un regulador con una alta jerarquía, hipotetizaron sobre la posibilidad de que SAM indujese la actividad de AfsK; sus estudios mostraron que la presencia de SAM inducía la autofosforilación de AfsK e inducía la sobreproducción de actinorrodina, posteriormente Lee et al. (2007) mostraron mediante NMR que SAM se unía a AfsK, induciendo su actividad.

Todo esto parece mostrar un cuadro en el cual si cada una de las quinasas que fosforilan a AfsR respondiese a un estímulo medioambiental diferente, este regulador de respuesta serviría como punto de unión a todo un abanico de cascadas de señalización que la célula utilizase para ajustar de una manera más específica su metabolismo primario y secundario a los requerimientos impuestos por el medio y que junto con el posible “*cross-talk*” con la ruta *bld* sincronizase (en mayor o menor medida) la diferenciación morfológica y bioquímica

Dentro de los diferentes mecanismos de regulación aparece un grupo interesante, que está despertando un gran interés: las γ -butirolactonas. Estas, son pequeñas moléculas de señalización intercelular, eficaces a muy bajas concentraciones y en un pequeño rango molar (0.25-0.5 μ M) que en *S. coelicolor* regulan la producción de antibióticos. Las γ -butirolactonas se unen a receptores citoplasmáticos muy específicos e inhiben la unión de estos a secuencias específicas del DNA que actúan mayoritariamente como represores, de tal manera que, la unión de las γ -butirolactonas a sus receptores inducen la expresión de sus genes diana (Takano, 2006).

1.5.5.- Genes Reguladores Específicos de Ruta:

Como se ha analizado antes, trabajos recientes pueden poner en tela de juicio el término de reguladores específicos de ruta (*genes implicados exclusivamente en la producción de antibióticos*, página 8), pero designa a un grupo de genes reguladores que cumplen una serie de requisitos y serán analizados en esta sección.

Los genes reguladores específicos de ruta se encuentran localizados en *clusters* de biosíntesis de antibióticos y su descubrimiento supuso uno de los mayores avances en el conocimiento de los procesos de regulación de la biosíntesis de antibióticos (Bibb, 1996). Estos genes reguladores actúan en la mayoría de los casos como “efectores positivos” de la transcripción de los genes biosintéticos, siendo en otros casos “efectores negativos”. La manipulación genética de estos genes reguladores específicos de ruta puede conducir a una sobreproducción del antibiótico sobre el que actúa, por lo cual supone una circunstancia muy interesante desde el punto de vista de la industria. El análisis de estos genes dio como resultado una nueva familia de proteínas denominada

SARP (*Streptomyces Antibiotic Regulatory Protein*) que no mostraba relación alguna con ninguna proteína reguladora conocida. La familia SARP no contiene un motivo de unión a DNA hélice-giro-hélice (HTH) sino dos segmentos con forma de hélice (designados $\alpha 2$ y $\alpha 3$) que se supone actúan de manera análoga al dominio HTH (Martínez-Hackert y Stock, 1997, Bibb. M.J., 2005).

Entre los miembros de la familia SARP destacan los genes de *S. coelicolor actII-ORF4* (regulador específico de ruta del *cluster* de biosíntesis de actinorrodina) y *red D* (regulador específico de ruta del *cluster* de biosíntesis de prodigiosina). Estudios realizados con estas proteínas han demostrado que una mutación en dichos genes genera un fenotipo no productor del antibiótico, así como su expresión en multicopia da lugar a una hiperproducción del mismo. El análisis de la transcripción de los genes *actII-ORF4* y *redD* demostró que ésta solo ocurre durante la transición a la fase estacionaria y que inmediatamente después se produce la expresión de los correspondientes genes estructurales. Si forzamos de alguna manera la expresión de los genes reguladores durante la fase exponencial se produce una transcripción prematura de los genes biosintéticos así como una producción adelantada del antibiótico (Gramajo et al., 1993). En lo que se refiere al mecanismo de acción de estos reguladores, Arias et al. (1999) mostraron que la proteína ActII-ORF4 se unía a las regiones intercistricas de los genes de expresión temprana y tardía del *cluster*. En el caso de los genes *redD* y *redZ*, se sabe que el producto génico de este último ejerce su función a través de la regulación de la transcripción del gen *redD* ya que, mutantes en *redZ* ven severamente afectada la transcripción de *redD* (White y Bibb, 1997). Es interesante destacar que el gen *redZ* posee un codón TTA que le hace estar bajo el control del gen regulador pleiotrópico *bldA*, antes nombrado.

1.6.- Estrés Oxidativo:

Todas las formas de vida, especialmente aquellas con un metabolismo aeróbico, mantienen un diferencial reductor dentro de sus células que se conserva gracias al efecto de ciertas enzimas. El estrés oxidativo se manifiesta como un gran incremento en el potencial reductor de la célula debido a una serie de productos químicos tales como: anión superóxido, el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo (Davies, 1995). El origen de estos radicales puede ser endógeno: como productos secundarios de una respiración aerobia normal; o exógeno, debido a la radiación y los compuestos oxidantes capaces de llevar a cabo ciclos redox (Kim et al., 1998). Los cambios en un estado redox normal dañan los componentes básicos de la célula, incluyendo: proteínas, lípidos y DNA (Cabiscol et al., 2000) y las consecuencias del fenómeno dependen de la magnitud del cambio y la capacidad de la célula para restaurar estas perturbaciones en el potencial redox, pero en caso de un estrés oxidativo severo, los daños podrían ser muy graves, llegando incluso a la muerte celular (Schafer, 2001).

Streptomyces coelicolor no sólo tiene que enfrentarse a las especies reactivas del oxígeno derivadas del funcionamiento normal del metabolismo, sino también a aquellos compuestos derivados de la actinorrodina y sus precursores, que utilizan su capacidad oxidativa como una estrategia biocida (Dietrich et al., 2008). Entre sus mecanismos de defensa, posee compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos reductores; un ejemplo de ellos es el micotiol, al que se le considera como el equivalente funcional del glutatión en procariontes (Newton et al., 1996). Alternativamente, existen una serie de enzimas diseñadas para neutralizar estos compuestos: las catalasas, las superóxido dismutasas, las alquilhidroperóxido reductasas y las tioredoxinas. A pesar de esta batería de compuestos y enzimas, en ocasiones resultan insuficientes para anular la toxicidad del

oxígeno y la bacteria posee una serie de sofisticados mecanismos de reparación y sustitución que funcionan de forma permanente en lípidos, proteínas y DNA (Davies, 1995). Entre los diversos daños que el estrés oxidativo puede causar a la bacteria, quizás el más importante sea el que concierne al DNA. En multitud de ocasiones, se traduce en mutaciones irreversibles y transmisibles (Rocha et al., 2005).

La intensidad de este estrés puede variar y por ello los seres vivos han desarrollado sistemas regulatorios que modulan la síntesis de las enzimas antioxidantes y de los mecanismos de reparación. Uno de los mecanismos reguladores más extendidos en *Streptomyces coelicolor* para conservar el estado redox del citoplasma, es la alteración de la estructura terciaria, y por tanto la actividad, de las proteínas de unión a DNA mediante la reducción de los puentes disulfuro entre dos grupos cisteína de dicha proteína (Ahn et al., 2006; Grinberg et al., 2006; Hahn et al., 2000a, 2000b y 2002; Park y Roe, 2008).

1.6.1.- Las Superóxido Sismutasas (SODs):

Desde el punto de vista fisiológico, las SODs se consideran una de las enzimas fundamentales en el sistema de defensa contra la oxidación y evitan que el radical peróxido en una reacción espontánea reaccione consigo mismo produciendo oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Las superóxido dismutasas tienen la tasa de conversión más alta que se conoce: $\sim 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Evans y Cooke, 2004).

Las SODs son generalmente enzimas homodiméricas o homotetraméricas y muestran una gran similitud en la estructura primaria y terciaria, lo que sugiere que han evolucionado de un ancestro común (Chung et al., 1999). Dependiendo del tipo de metal que ocupe el centro activo de la enzima, las diferentes SODs se clasifican en cinco grupos: (i) MnSOD, que contiene manganeso y es muy común en el dominio de las bacterias y en las mitocondrias; (ii) FeSOD, contiene hierro y también se encuentra en multitud de tipos de bacterias; (iii) CuZnSOD, contiene cobre y zinc en su centro activo y se abunda en el citosol de los eucariotas y en el periplasma de las bacterias Gram negativas; (iv) FeZnSOD, contiene hierro y zinc, común entre los actinomicetos y (v) NiSOD, contiene níquel, es la única SOD hexamérica y hasta hoy solo ha sido descrita en *Streptomyces* (Youn et al., 1996) y cianobacterias (Palenik et al., 2003).

En *S. coelicolor* Müller hay dos SOD: SodN (con níquel) y SodF (con hierro y zinc) sin embargo, en *S. coelicolor* A3(2) se han hallado tres SOD diferentes: una SodN y dos SodF (1 y 2) idénticas en secuencia (Chung et al., 1999). En los que se refiere a la regulación de estos genes, apenas se conoce un gen, *nur*, que codifica una proteína de la familia Fur (“*ferric uptake regulator*”), descrita inicialmente en *E. coli* y que comprende genes relacionados con la asimilación de metales de transición y la respuesta al estrés oxidativo (Mills y Marletta, 2005). La proteína Nur actúa en la homeostasis del níquel, induce la transcripción del gen *sodN* y reprime a *sodF* en *S. coelicolor* Müller (Ahn et al., 2006).

1.6.2.- Las Catalasas:

Juegan un papel crucial en la eliminación del peróxido de hidrógeno que surge como resultado de la respiración aeróbica de cualquier célula, son unas enzimas muy comunes, que se hallan en prácticamente todos los organismos vivos y catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Al tener que actuar sobre especies químicas muy reactivas posee una estructura muy estable (Goodsell, 2004). La mayoría de las catalasas bacterianas están formadas por dos o cuatro subunidades

idénticas, que portan una protoporfirina férrica como grupo prostético (Ortiz de Orué Lucana y Schrempf, 2000).

Streptomyces coelicolor produce tres catalasas diferentes (Kim et al., 1994): (i) CatA, es una catalasa monofuncional típica, inducida por el peróxido de hidrógeno. Su expresión aumenta en las primeras fases del crecimiento hasta que se encuentra mediada la fase exponencial, tras lo que sus niveles se mantienen constantes. (Cho y Roe, 1997). Hahn et al. (2000a) caracterizaron un mutante hiperresistente al peróxido de hidrógeno; esta cepa poseía una mutación que inactivaba un gen que codifica una proteína de unión a DNA de la familia Fur y que poseía cuatro residuos cisteína, que dependiendo de su estado redox variaban la funcionalidad de la proteína. Con estos datos propusieron un modelo que explicaba la rápida respuesta de CatA a los niveles de peróxido de hidrógeno (Figura 8). (ii) CatB, difiere con CatA en que su tasa de transcripción no responde a los niveles de peróxido de hidrógeno, sino al estrés osmótico y se expresa fundamentalmente en la fase de crecimiento tardía en medio líquido y durante la

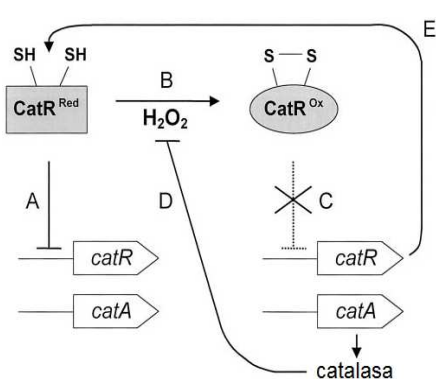


Figura 8: Modelo propuesto por Hahn et al. (2000a) para la regulación de *catA* y *catR* mediada por CatR. A.- estado redox normal, CatR se encuentra reducido, activo y unido a los promotores de *catA* y *catR*, previniendo su transcripción. B.- Aumenta el nivel de peróxido de hidrógeno en la célula y el ambiente se vuelve oxidante. C.- CatR se oxida, se forman puentes disulfuro entre los residuos cisteína del regulador induciendo un cambio conformacional que libera las regiones promotoras de *catA* y *catR*. D.- la CatA producida neutraliza el peróxido de hidrógeno y restaura el potencial redox. E.- CatR recupera su actividad y vuelve a impedir la transcripción de *catA* y *catR*.

diferenciación morfológica en medio sólido, donde juega un papel fundamental (Cho et al., 2000); (iii) CatC es una catalasa que se expresa únicamente durante la transición de la fase exponencial a la estacionaria y de la que se desconoce su posible función *in vivo*. Esta enzima forma parte de un operón junto con el gen regulador *furA*, que se encuentra corriente arriba. Una arquitectura similar se ha visto en *Streptomyces reticulii*, donde el gen de la catalasa *CpeB*, se encuentra corriente abajo del regulador *furS*, pero no siguen los mismos patrones de expresión temporal y localización (Zou et al., 1999). FurA, al igual que otros miembros de la familia, funciona como un represor del operón y regula su actividad mediante la reducción-oxidación de los cuatro grupos cisteína que posee (Hahn et al., 2000b).

1.6.3.- Alquil Hidroperóxido Reductasas (AHP):

Las AHP son un grupo de enzimas con un papel muy importante en la detoxificación de peróxidos orgánicos (Costa-Seaver et al., 2001). En *S. coelicolor* la AHP está codificada por un operón compuesto de tres genes: *ahpC*, *ahpD* y *OxyR*; el primero codifica la alquil hidroperóxido reductasa; el segundo posiblemente codifique para una proteína que funcione de una manera similar a la tiorredoxina y que reduzca a AhpC y el tercero funciona como un activador transcripcional de *aphCD* y de sí mismo, a pesar de que los reguladores LysR (a los que pertenece *OxyR*) ejercen una regulación negativa sobre sus genes diana, incluyendo a su homólogo en *E. coli*: *OxyR* (Hahn et al., 2002).

Las tiorredoxinas:

Son proteínas que actúan como antioxidantes facilitando la reducción de otras proteínas. Se encuentran en casi todos los organismos vivos, desde bacterias hasta mamíferos, pasando por plantas. Estas proteínas, funcionan como un mecanismo que impide la formación de los enlaces disulfuro, muy estables y potencialmente letales, en las proteínas con residuos cisteína (Paget et al., 1998)

1.7.- Las Acetil-CoA Carboxilasas

La acetil coenzima A carboxilasa, es un complejo enzimático formado por dos proteínas: la biotina carboxilasa (conocida como subunidad α), dependiente del cofactor biotina y de mayor tamaño y la carboxiltransferasa (subunidad β), con menor peso molecular. La carboxilación del acetil-CoA para producir malonil-CoA es una reacción irreversible que se lleva a cabo en dos pasos: la primera parte de la reacción se basa en una carboxilación dependiente de ATP de la biotina en la biotina carboxilasa; en la segunda parte de la reacción la carboxiltransferasa transfiere el grupo carboxilo de la biotina a una molécula de acetil-CoA, formando malonil-CoA (Figura 9). La importancia del malonil-CoA radica, principalmente, en que es un sustrato de la síntesis de ácidos grasos donde funciona como factor de elongación (Diacovich et al., 2004)

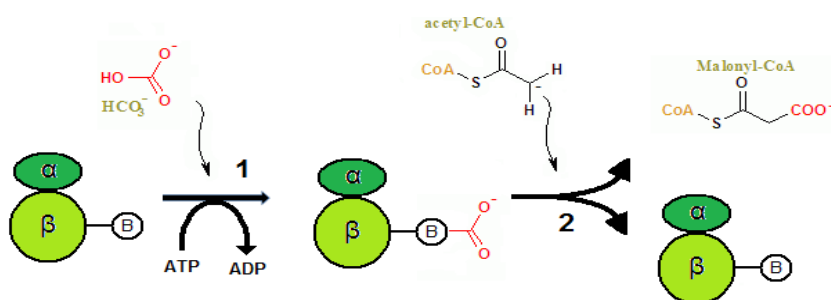


Figura 9: Esquema de la reacción de carboxilación del acetil-CoA para dar malonil-CoA. 1.- carboxilación del grupo biotina. 2.- transferencia del carboxilo a la acetil-CoA.

En *Streptomyces* el malonil-CoA no es únicamente un metabolito esencial que se usa como principal unidad de elongación de los ácidos grasos, sino también una de las piezas fundamentales utilizadas en la síntesis de varios compuestos poliquétidos con aplicaciones farmacológicas. Una serie de complejos enzimáticos biotinilados conocidos como acil-CoA carboxilasas son capaces de convertir acetil-, butiril- y propionil-CoA en malonil-CoA y otros compuestos relacionados (metilmalonil- y etilmalonil-) (Rodríguez and Gramajo 1999). Por tanto el conocimiento de las rutas reguladoras, enzimas y condiciones que afecten a esta ruta metabólica tan importante ampliarán el conocimiento del metabolismo primario de *Streptomyces* y permitirán desarrollar estrategias más racionales que aumenten la eficiencia en la producción de metabolitos secundarios de interés industrial.

En condiciones normales, *S. coelicolor* presenta una intensa transcripción de los complejos acetil-CoA carboxilasa durante la fase de crecimiento exponencial, que se reduce drásticamente en la estacionaria. *S. coelicolor* aparte de necesitar de malonil-CoA durante el crecimiento vegetativo, también necesita este metabolito durante la fase estacionaria; al menos actinorrodina y prodigiosina se sintetizan durante este periodo y ambas requieren malonil-CoA. Con todo esto, dedujeron que los bajos niveles de acetil-CoA carboxilasa observados durante la fase estacionaria eran suficientes para suplir las necesidades de las diversas PKS en cuestión de unidades de elongación (Rodríguez et

al., 2001). Sin embargo no se llevaron a cabo estudios que comprobasen los niveles intracelulares de malonil-CoA ni la estabilidad de los complejos acetil-CoA carboxilasa durante la fase estacionaria. Estos experimentos habrían mostrado si la bacteria acumula reservas suficientes de malonil-CoA previendo la síntesis de antibióticos poliquétidos o bien si los complejos acetil-CoA carboxilasa ensamblados durante la fase de crecimiento vegetativo se mantienen activos en la estacionaria.

S. coelicolor posee dos biotina carboxilasas: AccA1 y AccA2. Una mutación en la primera de las dos proteínas no causa ningún defecto ni en el metabolismo primario ni en el secundario, haciendo de AccA2 la acetil-CoA carboxilasa principal y creando dudas sobre la relevancia de AccA1 para la bacteria (Rodríguez y Gramajo 1999). AccA2, la biotina carboxilasa principal, puede interactuar con dos subunidades carboxiltransferasa: AccB, capaz de reconocer como sustrato el acetil-, propionil- y butiril-CoA y PccB, que reconoce el propionil-CoA principalmente (Diakovich et al., 2002)

Basándose en las observaciones realizadas con mutantes en *accA2* sin apenas actividad acil-CoA carboxilasa suplementados con ácidos grasos (estos mutantes son esenciales, por lo que requieren suplementación), en donde la producción de actinorrodina y prodigiosina estaba inhibida, Rodríguez et al. (2001) mostraron que este gen no sólo es responsable de suplir de malonil-CoA a la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, sino que también es responsable de proveer a las rutas de síntesis de actinorrodina y prodigiosina de las unidades elongadoras necesarias.

2.-ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En la búsqueda de genes biosintéticos de poliquétidos sintetizados por Poliquétido Sintasa Tipo II (PKS Tipo II), orientado a la producción de librerías génicas para la obtención de compuestos híbridos, se aisló, por homología con el gen *actI* de *S. coelicolor*, un fragmento genómico de *S. antibioticus* ATCC11891 que codificaba para distintos genes implicados en la biosíntesis de un poliquétido no identificado. La implicación de estos genes en la biosíntesis del poliquétido venía avalada por distintas aproximaciones: la organización genética del *cluster* biosintético (Figura 11) es similar a otros *clusters* de poliquétidos con PKS Tipo II; el análisis funcional de complementación heteróloga de la ruta de actinorrodina, en mutantes no productores de *S. coelicolor* y, además, la expresión heteróloga en *S. lividans* y *S. coelicolor* da lugar a un productor de un compuesto pigmentado no presente en ninguno de los parentales (posible híbrido resultante de la expresión de genes de biosíntesis de actinorrodina y los propios del *cluster* clonado). En el *cluster* biosintético de *S. antibioticus*, se identificaron, además de los genes estructurales (poliquétido sintetasa mínima, ciclasa, deshidratasa/aromatasa, cetoreductasa, etc.), varios reguladores tales como: regulador transcripcional de la familia *lysR* (*ORF0*), regulador específico de ruta (*orfI*) y un sistema regulador de respuesta de dos componentes (*orfD1/orfD2*) (Colombo et al., 2001; López-Vázquez, 2003).

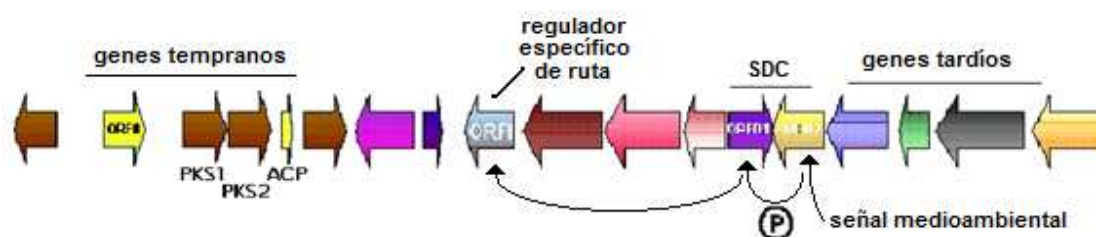


Figura 11: *cluster* de biosíntesis de un poliquétido derivado de acetato en *S. antibioticus*

Posteriormente los análisis funcionales realizados en condiciones heterólogas (por complementación de mutantes *act* de *S. coelicolor*) sugerían que el regulador específico de ruta (*orfI*) dirigía la transcripción de los genes estructurales del *cluster* y que la transcripción de éste era absolutamente dependiente del regulador de respuesta del sistema de dos componentes. Tanto es así que el regulador específico de ruta de *S. antibioticus* era capaz de complementar la mutación de su homólogo del *cluster* de biosíntesis de actinorrodina *actII-ORF4* (López-Vázquez, 2003).

Los productos génicos correspondientes al “regulador específico de ruta”, así como el correspondiente al regulador de respuesta del sistema de dos componentes fueron fusionados, en vectores adecuados, a colas de histidina para facilitar su purificación y posterior caracterización funcional.

Pese a la similitud estructural entre el *cluster* clonado a partir de *S. antibioticus* y el de actinorrodina de *S. coelicolor*, cabe señalar la peculiaridad de que, a diferencia del *cluster* de actinorrodina, éste de *S. antibioticus* codifica, además, para el sistema regulador de dos componentes. Por ello el *cluster* clonado ofrece un excelente modelo para analizar la cascada regulatoria más próxima al *cluster*. La activación de estos genes

va a desencadenar el proceso cuyo resultado final conducirá a la biosíntesis del poliquétido. Dada las dificultades para la manipulación genética del microorganismo de donde procede el *cluster* biosintético clonado, los análisis realizados en este trabajo, han sido abordados en *S. coelicolor* JF1 (un mutante no productor de actinorrodina con una mutación puntual en el regulador específico de ruta *actII-ORF4*, (Arias et al., 1999). Con estos antecedentes nos hemos propuesto:

- 1.- Analizar la interacción del producto del regulador de respuesta sobre su presunta diana (regulador específico de ruta de *S. antibioticus*).
- 2.- Analizar la interacción del regulador específico de ruta de *S. antibioticus* sobre las posibles dianas localizadas en regiones promotoras de los genes estructurales.
- 3.- Analizar el efecto de la biosíntesis del poliquétido en el metabolismo global de *S. coelicolor*, una vez activados los mecanismos de producción.
- 4.- Aislar de *S. coelicolor* y, eventualmente, caracterizar sistemas de dos componentes similares al clonado de *S. antibioticus*.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Microorganismos utilizados:

Los microorganismos utilizados para el desarrollo de este trabajo se encuentran reflejados en la Tabla 5:

Organismo	Genotipo	Referencia	
<i>Escherichia coli</i> JM101	supE thiΔ(lac-proAB) (F ⁺ traD36 proAB lac ^q ZΔM15)	Yanish-Perron et al. (1985)	
<i>Escherichia coli</i> JM109	recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB)		
<i>Escherichia coli</i> ET12567	dam ⁻ dcm ⁻	McNeil et al. (1985)	
<i>Streptomyces lividans</i> TK21	str6 ⁻ SLP2 ⁻ , SLP3 ⁻	Hopwood et al. (1983)	
<i>Streptomyces coelicolor</i> J1501	hisA1 uraA1 strA1 pgl SCP1 ⁻ SCP2 ⁻	Chater et al. (1982)	
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻	Kieser et al. (2000)	
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145 Δ2307	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , ΔSCO2307	Este trabajo	
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145/pPR2307	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , pPR2307 insertado en el genoma		
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145/pPR2308	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , pPR2308 insertado en el genoma		
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145/pPR5131	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , pPR5131 insertado en el genoma		
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145/pPR4072	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , pPR4072 insertado en el genoma		
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145/pPR4073	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , pPR4073 insertado en el genoma		
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145/pPRAbsA1	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , pPRAbsA1 insertado en el genoma		
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145/pPRAbsA2	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , pPRAbsA1 insertado en el genoma		
<i>Streptomyces coelicolor</i> JF1	argA1 guaA1 redD42 actII- 177 SCP1 ⁻ SCP2 ⁻		Feitelson J.S., Hopwood D.A. (1983)
<i>Streptomyces coelicolor</i> JF1- 152	pSET152		Este trabajo
<i>Streptomyces coelicolor</i> JF1- 401	pHJL401		
<i>Streptomyces coelicolor</i> JF1- 4812	pLV4812		
<i>Streptomyces coelicolor</i> JF1- 4303	pLV4303		
<i>Streptomyces coelicolor</i> JF1- 4812-4303	pLV4303 pLV4812		
<i>Streptomyces antibioticus</i> ATC11891		ATCC (American Type Culture Collection)	

Tabla 5: listado de las cepas utilizadas para el presente proyecto

3.2.- Crecimiento y Conservación:

Las cepas de *Escherichia coli* se crecieron a 37°C tanto en medio sólido como líquido; en este caso, a una agitación de 250rpm y se conservaron como suspensiones celulares en glicerol al 20% a una temperatura de -20°C. El crecimiento de *E. coli* se determinó midiendo la turbidez de los cultivos (absorbancia a 600nm) en el espectrofotómetro. Las cepas de *E. coli* utilizadas más frecuentemente también se conservaron mediante resiembra periódica en placas de agar con el medio de cultivo adecuado y los suplementos necesarios.

Las cepas de *Streptomyces* se crecieron en los diferentes medios de cultivo a la temperatura de 30°C y a una agitación de 250 rpm para los medios líquidos. En algunos casos la agitación se realizó con bolas de vidrio y muelles para facilitar tanto la oxigenación como la dispersión del micelio. Se conservaron como suspensiones de esporas en glicerol 20% a una temperatura de -20°C. Para obtener las esporas de las diferentes cepas se sembró el microorganismo en placas de R5 (Hopwood et al., 1985) convenientemente suplementadas. En todos los casos, las placas se incubaron a 30°C durante un tiempo estimado de 6-7 días. Las esporas se recogieron con la ayuda de un asa de siembra estéril, se filtraron a través de un filtro de algodón hidrófilo estéril, se centrifugaron 10 minutos a 4000 rpm, se lavaron con H₂O estéril y se resuspendieron en un volumen adecuado de glicerol 20% para su posterior congelación (Hopwood et al., 1985). En algunos casos las cepas de *Streptomyces* también se conservaron como micelio congelado, obtenido a partir de cultivo líquido.

3.3.- Medios de Cultivo de *Streptomyces*:

DNA (Difco Nutrient Agar):

Medio utilizado para la obtención de alto título y DNA de actinofagos. (Hopwood et al., 1985)

DNB (Difco Nutrient Broth):

Se utilizó para la preparación de suspensiones de fagos de *Streptomyces*. (Hopwood et al., 1985)

NMMN:

Medio mínimo líquido. (NH₄)₂SO₄ 0,25%, casaminoácidos 0,6%, MgSO₄ 0,8%, PEG6000 6,0%, elementos traza 0,12%. Tras la esterilización complementar con NaH₂(PO₄) 1,8% y manitol 1%.

R5:

Medio de cultivo rico usado sólido, líquido o como agar de cobertura para crecimiento rutinario y esporulación, obtención de RNA y transfección respectivamente de cepas de *Streptomyces*. (Hopwood et al., 1985).

SNA (Soft Nutrient Agar):

Agar de cobertura. (Hopwood et al., 1985)

SY:

Medio de cultivo usado para diferenciación de ciertos mutantes condicionales. Almidón soluble 1,5%, extracto de levadura 0,1%, KH₂PO₄ 0,1%, MgSO₄ 0,1%, NaCl 0,3%, TES 6,45%, Manitol 1%. Ajustar a pH7,4.

YEME (Yeast Extract, Malt Extract):

Medio de cultivo líquido usado para la extracción de plásmidos y DNA total de *Streptomyces* (Hopwood et al., 1985)

3.4.- Medios de Cultivo de *E. coli*:

LB (Luria-Bertani):

Medio utilizado para el cultivo de *E. coli* (Sambrook et al., 1989)

Medio Mínimo M9:

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento y conservación de cepas de *E. coli* (Miller, 1972).

3.5.- Selección con Antibióticos:

Los antibióticos utilizados para la selección de cepas resistentes tanto de *Streptomyces* como de *E. coli* se muestran en la Tabla 6:

Antibiótico	Medio líquido (µg/ml)	Medio sólido (µg/ml)
Ampicilina	200	200
Cloranfenicol	25	25
Higromicina	20	200
Tetraciclina	10	10
Tioestreptona	5	50
Apramicina (<i>E. coli</i>)	100	100
Apramicina (<i>Streptomyces</i>)	50	50

Tabla 6: concentraciones utilizadas con los diversos antibióticos

La preparación de estos antibióticos se realizó, dependiendo del antibiótico, bien mediante disolución en agua y posterior esterilización por filtración con filtros Millipore (Millipore corp. Bedford MA, EE.UU.) de 0.45µm, o mediante disolución en etanol o DMSO, en cuyo caso no precisaron de otro tipo de esterilización.

3.6.- Vectores:

La Tabla 7 refleja los diferentes vectores utilizados en este trabajo.

3.7.- Aislamiento de DNA:

3.7.1.- *Aislamiento de DNA plasmídico de E. coli:*

Dicho aislamiento se realizó siguiendo el método de lisis alcalina descrito por Birnboim (1983)

Para la preparación de aquellas muestras que posteriormente fueron secuenciadas se utilizó el kit Plasmid Miniprep Kit de Biorad (Ref.:732-6100)

Materiales y Métodos

Vector	Características	Referencia
PM1	Actinofago derivado de (ϕ C31, tsr^R , hyg^R , (att^-))	Malpartida y Hopwood (1986)
PM1 (Apra)	Actinofago derivado de (ϕ C31, tsr^f , hyg^f , $apra^f$ (att^-))	Sanz (2005)
PM1-2307	Actinofago derivado de (ϕ C31, tsr^f , hyg^f , $apra^f$ (att^-)) SCO2307	Este trabajo
PM1-2308	Actinofago derivado de (ϕ C31, tsr^f , hyg^f , $apra^f$ (att^-)) SCO2308	
pIJ2925	Para clonaje en <i>E. coli</i> amp^f β gal	Jansenn y Bibb. (1993)
pSET152	Plásmido shuttle. $apra^f$ rep^{UC} , $int^{(\phi)C31}$, β gal	Bierman et al. (1992)
pHJL401	Plásmido shuttle amp^f tsr^f	Larson y Hershberger (1986)
pLV4812	pHJL401 con ORFD1/ORFD2 clonado	López-Vázquez (2003)
pLV4303	pSET152 con ORF1 clonado	
pLV4602	pET19b con ORFI clonado	
pLV4622	pJOE2775 con ORFI clonado	
pLV4831	pET19b con ORFD1 clonado	
pAC301	pIJ2925 tsr^R	
pIJ2307I	pIJ2925 clonado HincII fragmento 1.0kb <i>upstream</i> de SCO2307 obtenido con oligos 2307.1 y 2307.2	Este trabajo
pIJ2307II	pIJ2925 clonado HincII fragmento 0.7 kb <i>downstream</i> de SCO2307 obtenido con oligos 2307.3 y 2308.6	
pIJ2308I	pIJ2925 clonado HincII fragmento 1.0kb <i>upstream</i> de SCO2308 obtenido con oligos 2308.1 y 2308.2	
pIJ2308II	pIJ2925 clonado HincII fragmento 0.9kb <i>downstream</i> de SCO2308 obtenido con oligos 2308.3 y 2308.4	
pIJ5131I	pIJ2925 clonado HincII fragmento 1.0kb <i>upstream</i> de SCO5131 obtenido con oligos 5131.1 y 5131.2	
pIJ5131II	pIJ2925 clonado HincII fragmento 1.0 kb <i>downstream</i> de SCO5131 obtenido con oligos 5131.3 y 5131.4	
pIJ5132I	pIJ2925 clonado HincII fragmento 1.0 kb <i>upstream</i> de SCO5132 obtenido con oligos 5132.1 y 5132.2	
pIJ4072I	pIJ2925 clonado HincII fragmento 0.9 kb <i>upstream</i> de SCO4072 obtenido con oligos 4072.1 y 4072.2	
pIJ4072II	pIJ2925 clonado HincII fragmento 1.0 kb <i>downstream</i> de SCO4072 obtenido con oligos 4072.3 y 4072.4	
pIJ4073I	pIJ2925 clonado HincII fragmento 1.0 kb <i>upstream</i> de SCO4073 obtenido con oligos 4073.1 y 4073.2	
pIJ4073II	pIJ2925 clonado HincII fragmento 1.0 kb <i>downstream</i> de SCO4074 obtenido con oligos 4073.3 y 4073.4	
pIJabsA1I	pIJ2925 clonado HincII fragmento 1.0 kb <i>upstream</i> de absA1 obtenido con oligos absA1.1 y absA1.2	
pIJabsA1II	pIJ2925 clonado HincII fragmento 1.0kb <i>downstream</i> de absA1 obtenido con oligos absA1.3 y absA1.4	
pIJabsA2I	pIJ2925 clonado HincII fragmento 1.0kb <i>upstream</i> de absA2 obtenido con oligos absA2.1 y absA2.2	
pIJabsA2II	pIJ2925 clonado HincII fragmento 1.0kb <i>downstream</i> de absA2 obtenido con oligos absA2.3 y absA2.4	
pPR2307	pAC301 clonado en BamHI/EcoRI fragmento BglII/EcoRI de pIJ2307I fragmento Hindi/EcoRI de pIJ2307II	
pPR2308	pAC301 clonado en BamHI/EcoRI fragmento BglII/EcoRI de pIJ2308I fragmento Hindi/EcoRI de pIJ2308II	
pPR5131	pAC301 clonado en BamHI/EcoRI fragmento BglII/EcoRI de pIJ5131I fragmento Hindi/EcoRI de pIJ5131II	
pPR4072	pAC301 clonado en BamHI/EcoRI fragmento BglII/EcoRI de pIJ4072I fragmento Hindi/EcoRI de pIJ4072II	
pPR4073	pAC301 clonado en BamHI/EcoRI fragmento BglII/EcoRI de pIJ4073I fragmento Hindi/EcoRI de pIJ4073II	
pPRabsA1	pAC301 clonado en BamHI/EcoRI fragmento BglII/EcoRI de pIJabsA1I fragmento Hindi/EcoRI de pIJabsA1II	
pPRabsA2	pAC301 clonado en BamHI/EcoRI fragmento BglII/EcoRI de pIJabsA2I fragmento Hindi/EcoRI de pIJabsA2II	

Tabla 7: plásmidos utilizados en este trabajo

3.7.2.- Aislamiento de DNA plasmídico de Streptomyces:

En este caso se utilizó una modificación del método de Birnboim (1983) publicada por Hopwood et al. (1985).

3.7.3.- Aislamiento de DNA total de Streptomyces:

Esta se realizó según el método descrito por Hopwood et al. (1985).

3.7.4.- Aislamiento de DNA de fagos de Streptomyces:

La preparación de DNA de actinofagos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Hopwood et al. (1985). Como cepa infectiva se empleó *Streptomyces lividans* TK21.

3.7.5.- Obtención de alto título de fagos de Streptomyces:

La preparación de alto título de actinofagos se realizó siguiendo el protocolo de Hopwood et al. (1985).

3.8.- Introducción de DNA:

3.8.1.- Transformación de E. coli:

Se realizó utilizando células competentes de *E. coli* JM101, JM109 y ET12567 siguiendo el protocolo descrito por Brown et al. (1979).

3.8.2.- Transformación de Streptomyces:

Se realizó mediante el uso de protoplastos de *Streptomyces* según describieron Hopwood et al. (1985).

3.8.3.- Transfección de Streptomyces:

Ver Hopwood et al. (1985)

3.9.- Manipulación Enzimática del DNA:

3.9.1.- Digestión del DNA:

Las endonucleasas de restricción con las que se llevaron a cabo las digestiones se utilizaron siguiendo las recomendaciones de las distintas casas comerciales.

3.9.2.- Desfosforilación de extremos cohesivos:

Este procedimiento se realizó cuando fue preciso evitar la recircularización de aquellos vectores digeridos con endonucleasas de restricción y que iban a ser utilizados para posteriores ligaciones. Para la desfosforilación, se trataron dichos vectores con fosfatasa alcalina, enzima que hidroliza los grupos fosfato del extremo 5' del DNA impidiendo la formación de los enlaces fosfodiéster en la misma molécula y así favorecer la incorporación de fragmentos de DNA que contengan los extremos 5' intactos.

La reacción de desfosforilación se llevó a cabo añadiendo una unidad enzimática de fosfatasa alcalina procedente del intestino de ternera (Boehringer Mannheim. Mannheim, Alemania. Ref. 1097 075) por cada 50 pico moles de extremos 5' de DNA e incubando a 37°C durante una hora (Sambrook et al., 1989)

3.9.3.- Relleno de extremos protuberantes de DNA:

Se siguió el protocolo descrito por Sambrook et al. (1989) utilizando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* para rellenar los extremos de DNA 5' protuberantes y T4 DNA polimerasa para rellenar fragmentos con extremos 3' protuberantes. Todas las reacciones se llevaron a cabo en las condiciones recomendadas por las casas comerciales y cuidando que el tiempo de incubación no sobrepasara los 30 minutos a 37°C para evitar posibles actividades exonucleasas no deseadas. Ambas enzimas se inactivaron a 65°C durante 10 min.

3.9.4.- Ligación de fragmentos de DNA:

Se utilizó la DNA ligasa del Bacteriófago T4 y se tuvieron en cuenta las recomendaciones de Sambrook et al. (1989), poniendo siempre un exceso molar del fragmento de DNA a clonar del orden de cuatro veces respecto al vector. Las reacciones fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas para extremos protuberantes. En el caso de ligación de extremos romos, la reacción fue llevada a cabo a 16°C durante toda la noche.

3.9.5.- Amplificación de DNA por PCR:

Todas las amplificaciones de DNA por reacción de la polimerasa en cadena (PCR) (se llevaron a cabo según las recomendaciones que la casa comercial Roche (Basel, Suiza) hace para su kit GC-RICH PCR System (ref.12 140 306 001). La temperatura de hibridación ha sido de 50°C para las sondas de *orfI* y *orfD1*, 55°C para los fragmentos SCO2307 I y II, SCO2308I y II y SCO5132I y II y de 60°C para el resto de fragmentos.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron suministrados por la empresa Isogen (Maarsen, Holanda) y se detallan en la Tabla 8.

3.9.6.- Marcaje de fragmentos con extremos 5' protuberantes:

Para el diseño de las sondas se diseñaron un par de oligonucleótidos unas 150 pares de bases corriente arriba y corriente abajo del inicio de traducción del gen. Posteriormente, usando estos oligos (Tabla 8) y el DNA genómico de la bacteria se amplifica mediante PCR una región de aproximadamente 300 pb que contiene la región reguladora de dicho gen. Este amplicón se clonó en pIJ2925, se transformó en *E. coli* y se extrajo mediante miniprep para incrementar la cantidad de sonda.

Primeramente la sonda se extrajo del plásmido pIJ2925 mediante digestión con BglIII y posterior purificación. El marcaje radioactivo de la sonda se llevó a cabo usando 500 ng de la misma, 200µM de dNTPs (excepto dATP), 330µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP marcado con fósforo 32 y 10 unidades del fragmento Klenow de la DNA polimerasa. Esta mezcla de reacción se incubó durante 20 min a 37°C y posteriormente se inactivó la enzima a 75°C. Para eliminar los restos de enzima, dNTPs etc., se purificó el DNA marcado con el kit de purificación de fragmentos de DNA Spinprep de Calbiochem (California, E.E.U.U.). Finalmente se midió la calidad del marcaje mediante centelleo, considerándose como satisfactorio un resultado de 100.000 cuentas por minuto.

Oligonucleótido	Secuencia
3015.1	CAG CCG CGT CTC CTT CGA CCT G
3015.2	GCG TCC AGA CGG CAC GAC ATC C
3015.3	GCC TGC CCC CTC TAC CCT TTC C
3015.4	CTG TCT CGC CGG CTT CCT GGA G
3016.1	GCC ATG GCG CTG GTG ACC TGT G
3016.2	CGT CCT CCA TCC CGA GCA GCA G
3016.3	CCT GTC CTC GGC GAT CGG AAA G
3016.4	GGT CGG TTT CGG CTG GCA GTC C
1216.1	CGG ACG CAA GCC CGG ACG CAA G
1216.2	TGC GGT TCT CCG GGC GTT GCC C
1216.3	GCG GCC ACC GAC GTA GGA TCC G
1216.4	GGA CGT GGT GGC ACG GGT GCT G
1217.1	CTT CGT GGT CTG GTA CAT GCT G
1217.2	CTC GGC CAG CAG GAC CTT GAT C
1217.3	CAG GAA CAA GGG CTG GCT GTA G
1217.4	GAC ATC ACT CCG AAA GGG CAC G
2508.1	CAG CTC TCC CTG TGG TGG TTC G
2508.2	CTG TCG CGC CAC GGA GAA ATC C
2508.3	CGC GTC GTC GGC GAG CAG AAC G
2508.4	CTC GGT CAC CGC GGT CGT GAT C
2509.1	CGT ACG ACA AGC AGT TCG TGC G
2509.2	GCA AGG GAG TGT TCC GGC TGA C
2509.3	CCT TCT CCG GCG TGC TCT TGA G
2509.4	GAG GAG GCC TTC CTC AGC ATC G
absA1.1	CCT TGC GCA TGC TGA GTT CGT G
absA1.2	GAG GAC CCG TAC AAG CGA TTC G
absA1.3	CAC GAC CTG CGA GTA CTA CCG G
absA1.4	GGG TTC TTC CTG ACC CTC GAC G
absA2.1	GCA CGA GGT GAT CGG GCT GCT G
absA2.2	CTC GTC GTC GGC GAG CAG TAC G
absA2.3	CGA GGC GGG ACT GGT GAA GGA C
absA2.4	GAC GAG GAC CTG ACG GTC GAC C
<i>orfI</i> probe sense	GTC TCC GGA TCG CGG TCG CTG TAG
<i>orfI</i> probe antis	CGT TGC CGC CGG AGC GCG TAC AC
<i>orfD1</i> probe sense	GAT CAA GGA CTG ACG TCT GCC CCA G
<i>orfD1</i> probe antis	GGA TCT GCC GGG GTT TTC CGG CAG

Tabla 8: secuencia de los diversos oligonucleótidos utilizados

3.10.- Electroforesis de DNA:

3.10.1.- Electroforesis en geles de agarosa no desnaturalizantes:

Las moléculas de DNA con una cantidad de tampón de carga apropiada, se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa preparados en tampón TBE, a los que se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0.5µg/ml. La concentración de agarosa (agarose D-1 medium EEO. ref.8021. Pronadisa. Madrid, España) utilizada para la preparación de los geles fue generalmente de 0.8% excepto en aquellos casos en los que era necesario separar fragmentos de un tamaño menor con lo

que la temperatura subió hasta 1.2% y para fragmentos de un tamaño mayor el porcentaje se redujo hasta el 0.5%. (Sambrook et al., 1989). Tampón TBE: Tris-HCl 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM pH8. Tampón de carga para DNA (5X): azul de bromofenol 0.25%, sacarosa 40%, Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 10mM. Bromuro de Etidio: solución 10mg/ml en agua. Se conserva a 4°C, protegido de la luz.

3.10.2.- Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa:

Ver el manual del Perfectprep Gel Cleanup (kit ref. 955152000. Eppendorf. Hamburgo, Alemania).

3.11.- Hibridación de DNA:

3.11.1.- Transferencia de DNA desde geles de agarosa: Southern blot.

La transferencia de DNA fue realizada según la técnica descrita por *Southern* (1975). El DNA fue transferido desde geles de agarosa a membranas de nylon (Hybond-N, ref. RCP203N. Amersham Biosciences. Buckinghamshire, Reino Unido).

Una vez realizada la transferencia, la fijación del DNA a la membrana de nylon se llevó a cabo tanto por exposición de la misma a la luz ultravioleta durante 3 minutos.

3.11.2.- Prehibridación, hibridación y marcaje del DNA transferido:

Se utilizaron los reactivos del AlkPhos Direct Labelling (ref. RPN3680. GE Healthcare. Buckinghamshire, Reino Unido)

3.11.3.- Secuenciación de DNA:

La secuenciación de los fragmentos del cromosoma de *Streptomyces coelicolor* M145 amplificados por PCR y posteriormente clonados en el plásmido pIJ2925 fue llevada a cabo por el servicio de secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) utilizando el método de terminación de cadena por didesoxidonucleótidos (Sanger et al., 1977). Los oligonucleótidos usados para dicho fin fueron el M13 universal (-47) y el M13 reverso (-48).

3.12.- Aislamiento y Manipulación de RNA:

3.12.1.- Condiciones de cultivo y purificación de RNA

Las cepas derivadas de *S. coelicolor* JF1 incluidas las control (aquellas conteniendo los plásmidos pSET152 y pHJL401) se cultivaron en medio R5 líquido suplementado con los antibióticos que proceden durante 72 horas a 30°C y 250 rpm.

El método comúnmente utilizado en el laboratorio para la extracción de RNA había sido descrito por Kirby et al. (1967). La calidad del RNA así obtenido era satisfactoria para su uso en *Northern blotting*; sin embargo, el RNA necesario para su uso con *arrays* debía tener una mejor calidad en cuanto a degradación y pureza a lo que se añadía la excesiva duración del proceso (hasta 3 días). Por otra parte, el kit de extracción de RNA, Rneasy Midi (ref. 75142) de Qiagen (Dusseldorf, Alemania) no era capaz de lisar satisfactoriamente las células y la cantidad de restos celulares saturaban las columnas de tal manera que la cantidad de RNA obtenida era muy baja.

Por tanto, se desarrolló un método híbrido en el que se lisaban las células y se limpiaba de restos celulares el lisado siguiendo el método Kirby y el RNA se purificaba de ese lisado mediante el uso de columnas RNeasy; el método se ha llamado Kirbyeasy.

Las ventajas del nuevo método Kirbyeasy fueron, por un lado, la obtención de un RNA de mejor calidad, más limpio de DNA genómico y proteínas y, por otro, la purificación es más rápida (Figura 10).

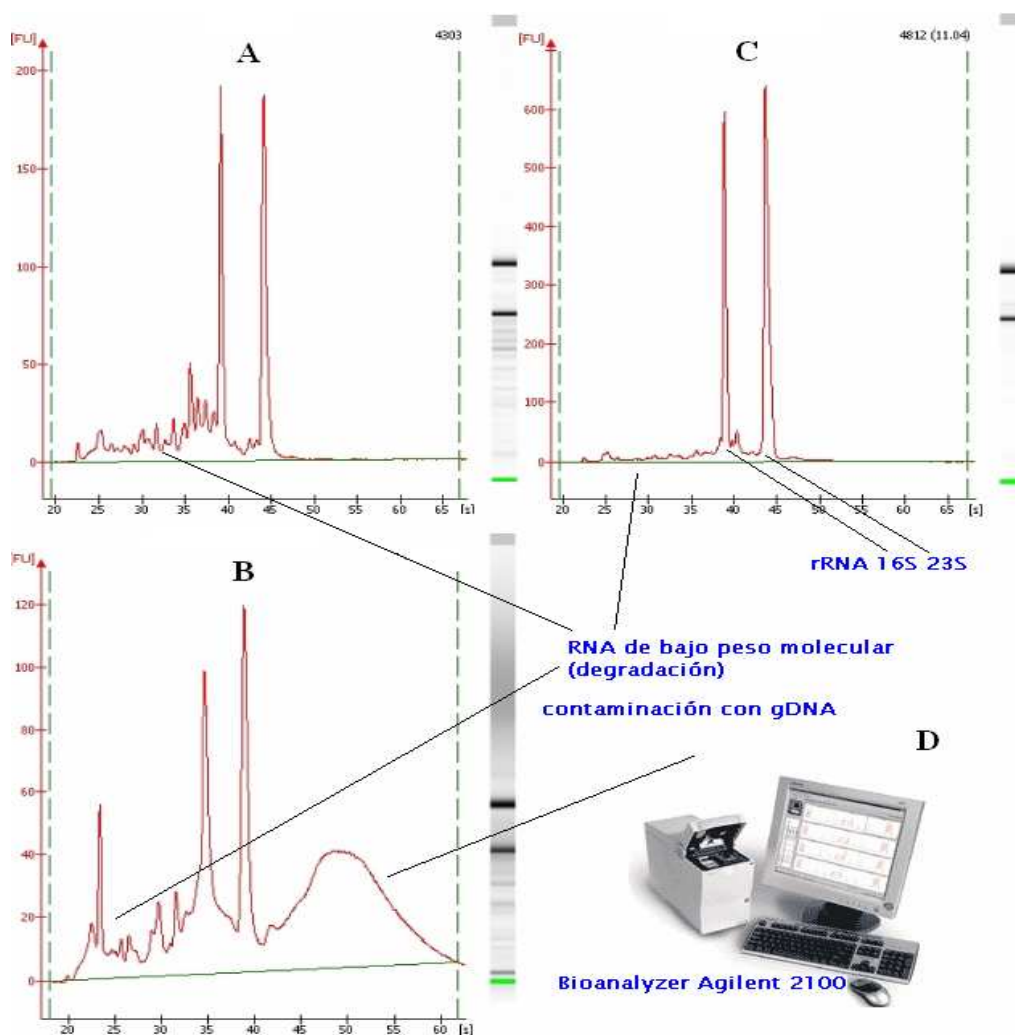


Figura 10: gráficas mostrando la calidad del RNA obtenidas por el bioanalyzer Agilent 2100 (D). A y B : RNA obtenido mediante el método kirby. C RNA obtenido mediante el método kirbeasy.

El micelio proveniente de 50 ml de cultivo se sometió a un proceso de fuerte agitación en presencia de 5 ml tampón de lisis (SDS 1%, EDTA 160mM pH 8), bolas de cristal de 1 mm de diámetro y 1 ml fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1). A continuación se añadieron 4 ml de tampón RTL del kit Rneasy Midi y 40 μ l de β -mercaptoetanol con una nueva agitación vigorosa. Tras esto, se añadieron otros 8 ml de fenol/cloroformo/isoamílico para extraer las proteínas de la muestra. Una vez recogida la fase acuosa, se completó el volumen hasta 5 ml con RTL.

Luego se continuó con el protocolo según las indicaciones del fabricante.

3.12.2.- Hibridación y procesado de microarrays

El cDNA marcado fluorescentemente para las hibridación de *microarrays* se obtuvo usando el kit “superScript Indirect cDNA labelling system” (ref. L1014-04) de invitrogen (Carlsbad, CA. E.E.U.U.) como recomienda el proveedor. El RNA se transformó en cDNA con la superScript III transcriptasa en reverso, usando hexámeros *random* como cebadores, incluyendo amino-acil y amino-hexil nucleótidos modificados en la muestra. Después de purificar el cDNA, los fluoróforos Cy3 y Cy5 (Amersahm

Biosciences) se acoplaron únicamente a la banda de cDNA modificada en el amino terminal. La eficiencia de marcaje se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies. Wilmintong, DE. EE.UU.). Anteriormente a la hibridación, los cristales del *microarray* (Eurogentec. Lieja, Bélgica) se bloquearon durante 45 minutos a 42°C por inmersión en SSC 5x, SDS 0.1% (p/v), 1% (p/v) albúmina sérica bovina. Los cristales fueron lavados brevemente en agua a temperatura ambiente, seguido de un nuevo lavado en isopropanol, antes de que se secan.

Se mezclaron cantidades iguales de cDNAs marcados con Cy3 o Cy5 (alrededor de 300 pM de cada uno) y se secaron en Speed-Vac. Las muestras se disolvieron en 35 µl de formamida desionizada 50% (v/v), solución Denhardt's 5x, SSC 6x, SDS 0.5% (p/v), dextransulfato 5% (p/v), pre-filtrado y precalentado a 42°C. Después de 2 minutos a 90°C para desnaturalizar el cDNA, se aplicó la solución a los cristales y se les cubrió con un cristal cobertor de 24 x 60 mm. Los cristales se introdujeron en una cámara de hibridación y se incubaron a 42°C durante 18 horas, evitando su exposición a la luz. Luego, tras quitar el cobertor, los cristales se realizaron dos lavados de 5 minutos con agitación suave en SSPE 0.5x SDS 0.5% (p/v) pre-calentado a 37°C (SSPE 1x se compone 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 11.5 mM NaH₂PO₄, PH 7.4). Finalmente se lavó con 0.1x SSPE a temperatura ambiente. Se dejaron secar los cristales y se escanearon en un escáner de *microarrays* con láseres de 543 y 633 nm. Se tomaron imágenes a una resolución de 10 µm. La intensidad de los spots se determinó con el programa informático Genepix Pro 5.0 (Axon. Palo Alto, CA., EE.UU.). Los datos de intensidades se trataron estadísticamente mediante el programa LIMMA (Ritchie et al., 2007). Para visualizar los resultados obtenidos por LIMMA se utilizó el programa FIESTA viewer

3.12.3 RT-PCR (*Real Time PCR*).

La RT-PCR consta, fundamentalmente, de dos pasos: la conversión del mRNA (RNA mensajero) en cDNA (DNA complementario) y la amplificación específica de cierto fragmento de cDNA que corresponde con un determinado transcrito de mRNA.

Previamente a la conversión del mRNA en cDNA, es necesario deshacerse de cualquier traza de gDNA (DNA genómico) que pueda hallarse en las muestras de RNA, ya que este también funcionaría como molde en la amplificación del cDNA; para ello se utilizó la DNasa TURBO DNA-free kit de Ambion (Austin, E.E.U.U.) tal y como especifica la casa comercial.

A la hora de convertir el RNA en cDNA, se utilizó la reverso transcriptasa con oligonucleótidos aleatorios del High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, E.E.U.U.), según recomienda el fabricante.

Con la intención de medir los niveles de cDNA específico del gen que nos interesa, se llevaron a cabo una serie de reacciones de PCR en un amplificador Applied RT-PCR 7300 de Applied Biosystems (Foster City, E.E.U.U.). La mezcla de reacción se obtuvo mezclando los oligos de interés (Tabla 9) con 3µl de cDNA, H₂O y POWER SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, E.E.U.U.) hasta completar los 20µl del volumen final de la mezcla de reacción.

Gen	Oligonucleótido corriente arriba	Oligonucleótido corriente abajo
<i>HrdB</i>	CGC GGC ATG CTC TTC CT	AGG TGG CGT ACG TGG AGA AC
<i>actII-ORF4</i>	AGA ATA GGG CCG ATG ATT CC	CAT GTG CAT ACG CTG GAT TT
<i>SodF</i>	TCG AGC AGA TCT ACG ACC AC	AGT CGA CCT TCT GGT TCT TGT ACT
<i>SodF2</i>	GAT GAA GTC GAC CTT CTG GTT	AGC AGG TCT ACG ACC ACC AG
<i>SodN</i>	ATG TAG TCC AGG GCC TTC TG	TGC TGT GGA GCG ACT ACT TC
<i>chpF</i>	TAG CGA GAG CTT GAC CAA TA	TAC TCC AGA TGC TGG TCA TC

Tabla 9: secuencias de los diferentes oligonucleótidos usados para la RT-PCR.

El diseño de los oligos es fundamental para obtener buenos resultados; la temperatura de *melting* debe estar entre 58 y 60°C y el tamaño del amplicón ha de estar siempre en las 50 y las 100 pb. La complejidad e invariabilidad de estos valores hace necesario el uso de programas informáticos para el diseño de oligos, en este caso se usó el programa Primer Express 3.0 de Applied Biosystems (Foster City, E.E.U.U.). Fuera de estos parámetros no se recomienda utilizar esta técnica. El alto contenido en G+C del género *Streptomyces* hace que en ciertas ocasiones el encontrar oligos con dichas características sea complicado si no imposible, como ocurrió en este trabajo en ciertas ocasiones.

La sensibilidad de esta técnica hace necesario que los experimentos se lleven a cabo en suficiente número para poder obtener valores estadísticos significativos. En este caso, cada muestra de RNA se extrajo por cuadruplicado y de cada una de estas muestras se realizaron tres reacciones de PCR para cada pareja de oligos. En el caso de los oligos de *hrdB* (este gen mantiene su nivel de transcripción estable durante todo el ciclo de crecimiento de la bacteria y se utiliza para normalizar los valores de expresión génica y poder compararlos entre dos cepas de *S. coelicolor*)(Pang et al., 2004), también se realizaron todas estas repeticiones.

3.13.- Soporte Informático para Secuencias de DNA y Proteínas:

Para el análisis de secuencias de DNA y amino ácidos se han utilizado los siguientes programas: GeneJockey II y AnnHyb (<http://bioinformatics.org/annhyb/>).

El programa BLAST (Altschul et al., 1997) del NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*. www.ncbi.nih.gov), de EXPASY (www.expasy.org) y de SANGER (www.sanger.ac.uk) se ha empleado para comparar el grado de similitud de secuencias de DNA y de proteínas con secuencias presentes en las bases de datos.

Para llevar a cabo alineamientos de secuencias de DNA y proteínas, se utilizó el CLUSTALW del EBI (*European Bioinformatics Institute*: www.ebi.ac.uk) (Higgins et al., 1994).

En lo que se refiere a las secuencia del genoma de *S. coelicolor* y sus anotaciones se usaron dos servidores: la StrepDB (<http://strepdb.streptomyces.org.uk>) (Bentley et al., 2002) y la *Streptomyces coelicolor* A3(2) Genome features + FUNcut annotations (<http://gbrowse.bioinfo.cnio.es/cgi-bin/gbrowse/SCO/>).

Predicciones *in silico* de dominios transmembrana: SOSUI (http://bp.nuap.nagoyau.ac.jp/sosui/sosui_submit.html, Mitaku et al., 2002).

Predicciones *in silico* de dominios conservados: Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>, Maglott et al., 2005). Predicciones de regiones reguladoras: NNPP (*Neural Network Promoter Prediction*. http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

3.14.- Purificación y Manejo de las Proteínas:

3.14.1.- Electroforesis de Proteínas en Geles de Acrilamida Desnaturalizantes (SDS-PAGE):

Se utilizaron geles de un 12% de acrilamida siguiendo el método descrito por Maniatis et al. (1989) y para la visualización de las mismas se utilizó la tinción con Commassie según Laemmli (1970).

3.14.2.- Purificación de Proteínas con *His-tag*

3.14.2.1.- Purificación de la proteína His-tag-ORF1 a partir del sistema E. coli BL21 pLysS/ pLV4306:

Se inoculó un precultivo de 30 ml de LB con células BL21pLysS con el plásmido pLV4302 que se dejó crecer a 37°C con fuerte agitación *overnight*. La mañana siguiente se diluyó el precultivo 1/25 v/v en LB líquido (500ml). El cultivo se incubó con fuerte agitación a 37°C hasta que este alcanzó una densidad óptica (D.O.) de 0.4, en este momento se enfrió el cultivo durante unos instantes en hielo para rebajar la temperatura y posteriormente se continuó la incubación a 30°C. Una vez la D.O. alcanzó los 0.6 se indujo la síntesis de la proteína en el cultivo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,5 mM por un periodo de 4 horas. Finalmente el cultivo se centrifugó para poder recoger las células.

Las células sedimentadas se resuspendieron en tampón de lavado (100mM Tris/ 500mM EDTA) y se procedió a la sonicación de las mismas con 6 pulsos de 15 segundos e intervalos de descanso entre uno y otro de 15 segundos. Para eliminar los restos celulares el cultivo sonicado se centrifugó en una centrífuga Sorvall RC6 plus, con un rotor SS-34 a 20000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se pasó por una columna con resina His-bind (Novagen. California, USA) cargada con níquel (para detalles ver manual del fabricante) previamente equilibrada con 10 volúmenes de tampón de lavado. Posteriormente la resina se lavó con 50 volúmenes de tampón de lavado con 17mM de imidazol y se eluyó la proteína a con 5 volúmenes de tampón de lavado con 350 mM de imidazol.

Los geles de proteínas mostraban que junto con la proteína de interés copurificaba otra proteína de un tamaño aproximado de 70 KDa, se decidió continuar con el proceso de purificación de la proteína utilizando cuentas magnéticas revestidas con Ni-NTA: Ni-NTA Magnetic Beads (Qiagen. Dusseldorf, Alemania). Para ello se equilibraron 50µl de Ni-NTA Magnetic Beads mediante dos lavados con 1 ml de solución de lavado. 1 ml de la solución de proteína desalada, se incubó con agitación suave durante 1 hora a 4°C. Utilizando un imán se recogieron las cuentas magnéticas con la proteína unida, posteriormente se lavaron las cuentas magnéticas 5 veces con 500µl de buffer de lavado con 17mM de imidazol. Finalmente se eluyó la proteína con solución de lavado con 350mM de imidazol y se desaló.

3.14.2.2.- Purificación de la proteína ORFI-His-tag a partir del sistema E. coli BL21 pLysS/ pLV4622:

La purificación se realizó de una manera similar a la realizada en el apartado anterior. En este caso la inducción se realizó con ramnosa a una concentración final de 0,2%. Tanto la calidad de la purificación como el rendimiento fueron satisfactorios y por tanto se optó por este método para la obtención de la proteína ORFI-His-tag.

3.14.2.3.- Purificación de la proteína His-tag-ORFD1 a partir del sistema E. coli BL21 pLysS/ pLV4831:

Se inoculó un precultivo de 30 ml de LB con células BL21pLysS con el plásmido pLV4831 que se dejó crecer a 37°C con fuerte agitación *overnight*. La mañana siguiente se diluyó el precultivo 1/25 v/v en LB líquido (500ml). El cultivo se incubó con fuerte agitación a 37°C hasta que este alcanzó una densidad óptica (D.O.) de 0.6, momento en el que se indujo la síntesis de la proteína en el cultivo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1,0 mM durante 4 horas. Finalmente el cultivo se centrifugó para poder recoger las células.

Los pasos posteriores de la purificación se llevaron a cabo de la misma manera que para la proteína ORFI, que se describe en el apartado anterior.

3.14.3.- Desalado de las Proteínas ORFI-His-tag y His-tag-ORFD1:

3.14.3.1.- Diálisis:

Para poder eliminar el imidazol de las soluciones que contenían las proteínas se optó en un primer momento por utilizar esta técnica. Se introdujo las muestras en bolsas de diálisis y se dejaron en 1 litro de solución de lavado sin imidazol. Al cabo de una hora se observó abundante precipitado que mostró ser de las proteínas de interés. Se probó a ir reduciendo paulatinamente la concentración de imidazol, dejando las bolsas en 1 litro de solución de lavado con concentraciones decrecientes de imidazol (200, 100 y 0 mM) , pero incluso así ambas proteínas precipitaban.

3.14.3.2.- Cromatografía de exclusión:

Al no ser posible la desalación de las muestras mediante diálisis, se probó una técnica alternativa: la cromatografía de exclusión. Para facilitar el proceso se usaron columnas pre-empaquetadas PD-10 (Amersham Biosciences. Londres, Reino Unido).

3.14.4.- Ensayos de Retardo en Gel (EMSA):

3.14.4.1.- Hibridación de la sonda:

La sonda marcada radioactivamente y purificada se incubó a 30°C durante 15 minutos con cantidades crecientes de proteína en tampón de unión estándar (Tris/HCl pH7,9 10mM, glicerol 5%, KCl 40mM, MgCl₂ 5mM, DTT 2mM).

3.14.4.2.- Resolución del retardo:

Las muestras se cargaron en geles PAGE del 4% ya precorridos durante una hora en 0,5X Tris-borato-EDTA (TBE) (Maniatis et al., 1989). El gel se corrió a 200 Voltios durante aproximadamente 3 horas. Posteriormente el gel se transfirió a un papel Whatmann mediante secado con calor y vacío. La lámina se dejó exponiendo durante la noche con una película de rayos-X.

3.14.5.- Ensayos de Protección a la DNasaI (“footprinting”).

En este caso la interacción DNA-proteína se mide por la capacidad de la proteína que se une al DNA de proteger la región a la cual se une del ataque de la enzima DNasa I. La protección se visualiza como una “huella” en el DNA que marca la zona a la que se unió la proteína de interés.

Las condiciones de reacción para el ensayo de protección a DNasa I fueron las mismas que para los ensayos de retraso. Tras incubar la proteína y la sonda radioactiva (ver: 2.2.3.1.-Marcaje de fragmentos con extremos 5' protuberantes) se añade DNasa I, previamente calibrada. Se considera como óptima la cantidad suficiente como para que cada molécula de DNA sea cortada por término medio una vez. Se dejó actuar 5 min a 37°C. La reacción se paró añadiendo EDTA hasta una concentración final de 25 mM. El DNA fue precipitado con acetato sódico 0,3 M y etanol frío. Las muestras fueron resuspendidas en tampón de carga desnaturizante (80% (v/v) formamida, 0,1 % (v/v) azul de bromofenol y 0,1% (v/v) xilencianol), separadas en un gel desnaturizante de poliacrilamida del 6 o del 15% (SDS-PAGE) y luego autoradiografiados. Como marcador de tamaño, se obtuvieron patrones utilizando la reacción química de secuenciación (G+A) con los mismos fragmentos de DNA que se utilizaron en el experimento.

3.15.- Cuantificación de la Producción de Actinorrodina:

La extracción de actinorrodina con potasa y posterior medición en el espectrofotómetro se llevó a cabo según las indicaciones de Kieser et al. (2000).

4.- RESULTADOS

4.1- Analisis Funcional del Regulador Específico de Ruta de *S. antibioticus*, ORFI.

4.1.1 Purificación de la Proteína ORFI:

Los datos preliminares que se disponían, permitieron determinar, mediante análisis de “retardos”, que el producto génico de *orfI*, fusionado a cola de histidinas, era funcional y, por tanto, capaz de interactuar en la región promotora del gen nativo de la PKS de *S. antibioticus*. Con la finalidad de analizar la región del promotor donde tenía lugar la interacción, se procedió a análisis mediante “footprinting”. Para asegurar rendimientos adecuados en la purificación de la proteína, se compararon dos construcciones del gen en plásmidos distintos: pLV4602 (*orfI*, clonado en el vector pET19b, con “his-tag” en el extremo amino terminal, y bajo el control del promotor *lacI* inducible por IPTG) y pLV4622 (*orfI*, clonado en el vector pJOE2775, con “his-tag” en el extremo carboxilo terminal, y bajo el control del promotor *ramR* inducible por ramnosa)

Ambos plásmidos se introdujeron por transformación en *E. coli* BL21 pLysS; los recombinantes se cultivaron en LB y los cultivos correspondientes se indujeron con 0,2% de ramnosa (recombinantes en pJOE2775) o con 1mM de IPTG (recombinante en pET19b). Tras la inducción se hicieron los extractos correspondientes y las proteínas se analizaron en geles de acrilamida (Figura 12). Los geles de acrilamida mostraron que el rendimiento del producto recombinante fue sensiblemente mejor cuando se expresó en pJOE2775 que en pET19b.

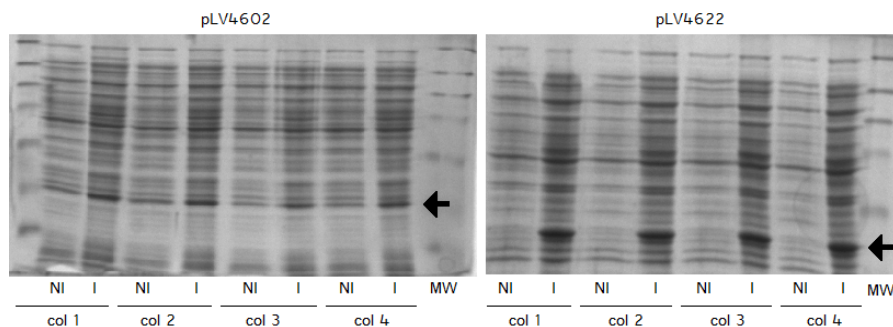


Figura 12: Panel izquierdo: ORFI expresado a partir de pET19b. Panel derecho: ORFI expresado a partir de pJOE2775. Las flechas señalan las proteínas de interés. NI: cultivo no inducido. I: cultivo inducido.

Para el procesamiento de los cultivos, las células se resuspendieron, en ambos casos, en buffer Q y las proteínas se purificaron de los extractos acelulares por cromatografía de afinidad en columna usando Ni-NTA inmovilizado en agarosa (QIAGEN). Los rendimientos obtenidos fueron muy pobres, por lo que se procedió a optimizar el proceso.

Tras numerosos ensayos se fijaron finalmente las siguientes condiciones óptimas de inducción: En el caso de la proteína obtenida a partir del plásmido pET19b, se indujo el cultivo con 0,5 mM de IPTG una vez que la D.O. alcanzó los 0,6. Para la proteína expresada en pJOE2775, las células se crecieron a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una D.O. de 0,4, y posteriormente se continuó la incubación a 30°C hasta alcanzar una D.O. de 0,6; punto en el que se indujo la expresión de la proteína con 0,2% de ramnosa. En ambos casos el periodo de inducción comenzó con una D.O. de 0,6 y se extendió durante 4 horas. Una vez transcurrido este tiempo, los extractos acelulares se resuspendieron en buffer W.

Los resultados muestran que la purificación utilizando el plásmido pJOE2775 (Figura 13B) fue también más eficiente que con pET19b (Figura 13A). Pese al mayor

rendimiento se aprecia la presencia de contaminantes que podrían falsear los datos que eventualmente se obtuvieran. Por ello se decidió realizar una purificación adicional para eliminar los contaminantes indeseables mediante una resina de *Ni-NTA magnetic beads* (QIAGEN) (Figura 14). Este segundo paso de purificación, permitió obtener una preparación de ORFI con un grado de pureza muy superior al obtenido en el paso previo.

4.1.2.- Ensayos de Actividad de Retardo en Gel (EMSA) y “*footprinting*” de ORFI:

Los datos de que se disponían permitieron establecer que la proteína recombinante en ambos vectores era funcional. Con la proteína suficientemente purificada y con una concentración adecuada, se procedió a determinar si ésta aún retenía la actividad biológica, como paso previo a los ensayos de “*footprinting*”; con este fin se hicieron los retardos en geles que se describen a continuación. Los retardos se hicieron tal como se indica en Materiales y Métodos, utilizando como sonda la región promotora de la Poliquétido Sintasa Mínima que precede a ORF1 (Colombo et al., 2001); corresponde al promotor del policistrón codificante de los “genes tempranos” del poliquétido de *S. antibioticus*.

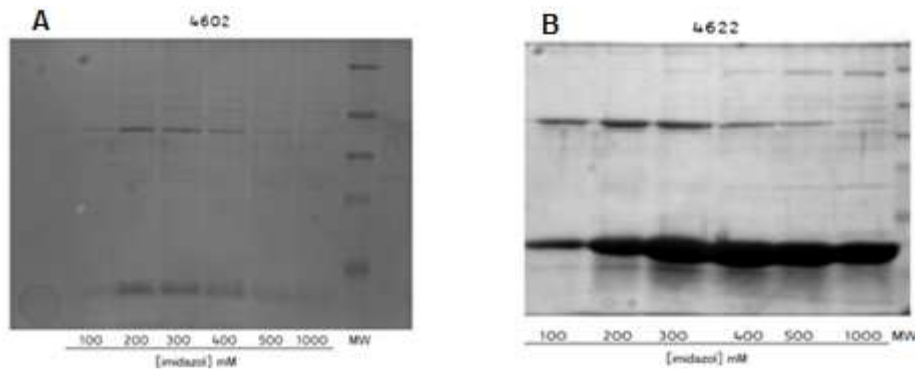


Figura 13A: ORFI expresado a partir de pET19b; la proteína fue purificada con Ni-NTA agarosa y eluida a concentraciones crecientes de imidazol. **Figura13B:** ORFI clonado en pJOE2775 purificada con Ni-NTA agarosa y eluida a concentraciones crecientes de imidazol

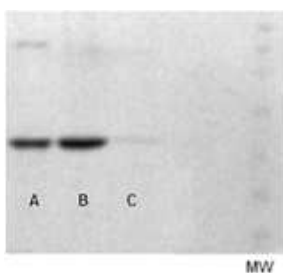


Figura14: Purificación con “*Ni-NTA magnetic beads*” de ORFI, expresada a partir del recombinante en el vector pJOE2775; se utilizaron dos colonias distintas. A: purificación inicial; B: purificación adicional, primera fracción después de elución; C: purificación adicional, segunda fracción después de elución.

Los resultados de los análisis de retardos, se presentan en la Figura 16 donde se observa una unión cooperativa de la proteína a la región promotora. Se utilizaron concentraciones crecientes de ORFI (de 20 nM a 400 nM en la Figura 15A y 400 nM en la Figura 15B); tras un periodo de incubación proteína/DNA de 20 minutos a 30°C, el producto de la reacción se cargó en un gel de acrilamida. La especificidad de la unión se muestra por reacción de competencia al añadir concentraciones crecientes de DNA no marcado.

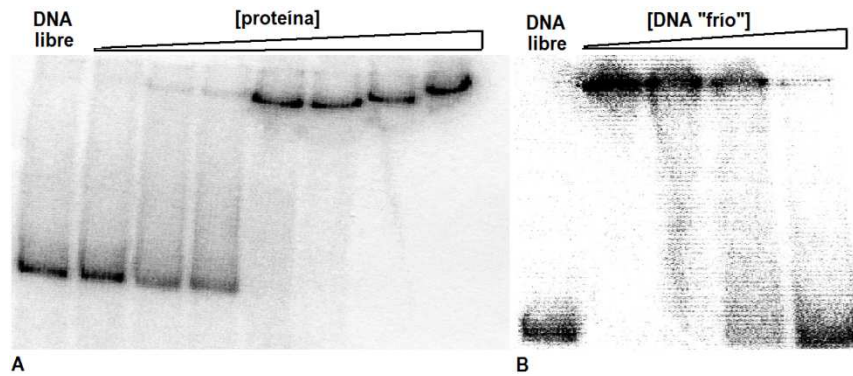


Figura 15: Análisis mediante EMSA de ORF1 incubada en concentraciones crecientes con una sonda de la región promotora de ORF1 marcada radioactivamente (A) y en concentraciones crecientes de sonda no marcada (DNA frío específico) (B).

Posteriormente se procedió a realizar el “*footprinting*”. Para la reacción de secuenciación se usó el método Sanger. Los resultados no fueron concluyentes al no obtener una zona de protección marcada. Cabe la posibilidad de que al igual que ocurre con ActII-ORF4 y con el regulador específico de la daunorubicina la unión sea intermitente (con la proteína uniéndose y soltándose a intervalos cortos) y no permita obtener unos resultados claros (Arias et al., 1999 y Stutzman-Engwall, 1992 respectivamente).

4.2.-Análisis Funcional del Regulador de Respuesta De *S. antibioticus*, ORFD1.

4.2.1.- Purificación de la Proteína ORD1.

Se disponía del gen *orfD1* que se había clonado en el plásmido pET19b, para obtener la fusión de ORFD1 con cola de histidina en el extremo C terminal. La funcionalidad del gen ORFD1-his en el plásmido recombinante pLV4331, se confirmó por transformación en *S. coelicolor* FJ1 conteniendo el plásmido pLV4853 (*orfI*, regulador específico de ruta, clonado en pIJ486 y bajo el control de su propio promotor). La cepa recombinante fue capaz de complementar la mutación puntual del regulador específico de la ruta de actinorrodina y complementar a fenotipo productor. Por tanto la complementación observada en la cepa recombinante confirmó que el gen ORFD1-his era funcional (López-Vázquez, 2003); con ello se procedió a la purificación de la proteína.

El plásmido se transformó en *E. coli* BL21 pLysS y se indujo con 0,5 mM de IPTG y se purificó con Ni-NTA inmovilizado en agarosa. Aunque la proteína se purificó satisfactoriamente, el rendimiento fue muy bajo (datos no mostrados); por ello, se utilizó una concentración mayor de IPTG para incrementar la inducción de la proteína en el cultivo. El aumento en la concentración de la proteína fue notable aunque se observaba la presencia de otras proteínas contaminando la preparación. Por ello se procedió a una segunda purificación (Figura 16A). Una vez más se utilizaron “*Ni-NTA magnetic beads*”, siendo el resultado satisfactorio (Figura 16B).

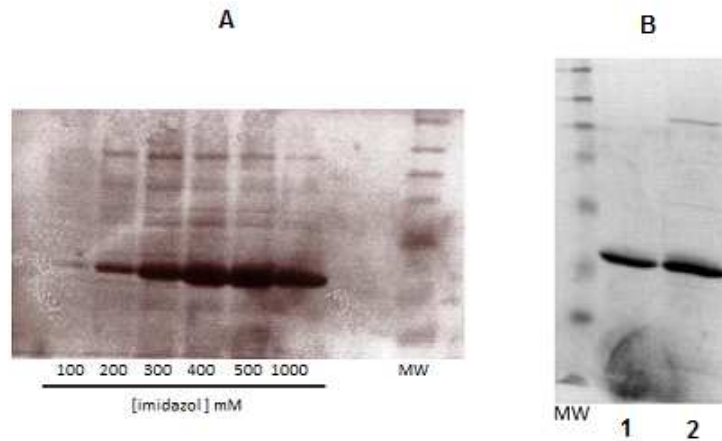


Figura 16: (A): Purificación de ORFD1-his en columna. Cultivo inducido a 1,0 mM IPTG y fracciones eluidas a concentraciones crecientes de imidazol; (B): 1.-Purificación inicial de ORFD1. 2.- Purificación adicional de ORFD1 con “Ni-NTA Magnetic Beads” y eluído a 400mM de imidazol.

4.2.2.- Ensayos de Actividad de ORD1-his por Retraso en Gel (EMSA) y “footprinting”.

Ya obtenida una proteína suficientemente pura y con una concentración adecuada, se procedió a determinar la actividad biológica como paso previo a los ensayos de “footprinting”; Primero se procedió a seleccionar como sonda la región promotora del gen regulador específico de ruta, *ORFI*. Con el correspondiente DNA se llevaron a cabo los ensayos de EMSAs, de una manera similar a la descrita para la proteína ORFI: incubaron entre 0,285 μ M y 2,85 μ M de proteína con la sonda). Los resultados mostraron la unión de ORFD1-his a la región promotora de *orfI*. (Figura 17)

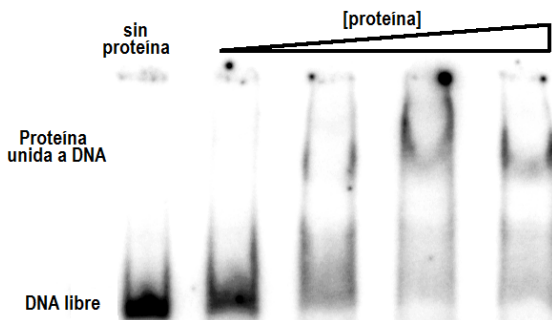


Figura 17: Ensayo de EMSA de ORFD1-his, frente la región promotora de *orfI* como sonda

Una vez comprobado que la proteína purificada tenía actividad y que se unía a la región promotora de *orfI*, se procedió a analizar, a nivel molecular, la zona de unión de ORFD1. A tal fin se llevaron a cabo los “footprinting” necesarios, tal como se indica en Materiales y Métodos; los resultados (Figura 18) mostraron una región de protección de aproximadamente 40 pb., que coincidía con unas de las posibles zonas de regulación predichas por el programa informático NNPP (*Neural Network Promoter Prediction*: www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) (Figura 19) (Reese, 2001). Un análisis en mayor profundidad de la secuencia reveló la presencia de cuatro tetrámeros con dos secuencias distintas (TCAT y CGAT) organizados de la siguiente manera (en mayúsculas la secuencias de los tetrámeros y en minúsculas las bases entre los grupos): TCAT acaa CGAT tctg CGAT gc TCAT.

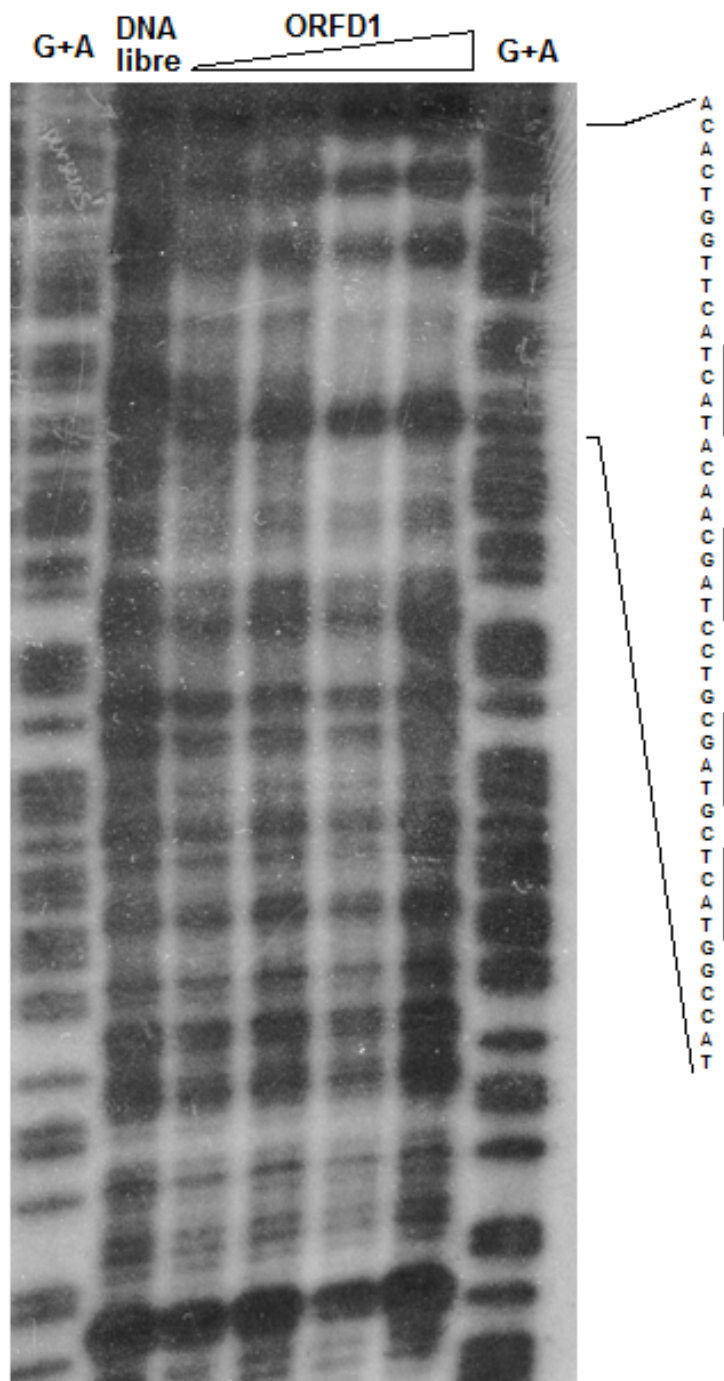


Figura 18: Ensayos de "footprinting" de la proteína ORFD1-his.

(A): Zona protegida en “footprinting”:
 CGCCGCGCTGCGTCTCGCCGGGGAGGAGGACGCCGGACCCTCACATCGTCCGGGGGATC
 GATTGATGGCCCTTGGATGAGTGTGTCAGGTGAGCGGGTGTGAATAATTCATGCCCGCTCAT
 GCCGGGCACACTGGTTCATCATACAACGATCCTGCGATGCTCATGGCCATCGAAATCGATGT
 TCTGGGACCACTTGGAGCACGAGTAAACGGCCTGTTCGATCGTCCCCTGACTGCCGGAAAACCC
 GGCAGATCCTGGCGCTGCTCGCG

(B): Zona promotora predicha: (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)

Score 0.57
 CGCCGCGCTGCGTCTCGCCGGGGAGGAGGACGCCGGACCCTCACATCGTCCGGGGGATC
 GATTGATGGCCCTTGGATGAGTGTGTCAGGTGAGCGGGTGTGAATAATTCATGCGCGCTCAT
 GCCGGGCACACTGGTTCATCATACAACGATCCTGCGATGCTCATGGCCATCGAAATCGATGT
 TCTGGGACCACTTGGAGCACGAGTAAACGGCCTGTTCGATCGTCCCCTGACTGCCGGAAAACCC
 GGCAGATCCTGGCGCTGCTCGCG

Score 0.35
 CGCCGCGCTGCGTCTCGCCGGGGAGGAGGACGCCGGACCCTCACATCGTCCGGGGGATC
 GATTGATGGCCCTTGGATGAGTGTGTCAGGTGAGCGGGTGTGAATAATTCATGCCCGCTCAT
 GCCGGGCACACTGGTTCATCATACAACGATCCGCGATGCTCATGGCCATCGAAATCGATGT
 TCTGGGACCACTTGGAGCACGAGTAAACGGCCTGTTCGATCGTCCCCTGACTGCCGGAAAACCC
 GGCAGATCCTGGCGCTGCTCGCG

Figura 19: Letras en negro: región promotora de *ORF1*. Letras en verde: zona de protección en el caso del “footprinting” y región promotora predicha en el caso del análisis informático. Letras en azul: región codificante del *ORF1*. Letras en negro subrayadas: posibles secuencias reconocidas por la proteína. Letras con fondo azul: ATG, inicio de traducción. Letras con fondo rojo: inicio de transcripción predicha *in silico*.

4.3.- Análisis de Expresión Genica en el Contexto del Metabolismo Global de *S. coelicolor*

4.3.1.- Análisis de Expresión Génica en Pares de Recombinantes Utilizando Arrays de DNA

Dado que *S. antibioticus* no es un Actinomiceto susceptible de manipulación genética, hemos abordado la expresión génica de los reguladores en condiciones de expresión heteróloga. Para ello se han obtenido una serie de recombinantes en *S. coelicolor* JF1, a partir de los reguladores clonados de *S. antibioticus*. Nuestro ánimo va orientado a caracterizar la activación del proceso biosintético para el poliquétido de *S. coelicolor* actinorrodina, en respuesta a la activación del regulador de respuesta y el específico de ruta de *S. coelicolor*. La activación del *cluster* biosintético nos proporcionaría una visión general del estado metabólico de la bacteria en las diferentes condiciones a estudiar y el efecto en el metabolismo global de la bacteria.

La cepa de *S. coelicolor* JF1 (Feitelson y Hopwood, 1983) posee mutaciones puntuales en los reguladores específicos de ruta de la actinorrodina (*actII-ORF4*) y la prodigiosina (*redD*), pero mantiene intactos todos los genes estructurales de ambos *clusters*. La mutación puntual de *actII-ORF4* en *S. coelicolor* JF1 determina una proteína que, manteniendo la capacidad de unión a promotores de los genes estructurales del *cluster act*, es incapaz de iniciar transcripción (Arias et al., 1999). Esta cepa, carece de la pigmentación característica de *S. coelicolor* y por ello es fácil identificar los fenotipos productores que eventualmente se generen al obtener los correspondientes recombinantes con los genes de *S. antibioticus orf1*, *orfD1* y *orfD2*. La aplicación de la tecnología Genómica mediante el uso de *arrays* de DNA, nos ofrece la posibilidad de comprobar los efectos globales que la expresión de estos genes puede

tener no solo en los genes estructurales del *cluster* de biosíntesis de la actinorrodina sino también en el conjunto del metabolismo de la bacteria.

Se construyeron una serie de cepas recombinantes de *S. coelicolor* JF1, con los genes reguladores de *S. antibioticus*. Para los correspondientes análisis se obtuvieron las siguientes cepas:

1. *S. coelicolor* **JF1/pSET152**: mutante de *S. coelicolor* con el vector integrativo usado para la obtención de recombinantes; el análisis genético servirá de como control para las cepas recombinantes en las que los correspondientes genes hayan sido clonados en este vector (en adelante **Cepa 1**).
2. *S. coelicolor* **JF1/pHJL401**: mutante de *S. coelicolor* con el vector replicativo pHJL401, utilizado para clonar alguno de los genes reguladores. En el análisis genético se utilizará como control de aquellas cepas donde los reguladores se hayan clonado en este vector (en adelante **Cepa 2**).
3. *S. coelicolor* **JF1/pLV4303**: mutante de *S. coelicolor* con el vector replicativo pHJL401 que contiene el regulador específico de ruta de *S. antibioticus*, *ORFI*, con su propia región promotora, de tal forma que solo se expresa si está presente el sistema de dos componentes ORFD1/ORFD2. Esta cepa no posee el sistema de dos componentes que activa la expresión del gen *ORFI*, con lo que el análisis genómico de esta cepa no debería mostrar ningún gen expresado diferencialmente, a excepción de aquellos imputables al vector en sí mismo (en adelante **Cepa 3**).
4. *S. coelicolor* **JF1/pLV4812**: mutante de *S. coelicolor* con el vector integrativo pSET152 que contiene el sistema de dos componentes de *S. antibioticus* *ORFD1/ORFD2* clonado con un promotor constitutivo. El análisis genómico de esta cepa mostrará sobre qué genes actúa ORD1/ORFD2 en *S. coelicolor* (en adelante **Cepa 4**).
5. *S. coelicolor* **JF1/pLV4303/pLV4812**: mutante de *S. coelicolor* con los vectores pHJL401 y pSET152 clonados con *orfI* y *orfD1/orfD2* respectivamente. En esta cepa se expresa el sistema de dos componentes y por lo tanto también se expresa el regulador específico de ruta, el cual induce la síntesis de actinorrodina. El análisis genómico de esta cepa mostrará qué genes están bajo el control de regulador específico de ruta, el sistema de dos componentes y el posible efecto debido a la biosíntesis de antibiótico (en adelante **Cepa 5**).
6. *S. coelicolor* **JF1/pSET152/pHJL401**: mutante de *S. coelicolor* con los vectores pHJL401 y pSET152 utilizados para clonar alguno de los genes reguladores. En el análisis genético se utilizará como control de aquellas cepas donde los reguladores se hayan clonado en estos vectores y estén ambos presentes (en adelante **Cepa 6**).

De las distintas Cepas se inocularon 10^7 esporas en 50 ml de R5 líquido, que se incubaron a 30°C durante 48 horas y se hicieron cuatro extracciones de RNA por cepa utilizando el método “kirbeasy”. Posteriormente, se hibridaron cuatro cristales de *arrays* de DNA por cada experimento utilizando un total de 20 *arrays*; en todos los casos se analizaron los resultados obtenidos en las hibridaciones en parejas de Cepas, utilizando una de ellas como control para determinar los posibles efectos en la expresión génica del recombinante a analizar.

La Figura 20 muestra estos experimentos de una forma más gráfica, y el fenotipo productor/no productor de actinorrodina.

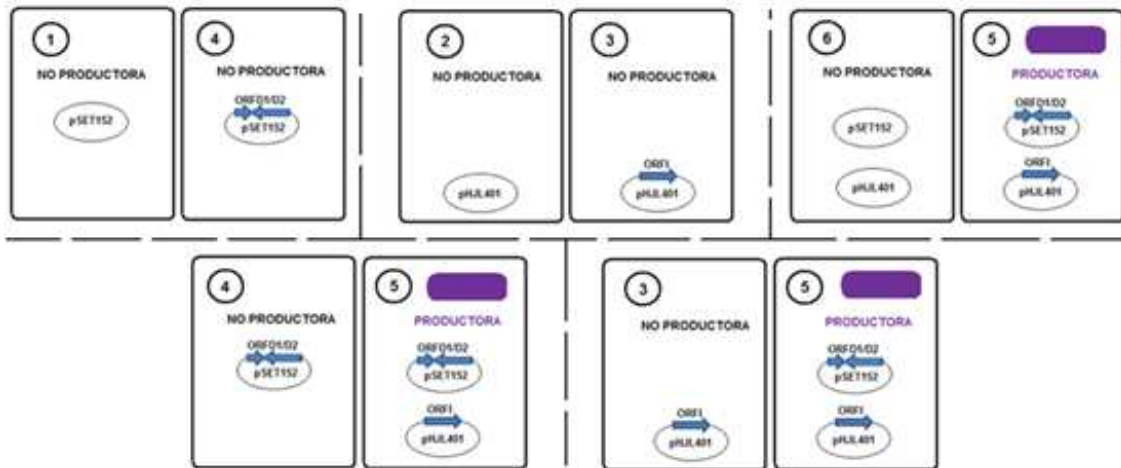


Figura 20: Representación gráfica de las parejas de las cepas usadas en las combinaciones correspondientes de los distintos análisis. El pSET152 a pesar de ser integrativo se representa como independiente. El rectángulo púrpura muestra las cepas productoras de actinorrodina.

- **Cepa 1 frente a Cepa 4:** El análisis comparativo de esta pareja nos permite determinar las variaciones en la expresión génica imputable al regulador de respuesta. Al comparar la expresión génica de ambas cepas, los genes activados únicamente por el plásmido son sustraídos, permitiendo ver el efecto del sistema de dos componentes en la expresión génica global.
- **Cepa 2 frente a Cepa 3:** La comparativa del análisis de estas dos cepas nos permitirá determinar la expresión génica que pudiera ser inducida por la presencia del regulador específico de ruta; en este caso se ha de señalar que el gen, con su propio promotor, no es capaz de activar los genes estructurales del *cluster act*.
- **Cepa 6 frente a Cepa 5:** Esta combinación en los análisis permite determinar el efecto que en el metabolismo global tiene lugar como consecuencia de la expresión del conjunto de los dos tipos de reguladores (específico de ruta y regulador de respuesta); la Cepa 6 permitirá filtrar aquellos genes cuya expresión pudiera ser imputable a uno u otro de los vectores utilizados en las construcciones de los reguladores.
- **Cepa 4 frente a Cepa 5:** Puesto que la Cepa 5 es productora, el control superpuesto de la Cepa 4 permitirá cribar aquellos genes cuya expresión pudiera estar inducida exclusivamente por el regulador de respuesta y analizar aquellos cuya expresión pueda ser imputable al específico de ruta que, en este caso, es activo porque su transcripción se induce por el regulador de respuesta.
- **Cepa 3 frente a Cepa 5:** En este par de recombinantes, el regulador específico de ruta constituye la base para el cribado de aquellos genes que eventualmente pudieran ser activados por la expresión basal (si la hubiere) del regulador específico de ruta.

A la hora de procesar los datos obtenidos con *arrays* de DNA es necesario discernir de la lista total de genes presentes en el *array* cuáles de ellos están siendo expresados diferencialmente. Uno de los valores estadísticos que se utilizan con este fin es el “p-valor”, el cual indica la probabilidad de que la expresión diferencial de un gen haya ocurrido por azar o por las condiciones experimentales establecidas, de tal forma que cuanto menor sea el “p-valor”, más probabilidad hay de que la variación en la expresión de cierto gen sea debida a las condiciones experimentales. Está generalmente

aceptado un p-valor de 0,05 como satisfactorio, ya que indica que solo un 5% de los genes expresados diferencialmente son falsos positivos. Alternativamente el logM, del que se obtiene el “*fold change*” también nos permite acotar los resultados obtenidos; se considera que una variación del logM superior a +0,5/-0,5 es significativa. En ocasiones es necesario variar ambos valores ya que seguir estrictamente esas acotaciones puede llevar a obtener una cantidad excesiva de genes expresados diferencialmente.

Siguiendo el criterio anterior y, tal como se esperaba en la comparativa de las Cepas 2 frente a 3, no se encontraron diferencias significativas en la expresión génica entre una y otra. Para resaltar este hecho, se ha establecido un p-valor excesivamente alto como sesgo para mostrar que incluso así apenas se encuentran variaciones en la expresión génica. En el resto de los análisis de *arrays* los resultados variaron de unos experimentos a otros en función del p-valor y el logM utilizados (Tabla 10)

Exp.	p-valor		logM		p-valor y logM	
	p-valor	Nº de genes	logM	Nº de genes	p-valor logM	Nº de genes
Cepas 1-4	0,03	103	>0,5 <-0,5	184	0,03 >0,5 <-0,5	63
Cepas 2-3	0,5	1	>0,5 <-0,5	1	0,5 >0,5 <-0,5	1
Cepas 6-5	0,01	63	>0,5 <-0,5	211	0,01 >0,5 <-0,5	63
Cepas 4-5	0,05	121	>1,0 <-1,0	155	0,05 >1,0 <-1,0	68
Cepas 3-5	0,005	104	>0,9 <-0,9	113	0,005 >0,9 <-0,9	71

Tabla 10: Se muestran los diversos valores utilizados en los experimentos como sesgo. Con éstos límites se construyeron las diferentes tablas de genes que se mostrarán más adelante. Exp.: experimento.

A continuación se muestran ciertos genes de especial interés y una serie de tablas con grupos de genes expresados diferencialmente de manera significativa en los diferentes experimentos. La lista con la totalidad de genes obtenidos se puede consultar en el Anexo 2:

Cepa 1 frente a Cepa 4 (pSET152 frente a ORFD1/ORFD2). Muestra los genes activados debido a la activación imputable al sistema de dos componentes tras sustraer la expresión de los genes imputables al vector. En las Tablas 11, 12 y 13 se resumen los más representativos:

- Genes con función reguladora:
 - Los genes de **SCO0166 a SCO0179**, son un grupo heterogéneo, con multitud de proteínas reguladoras e hipotéticas que no han sido previamente caracterizadas. Destacan varios posibles reguladores del estrés “universal” y osmótico, así como una deshidrogenasa dependiente de zinc relacionada con el metabolismo de azúcares para nucleótidos

(<http://strepdb.streptomyces.org.uk>), el gen regulador SCO0168 presenta un “*fold change*” alto: 7,5 (en la Tabla 11, aparecen únicamente los genes con función reguladora: SCO0166, SCO0168 y SCO0174). En todos los casos las anotaciones de los genes se basan únicamente en similitud de secuencia, lo que dificulta estimar su implicación e importancia en el contexto de la expresión génica.

- Otros 4 genes reguladores de diversa naturaleza aparecieron expresados diferencialmente (Tabla 11), entre ellos un regulador de respuesta de la familia lux-R.
- *wblC* y *wblE* (SCO5190 y SCO5240 respectivamente), el primero está activado mientras el segundo está reprimido. Estos genes se encontraron por su similitud a *whiB* (wbl: acrónimo de *WhiB like protein*, en inglés) y mostraron un dominio de unión a DNA hélice-giro-hélice (HTH) y una serie de residuos cisteína muy conservados, lo que llevó a pensar en que podrían estar relacionados con la regulación del estrés oxidativo de una manera similar a como lo hace OxyR en *B. subtilis* (Soliveri et al., 2000). Esta familia de proteínas se ha encontrado únicamente en miembros del género de los actinomicetos ricos en G+C. Tirumalai et al. (2006) halló ortólogos de *wbl* en *Mycobacterium smegmatis* y mediante mutagénesis dirigida vieron que dichos residuos cisteína eran esenciales para la actividad de la proteína, pero que variaciones en el estado redox no inducían un cambio en la conformación del polipéptido; tinciones con hierro sugieren que estas proteínas podrían estar uniendo hierro. *whcE* un ortólogo de *wblE* en *Corynebacterium glutamicum* juega un papel importante en la supervivencia de la bacteria tras sufrir estrés oxidativo (Kim et al., 2005) (Tabla 11).
- **SCO1935 a SCO1942:** Representan una serie de genes pertenecientes a la glicólisis y la ruta de la pentosa fosfato (su función parece estar relacionada con la generación de agentes reductores como el NADP y ribosa-5-fosfato para la síntesis de nucleótidos); en este caso están siendo reprimidos. La glucosa-6-fosfato es una enzima de la fase oxidativa de la ruta de la pentosa fosfato, relacionada con el estrés oxidativo, ya que es reductora (Hahn et al., 2002). Junto a este grupo de genes aparecieron otros también relacionados con el metabolismo de la glucosa (Tabla 12).
- *ahpC* (SCO5032): está siendo reprimido. Este gen, que codifica una alquil hidroperóxido reductasa, forma un operón junto con *ahpD* (SCO5031) y *oxyR* (SCO5033). *ahpD* y *ahpC* forman un policistrón regulado positivamente por OxyR (Hahn et al., 2002).(Tabla 13)

Resultados

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj. p value	ProbelD	description
8,26	-0,97	-1,9588406	0,00006577	0,0244904	SCO0166	putative regulator
11	-2,92	-7,56846117	0,00001344	0,0244904	SCO0168	possible regulator protein
10,43	-0,82	-1,76540599	0,00012738	0,02530085	SCO0174	putative DNA-binding protein
9,94	-1,05	-2,07052985	0,00072375	0,04810184	SCO0204	probable luxR family two-component response regulator
9,01	-0,78	-1,71713087	0,00043536	0,04002358	SCO4159	transcriptional regulatory protein
10,16	0,76	1,69349062	0,0002872	0,03302814	SCO6334	putative transcriptional regulator
9,72	-0,75	-1,68179283	0,00001068	0,0244904	SCO7306	regulatory protein
11,23	0,73	1,65863909	0,00004803	0,0244904	SCO5190	wblC putative DNA-binding protein
11,47	-1,11	-2,15845647	0,00055056	0,04324274	SCO5240	wblE, hypothetical protein

Tabla 11: Proteínas reguladoras expresadas diferencialmente.

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj. p value	ProbelD	description
9,6	-0,7	-1,62450479	0,00050459	0,04324274	SCO1935	tktA1, probable transketolase (RPP)
10,29	-0,51	-1,62450479	0,00013593	0,02609815	SCO1936	putative transaldolase
10,48	-0,69	-1,61328352	0,00001148	0,0244904	SCO1937	zwf2, probable glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (RPF)
9,33	-1,11	-2,15845647	0,00006801	0,0244904	SCO1942	pgi2, glucose-6-phosphate isomerase (GLI)
9,71	-0,78	-1,71713087	0,00077536	0,0499721	SCO3877	putative 6-phosphogluconate dehydrogenase (RPF)
9,45	-1	-2	0,00038492	0,03656413	SCO5423	pyruvate kinase (GLI)
9,82	-0,85	-1,80250093	0,00028861	0,03302814	SCO6658	probable 6-phosphogluconate dehydrogenase (RPF)
9,44	-1,35	-2,54912125	0,00008521	0,0244904	SCO6659	pgi, glucose-6-phosphate isomerase (GLI)
10,2	-0,71	-1,63580412	0,00062444	0,04495587	SCO6661	zwf, probable glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (RPF)
9,87	-0,69	-1,61328352	0,00015406	0,02639254	SCO7000	idh, isocitrate dehydrogenase (GLI)

Tabla 12: Genes relacionados con el metabolismo de la glucosa expresados diferencialmente. RPF: ruta de la pentosa fosfato. GLI: glicólisis. En verde: gen con un p-valor y un fold change próximo a los valores de corte pero aún significativo.

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj. p value	ProbelD	description
11,08	-1,04	-2,05622765	0,00024748	0,03121541	SCO0200	unknown, related to "stress endurance"
9,03	-1,17	-2,25011697	0,00010685	0,02530085	SCO5032	ahpC, alkyl hydroperoxide reductase

Tabla 13: Genes relacionados con el estrés oxidativo expresados diferencialmente.

Cepa 6 frente a Cepa 5 (pSET152+pHJL401 -vectores control- frente a ORFD1/ORFD2+ORFI). Muestra el efecto del regulador específico de ruta, el sistema de dos componentes y la activación de la ruta biosintética para el antibiótico actinorrodina, tras haber sustraído los genes controlados por los plásmidos en los que están clonados estos genes):

Se observa una expresión diferencial de los siguientes genes:

- **SCO5071-SCO5092** (ver Tabla 14): genes codificantes del *cluster* biosintético de la actinorrodina. Todos los genes del *cluster* de la actinorrodina están sobreexpresados. Estos genes constituyen un control interno, ya que permite apreciar la producción del antibiótico actinorrodina (visible por su fuerte color azulado) y su correlación con la inducción de la expresión de los genes estructurales. Lo más destacable de estos resultados es la inesperada activación del regulador específico de ruta de *S. coelicolor*, *actIII-orf4* (SCO5085). La activación observada sugiere una “retroalimentación” positiva del regulador concomitante a la activación del conjunto de los genes del *cluster*.
- **SCO3211-SCO3249** (Tabla 15): 16 de los 38 genes del *cluster* de biosíntesis del CDA aparecen reprimidos. Es difícil establecer si la represión de estos genes es significativa, ya que no son ni la mitad de los genes del *cluster* y algunos de ellos no tienen función establecida.
- **sodF2 (SCO0999), sodF (SCO2633) y sodN (SCO5254)**: *S. coelicolor* posee tres genes que codifican para superóxido dismutasas en su genoma. Estas metaloproteínas, catalizan la conversión del superóxido en peróxido de hidrógeno que posteriormente es inactivado por la catalasa. Dos de ellas (SodF1 y SodF2) utilizan Fe como cofactor, mientras que SodN usa níquel. (Tabla 16).
- **catA (SCO0379)**: catalasa. Enzima que cataliza la transformación del peróxido de hidrógeno producido por las superóxido dismutasas en hidrógeno y oxígeno. (Tabla 16).
- **bioB (SCO1244) y bioA (SCO1245)**: codifican para una biotina sintasa y una aminotransferasa respectivamente que junto con *bioD* (SCO1246) y *bioF* (SCO1243) sintetizan el cofactor biotina. Esta vitamina es necesaria en el metabolismo de los ácidos grasos y como era de esperar, en la biosíntesis de los poliquétidos ya que funciona como cofactor de la acetil-CoA carboxilasa (Rodríguez et al., 2001). En este caso estos genes se encuentran reprimidos y los genes *bioC* y *bioF* no parecen estar expresados diferencialmente (Tabla 17). Es paradójico que las enzimas encargadas de proveer un cofactor necesario para la biosíntesis de los poliquétidos estén siendo reprimidas a nivel transcripcional.
- **SCO4920, accA2 (SCO4921) y pccB (SCO4926)**: codifican para un represor de la familia DeoR, una acetil-CoA carboxilasa y una propionil-CoA carboxilasa respectivamente. Las acetil-CoA carboxilasas y las propionil-CoA carboxilasas catalizan la carboxilación del acetil-, propionil- y butiril-CoA para proporcionar malonil-, metilmalonil- y etilmalonil-CoA respectivamente (Diakovich et al., 2002). Esta reacción de carboxilación suministra unidades de extensión importantes para la biosíntesis de ácidos grasos y poliquétidos. (Tabla 17)
- **phoR/phoP (SCO4229/SCO4230)**: sistema de dos componentes relacionado con la regulación del metabolismo del fosfato. Se ha descrito que su delección muestra un fenotipo sobreproductor de actinorrodina (Sola-Landa et al., 2003). Junto con este sistema de dos componentes y *actIII-ORF4* hay tres genes reguladores más (Tabla 18).

Resultados

logSignal (A)	logRatio (M)	Fold Change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
9,78	4,28	19,4271182	0,00000121	0,00065331	SCO5071	ORFA hydroxylacyl-CoA dehydrogenase
11,41	1,92	3,78423059	0,00004862	0,00807909	SCO5072	ORF1 hydroxylacyl-CoA dehydrogenase
10,06	3,32	9,98664439	0,00002641	0,00563328	SCO5073	ORF2, possible oxidoreductase
10,34	4,99	31,7789599	0	0,0000222	SCO5074	possible dehydratase
11,47	0,96	1,94530989	0,00000796	0,00237007	SCO5076	actVA1, probable integral membrane protein
9,71	3,29	9,78112222	0,00000134	0,00068142	SCO5077	actVA2, hypothetical protein
10,85	2,88	7,3615012	0,00004077	0,00733803	SCO5079	actVA4, conserved hypothetical protein
10,73	2,03	4,0840485	0,00000017	0,00026071	SCO5080	actVA5, possible hydrolase
9,7	3,03	8,16809701	0,00002837	0,00597914	SCO5081	actVA6, hypothetical protein
6,89	1,19	2,28152743	0,00004609	0,00788545	SCO5082	actII-1, probable transcriptional regulatory protein
8,79	2,42	5,35171022	0,00000812	0,00237707	SCO5083	actII-2, probable actinorhodin transporter
8,31	2,67	6,36429187	0,00000176	0,00082143	SCO5084	actII-3, putative membrane protein,
9,36	3,75	13,4543426	0,00000059	0,00054019	SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein
10,6	2,65	6,27667278	0,00041805	0,02501259	SCO5086	actIII, ketoacyl reductase
10,98	1,56	2,94853843	0,00017771	0,01677156	SCO5087	actIORF1, act polyketide beta-ketoacyl synthase alpha subunit
11,46	0,8	1,74110113	0,00002223	0,00491375	SCO5088	actIORF2, act polyketide beta-ketoacyl synthase beta subunit
11,06	3,11	8,63382589	0,00005135	0,00845042	SCO5089	actIORF3, act polyketide synthase acyl carrier protein
9,52	4,2	18,3791737	0,00000329	0,00126323	SCO5090	actVII, act polyketide synthase bifunctional cyclase/dehydratase
10,06	3,13	8,75434961	0,00000639	0,0019457	SCO5091	actIV, cyclase
9,31	4,92	30,2738447	0,00000022	0,00026703	SCO5092	actVB, actinorhodin polyketide possible dimerase

Tabla 14: Genes del *cluster* de biosíntesis de la actinorrodina expresados diferencialmente. En verde: gen con un p-valor y un fold change próximo a los valores de corte pero aún significativo.

Resultados

logSignal (A)	logRatio (M)	Fold Change	p value	adj, p value	ProbelD	Description
9,74	-0,54	-1,45397252	0,00354456	0,08312357	SCO3211	putative indoleglycerol phosphate synthase
8,86	-0,77	-1,70526978	0,00125086	0,04484401	SCO3216	putative integral membrane ATPase
9,65	-0,46	-1,37554182	0,0008062	0,03627881	SCO3217	cdaR, transcriptional activator protein
11,03	-0,88	-1,8403753	0,00001287	0,00347388	SCO3218	small conserved hypothetical protein
10,19	-0,69	-1,61328352	0,00037499	0,02364687	SCO3221	probable oxidoreductase
7,96	-0,97	-1,9588406	0,00005912	0,00937204	SCO3224	probable ABC transporter ATP-binding protein
8,03	-1,07	-2,09943337	0,00005706	0,00912937	SCO3229	probable 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase
7,94	-0,96	-1,94530989	0,00005334	0,00861456	SCO3230	cdaPSI, CDA peptide synthetase I
9,67	-0,37	-1,29235283	0,00298808	0,07495622	SCO3233	probable hydrolase
10,35	-1,08	-2,11403608	0,0002907	0,02153963	SCO3235	probable ABC transporter
9,76	-1,68	-3,20427951	0,00000242	0,00101292	SCO3236	possible oxygenase
7,14	-0,73	-1,65863909	0,00397353	0,08855777	SCO3237	unknown
8,13	-0,91	-1,8790455	0,00016697	0,0160288	SCO3239	unknown
9,29	-0,63	-1,54756499	0,00041253	0,02483778	SCO3241	possible isomerase
10,57	-0,53	-1,4439292	0,00183245	0,05546208	SCO3244	putative secreted protein
12,52	0,34	1,26575659	0,00104003	0,04093773	SCO3248	fabF3, probable 3-oxoacyl-[acyl carrier protein] synthase II

Tabla 15: Genes del *cluster* de biosíntesis del CDA expresados diferencialmente. En verde: gen con un p-valor y un fold change próximo a los valores de corte pero aún significativo.

logSignal (A)	logRatio (M)	Fold Change	p value	adj, p value	ProbelD	Description
10,11	0,43	1,34723358	0,00071521	0,03433029	SCO0379	catA, catalase (EC 1.11.1.6)
8,22	0,63	1,54756499	0,00004146	0,00738521	SCO0998	ftrE, Fe uptake system permease
11,34	1,46	2,75108364	0,00000003	0,00010098	SCO0999	sodF2, superoxide dismutase
11,74	1,55	2,92817139	0,00000009	0,00019928	SCO2633	sodF, superoxide dismutase [Fe-Zn] (EC 1,15,1,1)
8,55	1,32	2,4966611	0,00000131	0,00068142	SCO5254	sodN, superoxide dismutase

Tabla 16: Genes de superóxido dismutasas expresados diferencialmente.

Resultados

logSignal (A)	logRatio (M)	Fold Change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
10,76	-0,79	-1,72907446	0,00000487	0,00168283	SCO1244	bioB, biotin synthase
10,11	-0,68	-1,60213976	0,00061354	0,03118214	SCO1245	bioA, adenosylmethionine-8-amino-7-oxonanoate aminotrans
7,97	-0,49	-1,40444488	0,00014617	0,01460001	SCO4920	deoR-family transcriptional regulator
12,85	0,41	1,32868581	0,00022517	0,01870656	SCO4921	accA2, acyl-CoA carboxylase complex A subunit
10,42	0,9	1,86606598	0,00008393	0,01082291	SCO4926	pccB, propionyl-CoA carboxylase complex B subunit

Tabla 17: Genes de la biosíntesis de la biotina, acetil-CoA carboxilasa y la propionil-CoA carboxilasa expresados diferencialmente. En verde: gen con un p-valor y un fold change próximo a los valores de corte pero aún significativo.

logSignal (A)	logRatio (M)	Fold Change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
9,36	3,75	13,4543426	0,00000059	0,00054019	SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein
11,73	-1,08	-2,11403608	0,00000213	0,00091837	SCO7573	putative anti-sigma factor antagonist
8,07	-0,74	-1,67017584	0,00006219	0,00976913	SCO4159	glnR, transcriptional regulatory protein
8,36	-0,69	-1,61328352	0,0000951	0,0115725	SCO4229	phoR putative sensor kinase
8,37	-1,06	-2,08493152	0,00001228	0,00342233	SCO4230	phoP putative response regulator
12,49	-0,62	-1,53687518	0,00003366	0,00665997	SCO5025	putative transcriptional regulator

Tabla 18: Proteínas reguladoras expresadas diferencialmente

Cepa 4 frente a Cepa 5 (ORFD1/ORFD2 frente a ORFD1/ORFD2+ORFI). Muestra los genes controlados por el regulador específico de ruta; la comparación entre ambas cepas nos filtraría las posibles dianas del regulador de respuesta fuera del contexto de activación del regulador específico de ruta. Los análisis permiten identificar los siguientes genes:

- **SCO5071-SCO5092:** *cluster* biosíntesis de la actinorrodina. Una vez más aparece la práctica totalidad de los genes del *cluster* activados (Tabla 19). Debemos volver a destacar la importancia de la presencia de una retroalimentación positiva sobre el regulador específico de ruta *actII-ORF4*, que no parece deberse al regulador de respuesta.
- ***bioB* (SCO1244):** aparece nuevamente expresado diferencialmente, pero no así ninguno de los otros genes involucrados con la síntesis de biotina (*bioA*, *bioD*, *bioF*) (Tabla 20)
- Al igual que en 6 frente 5, están siendo activados los genes ***accA* (SCO4921) y *pccB* (SCO4926)**, pero no el regulador de la familia DeoR (SCO4920) que podría estar regulando a la acetil-CoA carboxilasas. *accAI* no está representado en el *array* (Tabla 20)
- ***ahpD* (SCO5031)**, una alquil-hidroperóxido reductasa está siendo sobreexpresada. Este gen pertenece a un operón formado por *ahpC* y *oxyR* (SCO5032 y SCO5033) (Hahn et al., 2002), pero ninguno de estos dos genes está siendo expresado diferencialmente de una manera significativa. Cabe destacar la expresión diferencial del gen SCO5025, un regulador de la familia MerR, relacionada con la regulación del estrés oxidativo entre otros (StrepDB, <http://strepdb.streptomyces.org.uk>) ya que podría estar relacionado con la regulación de *ahpD*.
- ***catA* (SCO0379):** catalasa. Enzima que cataliza la transformación del peróxido de hidrógeno en hidrógeno y oxígeno. En este caso, a diferencia de 6-5 y 3-5, la expresión diferencial de *catA* no va acompañada de la de los genes que codifican para las superóxido dismutasas.
- ***wblE* y *wblK* (SCO5240 y SCO7306 respectivamente):** pertenecen a un grupo de genes que codifican para proteínas reguladoras con gran similitud a WhiB, y juegan un papel aún por aclarar. El gen *wblE* también aparece como reprimido en 1 frente a 4. Un total de 8 genes con funciones regulatorias asignadas han aparecido como expresados diferencialmente (Tabla 21); entre ellos destacan SCO7614 y SCO7615, dos reguladores de la familia LacI con función desconocida pero que también aparecen en 3 frente a 5 (ver página siguiente).
- ***scbR* y *scbA* (SCO6265 y SCO6266 respectivamente):** Estos dos genes, que se transcriben divergentemente, están relacionados con la regulación y síntesis de las γ -butirolactonas de *S. coelicolor* (Hsiao et al., 2007), las cuales parecen influir en la transcripción del *cluster* del poliquétido *cpk* (Takano et al., 2005) y que en este caso también está siendo activado (Tabla 22).
- ***cluster cpk* (SCO6269-SCO6289):** *cluster* de biosíntesis de un poliquétido caracterizado por “*data mining*” gracias a la secuenciación del genoma de *S. coelicolor* y codificado por una PKS tipo I (Bentley et al., 2002). Este poliquétido se expresa durante la transición de la fase exponencial a la estacionaria aunque la delección de una de sus PKS no muestra ningún fenotipo visible. 12 de los 20 genes que componen este *cluster* están siendo activados significativamente, incluyendo las PKS tipo I (*cpkA* ó SCO6275 no está representado en el chip) y *cpkO* (SCO6280, denominado por Takano et al. (2005) como *kasO*) y *cpkN* (SCO6289), ambos reguladores específicos de ruta de la familia SARP.(Tabla 23)

Resultados

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
10,24	3,96	15,5624792	0,00034444	0,0546859	SCO5071	ORFA hydroxylacyl-CoA dehydrogenase
11,19	2,5	5,65685425	0,00145512	0,0757366	SCO5072	possible dehydratase
10,31	5,31	39,6706464	0,0000662	0,0401965	SCO5074	possible dehydratase
10,19	2,46	5,50216727	0,00012556	0,05160442	SCO5077	actVA2, hypothetical protein
10,47	3,05	8,28211939	0,000505	0,05707747	SCO5079	actVA4, conserved hypothetical protein
10,35	2,58	5,97939699	0,0004228	0,05707747	SCO5080	actVA5, possible hydrolase
9,81	3,55	11,7126856	0,0027722	0,09274528	SCO5081	actVA6, hypothetical protein
9,13	2,74	6,68070336	0,00287705	0,09305314	SCO5083	actII-2, probable actinorhodin transporter
8,56	2,54	5,81589007	0,00030702	0,0542588	SCO5084	actII-3, putative membrane protein
9,94	3,13	8,75434961	0,00004279	0,03521003	SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein
10,61	3,04	8,22491061	0,00054803	0,05860782	SCO5086	actIII, ketoacyl reductase
10,84	2,13	4,37717481	0,00092435	0,06630994	SCO5087	actIORF1, act polyketide beta-ketoacyl synthase alpha subunit
10,97	1,76	3,38698125	0,00306943	0,09442808	SCO5088	actIORF2, act polyketide beta-ketoacyl synthase beta subunit
10,76	3,23	9,38267959	0,00125412	0,07366352	SCO5089	actIORF3, act polyketide synthase acyl carrier protein
9,72	4,6	24,2514651	0,00011339	0,0515606	SCO5090	actVII, act polyketide synthase bifunctional cyclase/dehydratase
10,19	3,64	12,4666333	0,00021449	0,0542588	SCO5091	actIV, cyclase
9,92	4,57	23,7523771	0,00000755	0,02822887	SCO5092	actVB, actinorhodin polyketide possible dimerase

Tabla 19: Genes del *cluster* de biosíntesis de la actinorrodina expresados diferencialmente. En verde: gen con un p-valor y un fold change próximo a los valores de corte pero aún significativo.

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
10,01	1,44	2,71320865	0,00031253	0,0542588	SCO1244	bioB, biotin synthase
12,26	1,21	2,31337637	0,00051077	0,05707747	SCO4921	accA2, putative acyl-CoA carboxylase complex A subunit
10,02	1,26	2,39495741	0,00017093	0,0542588	SCO4926	pccB, propionyl-CoA carboxylase complex B subunit

Tabla 20: Genes de la biosíntesis la acetil-CoA carboxilasa y la propionil-CoA carboxilasa expresados diferencialmente.

Resultados

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
11,14	5,43	43,1114745	0,00005931	0,0401965	SCO3413	tipA, transcriptional regulator
8,64	2,25	4,75682846	0,00017127	0,0542588	SCO3414	putative transcriptional regulator
11,55	-1,47	-2,77021894	0,00000236	0,02822887	SCO4198	putative DNA-binding protein
9,94	3,13	8,75434961	0,00004279	0,03521003	SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein
10,91	-0,96	-1,94530989	0,00029545	0,0542588	SCO5240	wblE, transcription factor, prot hipo
9,11	0,94	1,91852824	0,00026805	0,0542588	SCO6280	cpkO, SARP regulator
9	2,15	4,43827789	0,00016313	0,0542588	SCO6288	cpkN, SARP regulator
9,28	-0,62	-1,53687518	0,00014063	0,05400138	SCO7306	wblK, regulatory protein

Tabla 21: Genes reguladores expresados diferencialmente.

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
9,23	0,78	1,71713087	0,00177028	0,08034506	SCO6265	scbR, gamma-butyrolactone binding protein
8,92	1,62	3,07375036	0,0011273	0,07241555	SCO6266	scbA, possible SCB biosynthesis enzyme

Tabla 22: Genes de regulación y biosíntesis de las γ -butirolactonas. En verde: gen con un p-valor y un fold change próximo a los valores de corte pero aún significativo.

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
11,22	1,08	2,11403608	0,00125713	0,07366352	SCO6269	cpkP α , possible oxidoreductase alfa-subunit
11,09	1,22	2,32946717	0,00289906	0,09323809	SCO6270	cpkP β , possible oxidoreductase beta-subunit
11,76	1,02	2,02791896	0,00031452	0,0542588	SCO6273	cpkC, probable type I polyketide synthase
11,37	1,47	2,77021894	0,00006785	0,0401965	SCO6274	cpkB, probable type I polyketide synthase
12,03	1,11	2,15845647	0,00024175	0,0542588	SCO6276	cpkD, secreted monooxygenase
11,95	0,94	1,91852824	0,00050385	0,05707747	SCO6277	cpkE, epoxide hydrolase
10,9	1,53	2,88785839	0,00045436	0,05707747	SCO6278	cpkF, transmembrane efflux protein
12,02	1,15	2,21913894	0,00002703	0,03336672	SCO6279	cpkG, aminotranferase
9,11	0,94	1,91852824	0,00026805	0,0542588	SCO6280	cpkO, SARP regulator
12,03	1,86	3,63007662	0,00002252	0,03243333	SCO6284	cpkK, acetyl-CoA carboxylase beta-subunit
12,49	1,65	3,13833639	0,00054583	0,05860782	SCO6285	cpkL, unknown hypothetical protein
9	2,15	4,43827789	0,00016313	0,0542588	SCO6288	cpkN, SARP regulator

Tabla 23: Genes del *cluster* de biosíntesis de *cpk* expresados diferencialmente. En verde: gen con un p-valor y un fold change próximo a los valores de corte pero aún significativo

- ***qcrB*, *qcrA* y *qcrC* (SCO2148-SCO2150):** Las quinol-citocromo c reductasas constituyen una superfamilia de enzimas presentes en las cadenas respiratorias de mitocondrias, bacterias y plastos (Sone et al., 2001) (Tabla 24)
- ***cox1*, *2* y *3* (SCO2151, SCO2155, SCO2156):** Las citocromo c oxidasas son las oxidasas finales de la cadena respiratoria de las bacterias aeróbicas. Es un complejo transmembranoso y multiproteico localizado en la membrana celular. Cataliza la reducción del O₂ y simultáneamente bombea protones a través de la membrana (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)(Tabla 24)

Cepa 3 frente a Cepa 5 (ORFI frente a ORFD1/ORFD2+ORFI). Situación similar a la comparativa Cepa 6 frente a Cepa 5, pero en este caso también se criba aquella expresión derivada de un posible escape del promotor de ORFI, independiente de la posible implicación de la activación de la biosíntesis de actinorrodina:

Entre los genes identificados, cabe señalar:

- **SCO5071-SCO5092:** de nuevo el conjunto de genes del *cluster* biosintético de actinorrodina. Una vez más aparece la práctica totalidad de los genes del *cluster* activados (Tabla 25). Debemos volver a destacar la importancia de la presencia de una retroalimentación positiva sobre el regulador específico de ruta *actIII-ORF4*.
- ***sodF2* (SCO0999), *sodF* (SCO2633) y *sodN* (SCO5254),** implicados en estrés oxidativo. Ver, también, Cepa 6 frente a Cepa 5 para más información. Además de los anteriores, cabe señalar otro gen relacionado con el estrés oxidativo y que aparece aquí como expresado diferencialmente, *catA* (SCO0379), que codifica una catalasa; ésta es una enzima necesaria para la inactivación del peróxido de hidrógeno que producen las superóxido dismutasas. La ausencia de una expresión diferencial del regulador de *catA*, *catR* (Hahn et al., 2000a) vuelve a hacerse patente, tal y como ocurre en Cepa 6 frente a Cepa 5 (Tabla 26).
- ***cpk cluster* (SCO6269-SCO6289):** *cluster* de biosíntesis de un poliquétido con estructura aún desconocida (ver Cepa 4 frente a Cepa 5, apartado anterior) (Tabla 27)
- Varios genes reguladores se muestran expresados diferencialmente (Tabla 28). **SCO7614 y SCO7616**, aparecen también en la comparativa de Cepa 4 frente a Cepa 5 (ver apartado anterior).
- **Los genes *accA* y *pccB* (SCO4921 y SCO4922 respectivamente),** necesarios para la síntesis de unidades elongadoras requeridas en la producción de poliquétidos (*accA1* no está representado en el *array*). *bioB* y *bioA* (SCO1244 y SCO1245) proveen del cofactor biotina a *accA* (Tabla 29)

Resultados

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbelD	
10,99	-0,77	-1,70526978	0,0019519	0,08186627	SCO2148	cytochrome B subunit
11,22	-1,01	-2,0139111	0,0000646	0,0401965	SCO2149	qcrA Rieske iron-sulfur protein
11,07	-1,04	-2,05622765	0,00012839	0,05160442	SCO2150	qcrC, cytochrome C heme-binding subunit
10,84	-1,22	-2,32946717	0,00008557	0,0448073	SCO2151	cox3, cytochrome c oxidase subunit III
10,25	-0,56	-1,47426922	0,0028114	0,09274528	SCO2155	cox1, cytochrome c oxidase subunit I
10,08	-0,69	-1,61328352	0,00081391	0,06471335	SCO2156	cox2, cytochrome c oxidase subunit II

Tabla 24: Genes del citocromo c expresados diferencialmente. En verde: gen con un p-valor y un fold change próximo a los valores de corte pero aún significativo.

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbelD	
10,55	3,87	14,6213032	0,00008546	0,00674315	SCO5071	ORFA hydroxylacyl-CoA dehydrogenase
12,31	1,73	3,31727818	0,00008665	0,00677132	SCO5072	ORF1 hydroxylacyl-CoA dehydrogenase
10,78	2,96	7,78123958	0,000001	0,00074702	SCO5073	ORF2, possible oxidoreductase
10,38	5,28	38,8542363	0,00000002	0,00009685	SCO5074	possible dehydratase
10,36	2,64	6,23331664	0,00000002	0,00009685	SCO5077	actVA2, hypothetical protein
10,56	2,61	6,10503684	0,00000035	0,00039922	SCO5079	actVA4, conserved hypothetical protein
11,26	1,71	3,27160823	0,00000678	0,00158436	SCO5080	actVA5, possible hydrolase
10,4	2,89	7,4127045	0,00000276	0,00108555	SCO5081	actVA6, hypothetical protein
9,19	2,21	4,62675274	0,00005608	0,00534584	SCO5083	actII-2, probable actinorhodin transporter
8,54	2,48	5,57897467	0,00000355	0,00124683	SCO5084	actII-3, putative membrane protein,
9,6	3,43	10,7778686	0,00000002	0,00009685	SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein
11,53	2,85	7,2100037	0,00000886	0,00184499	SCO5086	actIII, ketoacyl reductase
11,24	2,85	7,2100037	0,0000006	0,00061273	SCO5089	actIORF3, actinorhodin polyketide synthase acyl carrier prot
9,75	4,19	18,2522195	0,00000021	0,00027732	SCO5090	actVII, act polyketide synth bifunctional cyclase/dehydratase
10,29	2,87	7,3106516	0,00000149	0,000858	SCO5091	actIV, cyclase
9,86	4,92	30,2738447	0,00000012	0,00017922	SCO5092	actVB, actinorhodin polyketide possible dimerase

Tabla 25: genes del *cluster* de biosíntesis de la actinorrodina expresados diferencialmente. En verde: gen con un p-valor y un fold change fuera de los valores de corte pero aún significativo.

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbelD	
11,74	1,13	2,1885874	0,00000091	0,00074702	SCO0999	sodF2, superoxide dismutase
11,9	1,16	2,23457428	0,00000276	0,00108555	SCO2633	sodF, superoxide dismutase [Fe-Zn] (EC 1,15,1,1)
9,04	1,14	2,20381023	0,0000277	0,00342094	SCO5254	sodN, superoxide dismutase

Tabla 26: genes de superóxido dismutasas expresados diferencialmente.

Resultados

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
12,3	1,13	2,1885874	0,00002772	0,00342094	SCO6273	cpkC, probable type I polyketide synthase
11,67	1,54	2,90794503	0,00000495	0,00140201	SCO6274	cpkB, probable type I polyketide synthase
12,16	1,03	2,04202425	0,00000136	0,00081164	SCO6276	cpkD, secreted monooxygenase
11,72	0,88	1,8403753	0,00001415	0,00237409	SCO6277	cpkE, possible epoxide hydrolase
11,88	1,21	2,31337637	0,00000118	0,00075523	SCO6279	cpkG, probable diaminobutyrate-pyruvate aminotransferase
9,05	0,99	1,98618499	0,00000831	0,00176569	SCO6280	cpkO, SARP regulator
12,18	2,06	4,16986304	0,00000007	0,00016685	SCO6284	cpkK, acetyl-CoA carboxylase beta-subunit
12,54	1,38	2,60268371	0,0000022	0,00107236	SCO6285	cpkL, unknown hypothetical protein
8,62	2,05	4,1410597	0,00000175	0,00096984	SCO6288	cpkN, SARP regulator

Tabla 27: genes del *cluster* de biosíntesis de *cpk* expresados diferencialmente

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
10,96	0,95	1,93187266	0,00000786	0,00171901	SCO0422	putative two-component sensor kinase
13,98	0,98	1,97246541	0,00002834	0,00347258	SCO3413	tipA, transcriptional regulator
9,95	-1,02	-2,02791896	0,00000518	0,00140201	SCO4027	putative anti sigma factor antagonist
13,47	-1,28	-2,42838977	0,00000244	0,00107236	SCO4036	RpoX sigma factor prot hipo
9,6	3,43	10,7778686	0,00000002	0,00009685	SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein
9,06	0,94	1,91852824	0,00004347	0,00444437	SCO6280	possible regulatory protein, kasO
8,62	2,05	4,1410597	0,00000175	0,00096984	SCO6288	putative regulatory protein (similar to actII-4)
11,75	1,18	2,26576777	0,00000433	0,00138572	SCO7014	probable LacI-family transcriptional regulatory protein
11,57	1,07	2,09943337	0,00003571	0,00390528	SCO7016	putative LacI-family transcriptional regulatory protein (duplicated)

Tabla 28: proteínas reguladoras expresadas diferencialmente

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
10,17	1,07	2,09943337	0,00000261	0,00107236	SCO1244	bioB, biotin synthase
11,13	0,4	1,31950791	0,00463042	0,07254181	SCO1245	bioA, adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotrans
13,1	0,76	1,69349062	0,00007294	0,00636562	SCO4921	accA2, putative acyl-CoA carboxylase complex A subunit
10,6	1,51	2,84810039	0,00000259	0,00107236	SCO4922	pccB, propionyl-CoA carboxylase complex B subunit

Tabla 29: genes de la biosíntesis de la biotina, la acetyl-CoA carboxilasa y la propionil-CoA carboxilasa expresados diferencialmente. En verde: gen con un p-valor y un fold change fuera de los valores de corte pero aún significativo.

4.3.2.- Comparación de los Genes Expresados Diferencialmente entre los Diversos Experimentos.

A pesar de la consistencia de los resultados de expresión génica observados entre varias de las parejas de recombinantes, se ha de resaltar ciertas discrepancias observadas al comparar entre sí los distintos experimentos. Por ejemplo, en los experimentos donde se lleva a cabo una comparativa entre la cepa 6 y la cepa 5 y la cepa 3 y la cepa 5. En estos dos ensayos se comparan situaciones muy similares, donde un recombinante que contiene el TCS y el regulador específico de ruta y que por tanto posee un fenotipo productor de actinorrodina, se confronta con otro no productor en el que ni el TCS ni el regulador específico de ruta están siendo expresados. El resultado que cabría esperar de esta prueba, es la obtención de dos listas de genes expresados diferencialmente (una lista de la comparativa entre la cepa 6 y la cepa 5 y otra lista de la comparativa entre la cepa 3 y la cepa 5) muy similares entre sí; sin embargo vemos que en el caso de la cepa 6 frente a la cepa 5 hay una serie de genes del *cluster* de biosíntesis del CDA expresados diferencialmente que no lo están en el experimento que enfrenta a la cepa 3 con la cepa 5. Así mismo, cuando se comparan los genes expresados diferencialmente en los *arrays* de la cepa 3 frente a la cepa 5, aparecen expresados diferencialmente ciertos genes del *cluster* de biosíntesis del *cpk* que no lo están en los *arrays* de la cepa 6 frente a la cepa 5.

Todos aquellos genes expresados diferencialmente que no están en ambas listas, cabe pensar que probablemente se deben a que son falsos positivos. Con el fin de filtrar estos posibles errores experimentales se llevó a cabo una serie de comparaciones entre las listas de genes expresados diferencialmente de los diferentes experimentos, con la intención de incrementar la fiabilidad de los ensayos:

Cepas 6 y 5 frente a las cepas 3 y 5:

Como se discutió anteriormente, la comparación entre las listas de genes expresados diferencialmente de ambos experimentos debería ser muy similar. De los genes expresados diferencialmente entre la cepa 6 y 5 y las cepas 3 y 5 un 47% y un 44% respectivamente estaban en ambas listas y su presencia sería debida a la regulación que ejerce el sistema de dos componentes, al regulador específico de ruta y/o al antibiótico. Aquellos genes que no estuvieran presentes en ambas listas serían, probablemente, falsos positivos (figura 21). De los genes expresados diferencialmente presentes en ambas listas los más destacables son (las listas completas se hallan en el anexo 3):

- *accA2*, *pccB* y *bioB*: relacionados con la síntesis de unidades elongadoras para la condensación de ácidos grasos y poliéteridos (Rodríguez et al., 2001; Diakovich et al., 2002 y 2004).
- Los genes del *cluster* de biosíntesis de la actinorrodina.
- *sodF*, *sodF2*, *sodN* y *catA*: genes del estrés oxidativo.

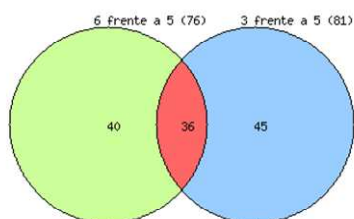


Figura 21: representación gráfica de las comparaciones entre los experimentos 6 frente a 5 y 3 frente a 5.

Cepas 6 y 5 frente a las cepas 4 y 5:

En este caso, se comparó la expresión diferencial de la cepa productora (cepa 5) frente a su control negativo (cepa 6) con la cepa que tiene el sistema de dos componentes (cepa 4) y la cepa productora (cepa 5). Los genes que se encuentren en ambas listas serían debidos al regulador específico de ruta y/o al antibiótico. Los genes que estén expresados diferencialmente solo entre las cepas 6 y 5, o se deben al sistema de dos componentes, o son falsos positivos; y aquellos genes que solo aparezcan entre las cepas 4 y 5 deberían corresponder, únicamente, a falsos positivos.

Los resultados obtenidos muestran que un 37% de los genes de la pareja 6-5 coinciden con los de 4-5 y un 32% de los genes de la pareja 4-5 coinciden con los de la 6-5 (Figura 22). De los 28 genes que se encuentran en ambas listas, los más destacables son (las listas completas se hallan en el anexo 3):

- *accA2*, *pccB* y *bioB*
- Los genes del *cluster* de biosíntesis de la actinorrodina.
- *catA*, gen que codifica una catalasa. En este caso cabe subrayar la ausencia del los genes *sodF*, *sodF2* y *sodN*.

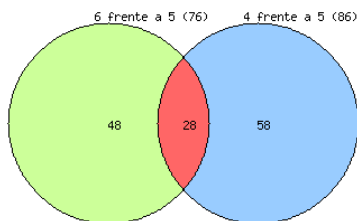


Figura 22: representación gráfica de las comparaciones entre los experimentos de la cepa 6 frente a la 5 y la 4 frente a la 5.

Cepas 3 y 5 frente a las cepas 4 y 5:

A continuación se cotejaron los genes expresados diferencialmente al comparar la cepa productora (cepa 5) con una no productora que contiene únicamente el regulador específico de ruta clonado junto con su propio promotor (cepa 3), con una cepa que tiene el sistema de dos componentes (cepa 4) y la cepa productora (cepa 5). Al igual que en el punto anterior, los genes que se encuentren en ambas listas se deberían a expresión diferencial del regulador específico de ruta y/o a la biosíntesis del antibiótico. Los genes que estén únicamente en el listado correspondiente a la pareja 3-5 se deben a expresión diferencial del sistema de dos componentes. Finalmente, los genes de la pareja 4-5 que no estén en ambas listas serían falsos positivos. Se puede observar que el 48% de los genes de que aparecen en la pareja 3-5 coinciden con los de la 4-5 y el 45% de los genes de la pareja 4-5 coinciden con los de la 3-5 (figura 23). Entre los más significativos caben señalar (las listas completas se hallan en el anexo 3):

- *accA2*, *pccB* y *bioB*
- Los genes del *cluster* de biosíntesis de la actinorrodina.
- *catA*, gen que codifica para una catalasa. En este caso cabe subrayar la ausencia del los genes *sodF*, *sodF2* y *sodN*.
- Algunos genes del *cluster* de biosíntesis de *cpk*

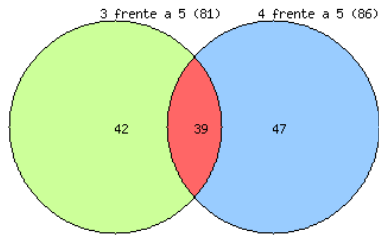


Figura 23: representación gráfica de las comparaciones entre los experimentos 3 frente a 5 y 4 frente a 5.

Cepas 6 y 5 frente a las cepas 1 y 4:

Aquí se exponen los resultados obtenidos al comparar los genes expresados diferencialmente en el experimento entre las cepas 6 y 5 (la cepa productora frente a su control negativo) con los expresados diferencialmente entre las cepas 1 y 4 (*S. coelicolor JF1* con el sistema de dos componentes frente a su control negativo). Aquellos genes presentes en ambas listas se deberían a la expresión diferencial atribuible al sistema de dos componentes; los genes expresados diferencialmente en el experimento entre las cepas 6 y 5 que no aparezcan como expresados diferencialmente en la comparativa entre las cepas 1 y 4, se deberían al regulador específico de ruta o serían falsos positivos, mientras que los genes expresados diferencialmente en el experimento entre las cepas 1 y 4 que no estén presentes en ambas listas, se deberían a falsos positivos. Los resultados en este caso han sido muy pobres, únicamente 8 genes aparecen en ambos listados (10 y 11% para las cepas 6 y 5 y la pareja de cepas 1 y 4 respectivamente) y todos ellos son proteínas hipotéticas (Figura 24. Listado completo en anexo 3).

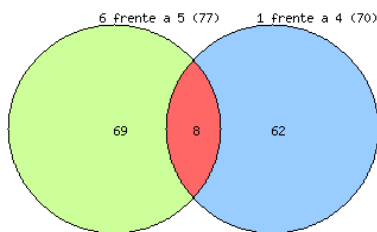


Figura 24: representación gráfica de las comparaciones entre los experimentos 6 frente a 5 y 1 frente a 4.

Cepas 3 y 5 frente a las cepas 1 y 4:

Los resultados esperados en este apartado son similares a los del punto anterior. En este caso se han obtenido 4 genes expresados diferencialmente que se hallan en ambas listas y no tienen ninguna función de importancia (Figura 25). En el caso de la comparativa de las cepas 4-5 con las de 1-4 los resultados han sido muy similares y por tanto se ha eludido presentarlos aquí, aunque si se incluyen en el Anexo 3.

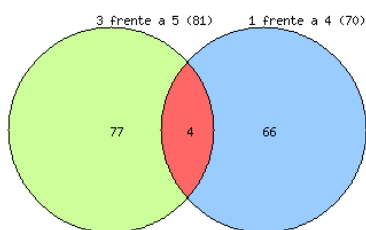


Figura 25: representación gráfica de las comparaciones entre los experimentos 3 frente a 5 y 1 frente a 4.

Observaciones Finales:

Cuando comparamos los resultados experimentales obtenidos de la cepa **6 frente a la cepa 5** con la **3 frente a la 5**, los resultados parecen bastante robustos; se obtienen fundamentalmente tres grupos de genes: los del *cluster* de biosíntesis de la actinorrodina; los genes de las enzimas de biosíntesis de biotina y las acetil-CoA carboxilasas; y varios genes del estrés oxidativo. Parece claro que la activación del *cluster* de biosíntesis de la actinorrodina induce por una parte la síntesis de unidades elongadoras, necesarias tanto para la biosíntesis de poliquétidos como para la de ácidos grasos y también el mecanismo de respuesta al estrés oxidativo, mediante la inducción de la transcripción de las superóxido dismutasas y catalasa. Estos experimentos, sin embargo, no arrojan ninguna luz sobre cual pudiera ser el responsable último de estas activaciones entre: el regulador específico de ruta, el sistema de dos componentes o la presencia del antibiótico en la bacteria.

Las comparaciones de las listas de genes expresados diferencialmente entre las cepas **6-5** y **3-5** con las de **4-5** y las **de 1-4**, deberían darnos alguna clave sobre el efector de los cambios en la expresión de los genes expuestos anteriormente, pero es aquí donde los resultados empiezan a mostrar discrepancias. Como ejemplo ilustrativo se podrían usar las SODs (superóxido dismutasas), estos genes aparecen expresados en la pareja 6-5 y la 3-5, sin embargo no lo hacen en 4-5, esto indicaría que el causante de la activación de las SODs podría ser el sistema de dos componentes. Si esto fuera así, cabría esperar una activación de las SODs en el experimento que compara la expresión de la cepa 1 con la cepa 4, pero esto no ocurre. Este hecho unido a que los genes de 4-5 que también son expresados diferencialmente en 1-4 son únicamente 6 y sin actividad descrita ni pauta aparente, parece mostrar que las hibridaciones llevadas a cabo con el RNA de la cepa 4 no funcionaron debidamente o que la calidad del mismo no fuera adecuada. Posteriormente se realizaron nuevas hibridaciones entre los RNAs de las cepas **1 y 4** y las cepas **4 y 5** tanto con el RNA original como con otro extraído “*de novo*”; los resultados fueron similares a los previamente obtenidos.

4.3.3.- Validación de la Transcripción Diferencial de Ciertos Genes Mediante RT-PCR Semicuantitativa:

Los resultados obtenidos con los *arrays* debían ser validados por otros medios para descartar posibles falsos positivos. Ya que las diferencias en expresión pueden llegar a ser muy pequeñas en algunos casos, nos decantamos por el uso de la RT-PCR semicuantitativa, que es un método más sensible que el Western y nos permite obtener valores relativos en lo que se refiere a las diferencias en la transcripción de mRNAs entre la cepa silvestre y la mutante. La posibilidad de poder utilizar la expresión de el factor sigma HrdB (un gen que mantiene su tasa de transcripción estable durante todo el ciclo de vida de la bacteria. Pang et al., 2004) para normalizar los valores obtenidos nos brinda una ventaja magnífica para poder explotar este método de una manera más fiable.

Los resultados obtenidos y expuestos en el apartado anterior, mostraron una serie de genes candidatos a estar bajo el control directo o indirecto del sistema de dos componentes, el regulador específico de ruta y/o la presencia del antibiótico. Entre los más significativos se encuentran *actII-ORF4*, *sodF*, *sodF2*, *sodN*, *catA* y *accA2*. Para asegurar que estos genes están siendo expresados diferencialmente postulamos la validación de estos resultados mediante una técnica diferente a la de los *arrays*. La sensibilidad y la posibilidad de cuantificar las diferencias en la expresión de un gen entre dos cepas distintas, nos hizo decantarnos por el uso de la RT-PCR. Los genes candidatos seleccionados por su interés fueron: *actII-ORF4*, *sodF*, *sodF2* y *sodN*:

- *actII-ORF4*: Las RT-PCR mostraron como la activación de la biosíntesis de actinorrodina induce una fuerte (unas 30 veces) retroalimentación positiva del propio regulador específico de ruta (Figura 26)
- *sodF*: Las RT-PCR mostraron que la transcripción de este gen se ve incrementada en más de cuatro veces en las cepas con el sistema de dos componentes, el regulador específico de ruta y, por tanto, la biosíntesis del antibiótico actinorrodina (elementos presentes en la cepa 5), respecto a la cepa silvestre (en este caso la cepa 6). Cuando se intenta ver exactamente cuál de estos componentes es el causante del incremento en la transcripción de *sodF*, los resultados comienzan a ser contradictorios. Según los resultados obtenidos mediante RT-PCR, la cepa 4 (que contiene el sistema de dos componentes) lleva a cabo un incremento en la expresión de *sodF* únicamente de 1,5 veces (valor considerado no significativo), mientras que la cepa 5 lo hace en 4,5 veces. En principio, esto indica que el sistema de dos componentes no afectaría la tasa de transcripción de este gen, sin embargo, siendo esto así, ¿por qué no aparece *sodF* expresado diferencialmente en los *arrays* de las cepas 5 y 4?, posiblemente debido a un artefacto (Figura 27).

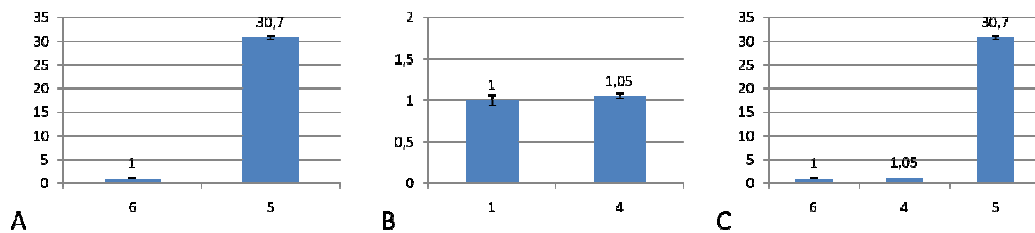


Figura 26: representación gráfica de las RT-PCR obtenidas con *actII-ORF4*. A) expresión semicuantitativa en las cepas 5 y 6. B) expresión semicuantitativa en las cepas 1 y 4. C) expresión semicuantitativa en las cepas 6, 4 y 5

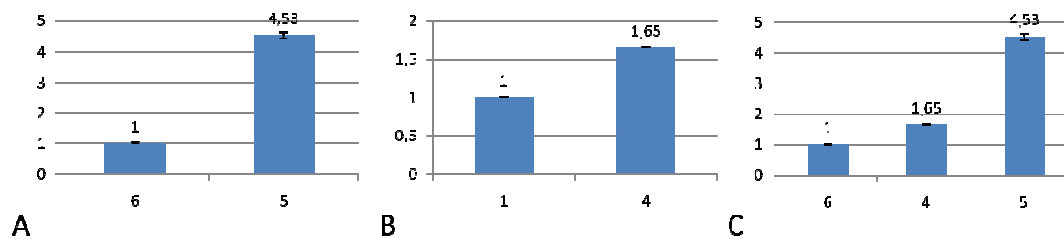


Figura 27: representación gráfica de las RT-PCR obtenidas con *sodF*. A) expresión semicuantitativa en las cepas 5 y 6. B) expresión semicuantitativa en las cepas 1 y 4. C) expresión semicuantitativa en las cepas 6, 4 y 5

- *sodF2*: Los resultados obtenidos con este gen, son similares al caso anterior. La cepa 5 expresa 4,4 veces más *sodF2* que su control (la cepa 6). Ahora, la cepa 4 expresa dos veces más *sodF2* que su control (cepa 1) y este valor, a diferencia del caso anterior, ya se puede considerar como significativo (Figura 28).
- *sodN*: La expresión diferencial de este gen es 119 veces mayor que cuando se comparan sus niveles de transcripción entre la cepa 5 y su control negativo (cepa 6). En el momento de distinguir si el causante de este incremento es el sistema de dos componentes, obtenemos una vez más un resultado un confuso: el sistema de dos componentes (la cepa 4) induce la expresión de *sodN* 4 veces (Figura 29).

Lo más destacable de estos resultados es por una parte la confirmación de la presencia de una retroalimentación positiva del regulador específico de la ruta de actinorrodina y la inducción de la respuesta al estrés oxidativo cuando entra en acción todo el sistema regulatorio que provoca la síntesis de la actinorrodina.

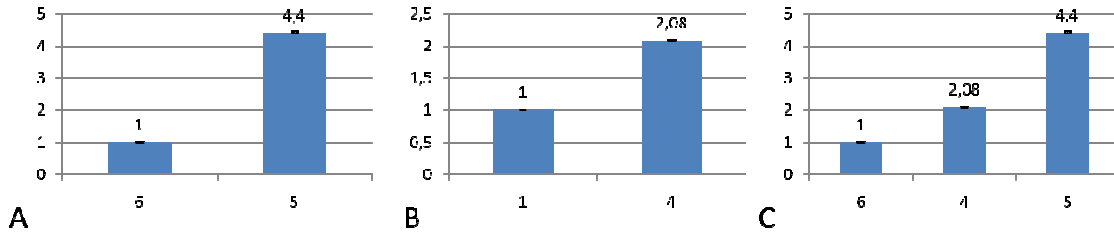


Figura 28: Representación gráfica de las RT-PCR obtenidas con *sodF2*. A) expresión semicuantitativa en las cepas 5 y 6. B) expresión semicuantitativa en las cepas 1 y 4. C) expresión semicuantitativa en las cepas 6, 4 y 5

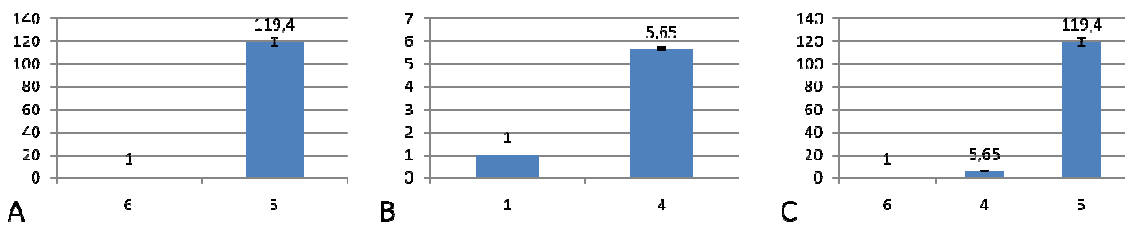


Figura 29: Representación gráfica de las RT-PCR obtenidas con *sodN*. A) expresión semicuantitativa en las cepas 5 y 6. B) expresión semicuantitativa en las cepas 1 y 4. C) expresión semicuantitativa en las cepas 6, 4 y 5

4.4.- Sistemas de Dos Componentes Similares a ORFD1/ORFD2 en *S. coelicolor*:

Las razones expuestas en la sección de antecedentes nos han hecho interesarnos por encontrar un sistema de dos componentes en *S. coelicolor* con un control sobre los genes biosintéticos de actinorrodina similar al que tiene ORFD1/ORFD2 sobre el *cluster* del poliquétido aislado de *S. antibioticus* y similar al de actinorrodina.

Se optó por buscar posibles candidatos basándonos en su similitud de secuencia con ORFD1/ORFD2. Se llevó a cabo una búsqueda por ptBLAST (en tres servidores distintos) de los sistemas de dos componentes con mayor similitud a ORFD1/D2 en *S. coelicolor* y se seleccionaron 4 sistemas de dos componentes (o sea, un total de 8 genes) con similitudes de entre el 45% y el 31% (los genes están ordenados por similitud):

- SCO5131/SCO5132-SC9E12.16/SC9E1217
- SCO2307/SCO2308-SCC30.15/SCC30.16
- SCO4072/SCO4073-SCD25.08c/SCD2509.c
- SCO3225/SCO3226-SCE8.18/SCE8.19c-AbsA1/AbsA2

A continuación se procedió a construir los mutantes nulos de dichos genes; para posteriormente, y mediante el uso de *arrays* de DNA poder determinar el efecto global de estos sistemas de dos componentes en el metabolismo de la bacteria y su nivel de pleiotropía o especificidad.

4.5.- Construcción de Mutantes Nulos para Caracterizar los TCSs Seleccionados por su Alta Similitud a ORFD1/ORFD2 de *S. antibioticus*.

4.5.1.- Construcción de los Vectores Necesarios para la Posterior Delección de los Diferentes Genes en *S. coelicolor* M145:

La estrategia se basa en (a) construir una delación *in vitro* del gen diana (b) introducir la construcción en el genoma vía inserción por uno de los fragmentos clonados y (c) forzar la doble recombinación homóloga entre el fragmento cromosómico y la delección clonada *in vitro* para realizar el intercambio entre el genoma y el fragmento portando la delección correspondiente. Para ello, se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos que nos permitieron amplificar por PCR, utilizando como molde DNA total de *S. coelicolor*, dos fragmentos del cromosoma *corriente arriba* y *corriente abajo* del gen a deleccionar (designados con el nombre del gen y el numeral romano I y II para los fragmentos *corriente arriba* y *corriente abajo* respectivamente), posteriormente los fragmentos fueron clonados independientemente en el plásmido pIJ2925 (nombrados pIJx (x corresponde al nombre del gen a deleccionar) seguido del numeral romano I o II). Los fragmentos amplificados se ligaron concatenadamente en el vector pAC301, dando así lugar al deleccionante al que se denomina pPRx, donde x es el nombre del gen. En algunos casos, los plásmidos pPRx se digirieron y los fragmentos I y II clonados concatenadamente se clonaron a su vez en el actinofago att⁻ PM1 (Figura 30) con el fin de aprovechar la mayor eficiencia de los fagos para transfectar y facilitar la obtención de disruptantes simples.

Con los plásmidos así construidos se transformaron protoplastos de *S. coelicolor* M145 y se seleccionaron disruptantes simples (obtenidos por inserción) por recombinación homóloga a nivel de uno de los fragmentos mediante la adquisición de resistencia al antibiótico tioestreptona (tsr^R). Una vez confirmada mediante *Southern blotting* la integración en el cromosoma y a nivel de qué fragmento tuvo lugar la integración, estos disruptantes simples sufrieron cinco pases en medio sólido sin selección (plaqueo, esporulación y recogida de esporas) para forzar la recombinación doble entre la construcción generada "*in vitro*" y el fragmento del cromosoma, con lo que una de las dos construcciones se integra en el cromosoma y la otra es escindida junto con el plásmido. Esta doble recombinación crea cepas sensibles a la tioestreptona (tsr^S). Este *pool* de disruptantes simples (tsr^R) y dobles (tsr^S) fueron plaqueados en medio con y sin resistencia mediante plaqueo por réplica para poder seleccionar aquellas sin resistencia. Se extrajo el DNA total de aquellas colonias tsr^S para saber mediante *Southern blotting* si han intercambiado la copia deleccionada o la copia silvestre, revirtiendo en este último caso a la cepa original (Figura 31). Se consiguió obtener recombinantes simples de todos los genes menos de SCO5131 (Figura 32).

Para los recombinantes dobles, en total se ha hecho un *screening* de gran cantidad de colonias, de las cuales se obtuvieron unas 80 sensibles a tioestreptona que en todos los casos habían revertido a la cepa silvestre menos en uno (Tabla 30), obteniendo el mutante *S. coelicolor* M145 Δ SCO2307.

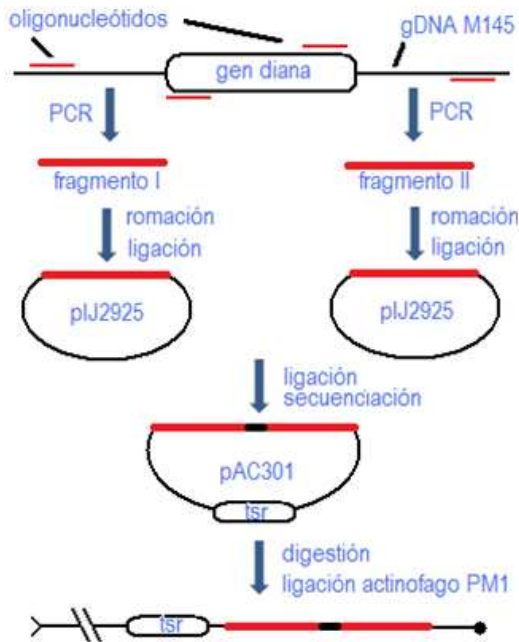


Figura 30: esquema de la estrategia seguida para las construcción de los diversos plásmidos y fagos deleciónantes. Para más detalles ver texto.

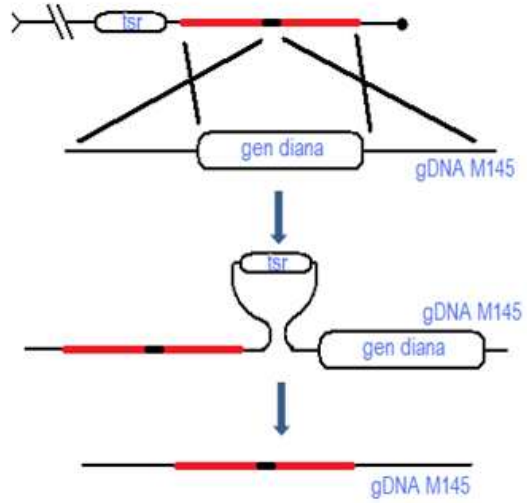


Figura 31: Representación esquemática de la doble recombinación esperada para generar la deleción. Si bien aparece representada la construcción hecha en el fago, este puede sustituirse con el plásmido sin que la estrategia sufra variación alguna

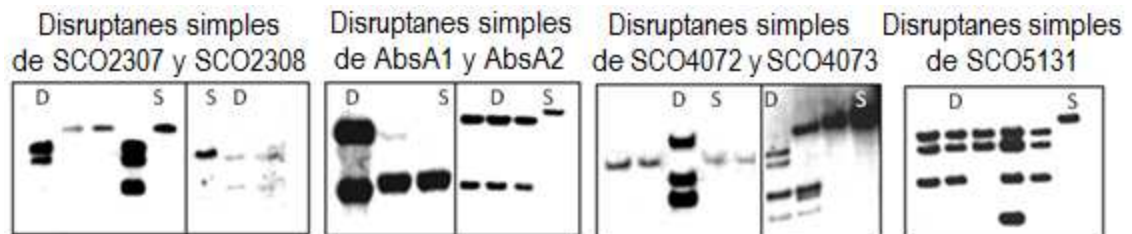


Figura 32: Southern blots de los diversos recombinantes simples obtenidos (cepas con el plásmido deleciónante, insertado específicamente en el genoma). D: disruptante simple. S: Silvestre. **SCO2307:** patrón esperado para D: 3,7kb, 2X 3,7kb (fragmento doble) y 3,6kb, patrón esperado para S: 5,6 kb **SCO2308:** patrón esperado para D: 3,6 y 2,2kb, patrón esperado para S: 3,8kb; **AbsA1:** patrón esperado para D: 6,6 y 3,8kb, patrón esperado para S: 3,9kb **AbsA2:** patrón esperado para D: 4,3 y 2,5kb, patrón esperado para S: 5,7kb **SCO4072:** patrón esperado para D: 6,6kb, 2,7 y 1,7kb; **SCO4073:** patrón esperado para D: 4,8kb, 3,6kb, 2,6kb, 1,8kb, patrón esperado para S: 6,4kb **SCO5131:** patrón esperado para D: 5,2kb, 4,5kb, y 3,0kb, patrón esperado para S: 6,2kb

Gen	SC02307	SC02308	SC04072	SC04073	SC05131	SC05132	AbsA1	AbsA2
Fragmento de homología	X	X	X	X	X		X	X
Clonaje en pIJ2925	X	X	X	X	X		X	X
Clonaje en pAC301	X	X	X	X	X		X	X
Clonaje en PM1	X	X						
Disruptante simple	X	X	X	X	X		X	X
Disruptante doble	X							

Tabla 30: Avances hechos en la obtención de los mutantes de los diferentes genes.

Debido a la baja eficiencia obtenida con este método, decidimos intentar obtener mutantes mediante la sustitución del gen diana por un casete de resistencia a apramicina. Este método, aunque más simple, se descartó en un principio por que la presencia del casete podría llevar consigo efectos polares sobre los genes más próximos, sobre todo teniendo en cuenta que muchos sistemas de dos componentes se transcriben como policistrones y en este caso todos se solapan (Figura 33). El uso de un fragmento de DNA, a diferencia de un plásmido, resulta en la inviabilidad de los disruptantes simples y permite únicamente el crecimiento de las bacterias que hayan incurrido en una recombinación homóloga doble. Este es un fenómeno complejo y poco frecuente en *Streptomyces* como para permitir una selección positiva. Para aumentar la eficiencia de la transformación, reducir la degradación del DNA por los mecanismos de restricción y aumentar la tasa de recombinación intentamos desnaturalizar el fragmento de DNA transformado mediante el uso de calor y de sosa cáustica como ya ha sido descrito (Oh and Chater 1997). Varios intentos por obtener mutantes con este método, resultaron infructuosos.

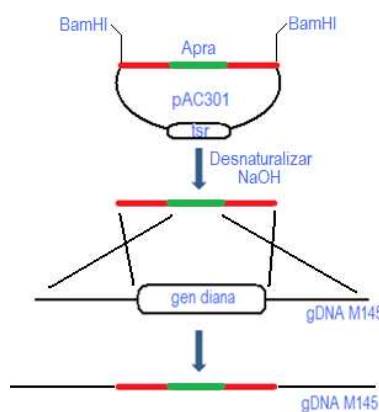


Figura 33: sustitución del gen diana por un casete de resistencia a apramicina.

4.5.2.- Obtención del Mutante *S. coelicolor* M145 Δ SCO2307:

Al transformar protoplastos de *S. coelicolor* M145 con la construcción pPR2307 con el fin de obtener disruptantes simples, se obtuvieron 3 colonias que eran tsr^R , pero únicamente una de estas 3 poseía una arquitectura que coincidiese con aquella esperada para el disruptante simple de SCO2307 (Figura 32).

Una vez obtenido el mutante tsr^R , que porta el gen silvestre y la construcción con la delección correspondiente, se llevaron a cabo una serie de plaqueos en medio R5 sólido sin tioestreptona, para forzar una nueva ronda de recombinación homóloga. Posteriormente mediante plaqueo en réplica se seleccionaron un total de 4 colonias tsr^S que eran candidatas a tener o el gen deleccionado o a haber revertido en la cepa silvestre; de las cuatro colonias, sólo una cumplía el patrón de digestión esperado para el mutante mediante *Southern blotting* (Figura 34), habiendo revertido, el resto, a la cepa silvestre.



Figura 34: *Southern blot* del mutante M145 Δ SCO2307 con 3 enzima distintas. S: silvestre M: mutante. De izquierda. a derecha: *SphI* (S: 8,0 kb. M: 3,2 kb); *Stul/BclI* (S: 4,2 kb. M: 3,2 kb); *Stul/SphI* (S: 6,0 kb. M: 4,8 kb).

Únicamente se consiguió deleccionar un gen: SCO2307. Este gen codifica la quinasa sensora de 402 amino ácidos (a.a.) del sistema de dos componentes codificado por los genes SCO2306/SCO2307. Mediante un análisis *in silico* se predijo que la proteína posee una región extracelular (aa 1-46), 5 dominios transmembrana (aa 46-172) y una región intracelular formada a su vez por dos dominios conservados (Figura 35): HisKA_3 (a.a. 216-275; este es el dominio fosfo-aceptor) y un dominio HATPase_c (a.a. 310-399; dominio ATPasa). (Dominios transmembrana: SOSUI, Mitaku et al. (2002). Dominios conservados: Entrez Gene, Maglott et al., 2005).

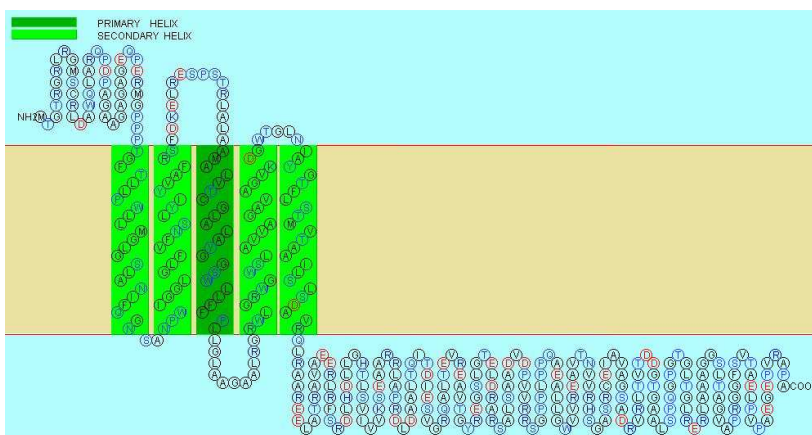


Figura 35: representación esquemática de la proteína SCO2307, mostrando la región extracelular, la transmembrana y la interna. Obtenido de SOSUI (ver texto).

4.6.- Análisis Fenotípico del Mutante *S. coelicolor* M145Δ2307:

Los resultados obtenidos en los *arrays* muestran cambios en la expresión de muchos genes con funciones muy dispares. Si bien en algunos casos estos resultados se han mostrado también mediante RT-PCR, sería necesario determinar si estas variaciones llevan consigo cambios fenotípicos de importancia en la bacteria.

4.6.1.- Producción de Actinorrodina en Medio Sólido:

El plaqueo del mismo número de esporas del mutante y el silvestre sobre medio R5 sólido no pareció tener un efecto visible en el fenotipo (datos no mostrados), sin embargo, el plaqueo sobre medio mínimo con manitol como fuente de carbono y nitrato cálcico y asparagina para suplir los requerimientos de nitrógeno de las bacterias sí mostraron notables diferencias en la producción de actinorrodina (Figura 36). Estos resultados muestran que la mutación del gen SCO2307 es condicional y que parece haber rutas alternativas que pudiesen circunvalar este corte en el circuito de señalización.

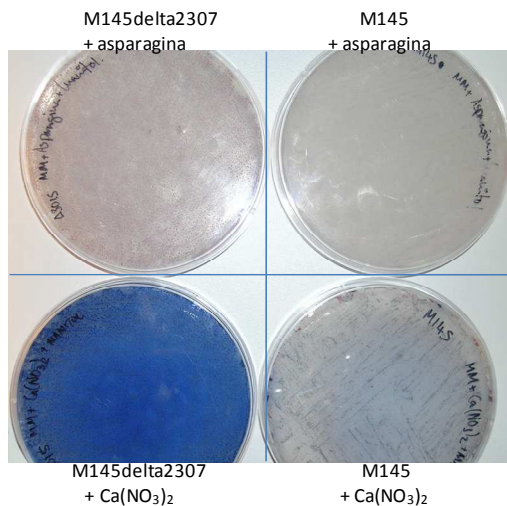


Figura 36: Cultivos sobre medio mínimo con manitol como fuente de carbono y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ o asparagina como fuente de nitrógeno.

4.6.2.- Producción de Actinorrodina en Medio Líquido:

Debido a que tanto *S. coelicolor* M145 como *S. coelicolor* M145 Δ2307 no producen actinorrodina en medio R5 líquido, utilizamos medio SY con manitol como fuente de carbono. Dos cultivos con igual número de esporas de M145 y M145Δ2307 se incubaron a 30°C durante 5 días, extrayendo muestras de micelio en diversos periodos de tiempo. (Figura 37). El experimento mostró que la concentración de actinorrodina en el mutante es 3,4 veces mayor con respecto al silvestre.

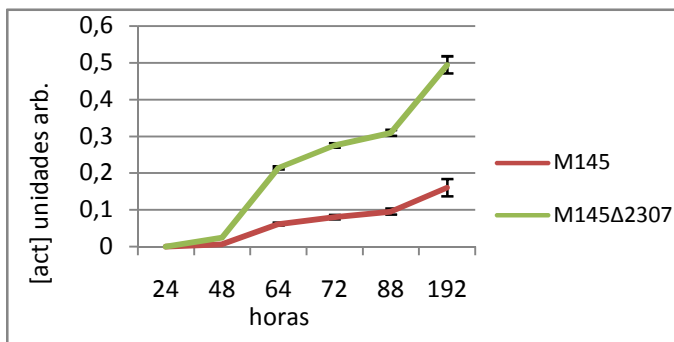


Figura 37: producción de actinorrodina de la cepa silvestre de *S. coelicolor* M145 y la cepa mutante *S. coelicolor* M145Δ3015 .

4.7.- Análisis Genómico del mutante de *S. coelicolor* M145 Δ 2307:

Una vez comprobada la delección del gen SCO2307 mediante “*Southern blotting*”, procedimos a llevar a cabo estudios de expresión génica y la incidencia en el metabolismo global mediante el uso de *arrays* de DNA (C200G. Eurogentec, Bélgica).

Se plaqueó sobre R5 sólido cubierto con celofán 10^6 esporas del mutante *S. coelicolor* M145 Δ 2307 y M145 por cuadruplicado; estas se incubaron 72 horas (tiempo necesario para producir actinorrodina) a 30°C y posteriormente se recogió el micelio y se extrajo RNA total mediante el método kirbeasy, tal y como se indica en Materiales y Métodos. Las muestras de RNA así obtenidas (Figura 38), se convirtieron a cDNA que se marcó y se hibridó en 4 *arrays* diferentes.

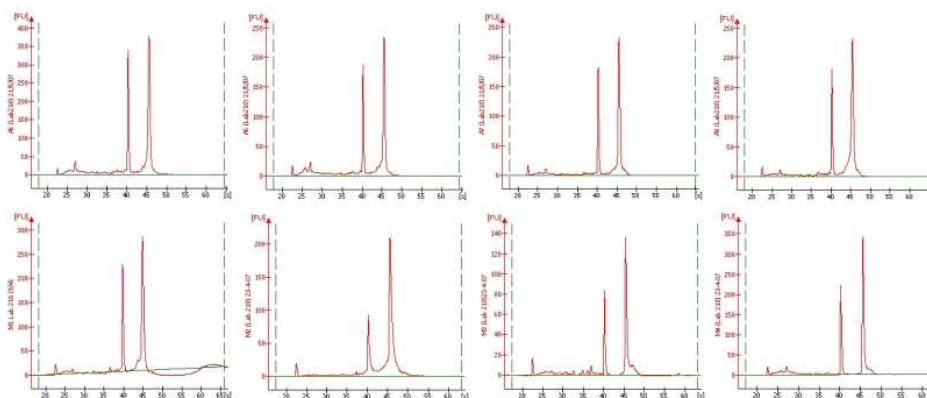


Figura 38: Análisis para determinar la calidad del RNA total extraído de *S. coelicolor* M145 (fila superior) y el mutante *S. coelicolor* M145 Δ 2307 (fila inferior). Los RNAs obtenidos parecen intactos y apenas presentan degradación

Usando unos parámetros de restricción de un p-valor ajustado menor de 0.05 y una *fold change* mayor de 1.7 y menor de -1.7 se obtuvieron un total de 176 genes que, aparentemente, se expresaban diferencialmente (lista completa en Anexo 1); de ellos caben destacar:

- 72 que aparecían reprimidos con *fold changes* de entre -23.8 y -1.8.
- 103 genes aparecieron como inducidos con *fold changes* de entre 1.65 hasta 6.9.
- 18 entran en la categoría de proteínas reguladoras (Tabla 31).
- Todos los genes del *cluster* de biosíntesis de la actinorrodina (21 genes) están siendo inducidos (SCO5075 no se encuentra en el chip, y SCO5074 y SCO5086 tienen un p-valor alto) (Tabla 32).
- 29 genes de 38 del *cluster* de biosíntesis de CDA son inducidos (algunos con p-valoros altos). (Tabla 33).
- 9 genes de la capa fibrosa que rodea las hifas aéreas, incluyendo chaplinas y rodlinas (Tabla 34).
- 9 genes del metabolismo del nitrato (Tabla 35).
- 4 genes de la síntesis de glutamina (Tabla 36).
- 3 genes del *cluster* *bldK* (en el *array* falta *bldKE* y la expresión diferencial de *bldKD* a pesar de no tener un buen p-valor tiene un *fold change* alto) (Tabla 37).
- 10 citocromos. (Tabla 38).
- 56 proteínas hipotéticas o desconocidas (datos no mostrados).

Resultados

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
10,07	1,3	2,46228883	0,00046278	0,03820502	SCO0712	lipR, putative transcriptional activator
9,87	-1,32	-2,4966611	0,00092029	0,04923398	SCO2954	sigU, probable RNA polymerase sigma factor
12,7	1,64	3,11665832	0,00000594	0,01234209	SCO3217	cdaR, transcriptional activator protein,
11,95	-0,89	-1,85317612	0,00057144	0,04148282	SCO3356	sigE, ECF sigma factor
10,7	-2,15	-4,43827789	0,00038241	0,03654733	SCO3715	possible ECF sigma factor
10,53	1,18	2,26576777	0,00039305	0,03654733	SCO4159	glnR, transcriptional regulatory protein
11,25	1,95	3,86374532	0,00077584	0,0468762	SCO4198	probable DNA-binding protein
10,72	-2,16	-4,46914855	0,00039366	0,03654733	SCO4412	possible regulatory protein
11,82	-1,9	-3,73213197	0,00091554	0,04923398	SCO4920	probable deoR-family transcriptional regulator
9,71	0,86	1,81503831	0,00080624	0,0483674	SCO4944	possible DNA-binding protein
13,16	0,76	1,69349062	0,00088734	0,04883212	SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein
12,39	1,69	3,22656704	0,0000181	0,02233684	SCO5405	probable transcriptional regulator
10,32	-1,23	-2,3456699	0,00084241	0,0483674	SCO5819	whiH, sporulation transcription factor
11,95	-1,65	-3,13833639	0,00041666	0,03654733	SCO6992	absR1, regulatory protein,
10,25	-3,77	-13,6421583	0,00003376	0,02293262	SCO7252	possible regulatory protein
9,36	-1,08	-2,11403608	0,00008735	0,02695399	SCO7325	anti-sigma factor antagonist
8,86	-1,16	-2,23457428	0,00033531	0,03654733	SCO7727	possible marR-family regulatory protein
8,3	-1,4	-2,63901582	0,00003285	0,02293262	SCO7765	possible transcriptional regulator

Tabla31: genes reguladores expresados diferencialmente

Resultados

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
13,27	1,39	2,62078681	0,00014659	0,02822164	SCO5072	ORF1 hydroxylacyl-CoA dehydrogenase
13,4	1,64	3,11665832	0,00000714	0,01234209	SCO5073	ORF2, possible oxidoreductase
13,6	1,04	2,05622765	0,00019444	0,03010117	SCO5076	actVA1, probable integral membrane protein
13,78	1,28	2,42838977	0,0001088	0,02802865	SCO5077	actVA2, hypothetical protein
13,31	1,21	2,31337637	0,00025894	0,03368196	SCO5078	actVA3, hypothetical protein
13,89	1,27	2,41161566	0,00004284	0,02293262	SCO5079	actVA4, conserved hypothetical protein
13,09	1,58	2,9896985	0,0000733	0,02638635	SCO5080	actVA5, possible hydrolase
12,81	1,65	3,13833639	0,00002866	0,02293262	SCO5081	actVA6, hypothetical protein
9,68	1,62	3,07375036	0,0005379	0,04041238	SCO5082	actII-1, probable transcriptional regulatory protein
12,37	-2,12	-4,34693945	0,00030388	0,03524803	SCO5083	actII-2, probable actinorhodin transporter
12	-1,97	-3,91768119	0,00082357	0,0483674	SCO5084	actII-3, putative membrane protein
13,16	0,76	1,69349062	0,00088734	0,04883212	SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein
12,86	1,8	3,48220225	0,00039282	0,03654733	SCO5087	actIORF1, actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase alpha subunit
12,42	1,88	3,6807506	0,0000847	0,02695399	SCO5088	actIORF2, actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase beta subunit
13,38	1,92	3,78423059	0,00000441	0,0120337	SCO5089	actIORF3, actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein
13,34	1,93	3,81055199	0,00000324	0,0120337	SCO5090	actVII, actinorhodin polyketide synthase bifunctional cyclase/dehydratase
12,63	2,17	4,50023394	0,00004645	0,02293262	SCO5091	actIV, cyclase
12,92	1,97	3,91768119	0,00011704	0,02802865	SCO5092	actVB, actinorhodin polyketide possible dimerase
13,2	0,77	1,70526978	0,00125924	0,05787124	SCO5086	actIII, ketoacyl reductase
14,57	0,83	1,77768536	0,00247371	0,08202763	SCO5074	ORF3, possible dehydratase

Tabla 32: genes del *cluster* de biosíntesis de la actinorrodina expresados diferencialmente. En verde: gen con un p-valor y un fold change próximo a los valores de corte pero aún significativo.

Resultados

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbelD	Description
10,51	1,14	2,20381023	0,00004416	0,02293262	SCO3211	trpC2, probable indoleglycerol phosphate synthase
10,91	0,71	1,63580412	0,00083888	0,0483674	SCO3214	trpE2, anthranilate synthase component I,
12,7	1,64	3,11665832	0,00000594	0,01234209	SCO3217	cdaR, transcriptional activator protein,
12,9	1,15	2,21913894	0,00063007	0,0426602	SCO3218	small conserved hypothetical protein
11,97	1,7	3,24900959	0,00004636	0,02293262	SCO3220	putative secreted protein
11,42	1,27	2,41161566	0,00065272	0,04353236	SCO3221	probable oxidoreductas
10,89	1,02	2,02791896	0,00042248	0,03671369	SCO3228	probable glycolate oxidase
11,39	1,3	2,46228883	0,00054348	0,04060001	SCO3229	probable 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase,
10,5	1,02	2,02791896	0,00068472	0,04398478	SCO3230	cdaPSI, CDA peptide synthetase
11,73	0,94	1,91852824	0,00066465	0,04366996	SCO3234	possible phosphotransferase
12,15	1,12	2,17346973	0,00042605	0,03671369	SCO3235	probable ABC transporter
12,4	1,17	2,25011697	0,00016191	0,02898417	SCO3236	possible oxygenase
10,49	1,07	2,09943337	0,00071995	0,04540427	SCO3237	unknown
10,38	0,92	1,89211529	0,00089417	0,04905181	SCO3238	unknown
10,79	1,21	2,31337637	0,00035576	0,03654733	SCO3239	unknown
10,86	0,87	1,8276629	0,00074059	0,04602929	SCO3240	unknown
10,96	1,08	2,11403608	0,00039072	0,03654733	SCO3241	possible isomerase
11,43	1,12	2,17346973	0,00035974	0,03654733	SCO3243	possible myo-inositol phosphate synthase
12,39	1,34	2,53151319	0,00018121	0,03010117	SCO3248	fabF3, probable 3-oxoacyl-[acyl carrier protein] synth II
12,14	1,06	2,08493152	0,00060321	0,04231482	SCO3249	probable acyl carrier protein
12,83	0,86	1,81503831	0,00163783	0,06511329	SCO3222	possible small secreted protein
13,2	0,97	1,9588406	0,01868408	0,23930655	SCO3223	probable ABC transporter integral membrane protein
13,31	1,17	2,25011697	0,01256968	0,19272765	SCO3224	probable ABC transporter ATP-binding protein
10,55	0,82	1,76540599	0,00473405	0,11127898	SCO3225	absA1, two component sensor kinase
10,43	0,77	1,70526978	0,01372988	0,20137592	SCO3226	absA2, two component system response regulator
10,89	1,02	2,02791896	0,00042248	0,03671369	SCO3228	probable glycolate oxidase
11,47	1,06	2,08493152	0,00145148	0,06102568	SCO3233	probable hydrolase
12,82	1,05	2,07052985	0,00116626	0,05625796	SCO3244	putative secreted protein
11,56	1,01	2,0139111	0,00337899	0,0926112	SCO3247	possible acyl CoA oxidase

Tabla33: genes del *cluster* de biosíntesis de CDA expresados diferencialmente. En verde: gen con un p-valor y un fold change próximo a los valores de corte pero aún significativo.

Resultados

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbelD	Description
12,67	-3,39	-10,4831472	0,00006189	0,02376387	SCO0409	sapA spore-associated protein precursor
10,59	-1,31	-2,4794154	0,00042835	0,03671369	SCO1674	chpC, possible secreted protein
13,29	-1,86	-3,63007662	0,00029575	0,03500426	SCO1800	chpE, possible small secreted protein
12,17	-1,88	-3,6807506	0,00060202	0,04231482	SCO2705	chpF, possible membrane protein
10,34	-1,53	-2,88785839	0,00054509	0,04060001	SCO2717	chpD, possible small membrane protein
10,42	-2,33	-5,0280535	0,00037062	0,03654733	SCO2718	rdIA, putative secreted protein
13,06	-1,37	-2,58470566	0,00169014	0,06548154	SCO2699	chpG
13,94	-1,3	-2,46228883	0,00275728	0,08538679	SCO1675	chpH
10,55	-1,21	-2,31337637	0,00247995	0,08202763	SCO2719	rdIB, putative secreted protein

Tabla 34: genes de la capa fibrosa que rodea a las hifas expresados diferencialmente. En verde: gen con un p-valor y un fold change próximo a los valores de corte pero aún significativo.

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbelD	Description
11,94	2,45	5,46416103	0,00088693	0,04883212	SCO4947	narG3, nitrate reductase alpha chain
11,84	1,8	3,48220225	0,00067548	0,04369082	SCO4948	narH3, nitrate reductase beta chain
11,56	1,68	3,20427951	0,00076586	0,04684305	SCO4949	narJ3, nitrate reductase delta chain
11,43	1,83	3,55537072	0,00047533	0,03856158	SCO4950	narI3, nitrate reductase gamma chain

Tabla 35: genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno expresados diferencialmente.

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbelD	Description
10,73	1,81	3,50642289	0,00005103	0,02376387	SCO2198	glnA, glutamine synthetase I
12,27	2,53	5,77571678	0,00030912	0,03524803	SCO2210	glnII, glutamine synthetase
10,53	1,18	2,26576777	0,00039305	0,03654733	SCO4159	glnR, transcriptional regulatory protein
10,58	2,51	5,69620078	0,00003104	0,02293262	SCO5583	amtB, ammonium transporter

Tabla 36: genes de la síntesis de glutamina expresados diferencialmente.

Resultados

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
11,35	1,77	3,41053957	0,00002086	0,02252389	SCO5112	bldKA, possible ABC transport system integral membrane protein
11,71	1,74	3,34035168	0,00010278	0,02802865	SCO5113	bldKB, possible ABC transport system lipoprotein
10,74	1,45	2,73208051	0,00012093	0,02802865	SCO5114	bldKC, possible ABC transport system integral membrane protein

Tabla 37: genes del *cluster* bldK expresados diferencialmente.

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
11,08	2,1	4,28709385	0,00017017	0,02935499	SCO0773	soyB2, probable ferredoxin
10,91	2,48	5,57897467	0,00028202	0,03500426	SCO0774	probable cytochrome P450
12,45	-1,56	-2,94853843	0,00083722	0,0483674	SCO1626	rarE, possible cytochrome P450
10,95	-2,04	-4,11245531	0,00008688	0,02695399	SCO1627	rarD, cvnD9, probable ATP-GTP binding protein
11,03	-2,04	-4,11245531	0,00013289	0,02802865	SCO1628	rarCcvnC9, hypothetical protein
11,22	-2,15	-4,43827789	0,0003752	0,03654733	SCO1629	rarB, cvnB9, unknown
11,42	-2,02	-4,05583792	0,00077485	0,0468762	SCO1630	rarA, cvnA9, possible integral membrane protein,
10,69	0,74	1,67017584	0,00085461	0,0483674	SCO2150	qcrC, cytochrome C heme-binding subunit
10,49	1,03	2,04202425	0,00028261	0,03500426	SCO5222	eizA, possible lyase
9,79	1,22	2,32946717	0,00041501	0,03654733	SCO5223	probable cytochrome P450

Tabla 38: genes de citocromos o relacionados con citocromos expresados diferencialmente.

Lo que estos resultados parecen mostrar en un primer momento es que la quinasa sensora, que ha sido delecionada, parece ejercer un control negativo sobre el regulador específico de ruta de la actinorrodina y el CDA, ya que en el mutante nulo se sobreexpresan la mayoría de genes de los *clusters* de biosíntesis de ambos antibióticos. También podría tener cierto efecto sobre la formación de micelio aéreo debido a un control sobre *bldK*, las chaplinas y las rodlinas.

4.8.- Capacidad anaeróbica de M145Δ2307:

Los *arrays* hibridados muestran una serie de genes en la cepa mutante relacionados con el metabolismo anaeróbico; fundamentalmente los genes del *cluster narGHIJ3* y varios genes *nir*, así como algunos genes del metabolismo de la glutamina (glutamina sintetasa, *gln*).

El interés en estos genes radica en que *Streptomyces* es un organismo fundamentalmente aerobio a pesar de que posee enzimas de respiración anaeróbica. Su falta de movilidad y las condiciones cambiantes del suelo implican que esta bacteria tendría que soportar periodos de anaerobiosis o micro-anaerobiosis (verbigracia: suelos encharcados tras un diluvio). Si bien *S. coelicolor* no tiene la facultad de crecer en anaerobiosis completa si podría obtener energía usando el nitrato como aceptor de electrones: en su genoma posee tres operones (*nar1*, *nar2* y *nar3*) que codifican para las enzimas necesarias para ello y todos se expresan, aunque se desconoce bajo qué genes podrían estar regulados y en qué condiciones se transcriben (Van Keulen et al., 2005). Estudios más recientes han mostrado que el micelio “joven” de esta bacteria es capaz de sobrevivir a largos periodos de anaerobiosis (y por supuesto, también las esporas) e incluso puede crecer en condiciones de microanaerobiosis (Van Keulen et al., 2007).

Como en el mutante estaban sobreexpresados los genes del operón *nar3*, varias nitrito reductasas y glutamina sintetasas, nos interesaba saber si este presentaba alguna ventaja en el crecimiento o supervivencia en condiciones anóxicas. La literatura al respecto es muy escasa y apenas hay publicaciones en las que describan experimentos en dichas condiciones (Van Keulen et al., 2003, 2005 y 2007).

Decidimos adaptar un experimento llevado a cabo por Van Keulen et al. (2003): en una placa multipocillo de 15 pocillos añadimos 2 ml de medio mínimo con manitol gMNNP líquido (esta cantidad de medio líquido daba una profundidad de 10 mm, suficiente para crear condiciones anóxicas en al menos 7 días). En cuatro pocillos sembramos esporas de M145 y en los otros 4 un mismo número de M145Δ2307, posteriormente en dos de los pocillos que contenían M145 y en dos de los de contenían M145Δ2307 añadimos 500 μl de parafina (formando una capa que evitara el intercambio de oxígeno entre el aire y el medio) y los otros cuatro se dejaron al aire. La placa, tapada, se incubó durante 15 días a 30°C sin agitación.

En las observaciones periódicas realizadas no se apreciaron diferencias en el crecimiento ni la morfología de las cepas de *S. coelicolor* M145 silvestre y mutante. Tras quince días apenas se vislumbró crecimiento en los pocillos tapados con parafina y si cierto crecimiento en aquellos no recubiertos, con colonias de color blanquecino, la mayoría creciendo en la superficie, algunas pegadas a las paredes del pocillo y unas pocas flotando dentro del medio y en el fondo. Los resultados obtenidos no fueron concluyentes, ya que no se distinguieron diferencias notables entre la cepa silvestre y la mutante.

4.9.- Análisis de la transcripción diferencial de ciertos genes mediante RT-PCR semicuantitativa:

Para realizar los análisis se seleccionaron aquellos genes cuya expresión diferencial nos pareció más destacable: se seleccionaron los genes *actII-ORF4* y *chpF*. Con el fin de obtener resultados fiables estadísticamente realizamos el ensayo de RT-PCR por triplicado para cada réplica de RNA de cada cepa. Por ejemplo, para la cepa silvestre extrajimos 4 RNAs, con cada uno de ellos realizamos tres RT-PCRs con los oligonucleótidos de uno de los genes de interés y tres RT-PCRs con los oligonucleótidos del gen *hrdB*.

Como se muestra en la Figura 39, los datos obtenidos en el análisis RT-PCR son consistentes con los obtenidos por *arrays*. En el caso del gen *actII-ORF4* vimos que la cepa mutante expresaba este gen dos veces más de lo que lo hacía la silvestre (Figura 39A). Este resultado refuerza la idea de que el gen SCO2307 tiene un efecto negativo sobre la biosíntesis de la actinorrodina; la confirmación de esta hipótesis vendría acompañada de una observación fenotípica de este hecho.

El gen *chpF* se expresaba 14 veces más en el mutante que en el silvestre (Figura 39B). Los diversos plaqueos a los que se sometió el mutante no parecieron mostrar un fenotipo diferencial en el micelio aéreo, aunque si se apreció que en todas las ocasiones en que fue necesario recoger esporas de ambas cepas, en el caso del mutante siempre se obtenían títulos una magnitud menor que en el silvestre. Es posible que la diferencia fenotípica no fuese apreciablemente significativa a simple vista y fuese necesario realizar análisis diferentes, tales como micrografías electrónicas de barrido, para determinar posibles diferencias entre la cepa silvestre y la mutante.

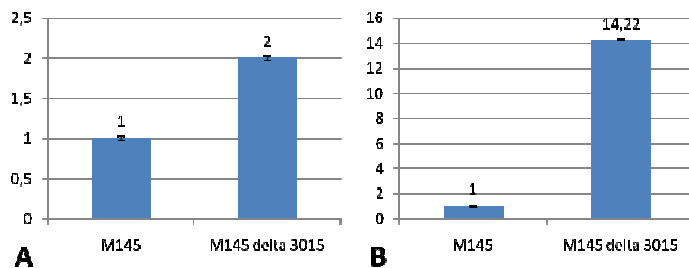


Figura 39: Análisis de RT-PCR de genes expresados diferencialmente: **A.-** Expresión relativa del gen *actII-ORF4* en M145 vs M145 Δ 2308. **B.-** Expresión relativa del gen *chpF* en M145 vs M145 Δ 2308.

5.- DISCUSIÓN

5.1.- Regulación del Cluster Biosintético de un Antibiótico Poliquétido en *S. antibioticus*.

Los *clusters* de biosíntesis de metabolitos secundarios generalmente incluyen genes reguladores específicos que pueden distribuirse entre distintos tipos de familias. La familia del grupo SARP es, sin duda, una de las mejor caracterizadas. Estos reguladores ejercen una regulación positiva, tal y como el regulador específico de actinorrodina (*actIII-ORF4*; Fernández-Moreno et al., 1991), prodigiosina (*redD*; Narva y Feitelson 1990) y daunorubicina (Stutzman-Engwall et al., 1992), entre otros. Estos reguladores específicos de ruta, constituyen una red primaria de regulación y suelen estar interconectados con otros aspectos del desarrollo y el metabolismo mediante una serie de genes que constituyen una red secundaria. Los mecanismos que modulan estos aspectos son múltiples y muy diversos: tRNAs poco comunes (*bldA*; Lawlor et al., 1987), sistemas de dos componentes (*afsK/afsR*; Lee et al., 2002), factores sigma (*sigU*; Gehring et al., 2001), proteínas de unión a DNA (*bldC*; Hunt et al., 2005) etc.

El *cluster* de biosíntesis del antibiótico poliquétido, sintetizado por una PKS tipo II, de *S. antibioticus*, cuyo sistema de regulación hemos analizado, además del regulador específico de ruta, posee un sistema de dos componentes integrado en el *cluster* mismo y que regula específicamente al regulador específico de ruta. La caracterización y posterior estudio de este sistema, es de gran interés por la importancia que posee el género *Streptomyces* como microorganismo de uso industrial. Elucidar y comprender las diversas rutas de regulación de *Streptomyces* permitirán mejorar sustancialmente la eficiencia de los procesos industriales que se le aplican.

Los datos previos sobre la caracterización funcional del regulador específico de ruta codificado en los genes biosintéticos de este *cluster* de poliquétidos determinaron una interacción entre el producto génico del regulador específico de ruta (*orfI*) y promotores de genes estructurales (López-Vázquez et al., 2003). En este caso no ha sido posible identificar la región de interacción en el DNA del promotor, al no ser claro los análisis de “*footprinting*” realizados con ORFI y el promotor del gen de la PKS ORF1. No obstante, la secuencia TCGAG, que había sido descrita por Arias et al. (1999) y Tang et al. (1996) como posible diana de la proteína reguladora específica de secuencia, aparece en la región promotora codificante de la poliquétido sintasa (ORF1). Sin embargo sí ha sido posible identificar la diana del regulador de respuesta ORFD1: TCATNNNNCGAT (donde N es cualquier nucleótido). Es de resaltar que la proteína ORFD1, purificada de *E. coli* parece funcional para el reconocimiento de la secuencia de interacción, sugiriendo que en *E. coli* existe un sistema capaz de reconocer y fosforilar la proteína heteróloga, dado que para la actividad se determinó que el estado fosforilado parece crítico para la actividad “*in vitro*” (López-Vázquez, 2004).

Estos datos parecen corroborar el modelo propuesto en su momento por López-Vázquez (2003) para la regulación de este *cluster* de *S. antibioticus*; en el que cierta señal medioambiental desconocida induce la autofosforilación de ORFD2 que seguidamente fosforila ORFD1; esto induce un cambio conformacional en esta última proteína, la cual se activa, se une al promotor de *orfI*, e induce su transcripción.

Posteriormente el producto génico de *orfI* se unirá a las diversas regiones promotoras dentro del *cluster*, induciendo finalmente la síntesis del antibiótico (Figura 40).

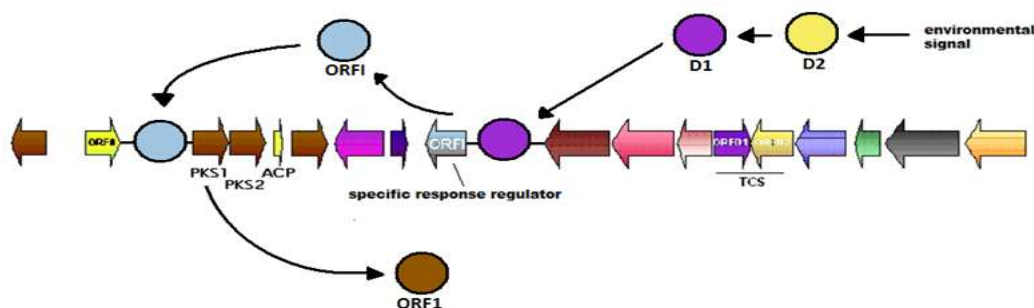


Figura 40: representación esquemática de la regulación de un antibiótico poliquétido de *S. antibioticus* sintetizado por una PKS tipo II. Para detalles ver texto.

5.2.- Cambios Metabólicos Asociados al “onset” de la Producción de Antibióticos.

Dos características comunes en los compuestos poliquétidos cíclicos derivados del acetato son su capacidad de intercalarse en el DNA y la alta reactividad de muchos de sus precursores químicos. Esto puede implicar que la biosíntesis de estos compuestos genere efectos muy aparentes en el metabolismo global de la bacteria, debidos, por ejemplo, a la aparición de radicales libres en el citoplasma.

Se han llevado a cabo numerosos estudios en relación a los factores que inciden en el “onset” de la biosíntesis de antibióticos en Actinomicetos, pero la información disponible en relación al efecto que estas especies químicas tan reactivas puedan tener en el metabolismo bacteriano son escasas. La tecnología genómica nos permite analizar el efecto relativamente global en la expresión génica tanto de genes biosintéticos de antibióticos como otros posibles genes que puedan generar respuesta en cascada.

La introducción del sistema de dos componentes *orfD1/orfD2* y el regulador específico de ruta *orfI* de *S. antibioticus* en *S. coelicolor* induce una serie de cambios en la bacteria de los que el más llamativo es, sin duda, la producción del antibiótico pigmentado actinorrodina, que otorga al organismo un intenso color azul.

Adicionalmente, este estudio mediante *arrays* de DNA ha mostrado que la activación de la síntesis de este antibiótico con actividad redox, puede tener efectos sobre la expresión de otros genes, como han sugerido recientemente Dietrich et al. (2008). En el caso que nos atañe, los efectos más interesantes son los relacionados con el estrés oxidativo y la carga metabólica que provoca en el organismo la producción de actinorrodina.

5.2.1.- Inducción de la Síntesis de Actinorrodina:

Dado que el regulador específico de ruta de *S. antibioticus* es capaz de complementar la mutación en *actII-ORF4* de *S. coelicolor*, las regiones reguladoras del *cluster* de biosíntesis de actinorrodina son reconocidas por la proteína ORFI, similar a ActII-ORF4. En la cepa *S. coelicolor* JF1 recombinante 5 (contiene el sistema de dos componentes *orfD1/orfD2* y el regulador específico de ruta *orfI*) la expresión de

orfD1/orfD2 induce la transcripción de *orfI*, que a su vez activa el *cluster* de biosíntesis de actinorrodina (en la cepa JF1 tanto ActII-ORF4 como RedD son no funcionales).

El análisis de los *arrays* llevados a cabo con las cepas recombinantes 5 frente a 6 (control negativo de 5) y la cepa 5 frente a la 3 (*S. coelicolor* JF1 únicamente con el regulador específico de ruta bajo su propio promotor) han mostrado que, además de complementar al fenotipo productor de actinorrodina, se observa una activación de la transcripción del gen *actII-ORF4*; el incremento en la transcripción de este gen se interpreta como mecanismo regulatorio de retroalimentación positiva, aunque no es posible especificar si éste es directo (ActII-ORF4 interacciona con su propio promotor) o indirecto (con la mediación de uno o más genes reguladores).

Es sabido de la actividad redox de la actinorrodina y sus precursores (Dietrich et al., 2008) y por tanto la bacteria necesita poder responder a posibles incrementos en la concentración intracelular de todas estas especies químicas. Una forma de hacerlo es mediante el incremento en los niveles de transcripción de ciertos componentes de la maquinaria de biosíntesis del antibiótico dirigidos por el incremento del propio regulador específico de ruta (ActII-ORF4). Esto permitiría una rápida conversión de los precursores en el producto final (seguido de su expulsión al exterior celular) y también una expresión suficiente de ciertas bombas de exportación que se encuentran dentro del *cluster* de biosíntesis de la actinorrodina y que podrían funcionar para reducir los niveles de precursores tóxicos ante una eventual acumulación de éstos en el interior celular (Fernández-Moreno et al., 1991).

5.2.2.- Respuesta al Estrés Oxidativo:

Es de esperar que la detoxificación de los radicales libres que eventualmente pudieran generarse por la reactividad de los metabolitos quinónicos se eliminen a partir de genes cuya expresión sea inducida por la presencia de los primeros en la célula. Dado que tanto la actinorrodina como sus precursores son compuestos que inducen la formación de radicales superóxido. Estos podrían ser eliminados en dos pasos: primero, las superóxido dismutasas los convierten en peróxido de hidrógeno y posteriormente, la catalasa transforma el peróxido en agua y oxígeno.

El proceso de biosíntesis de actinorrodina parece ir paralelo a la transcripción de todos los genes *sodF2* (SCO0999) (Chung 1999), *sodF* (SCO2633) (Kim et al., 1998a) y *sodN* (SCO5254) (Kim et al., 1998b), que codifican para superóxido dismutasas en *S. coelicolor*. Hasta el momento no está claro si esta inducción es directa (debido a la acción del regulador específico de ruta o el sistema de dos componentes) o indirecta (como respuesta al cambio en el estado redox que induciría la presencia de los precursores de la actinorrodina), pero es común que los reguladores que controlan la respuesta al estrés oxidativo lo hagan mediante cambios conformacionales debido a la presencia o falta de puentes disulfuro entre los residuos cisteína presentes en dichos reguladores (Ahn et al., 2006; Grinberg et al., 2006; Hahn et al., 2000a, 2000b y 2002; Park y Roe 2008)

Como era de esperar, la síntesis de actinorrodina induce también la transcripción del gen *catA* (SCO0379) (Kim et al., 1994), uno de los dos genes de *S. coelicolor* que

codifican para una catalasa. Al igual que ocurre con las proteínas SOD, la ausencia de una expresión diferencial del regulador de *catA*, *catR* (Hahn et al., 2000) puede ser debida al hecho de que la actividad de éste no depende tanto de sus niveles de expresión si no de su estado redox, ya que las cuatro cisteínas que posee la proteína para la que codifica parecen modular su actividad.

Es probable que la célula responda de dos maneras diferentes a la presencia de radicales superóxido: sin apenas variación en las tasas de transcripción de los diversos reguladores si los niveles de estas especies químicas son bajos, de tal forma que la activación de estos reguladores es debido a un cambio conformacional que sería suficiente para neutralizar los compuestos tóxicos; e incrementando la tasa de transcripción de los reguladores, consiguiendo producir la cantidad suficiente de SODs y catalasas necesarias para neutralizar tan altos niveles de especies químicas reactivas.

5.2.3.- Regulación del Flujo Metabólico:

La síntesis de poliquétidos requiere de unidades iniciadoras y elongadoras basadas en acetil-CoA para formar la cadena policetónica. Es evidente, por tanto, que se trata de un proceso que compite por las mismas unidades que la biosíntesis de algunos metabolitos primarios como los ácidos grasos y con procesos metabólicos básicos como el ciclo de Krebs. La principal fuente de acetil-CoA procede del catabolismo de diversos productos del carbono, entre los que destaca la glicólisis; la acetil-CoA así generada, tiene ahora diversos usos: puede pasar al ciclo de Krebs o mediante la acción de las acetil-CoA carboxilasas ser introducido en la biosíntesis de los ácidos grasos o los poliquétidos. Ryu et al. (2006) vieron que la modificación del flujo del carbono mediante la inactivación de la ruta de la pentosa-fosfato (delecionando el gen *zwf2*) en *S. coelicolor*, resultaba en un incremento de la producción de acetil-CoA a través de la glicólisis y consecuentemente en un aumento de la biosíntesis de actinorrodina. Sin embargo, el incremento más marcado en la producción de actinorrodina, se produjo al sobreexpresar las acetil-CoA carboxilasas. Todo esto muestra la importancia que tiene el metabolismo primario en la tasa de producción de los antibióticos poliquétidos y como se podría incrementar el rendimiento en la producción de compuestos de importancia industrial mediante una manipulación racional de los flujos metabólicos.

La cepa de *S. coelicolor* JF1, recombinante 5 (que contiene el sistema de dos componentes y el regulador específico de ruta) presenta una sobreexpresión temprana de los genes implicados en la biosíntesis de actinorrodina. En este caso, las unidades iniciadoras y elongadoras requeridas para la formación de la cadena policetónica podrían constituir un factor limitante. El análisis de los *arrays* muestran que la bacteria se adapta a esta situación de dos formas distintas: en un primer paso induciría un incremento en los niveles de biotina (grupo prostético necesario para la actividad de la acetil-CoA carboxilasa) y posteriormente incrementaría la tasa de transcripción de la acetil-CoA carboxilasa principal (AccA2) y la propionil-CoA carboxilasa (PccB); la combinación de estas dos enzimas da lugar a un complejo que procesa primordialmente propionil-CoA y en menor medida butiril-CoA, pero que es incapaz de utilizar acetil-

CoA como sustrato (Diakovich et al., 2002). Teniendo en cuenta la mayor importancia que posee la síntesis de ácidos grasos y el ciclo de Krebs sobre la de poliquétidos, probablemente el control de los niveles de la acetil-CoA carboxilasa se regulen mediante la tasa de metabólica de la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos y el ciclo de Krebs.

El flujo de carbono parece constituir un factor limitante en la síntesis de poliquétidos, ya que alimenta al complejo sistema de biosíntesis de antibióticos poliquétidos de las materias primas que requiere para poder ofrecer el producto terminado. Una inducción de la expresión de los genes implicados en proporcionar las unidades iniciadoras y elongadoras podría contribuir a incrementar la tasa de biosíntesis de poliquétidos por parte de las cepas productoras. La reconducción de los flujos de carbono, nitrógeno y otros compuestos básicos para la vida, podría incrementar las tasas de producción de los metabolitos secundarios de una forma mayor a lo que lo hace la regulación génica.

5.2.4.- Consideraciones Finales:

El efecto del sistema de dos componentes, el regulador específico de ruta y la biosíntesis del antibiótico en la bacteria induce una serie de cambios en la expresión global de la bacteria. En primer lugar, la activación del *cluster* de biosíntesis de la actinorrodina lleva consigo una retroalimentación positiva del propio regulador específico de ruta; esta alteración en la expresión de este gen podría ser consistente con un mecanismo de detoxificación para prevenir la acumulación de precursores de la actinorrodina capaces de generar daños. En segundo lugar, sobre el mecanismo anterior parece haber otro en el que se induce la expresión de tres proteínas SOD y, además, la catalasa, que eventualmente previenen contra los daños causados por la actinorrodina y/o sus precursores con alta reactividad. Y por último, parece ponerse de manifiesto una sobreexpresión de varios genes relacionados con la biosíntesis de la biotina y la propionil-CoA carboxilasa, lo que incrementarían el flujo de carbono dirigido a la síntesis del antibiótico, evitando la depleción de metabolitos necesarios en otros procesos metabólicos.

Con los resultados obtenidos en los *Arrays* es difícil elucidar a cuál de los sistemas presentes en los vectores recombinantes se deben los incrementos (sistema de dos componentes, regulador específico de ruta o moléculas de antibiótico quinónico o sus precursores). Es posible aventurar que la inducción de las diferentes proteínas SOD y catalasa, se debe muy probablemente a la presencia del antibiótico o sus precursores, ya que es éste el que podría hacer variar el estado redox en el citoplasma e induce así un cambio conformacional en los reguladores, variando su actividad. En cuanto a la biotina sintasa y acetil-CoA carboxilasas, probablemente sean la disponibilidad de unidades elongadoras para el ciclo de Krebs o para la biosíntesis de ácidos grasos lo que controle la expresión de dichos genes.

5.3.- Sistemas de Dos Componentes Similares a ORFD1/ORFD2 en *S. coelicolor*:

En *S. coelicolor*, el *cluster* de actinorrodina carece de un sistema de reguladores de dos componentes asociado al *cluster* biosintético, a diferencia del de biosíntesis del antibiótico CDA que, al igual que ORFD1/ORFD2 de *S. antibioticus*, AbsA1/AbsA2 se encuentra físicamente dentro de un *cluster* CDA (Adamidis et al., 1992) y ha sido objeto de un profundo estudio (Aceti and Champness 1998; Anderson et al., 2001; Ryding et al., 2002; Sheeler et al., 2005, McKenzie and Nodwell 2007). Delecciones de estos genes han mostrado un fenotipo no productor de los 4 antibióticos producidos por *S. coelicolor* y su sobreexpresión resultó en una sobreproducción de los mismos cuatro antibióticos. AbsA1/2 es un sistema de dos componentes no específico, actúa sobre los cuatro antibióticos y ejerce un fuerte influjo sobre la producción de estos compuestos, ya que es capaz de inhibir casi totalmente su síntesis. Se han encontrado otros sistemas de dos componentes más específicos que AbsA1/AbsA2, pero con un efecto sobre la producción de antibióticos mucho más débil (Uguru et al., 2005).

Por los datos obtenidos hasta el presente, no se ha podido identificar un sistema de reguladores de dos componentes, similar a ORFD1/ORFD2 que haya podido caracterizarse por la alta especificidad del regulador de respuesta por el promotor de *actII-ORF4*. El gen SCO2307, aislado por su similitud de secuencia al sistema ORFD1/ORFD2, parece comportarse como un represor de la biosíntesis de actinorrodina.

El uso de *arrays* de DNA en los últimos años ha desvelado en multitud de reguladores nuevas dianas regulatorias, que habían pasado desapercibidas y que han llegado a mostrar la pleiotropía del arquetipo de regulador específico: *actII-ORF4* (Huang et al., 2001; Huang et al., 2005). Estos estudios han dado lugar a nuevas teorías sobre la organización de toda la red regulatoria de *Streptomyces coelicolor* y nuevas interconexiones entre rutas reguladoras tan diversas como la *bld*, *whi* y el metabolismo secundario (Li et al., 2006; Hesketh et al., 2007b; Liam et al., 2008).

Si se llevaran a cabo estudios de genómica y proteómica similares con otros muchos reguladores tal y como AbsA1/AbsA2, es muy probable que se obtuvieran resultados similares a los obtenidos con otros reguladores, mostrando que este sistema de dos componentes afecta a otros procesos celulares más allá del metabolismo secundario.

5.4.- Posibles Dianas de la Quinasa Sensora SCO2307

La delección de este gen tiene un efecto muy diverso en la bacteria; afectando tanto al metabolismo secundario como a la diferenciación morfológica e incluso al metabolismo primario. Los datos obtenidos a partir de los *arrays* sugieren para este sistema una cierta pleiotropía.

5.4.1.- Efectos en el metabolismo secundario:

Uno de los efectos más claros de que tiene la mutación de este regulador es la inducción de los genes responsables de la síntesis de actinorrodina, visible incluso a simple vista debido a un aumento de la pigmentación del mutante (datos no mostrados). También parece aumentar la expresión de los genes del *cluster* de biosíntesis de CDA, aunque este resultado ha de ser aún validado por RT-PCR y fenotípicamente. Es difícil aventurar si el efecto sobre *actII-ORF4* es directo o no; en el caso de AbsA1/AbsA2 en *S. coelicolor* (McKenzie y Nodwell 2007) y de ORFD1/ORFD2 en *S. antibioticus* (López-Vázquez 2003) que comparten cierta similitud con SCO2307/SCO2308 si ocurre así, lo que lleva a pensar que en este caso también sea así. Por otra parte, existen otros genes, que aparecen como expresados diferencialmente en los *arrays* y que han sido relacionados con incrementos en la biosíntesis de la actinorrodina: *bldK* (Okamoto et al., 2003), *sigU* (Gehring et al., 2001), *rarABCDE* (Komatsu et al., 2003), *lipR* (Valdez et al., 1999). Estos genes podrían ser los que sirviesen de intermediarios en el control de SCO2307 sobre el regulador específico de la actinorrodina. La notable complejidad que tiene la regulación del metabolismo secundario y la diferenciación morfológica y la trans-regulación existente entre unos y otros componentes de esta red en *Streptomyces*, podría ser otro factor que explique la presencia de tantos reguladores distintos que afectasen a la biosíntesis de este antibiótico.

5.4.2.- ¿De qué Manera Actúa SCO2307 sobre la Diferenciación Morfológica?

Hay dos rutas regulatorias consecutivas que dirigen los cambios morfogenéticos en esta etapa crucial para la vida de la bacteria: la ruta *bld* y la *whi*, que controlan el crecimiento de las hifas aéreas y la otra la maduración de estas en cadenas de esporas respectivamente.

Los datos que se desprenden de los *arrays* muestran que el sistema de dos componentes actúa sobre la ruta *bld* y más específicamente sobre el locus *bldK*. Este locus se caracterizó como un *cluster* que codificaba para un complejo permeasa de S-adenosilmetionina (SAM) (Nodwell et al., 1996 y 1998). La acumulación intracelular de SAM induce la síntesis de actinorrodina y retrasa la diferenciación morfológica sin afectar al incremento de la biomasa, dando lugar a un micelio aéreo menos frecuente pero excesivamente alargado (Park et al., 2005). Además, un estudio del proteoma de células tratadas con SAM, mostró que dos transportadores ABC más eran inducidos (Park et al., 2005); los niveles de RNA de uno de estos transportadores (SCO5476-), que muestra una similitud del 42% y del 32% con BldKA y BldKB respectivamente, también se ven afectados por SCO2307. A diferencia del tratamiento directo con SAM, la delección de SCO2307, no induce la síntesis del antibiótico prodigiosina, pero sí de CDA. Esta diferencia podría ser debida a que SCO2307 actuaría de manera diferente a como lo haría SAM por su cuenta. En lo que se refiere al efecto que tiene BldK sobre la formación del micelio aéreo, se desconoce sobre qué elementos estructurales podría actuar. Basándonos en la reducción de la tasa de transcripción vista en ciertos genes *chp*

y *rdl*, relacionados con la formación de la capa fibrosa, que otorga hidrofobicidad y rigidez a las hifas aéreas (Claessens et al., 2003 y 2004; Elliot et al., 2003), podríamos argumentar que son éstos genes las dianas finales de BldK.

Los experimentos mostraron que seis de las ocho chaplinas y las dos rodlinas estaban siendo reprimidas en el mutante. Las chaplinas reprimidas pertenecen a ambas familias: *chpC* y *chpD*, son chaplinas largas, y *chpE*, *chpF*, *chpG* y *chpH* son cortas. Diversos estudios llevados a cabo han mostrado la redundancia de estas proteínas (Claessens et al., 2003, 2004; Elliot et al., 2003; Diberardo et al., 2006), ya que mutantes en uno, dos y hasta cuatro de estos genes son capaces de producir cantidades prácticamente normales de micelio aéreo, aunque sí presentaban cierto retraso y defectos en la formación de la ultraestructura de la capa fibrosa. Se hace necesario eliminar seis o más de estos genes para poder obtener fenotipos *bld*. Tampoco son necesarias RdlA y RdlB para el crecimiento de las hifas pero sí para la formación de los bastoncillos característicos de la capa fibrosa. Debe ser tenido en cuenta que en este caso los genes *chp* no han sido deleccionados, sino atenuados (a pesar de que no se ha estimado el alcance de esta atenuación). Basándonos en todo lo anteriormente expuesto parece razonable que la represión de las seis chaplinas no muestre un fenotipo visible a simple vista y que sea necesario llevar a cabo micrografías con un microscopio electrónico de barrido, lo que probablemente nos permitiría observar una menor cantidad de micelio en la cepa mutante y una ultraestructura aberrante en la capa fibrosa de las hifas aéreas.

5.4.3.- SCO2307 y la Respiración Anaeróbica

La información en este campo es realmente escasa en *Streptomyces*. A falta de más experimentos de anaerobiosis y microaerobiosis con la cepa M145ΔSCO2307, es, por ahora, difícil llegar a sacar algún tipo de conclusión al respecto en base a los datos de que disponemos. Diversos genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno aparecen como expresados diferencialmente (el operón *nar3*, los genes de la biosíntesis de la glutamina, los genes *nir*), pero se desconoce su implicación en el proceso por el cual *Streptomyces coelicolor* es capaz de sobrevivir a largos periodos de anaerobiosis, manteniendo su viabilidad e incluso aumentando su biomasa en condiciones de microanaerobiosis.

5.4.4.- ¿Es SCO2307 un Regulador Pleiotrópico?

Los reguladores específicos de ruta tales como *actII-ORF4*, *redD* y *cdaR* se encuentran en la parte baja de una red reguladora, en la que controlan una ruta biosintética de un antibiótico. Una serie de reguladores globales entre los que se encuentran *bldA*, *bldB*, *bldD* y *bldG*, están en la parte más alta del circuito de regulación e influyen en la regulación morfológica y fisiológica. Finalmente en un nivel intermedio se encuentran infinidad de genes con función reguladora: *afsK/afsR/afsS* (Sawai et al., 2004; Lian et al., 2008), *abaA* (Fernández-Moreno et al., 1992), *absA1/absA2*

(Anderson et al., 2001), *absB* (Chang et al., 2005), *phoP/phoR* (Sola-Landa et al., 2008), *nsdA* (Li et al., 2006), etc.

Todos estos genes controlan la expresión de dos o más *clusters* de biosíntesis y/o ciertos procesos de la diferenciación morfológica, aunque a diferencia de los genes reguladores de alto nivel, lo hacen de una manera mucho menos marcada. En algunos casos, su efecto puede limitarse únicamente a producir cierto retraso en el desarrollo de dichos eventos. En los últimos años, este ordenamiento se ha visto desdibujado debido a una serie de experimentos utilizando *arrays* de DNA (Huang et al., 2001; Huang et al., 2005; Liam et al., 2008), que han ido mostrando cómo lo que parecía una secuencia jerarquizada de señalases se ha convertido en una compleja red interconectada hasta un punto que está aún por determinar, pero en la que incluso los reguladores específicos de ruta muestran efectos pleiotrópicos.

Teniendo todo esto en cuenta y contrastándolo con los resultados obtenidos, el gen SCO2307 podría ser encuadrado dentro del nivel medio de reguladores, con efectos pleiotrópicos no excesivamente marcados, afectando en cierta medida a la producción de actinorrodina y CDA, a la formación de micelio aéreo y quizás también al metabolismo del nitrógeno.

Probablemente el haber deleccionado únicamente la quinasa sensora del sistema de dos componentes, tenga un efecto menor sobre los genes diana que la delección del regulador de respuesta o de ambos genes a la vez. Este efecto es debido a la “poligamia” que presentan muchos de estos reguladores, donde un regulador de respuesta podría recibir información de varias quinastas y una quinasa podría transmitir información a varios reguladores de respuesta diferentes. Ejemplos de esto es el sistema de dos componentes AbsA1/AbsA2 (Sheeler et al., 2005) y AfsK/AfsR (Horinouchi 2003 y Sawai et al., 2004). Por tanto cabría esperar que la delección de la totalidad de dicho sistema de dos componentes tuviese efectos más marcados sobre los genes a los que regula.

6.- CONCLUSIONES

1. En *Streptomyces antibioticus*, el regulador de respuesta ORFD1, asociado al cluster biosintético de un antibiótico poliquetido se une específicamente a una región promotora del regulador específico de ruta ORFI.
2. En *Streptomyces coelicolor*, la biosíntesis de actinorrodina va acompañada de la inducción de la transcripción del regulador específico de ruta en un circuito de retroalimentación positiva.
3. En *Streptomyces coelicolor*, la activación de la biosíntesis del antibiótico actinorrodina va paralela a la inducción de genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo mediante la activación de los genes *sodF*, *sodF*, *sodN* y *catA*.
4. En *Streptomyces coelicolor*, el gen SCO2307, que codifica para una quinasa sensora homóloga al sistema de *S. antibioticus* ORD1/ORD2, funciona como un represor de la biosíntesis de la actinorrodina y probablemente del CDA.
5. El gen SCO2307 de *S. coelicolor*, codificante de una quinasa sensora, induce la expresión de la mayoría de los genes chaplina y de los dos genes rodina, lo que probablemente estimule la formación de micelio aéreo.

7.-BIBLIOGRAFÍA

Aceti D.J. and 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. and Champness W. (1992) "Genetic analysis of *absB*, a *Streptomyces coelicolor* locus involved in global antibiotic regulation". J. Bacteriol. 174(14):4622-4628

Adamidis T., Riggle P. and Champness W. (1990) "Mutations in a new *Streptomyces coelicolor* locus which globally blocks antibiotic biosynthesis but not sporulation". J. Bacteriol. 172:2962-2969

Ahn B.E., Cha J., et al. (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., Parry H.D. and Chater K.F.(1999)."A response regulator-like protein that functions at an intermediate stage of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)" Mol. Microbiol. 34:607-619

Ainsa J.A. and Ryding N.J. et al. (2000) "WhiA, a protein of unknown function conserved among Gram positive bacteria, is essential for sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)" J. Bacteriol. 182:5470-5478

Altschul S.F., Madden T.L., et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" Nucleic Acid Res. 25(17):3389-3402.

Anderson T.B., Brian P. and 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

Ando N., Matsumori N. et al (1997)" Involvement of AfsA in A-factor biosynthesis as a key enzyme" J. Antibiot. 50, 847-852.

Arias P., Fernández-Moreno M.A. and Malpartida F. (1999) "Characterization of the pathway specific positive transcriptional regulator for actinorrodine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA binding protein". J. Bacteriol. 181, 6958-6968.

Bate N., Stratigopoulos G. and Cundliffe E., (2002). "Differential roles of two SARP-encoding regulatory genes during tylosin biosynthesis" Mol. Microbiol. 43, 449-458

Bentley, S.D., Chater K.F. et al. (2002) "Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)". Nature 417:141-147.

Bibb M.J. (1996). "The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)" Microbiology. 142: 1335-1344.

- Bibb M.J., Molle V. and Buttner M.J. (2000). " σ^{BidN} , an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)" J. Bacteriol. 182(16): 4606-4616.
- Bibb M.J. (2005). "Regulation of secondary metabolism in streptomycetes." Curr. Op. Microbiol. 8:208-215
- Bierman M.R., Logan R., et al. (1992). "Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp." Gene 116(1): 43-9.
- Birnboim H.C. (1983). "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA". Methods Enzimol. 100:243-255.
- Brown D.P., Chiang S.J.D. et al. (1988). "Site-specific integration in *Saccharopolyspora erythraea* and multisite integration in *Streptomyces lividans* of actinomycete plasmid pSE101" J Bacteriol. 170(5): 2287-95.
- Brown, M.G.M., Weston A., et al. (1979) "Transformation of *E. coli* C600 by plasmid DNA at different phases of growth". FEMS Microbiol Lett. 5:219-222
- Cabiscol E., Tamarit J. and Ros J. (2000). "Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species". Internatl. Microbiol. 3(1): 3-8
- Capstick D.S., Willey J.M., Buttner M.J. and Elliot M.A. (2007). "SapB and the chaplins: connections between morphogenetic proteins in *Streptomyces coelicolor*". Mol. Microbiol. 64(3):602-613
- Castillo U.F., Strobel G.A., Ford E.J., Hess W.M., Porter H., Jensen J.B., Albert H., Robison R., Condrón M.A., Teplow D.B., Stevens D. and Yaver D. (2002) "Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*". Microbiology; 148: 2675-2685
- Chakraborty R. and Bibb M.J. (1997) "The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation". J. Bacteriol. 179:5854-5861
- Challis G.F., Hopwood D.A. (2003) "Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species" PNAS 100 (2): 14555-14561
- Champness W.C. and Chater, K.F. (1994), "Regulation and integration of antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces* spp.". Regulation of Bacterial Differentiation. (Piggot P., Moran C.P.J. and Youngman P., ed.) Washington D.C., American Society for Microbiology: 61-93.
- 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

Chater K.F. (1984) "Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*" Microbial Development. (Shapiro, L. and Losick R., ed), pp. 89-115. Cold Spring Harbor Laboratory (New York).

Chater, K.F., Bruton C.J., King A.A. and Suarez J.E. (1982). "The expression of *Streptomyces* and *Escherichia coli* drug-resistance determinants cloned into the *Streptomyces* phage (phi)C31". Gene 19:21-32

Chater, K. F. and Bibb, M. J. (1997). "Regulation of Bacterial Antibiotic Production. In: Biotechnology" (Eds: Rehm, H -J, Reed) Mannheim pp 149-182.

Chater K.F. (2001). "Regulation of Sporulation in *Streptomyces coelicolor* A(3)2: a checkpoint multiplex". Curr. Op. Microbiol. 4:667-673.

Chater K.F. and Horinouchi S. (2003). "Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species". Mol Microbiol. 48(1):9-15

Cho Y.H. and Roe J.H. (1997) "Isolation and expression of the *catA* gene encoding the major vegetative catalase in *Streptomyces coelicolor* Müller". J. Bacteriol. 179(12):4049-52.

Cho Y.H., Lee E.J. and Roe J.H (2000). "A developmentally regulated catalase required for proper differentiation and osmoprotection of *Streptomyces coelicolor*". Mol. Microbiol. 35(1): 150-160.

Chung H.J., Kim E.J., Suh B., Choi J.H. and Roe J.H. (1999). "Duplicate genes for Fe-containing superoxide dismutases in *S. Coelicolor* A3(2)". Gene. 29(231): 87-93

Claessen D., Rink R., de Jong W., Siebring J., de Vreugd P., Boersma F.G., Dijkhuizen L. and Wosten H.A. (2003). "A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils". Genes Dev. 15;17(14):1714-26

Claessen D., Stokroos I., Deelstra H.J., Penninga N.A., Bormann C., Salas J.A., Dijkhuizen L. and Wosten H.A. (2004). "The formation of the rodlet layer of streptomycetes is the result of the interplay between rodlets and chaplins". Mol Microbiol. 53(2):433-43.

Combes P., Till R., et al. (2002). "The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-attB sites for the (phi)C31-encoded site-specific recombination system". J. Bac. 184(20):5746-5752.

Colombo V., Fernández-de-Heredia M., Malpartida F. (2001). "A polyketide biosynthetic gene cluster from *Streptomyces antibioticus* includes a LysR-type transcriptional regulator". Microbiol. 147(11): 3083-92.

Costa Seaver L. and Imlay J.A: (2001). "Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*". J. Bacteriol. 183: 7182-7189

Davies K.J. (1995). "Oxidative stress: the paradox of aerobic life". *Biochem. Soc. Symp.* 61:1-31.

Demain A.L. (1999). "Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52(4):455-63.

Diakovich L., Peirú S., Kurth D., et al. (2002). "Kinetic and structural analysis of a new group of acyl-CoA carboxylases found in *Streptomyces coelicolor* A3(2)" *J. Biol. Chem.* 277, 31228-31236.

Diakovich L., Mitchell D.L., Pham H., et al. (2004). "Crystal structure of the β -subunit of acyl-CoA carboxylase: structure-based engineering of substrate specificity" *Biochem.* 43: 14027-14036.

DiBerardo C., Capstick D.S. et al. (2008). "Function and redundancy of the chaplin cell-surface proteins in aerial hyphae formation, rodlet assembly, and viability in *Streptomyces coelicolor*" *J. Bacteriol.* Published online ahead of print, June 2008.

Dietrich L.E.P., Teal T.K., Price-Whelan A. and Newman D.K. (2008). "Redox-active antibiotics control gene expression and community behaviour in divergent bacteria". *Science* 321.

Elliot M.A., Karoonuthaisiri N., Huang J., Bibb M.J., Cohen S.N. et al. (2003). "The chaplins: a family of hydrophobic cell-surface proteins involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*" *Genes Dev.* 15;17(14):1727-40.

Evans M.D. and Cooke M.S. (2004). "Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids". *Bioessays* 26(5):533-42.

Feitelson J.S. and Hopwood D.A. (1983). "Cloning of a *Streptomyces* gene for an O-methyl-transferase involved in antibiotic biosynthesis" *Mol.Gen.Genet.* 190:394-398.

Fernández-Moreno M.A., Caballero J. L., Hopwood D.A. and Malpartida F. (1991). "The *act* cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for transcriptional control by the *bldA* transfer RNA gene of *Streptomyces coelicolor*" *Cell* 66, 769-780.

Gehring A.M., Yoo N. and Losick R. (2001) "RNA polymerase sigma factor that blocks morphological differentiation by *Streptomyces coelicolor*" *J. Bacteriol* 183(20):5991-5996.

Goodsell D.S. (2004). "Catalase". *Molecule of the Month*. RCSB Protein Data Bank. http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb57_1.html

Gramajo H.C., Takano E., 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.

Grinberg I., Shteinberg T., et al. (2006). "The *Streptomyces* NrdR transcriptional regulator is a Zn ribbon/ATP cone protein that binds to the promoter regions of Class Ia and class II ribonucleotide reductase operons". *J. Bacteriol.* 188(21): 7635-7644

Hahn J.S., Oh S. Y., Chater K.F., Cho Y.H. and Roe J.H. (2000a). "H₂O₂-sensitive Fur-like repressor CatR regulating the major catalase gene in *Streptomyces coelicolor*". *JBC.* 49(8): 38254–38260

Hahn J.S., Oh S.Y. and Roe J.H. (2000b) "Regulation of the *furA* and *catC* operon, encoding a ferric uptake regulator homologue and acatalase-peroxidase, respectively, in *Streptomyces coelicolor* A3(2)" *J. Bacteriol.* 182(13): 3767-3774

Hahn J.S., Oh S.Y. and Roe J.H. (2002) "Role of OxyR as a peroxide-sensing positive regulator in *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *J. Bac.* 184 (19): 5214-5222

Hesketh A., Chen W.J., Ryding J., Chang S. And Bibb M. (2007a). "The global role of ppGpp synthesis in morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *Genome Biology* 8:R161.

Hesketh A., Bucca G., Laing E., Flett F., Hotchkiss G., Smith C.P. and Chater K.F.(2007b). "New pleiotropic effects of eliminating a rare tRNA from *Streptomyces coelicolor*, revealed by combined proteomic and transcriptomic analysis of liquid cultures." *BMC Genomics.* 2(8):261.

Higgins D., Thompson J., Gibson T., Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.(1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice". *Nuc. Ac. Res.* 22: 4673-4680.

Hopwood D.A., Bibb M.J. et al. (1985). "Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual" The John Innes Foundation, Norwich, UK.

Hopwood D.A., Kieser T. et al. (1983). "Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66"

Hopwood D.A., Bibb M.J., Chater K.F. et al. (1985). "genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual". John Innes Foundation, Norwich U.K.

Hopwood D.A., Kieser T., et al.(1986) "The Bacteria". Vol.9, pp.159. Ed. Queener. Academic Press (New York).

Hopwood D.A. (2007) "Streptomyces in Nature and Medicine". Ed. Oxford University Press (New York).

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):462-7

Hsiao N.H., Söding J., et al. (2007) "ScbA from *S. Coelicolor* A3(2) has homology to fatty acid synthases and is able to synthesize γ -butyrolactones" *Microbiol.* 153:1394-1404.

Huang J., Lih C.J., Pan K.H. and Cohen N.(2001)"Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays". *Genes Dev.* 15:3183-3192.

Huang J., Shi J., Molle V., Sohlberg G., Weaver D., Bibb M. J., et al. (2005). "Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*". *Mol. Microbiol.* 58(5): 1276-1287.

Hunt A.C., Servín-González L., Kelemen G.H. and 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 DNABinding Domains of the MerR Family" *J. Bacteriol.* 187(2): 716-728.

Hutchings M.I., Hoskisson P.A., et al. (2004) "Sensing and responding to diverse extracellular signals? Analysis of the sensor kinases and response regulators of *Streptomyces coelicolor* A3(2)" *Microbiol.* 150:2795-2806

Ikeda H., Ishikawa J. et al. (2003) "Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*".*Nat. Biotechnol.* 21(5):526-531.

Khochlov A.S., Tovarova I.I. et al. (1967). "The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*"*Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 177, 232-235.

Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F. and Hopwood D.A. (2000) "Practical *Streptomyces* Genetics". Norwich: John Innes Foundation.

Kim H., Lee J.S., Hah Y.C. and Roe JH. (1994). "Characterization of the major catalase from *Streptomyces coelicolor* ATCC 10147". *Microbiol.* 140 (12):3391-7

Kim E.J., Chung H.J. et al. (1998a) "Expression and regulation of the *sodF* gene encoding iron- and zinc-containing superoxide dismutase in *Streptomyces coelicolor* Müller". *J. Bacteriol.* 180(8):2014-2020.

Kim E.J., Chung H.J., Suh B., Hah Y.C. and Roe J.H. (1998b). "Transcriptional and post-transcriptional regulation by nickel of *sodN* gene encoding nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces coelicolor* Müller". *Mol. Microbiol.* 27(1):187-95.

Kim D.J., et al. (2003) "The accumulation of S-adenosylmethionine enhances production of actinorhodine but inhibits sporulation in *Streptomyces lividans* TK23" *J. Bacteriol.* 185(2):592-600.

Kim T.H., Park J.S. et al. (2005). "The *whcE* gene of *Corynebacterium glutamicum* is important for survival following heat and oxidative stress". Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 337(3):757-764,

Kinashi H., and Shimaji-Murayama T., (1987). "Detection of Giant linear plasmids in antibiotic producing strains of *Streptomyces* by the OFAGE technique". J.Antibiot. 40(6):913-916.

Kirby K.S., Fox-Carter E. and Guest M. (1967). "Isolation of deoxyribonucleic acid and ribosomal ribonucleic acid from bacteria". Biochem. J. 104(1):258-62.

Kodani S., Hudson M.E. et al. (2004). "The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(31):11448-11453.

Komatsu M., Kuwahara Y., et al. (2003). "Cloning of the conserved regulatory operon by its aerial mycelium-inducing activity in an *amfR* mutant of *Streptomyces coelicolor*". Gene 306: 79-89.

Laemmli U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4". Nature 227: 680

Larson J.L. and Hershberger C.L. (1986). "The minimal replicon of a streptomycete plasmid produces an ultrahigh level of plasmid DNA". Plasmid 15: 199-209

Lawlor E.J., Baylis H.A. and Chater K.F. (1987). "Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2)". Genes Dev. 1, 1305-1310.

Lee P.C., Umeyama T. and 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 Y., Kim K., Suh J.W., Rhee S. and Lim Y. (2007) "Binding of AfsK, a Ser/Thr kinase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) and s-adenosyl-L-methionine". FEMS Microbiol Lett 266:236-240.

Li W., Ying X., Guo Y. et al. (2006). "Identification of a gene negatively affecting antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)". J. Bacteriol. 188(24):8368-8375.

Li W., Wu J., Tao W., Zhao C., Wang Y., He X., Chandra G., Zhou X., Deng Z., Chater K.F. and Tao M.(2007). "A genetic and bioinformatic analysis of *Streptomyces coelicolor* genes containing TTA codons, possible targets for regulation by a developmentally significant tRNA". FEMS Microbiol Lett. 266(1):20-28

Liam W., Jayapal K.P., Charaniya S. et al. (2008). "Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2)". BMC Genomics 9:56

Lomovskaya N., Chater K.F., et al. (1980). "Genetics and molecular biology of *Streptomyces lividans* 66 is linear". Mol.Microbiol. 10(5):923-933

López-Vázquez J.C., (2003). "Caracterización del sistema de regulación de un poliquétido aromático de *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891". Tesis doctoral. Universidad de Alcalá.

Macneil D.J., Gewain K.M. et al. (1992). "Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector". Gene 111:61-68.

Maglott D., et al. (2005). "Entrez Gene: gene-centered information at NCBI". Nuc. Ac. Res. 1(33): 54-58.

Malpartida F. and Hopwood D.A. (1986). "Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2)" Mol Gen Genet 205(1):66-73

Maniatis T., Fritsch E.F., J. Sambrook. (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Ed. New York.

Manteca A., Claessen D., López-Iglesias C. and 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):118-25.

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. and Liras P. (1989). "Enzymes involved in penicillin, cephalosporin and cephamycin biosynthesis". Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 39:153-87

Martínez-Hackert E. and Stock A.M. (1997). "Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors". J. Mol. Biol.;269(3):301-12

Matsumoto A., Hong S-K, Ishikuza H., Horinouchi S. and Beppu T. (1994). "Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase". Gene 146:47-56.

McKenzie N.L., Nodwell J.R. (2007). "Phosphorylated AbsA2 Negatively Regulates Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* through Interactions with Pathway-Specific Regulatory Gene Promoters". J. Bac. July 5284-5292.

McNeil J.B., Storms R.K., Friesen J.D. and Smith M. (1985). "Efficient expression of the *Escherichia coli* leuB gene in yeast". Curr. Genet. 9(8):653-60.

Miller J.H.,(1972). "Experiments in Molecular Genetics". Cold Spring Harbor Ed. New York.

- Mills S.A. and Marletta M.A. (2005). "Metal binding characteristics and role of iron oxidation in the ferric uptake regulator from *Escherichia coli*". *Biochemistry*. 44(42): 13553-13559
- Mitaku S., Hirokawa T., and Tsuji T., "Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane-water interfaces" *Bioinformatics*, **18** 608-16 (2002)
- Narva K.E. and Feitelson J.S. (1990). "Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *red* locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *J. Bacteriol.* 172, 362-333.
- Newton G.L., Arnold K., Price M.S., Sherrill C., Delcardayre S.B., Aharonowitz Y., Cohen G., Davies J., Fahey R.C. and Davis C. (1996). "Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes";178(7):1990-1995.
- Nguyen K.T., Willey J.M., Nguyen .L.D., Nguyen L.T., Viollier P.H. and Thompson C.J. (2002). "A central regulator of morphological differentiation in the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor*". *Mol Microbiol.* 46(5):1223-38
- Nguyen K.T., Tenor J., Stettler H., Nguyen L.T., Nguyen L.D. and Thompson C.J. (2003). "Colonial differentiation in *Streptomyces coelicolor* depends on translation of a specific codon within the *adpA* gene". *J. Bacteriol.* 185(24):7291-6
- Nixon B.T., Ronson C.W. and Ausubel F.M. (1986). "Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(20):7850-7854
- Nodewell J.R., McGovern K. and Losick R. (1996)."An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*". *Mol. Microbiol.* 22, 881-893
- Nodewell J.R. and Losick R. (1998)."Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*" *J. Bacteriol.* 180, 1334-1337.
- Oh S.H. and Chater K.F. (1997). "Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): possible relevance to other organisms" *J. Bacteriol.* January p 122-127
- Okamoto S., Lezhava A., et al. (2003). "Enhanced expression of S-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2)" *J. Bacteriol.* 185(2) 601-609
- Omura S., Ikeda H., et al. (2001) "Genome Sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites". *Mol.Microbiol.*21:12215-12220.

Ortiz de Orué Lucana D. and Schrempf H. (2000). "The DNA-binding characteristics of the *Streptomyces reticuli* regulator FurS depends on the redox state of its cysteine residues". *Mol. Gen Genet.* 264: 341-353.

Page M.S., Kang J.G., Roe J.H. and Buttner M.J.(1998) " σ^R , an RNA polymerase sigma factor that modulates expression of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *EMBO J.* 17(19):5776-82.

Palenik B., Brahamsha B. et al (2003). "The genome of a motile marine *Synechococcus*". *Nature* 424: 1037-1042

Pang X., Aigle B., Girardet J.M., Mangenot S., Pernodet J.L., Decaris B., Leblond P. (2004). "Functional angucycline-like antibiotic gene cluster in the terminal inverted repeats of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome" *Antimicrob Agents Chemother.* 48(2):575-88.

Park H.S., et al. (2005) "Accumulation of S-adenosylmethionine induced oligopeptide transporters including BldK to regulate differentiation events in *Streptomyces coelicolor* M145". *FEMS* 249: 199-206

Park J.H. and Roe J.H.(2008). "Mycothiols regulate and is regulated by a thiol-specific antisigma factor RsrA and σ^R in *Streptomyces coelicolor*"

Reese M.G. (2001). "Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome", *Comput. Chem.* 26(1):51-6.

Ritchie M.E., Silver J., Oshlack A., Holmes M., Diyagama D., Holloway A., and Smyth G.K. (2007). "A comparison of background correction methods for two-colour microarrays". *Bioinformatics* 23, 2700-2707.

Rocha E.P.C., Cornet E. and Benedicte M. (2005). "Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems". *PLOS Genet.* 1(2): e15

Rodríguez E. and Gramajo H.(1999)"Genetic and biochemical characterization of the α and β components of a propionyl-CoA carboxylase complex of *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *Microbiol.* 145:3109-3119

Rodríguez E., Banchio C., Diacovich L., Bibb M.J. and Gramajo H.(2001) "Role of an essential acyl coenzyme A carboxylase in the primary and secondary metabolism of *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9):4166-4176

Ryding N.J., Anderson T.B., 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.

Ryu Y.G., Butler M.J., Chater K.F. and Lee K.J.(2006). "Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*". *Appl. Environ. Microbiol.* 2006 Nov;72(11):7132-9.

Sambrook T., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989) "Molecular cloning, a laboratory manual". Cold Spring Harbour, New York, USA.

Sanger F., Nicklen S., et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5463-5467.

Sanz López de Alda A., (2005). "Aislamiento y caracterización de genes de la ruta biosintética de un antifúngico oxopentaeno producido por *Streptomyces* sp.". Tesis doctoral. Universidad de Alcalá.

Sawai R., Suzuki A. et al. (2004). "Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2)" Gene. 9(334): 53-61

Schafer FQ, Buettner GR (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple". *Free Radic. Biol. Med.* 30 (11): 1191–212.

Sello, J. K., and M. J. Buttner. (2008). "The gene encoding RNase III in *Streptomyces coelicolor* is transcribed during exponential phase and is required for antibiotic production and for proper sporulation". *J. Bacteriol.* 190: 4079–4083

Sheeler N.L., MacMillan S.V. and Nodwell J.R.(2005) "Biochemical activities of the AbsA two component system of *Streptomyces coelicolor*". *J. Bacteriol.* 187(2):687-696

Sola-Landa A., Moura R.S., 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., et al. (2005) "Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes". *Mol.Micro.*

Sola-Landa A., Rodríguez-García A., Apel A.K. and Martín J.F.(2008)."Target genes and structure of the direct repeats in the DNA-binding sequences of the response regulator PhoP in *Streptomyces coelicolor*". *Nucleic Acids Res.* 36(4):1358-68.

Soliveri J.A., Gómez J. et al. (2000). "Multiple paralogous genes related to the *Streptomyces coelicolor* developmental gene *whiB* are present in *Streptomyces* and other actinomycetes". *Microbiology* 146, 333-343

Sone N., Nagata K., Kojima H., et al. (2001) "A novel hydrophobic diheme *c*-type cytochrome. Purification from *Corynebacterium glutamicum* and analysis of the *QcrCBA* operon encoding three subunit proteins of a putative cytochrome reductase complex" *Biochim. Biophys. Acta* 1503 (3): 279-290

Southern E. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *J.Mol.Biol.* 98:503-517

- Stackebrandt, E., W. Liesack, et al. (1992). "Ribosomal RNA and rDNA sequence Analyses." *Gene* 115(1-2):255-260.
- Stock A.M., Robinson V.L. and Goudreau P.N. (2000). "Two-component signal transduction" *Annu. Rev. Biochem.* 69:183-215
- Stutzman-Engwall K.J., Otten S.L. and Hutchinson C.R. (1992). "Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* spp. and overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius*". *J. Bacteriol.* 174, 144-154.
- Takano E., Nihira T. et al. (2000). "Purification and structural determination of SCB1, a γ -butyrolactone that elicits antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *J. Biol. Chem.* 275: 11010-11016.
- Takano E., Chacaraburttu R. et al. (2001). "A complex role for the γ -butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)" *Mol. Microbiol.* 41, 1015-1028
- Takano, E., M. Tao, et al. (2003). "A rare leucine codon in *adpA* is implicated in the morphological defect of *bldA* mutants of *Streptomyces coelicolor*." *Mol. Microbiol.* 50(2): 475-86.
- Takano E., Kinoshita H., et al. (2005) "A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gen in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*". *Mol. Microbiol.* 56(2): 465-479
- Takano E., (2006) " γ -Butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation". *Curr. Op. Microbiol.* 9: 287-294.
- Tang L., Grimm A., Zhang Y.X. and Hutchinson C.R.(1996). "Purification and characterization of the DNA-binding protein DnrI, a transcriptional factor of daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*". *Mol Microbiol.*;22(5):801-13
- Thompson C.J., Fink D. and Nguyen L.D. (2002). "Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence". *Genome Biol.* 26;3(7) Epub.
- Tillotson R.D., Wösten H.A.B. et al. (1998) "A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophyllum commune* restores the capacity of a bald mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* aerial structures" *Mol. Microbiol.* 30(3):595-602
- Tirumalai R.R. and Bishai W.R. (2006). "Mapping essential domains of *Mycobacterium smegmatis* WhmD: insights into WhiB structure and function". *J. Bacteriol.* 188(19): 6966-6976.
- Tokala R.K., Strap J.L., Jung C.M., Crawford D.L., Salove M.H., Deobald L.A., Bailey J.F. and Morra M.J.(2002). "Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving

Streptomyces lydicus WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*)". Appl Environ Microbiol.;68(5):2161-2171.

Uguru G.C., Stephens K.E., Stead J.A, Towle J.E., Baumberg S. and McDowall K.J. (2005). "Transcriptional activation of the pathway-specific regulator of the actinorhodin biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*". Mol. Microbiol. 58(1):131-50.

Umeyama T. and Horinouchi S. (2001). "Autophosphorylation of a bacterial serine/threonine kinase, AfsK, is inhibited by KbpA, an AfsK- binding protein". J. Bacteriol. 183(19):5506-5512.

Valdez F., Gonzalez-Cero G., Kieser H.M. y Servin-Gonzalez L. (1999) "The *Streptomyces coelicolor* A3(2) *lipAR* operon encodes an extracellular lipase and a new type of transcriptional regulator". Microbiol. 145, 2365–2374.

Van Keulen G., Jonkers H.M., Claessen D., Dijkhuizen L., Wösten A.B. (2003). "Differentiation and Anaerobiosis in Standing Liquid Cultures of *Streptomyces coelicolor*". J. Bac. February 1455-1458.

Van Keulen G., Alderson J., et al. (2005). "Nitrate Respiration in the Actinomycete *Streptomyces coelicolor*". Biochem. Soc. Transactions 33(1): 210-212

Van Keulen G., Alderson J., White J. and Sawers R.G. (2007). "The obligate aerobic actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) survives extended periods of anaerobic stress" Env. Microbiol. 9(12): 3143 - 3149

Volff J.N. and Altenbuchner J. (2000). "A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution" FEMS Microbiol. Lett. 186: 143-150

White J. and Bibb M.J. (1997). " *bldA* dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade" J. Bacteriol. 179(3):627-33.

Willey J.M., Santamaría R., Guijarro J. et al. (1991). "Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*". Cell 65, 641-650.

Willey, J.M. et al. (1993). "Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*." Genes Dev. 7:895-905

Woese, D.(1987). "Bacterial evolution". Microbiol.Rev. 51:221-271

Wright J. and Bibb M.J. (1992). "Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome". Gene 113:55-65

Yanish-Perron C., Viera j., et al. (1985). "Improved M13 phage cloning vector and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors". Gene 33:103-119

Youn H.D., Kim E.J., Hah Y.C. and Kang S.O. (1996) "A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp.". *Biochem. J.* 318: 889-896.

Zhao X.Q., Jin Y.Y., Kwon H.J., Yang Y.Y. & Suh J.W.(2006). "S-adenosylmethionine (SAM) regulates antibiotic biosynthesis in *Streptomyces* spp. in a mode independent of its role as a methyl donor". *J Microbiol Biotechnol* 16: 927–932.

Zhong Z., Caspi R., Mincer T., Helinski D., Knauf V., Boardman K., Wilkinson J.E., Shea T., DeLoughery C. and Toukdarian A.A. (2002). "50-kb plasmid rich in mobile gene sequences isolated from a marine micrococcus". *Plasmid*;47(1):1-9.

8.- ANEXO I

Lista total de genes expresados diferencialmente en el experimento **1 frente a 4**. Los genes en verde representan un p-valor o logM por encima del valor de corte pero aún significativo

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj. p value	ProbeID	Description
8,26	-0,97	-1,9588406	0,00006577	0,0244904	SCO0166	putative regulator
9,96	-1,41	-2,65737163	0,00018659	0,02755825	SCO0167	prot hipo
11	-2,92	-7,56846117	0,00001344	0,0244904	SCO0168	possible regulator protein
10,84	-2,26	-4,78991482	0,00036332	0,03615715	SCO0169	prot hipo
8,85	-1,31	-2,4794154	0,00006134	0,0244904	SCO0173	hypothetical protein
10,43	-0,82	-1,76540599	0,00012738	0,02530085	SCO0174	putative DNA-binding protein
9,92	-1,35	-2,54912125	0,00038511	0,03656413	SCO0179	possible zinc-containing dehydrogenase
10,15	-0,63	-1,54756499	0,0006493	0,04548381	SCO0181	hypothetical protein
9,87	-1,22	-2,32946717	0,00047065	0,04153653	SCO0197	hypothetical protein
11,08	-1,04	-2,05622765	0,00024748	0,03121541	SCO0200	unknown, related to "stress endurance"
9,94	-1,05	-2,07052985	0,00072375	0,04810184	SCO0204	probable luxR family two-component response regulator
8,94	-0,98	-1,97246541	0,00012578	0,02530085	SCO0217	narH2, probable nitrate reductase beta chain
8,66	-1,08	-2,11403608	0,00002164	0,0244904	SCO0219	narI2, possible nitrate reductase gamma chain
8,71	-0,96	-1,94530989	0,00071024	0,0477548	SCO0220	hypothetical protein
8,76	-0,64	-1,55832916	0,00007281	0,0244904	SCO0231	small hydrophobic hypothetical protein
8,37	0,66	1,58008262	0,00056704	0,0433701	SCO0408	probable methyltransferase
9,53	-0,62	-1,53687518	0,00074104	0,04879003	SCO0518	hypothetical protein
9,65	0,77	1,70526978	0,00045899	0,04126669	SCO0936	putative oligosaccharide deacetylase
9,69	-1,43	-2,69446715	0,00039689	0,03727347	SCO1366	prot hipo
10,18	-1,47	-2,77021894	0,00017534	0,02711372	SCO1550	putative small membrane protein
8,8	-0,65	-1,5691682	0,0001654	0,02671056	SCO1651	prot hipo
8,97	-0,85	-1,80250093	0,00006966	0,0244904	SCO1773	probable L-alanine dehydrogenase
9,6	-0,7	-1,62450479	0,00050459	0,04324274	SCO1935	tktA1, probable transketolase
10,29	-0,51	-1,80250093	0,00013593	0,02609815	SCO1936	putative transaldolase
10,48	-0,69	-1,61328352	0,00001148	0,0244904	SCO1937	zwf2, probable glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase

9,33	-1,11	-2,15845647	0,00006801	0,0244904	SCO1942	pgi2, glucose-6-phosphate isomerase
10,81	0,66	1,58008262	0,00012682	0,02530085	SCO2575	prot hipo
9,77	1,28	2,42838977	0,00002253	0,0244904	SCO2588	putative integral membrane protein,
11,66	0,64	1,55832916	0,00001438	0,0244904	SCO2971	putative secreted protein
10,5	0,88	1,8403753	0,00044406	0,04059982	SCO3218	putative small conserved hypothetical protein
8,4	0,95	1,93187266	0,00016415	0,02671056	SCO3236	possible oxygenase
8,86	0,79	1,72907446	0,00002709	0,0244904	SCO3299	prot hipo
9,93	0,61	1,52625921	0,00054631	0,04324274	SCO3663	putative membrane protein
9,71	-0,78	-1,71713087	0,00077536	0,0499721	SCO3877	putative 6-phosphogluconate dehydrogenase
7,72	-0,88	-1,8403753	0,00005465	0,0244904	SCO4031	probable integral membrane transport protein
9,01	-0,78	-1,71713087	0,00043536	0,04002358	SCO4159	transcriptional regulatory protein
9,59	-0,82	-1,76540599	0,00011704	0,02530085	SCO4200	putative membrane protein
9,26	0,82	1,76540599	0,00001064	0,0244904	SCO4252	prot hipo
8,98	0,92	1,89211529	0,00007677	0,0244904	SCO4253	prot hipo
10,83	0,72	1,64718203	0,00001938	0,0244904	SCO4559	putative electron transfer oxidoreductase
9,35	0,63	1,54756499	0,00053088	0,04324274	SCO4627	hypothetical protein
10,41	-0,64	-1,55832916	0,00036617	0,03615715	SCO4659	30S ribosomal protein S12
9,44	-1,21	-2,31337637	0,00001342	0,0244904	SCO5020	prot hipo
9,03	-1,17	-2,25011697	0,00010685	0,02530085	SCO5032	ahpC, alkyl hydroperoxide reductase
8,72	-0,72	-1,64718203	0,00069301	0,04714681	SCO5101	conserved hypothetical protein
10,61	-0,94	-1,91852824	0,00019918	0,02892288	SCO5149	putative protease
11,23	0,73	1,65863909	0,00004803	0,0244904	SCO5190	wblC putative DNA-binding protein
11,98	0,61	1,52625921	0,000053	0,0244904	SCO5191	prot hipo
11,47	-1,11	-2,15845647	0,00055056	0,04324274	SCO5240	wblE, hypothetical protein
8,72	0,66	1,58008262	0,00002461	0,0244904	SCO5367	atpB, ATP synthase A chain
9,23	0,75	1,68179283	0,00001956	0,0244904	SCO5369	atpF, ATP synthase B chain
9,45	-1	-2	0,00038492	0,03656413	SCO5423	pyruvate kinase
8,8	-0,71	-1,63580412	0,00039475	0,03727347	SCO5582	putative regulator
8,54	-0,75	-1,68179283	0,00057566	0,0433701	SCO5703	hypothetical protein

10,37	-0,65	-1,5691682	0,00037599	0,03656329	SCO5742	putative membrane protein
9,44	0,79	1,72907446	0,00012667	0,02530085	SCO6274	probable type I polyketide synthase
10,16	0,76	1,69349062	0,0002872	0,03302814	SCO6334	putative transcriptional regulator
9,47	-0,63	-1,54756499	0,00011246	0,02530085	SCO6551	probable oxidoreductase
9,82	-0,85	-1,80250093	0,00028861	0,03302814	SCO6658	probable 6-phosphogluconate dehydrogenase
9,44	-1,35	-2,54912125	0,00008521	0,0244904	SCO6659	pgi, glucose-6-phosphate isomerase
9,42	-1,32	-2,4966611	0,0000345	0,0244904	SCO6660	prot hipo
10,2	-0,71	-1,63580412	0,00062444	0,04495587	SCO6661	zwf, probable glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
9,87	-0,69	-1,61328352	0,00015406	0,02639254	SCO7000	idh, isocitrate dehydrogenase
9,72	-0,75	-1,68179283	0,00001068	0,0244904	SCO7306	regulatory protein
10,08	-0,66	-1,58008262	0,00021941	0,03003056	SCO7399	possible binding-protein-dependent transport lipoprotein,
7,83	1,01	2,0139111	0,00055066	0,04324274	SCO7717	possible secreted protein

Lista total de genes expresados diferencialmente en el experimento **6 frente a 5**. Los genes en verde representan un p-valor o logM por encima del valor de corte.

logSignal (A)	logRatio (M)	Fold Change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
10,11	0,43	1,34723358	0,00071521	0,03433029	SCO0379	katA, catalase (EC 1.11.1.6)
8,22	0,63	1,54756499	0,00004146	0,00738521	SCO0998	fttE, Fe uptake system permease
11,34	1,46	2,75108364	0,00000003	0,00010098	SCO0999	sodF2, superoxide dismutase
10,76	-0,79	-1,72907446	0,00000487	0,00168283	SCO1244	bioB, biotin synthase
10,11	-0,68	-1,60213976	0,00061354	0,03118214	SCO1245	bioA, adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotrans
8,62	0,77	1,70526978	0,00001127	0,00319285	SCO1442	putative integral membrane protein
10,37	-0,6	-1,51571657	0,00003902	0,00732887	SCO1480	prot hipo
10,32	-1,58	-2,9896985	0,00000016	0,00026071	SCO1550	putative small membrane protein
9,19	-1,44	-2,71320865	0,00001473	0,00374194	SCO1675	chpH, possible small membrane protein
8,97	-0,9	-1,86606598	0,00004297	0,00756306	SCO2258	probable ABC-transporter, transmembrane component,
11,74	1,55	2,92817139	0,00000009	0,00019928	SCO2633	sodF, superoxide dismutase [Fe-Zn] (EC 1,15,1,1)
9,53	0,89	1,85317612	0,00001647	0,00403474	SCO2929	putative transposase
8,43	1,54	2,90794503	0,00002246	0,00491375	SCO3105	prot hipo
9,74	-0,54	-1,45397252	0,00354456	0,08312357	SCO3211	putative indoleglycerol phosphate synthase
8,86	-0,77	-1,70526978	0,00125086	0,044844	SCO3216	putative integral membrane ATPase
9,65	-0,46	-1,37554182	0,0008062	0,03627881	SCO3217	cdaR, transcriptional activator protein
11,03	-0,88	-1,8403753	0,00001287	0,00347388	SCO3218	prot hipo
10,19	-0,69	-1,61328352	0,00037499	0,02364687	SCO3221	probable oxidoreductase
7,96	-0,97	-1,9588406	0,00005912	0,00937204	SCO3224	putative ABC transporter ATP-binding protein
8,03	-1,07	-2,09943337	0,00005706	0,00912937	SCO3229	putative 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase
7,94	-0,96	-1,94530989	0,00005334	0,00861456	SCO3230	CDA peptide synthetase I
9,67	-0,37	-1,29235283	0,00298808	0,07495622	SCO3233	probable hydrolase
10	-1,11	-2,15845647	0,00003268	0,00657293	SCO3235	probable ABC transporter

9,76	-1,68	-3,20427951	0,00000242	0,00101292	SCO3236	possible oxygenase
7,14	-0,73	-1,65863909	0,00397353	0,08855777	SCO3237	unknown
8,13	-0,91	-1,8790455	0,00016697	0,0160288	SCO3239	unknown
9,29	-0,63	-1,54756499	0,00041253	0,02483778	SCO3241	possible isomerase
12,52	0,34	1,26575659	0,00104003	0,04093773	SCO3248	fabF3, probable 3-oxoacyl-[acyl carrier protein] synthase II
8,07	-0,74	-1,67017584	0,00006219	0,00976913	SCO4159	glnR, transcriptional regulatory protein
8,36	-0,69	-1,61328352	0,0000951	0,0115725	SCO4229	phoR putative sensor kinase
8,37	-1,06	-2,08493152	0,00001228	0,00342233	SCO4230	phoP putative response regulator
8,86	1,97	3,91768119	0,0000096	0,00276562	SCO4252	prot hipo
8,54	1,93	3,81055199	0,00000252	0,00101292	SCO4253	prot hipo
8,04	0,76	1,69349062	0,00001753	0,0041495	SCO4280	putative reductase
10,48	0,58	1,49484925	0,00003271	0,00657293	SCO4714	50S ribosomal protein L5
7,97	-0,49	-1,40444488	0,00014617	0,01460001	SCO4920	deoR-family transcriptional regulator
12,85	0,41	1,32868581	0,00022517	0,01870656	SCO4921	accA2, acyl-CoA carboxylase complex A subunit
10,42	0,9	1,86606598	0,00008393	0,01082291	SCO4926	pccB, propionyl-CoA carboxylase complex B subunit
12,49	-0,62	-1,53687518	0,00003366	0,00665997	SCO5025	putative transcriptional regulator
9,78	4,28	19,4271182	0,00000121	0,00065331	SCO5071	ORFA hydroxylacyl-CoA dehydrogenase
11,41	1,92	3,78423059	0,00004862	0,00807909	SCO5072	ORF1 hydroxylacyl-CoA dehydrogenase
10,06	3,32	9,98664439	0,00002641	0,00563328	SCO5073	ORF2, possible oxidoreductase
10,34	4,99	31,7789599	0	0,0000222	SCO5074	possible dehydratase
11,47	0,96	1,94530989	0,00000796	0,00237007	SCO5076	actVA1, probable integral membrane protein
9,71	3,29	9,78112222	0,00000134	0,00068142	SCO5077	actVA2, hypothetical protein
10,85	2,88	7,3615012	0,00004077	0,00733803	SCO5079	actVA4, conserved hypothetical protein
10,73	2,03	4,0840485	0,00000017	0,00026071	SCO5080	actVA5, possible hydrolase
9,7	3,03	8,16809701	0,00002837	0,00597914	SCO5081	actVA6, hypothetical protein
6,89	1,19	2,28152743	0,00004609	0,00788545	SCO5082	actII-1, probable transcriptional regulatory protein
8,79	2,42	5,35171022	0,00000812	0,00237707	SCO5083	actII-2, probable actinorhodin transporter
8,31	2,67	6,36429187	0,00000176	0,00082143	SCO5084	actII-3, putative membrane protein,
9,36	3,75	13,4543426	0,00000059	0,00054019	SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein

10,6	2,65	6,27667278	0,00041805	0,02501259	SCO5086	actIII, ketoacyl reductase
10,98	1,56	2,94853843	0,00017771	0,01677156	SCO5087	actIORF1, act polyketide beta-ketoacyl synthase α -subunit
11,46	0,8	1,74110113	0,00002223	0,00491375	SCO5088	actIORF2, act polyketide beta-ketoacyl synthase β -subunit
11,06	3,11	8,63382589	0,00005135	0,00845042	SCO5089	actIORF3, act polyketide synthase acyl carrier protein
9,52	4,2	18,3791737	0,00000329	0,00126323	SCO5090	actVII, act polyketide synthase bifunctional cyclase/dehydratase
10,06	3,13	8,75434961	0,00000639	0,0019457	SCO5091	actIV, cyclase
9,31	4,92	30,2738447	0,00000022	0,00026703	SCO5092	actVB, actinorhodin polyketide possible dimerase
9,32	1,78	3,43426175	0,0000127	0,00347388	SCO5150	tatB putative membrane protein
8,55	1,32	2,4966611	0,00000131	0,00068142	SCO5254	sodN, superoxide dismutase
8,87	2,22	4,65893435	0	0,00002693	SCO5293	putative oxygenase subunit
9,42	1,06	2,08493152	0,0000061	0,00191524	SCO6009	probable solute-binding prot of transmemb transport sys
11,87	-0,6	-1,51571657	0,00003123	0,00642379	SCO6030	prot hipo
9,77	1,61	3,05251842	0,00000068	0,00057092	SCO6069	cvnA6, possible large secreted protein
8,81	0,78	1,71713087	0,00043456	0,0256096	SCO6266	scbA, possible SCB biosynthesis enzyme
12,09	1,02	2,02791896	0,00000085	0,0006302	SCO6284	putative decarboxylase
12,44	0,93	1,905276	0,00003613	0,00693762	SCO6285	prot hipo
7,89	-2,09	-4,25748073	0,00000089	0,0006302	SCO6949	prot hipo
9,8	1,41	2,65737163	0,00001434	0,00369778	SCO7311	probable amino acid decarboxylase
11,73	-1,08	-2,11403608	0,00000213	0,00091837	SCO7573	putative anti-sigma factor antagonist
8,55	-0,88	-1,8403753	0,00000091	0,0006302	SCO7717	putative secreted protein

Lista total de genes expresados diferencialmente en el experimento **4 frente a 5**. Los genes en verde representan un p-valor o logM por encima del valor de corte.

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
7,87	-1,05	-2,07052985	0,00034449	0,0546859	SCO0213	possible nitrate/nitrite transporter protein
9,96	1,71	3,27160823	0,00145495	0,0757366	SCO0379	katA, catalase (EC 1.11.1.6)
9,88	1,19	2,28152743	0,00024537	0,0542588	SCO0408	probable methyltransferase
8,63	1,06	2,08493152	0,00060208	0,05942177	SCO0526	possible oxidoreductase
9,51	3,07	8,39773347	0,00047655	0,05707747	SCO0556	prot hipo
8,2	-1,01	-2,0139111	0,00006677	0,0401965	SCO0892	putative integral membrane protein,
10,01	1,44	2,71320865	0,00031253	0,0542588	SCO1244	bioB, biotin synthase
8,65	-1,17	-2,25011697	0,00028396	0,0542588	SCO1557	putative lipoprotein
8,21	1,16	2,23457428	0,00064478	0,05958193	SCO1729	prot hipo
10,99	-0,77	-1,70526978	0,0019519	0,08186627	SCO2148	cytochrome B subunit
11,22	-1,01	-2,0139111	0,0000646	0,0401965	SCO2149	qcrA Rieske iron-sulfur protein
11,07	-1,04	-2,05622765	0,00012839	0,05160442	SCO2150	qcrC, cytochrome C heme-binding subunit
10,84	-1,22	-2,32946717	0,00008557	0,0448073	SCO2151	cox3, cytochrome c oxidase subunit III
10,25	-0,56	-1,47426922	0,0028114	0,09274528	SCO2155	cox1, cytochrome c oxidase subunit I
10,08	-0,69	-1,61328352	0,00081391	0,06471335	SCO2156	cox2, cytochrome c oxidase subunit II
9,93	-1,22	-2,32946717	0,00033096	0,0542588	SCO2198	glnA, glutamine synthetase I
10,85	2	4	0,00001669	0,0294647	SCO2463	probable ABC transporter
8,76	-1,1	-2,14354693	0,00062246	0,05942177	SCO2479	putative membrane protein
8,82	1,33	2,51402675	0,00063961	0,05942177	SCO2496	putative secreted protein
9,78	1,09	2,12874036	0,00019764	0,0542588	SCO2929	putative transposase
10,78	1,74	3,34035168	0,00002589	0,03336672	SCO3299	prot hipo
9,18	3,28	9,71355908	0,00003182	0,03436219	SCO3397	possible integral membrane lysyl-tRNA synthetase

11,14	5,43	43,1114745	0,00005931	0,0401965	SCO3413	tipA, transcriptional regulator
8,64	2,25	4,75682846	0,00017127	0,0542588	SCO3414	putative transcriptional regulator
8,2	1,18	2,26576777	0,00018937	0,0542588	SCO3433	prot hipo
9,3	-1,28	-2,42838977	0,00058767	0,05928846	SCO3900	prot hipo
11,55	-1,47	-2,77021894	0,00000236	0,02822887	SCO4198	putative DNA-binding protein
12,03	-1,1	-2,14354693	0,00034495	0,0546859	SCO4199	prot hipo
9,85	-1,06	-2,08493152	0,00052656	0,05795476	SCO4366	putative phosphoserine aminotransferase
10,58	1,02	2,02791896	0,00057275	0,05921831	SCO4594	putative oxidoreductase
10,76	1,1	2,14354693	0,00030732	0,0542588	SCO4762	groEL1, 60 kD chaperonin cpn60
12,26	1,21	2,31337637	0,00051077	0,05707747	SCO4921	accA2, putative acyl-CoA carboxylase complex A subunit
10,02	1,26	2,39495741	0,00017093	0,0542588	SCO4926	pccB, propionyl-CoA carboxylase complex B subunit
10,01	-1,75	-3,36358566	0,00049831	0,05707747	SCO4947	narG3, nitrate reductase alpha chain
10,36	4,14	17,6304819	0,00018154	0,0542588	SCO5071	ORFA hydroxylacyl-CoA dehydrogenase
11,19	2,5	5,65685425	0,00145512	0,0757366	SCO5072	possible dehydratase
10,31	5,31	39,6706464	0,0000662	0,0401965	SCO5074	possible dehydratase
10,59	2,36	5,13370359	0,00003457	0,035144	SCO5077	actVA2, hypothetical protein
10,79	3,25	9,51365692	0,00024979	0,0542588	SCO5079	actVA4, conserved hypothetical protein
10,43	2,68	6,40855902	0,00022626	0,0542588	SCO5080	actVA5, possible hydrolase
9,81	3,55	11,7126856	0,0027722	0,09274528	SCO5081	actVA6, hypothetical protein
9,13	2,74	6,68070336	0,00287705	0,09305314	SCO5083	actII-2, probable actinorhodin transporter
8,56	2,84	7,16020057	0,0003273	0,0542588	SCO5084	actII-3, putative membrane protein
9,94	3,13	8,75434961	0,00004279	0,03521003	SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein
10,7	3,24	9,44794129	0,00023573	0,0542588	SCO5086	actIII, ketoacyl reductase
10,97	2,19	4,56305486	0,00025662	0,0542588	SCO5087	actIORF1, act polyketide beta-ketoacyl synthase α -subunit
10,97	1,76	3,38698125	0,00306943	0,09442808	SCO5088	actIORF2, act polyketide beta-ketoacyl synthase β -subunit
10,99	3,5	11,3137085	0,00055011	0,05860782	SCO5089	actIORF3, act polyketide synthase acyl carrier protein
9,72	4,6	24,2514651	0,00011339	0,0515606	SCO5090	actVII, act polyketide synth bifunctional cyclase/dehydratase
10,19	3,64	12,4666333	0,00021449	0,0542588	SCO5091	actIV, cyclase
9,92	4,57	23,7523771	0,00000755	0,02822887	SCO5092	actVB, actinorhodin polyketide possible dimerase

9,42	1,05	2,07052985	0,00004217	0,03521003	SCO5150	tatB putative membrane protein
10,91	-0,96	-1,94530989	0,00029545	0,0542588	SCO5240	wblE, transcription factor, prot hipo
9,36	2,76	6,7739625	0,00021548	0,0542588	SCO5293	putative oxygenase subunit
10,13	1,73	3,31727818	0,00050628	0,05707747	SCO5317	whiE ORFIV, polyketide beta-ketoacyl synthase beta
8,64	1,38	2,60268371	0,00028475	0,0542588	SCO5632	prot hipo
9,93	1,68	3,20427951	0,00063195	0,05942177	SCO6009	probable solute-binding prot of transmemb transport sys
9,4	-1,47	-2,77021894	0,00057179	0,05921831	SCO6042	prot hipo
9,11	1,5	2,82842712	0,00015265	0,0542588	SCO6069	cvnA6, possible large secreted protein
8,67	-1,04	-2,05622765	0,00043858	0,05707747	SCO6101	prot hipo
9,23	0,78	1,71713087	0,00177028	0,08034506	SCO6265	scbR, gamma-butyrolactone binding protein
8,92	1,62	3,07375036	0,0011273	0,07241555	SCO6266	scbA, possible SCB biosynthesis enzyme
9,99	1,48	2,78948733	0,00029602	0,0542588	SCO6268	possible histidine kinase orfB
11,22	1,08	2,11403608	0,00125713	0,07366352	SCO6269	cpkP α , possible oxidoreductase alfa-subunit
11,09	1,22	2,32946717	0,00289906	0,09323809	SCO6270	cpkP β , possible oxidoreductase beta-subunit
11,76	1,02	2,02791896	0,00031452	0,0542588	SCO6273	probable type I polyketide synthase,
11,5	1,47	2,77021894	0,00011144	0,0515606	SCO6274	putative type I polyketide synthase
12,11	1,07	2,09943337	0,00016654	0,0542588	SCO6276	putative secreted protein
11,95	0,94	1,91852824	0,00050385	0,05707747	SCO6277	cpkE, epoxide hydrolase
10,9	1,53	2,88785839	0,00045436	0,05707747	SCO6278	putative integral membrane transport protein
12,02	1,15	2,21913894	0,00002703	0,03336672	SCO6279	putative diaminobutyrate-pyruvate aminotransferase
9,11	0,94	1,91852824	0,00026805	0,0542588	SCO6280	cpkO, SARP regulator
12,03	1,86	3,63007662	0,00002252	0,03243333	SCO6284	putative decarboxylase
12,49	1,65	3,13833639	0,00054583	0,05860782	SCO6285	prot hipo
9	2,15	4,43827789	0,00016313	0,0542588	SCO6288	cpkN, SARP regulator
10,48	1,03	2,04202425	0,00021654	0,0542588	SCO6540	prot hipo
8,72	-1,01	-2,0139111	0,00062495	0,05942177	SCO6764	putative squalene-hopene cyclase
8,4	-1,02	-2,02791896	0,00030685	0,0542588	SCO6819	aroA 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase,
7,89	-1,06	-2,08493152	0,0001228	0,05160442	SCO6820	putative oxidoreductase,
11,18	1,09	2,12874036	0,0003752	0,0559167	SCO6850	prot hipo

8,1	-1,43	-2,69446715	0,00035466	0,0547025	SCO6949	prot hipo
9,56	2,08	4,22807216	0,0002506	0,0542588	SCO7006	putative oxidoreductase,
11,8	1,06	2,08493152	0,00001675	0,0294647	SCO7014	probable LacI-family transcriptional regulatory protein
9,28	-0,62	-1,53687518	0,00014063	0,05400138	SCO7306	wblK, regulatory protein
10,65	1,12	2,17346973	0,00022017	0,0542588	SCO7653	hypothetical fusion protein

Lista total de genes expresados diferencialmente en el experimento **3 frente a 5**. Los genes en verde representan un p-valor o logM por encima del valor de corte.

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
10,28	1,25	2,37841423	0,00000361	0,00124683	SCO0379	katA catalase (EC 1,11,1,6)
10,96	0,95	1,93187266	0,00000786	0,00171901	SCO0422	putative two-component sensor kinase
11,28	1,47	2,77021894	0,00001807	0,00289127	SCO0762	protease inhibitor precursor sti1
10,07	1,2	2,29739671	0,00000423	0,00137866	SCO0912	conserved hypothetical protein SCM1,45,
9,15	0,95	1,93187266	0,00000997	0,00195542	SCO0965	hypothetical protein
11,74	1,13	2,1885874	0,00000091	0,00074702	SCO0999	sodF2, superoxide dismutase
10,17	1,07	2,09943337	0,00000261	0,00107236	SCO1244	bioB, biotin synthase
11,13	0,4	1,31950791	0,00463042	0,07254181	SCO1245	bioA, adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransf
8,76	0,91	1,8790455	0,00000983	0,00195323	SCO2085	ftsW, probable cell division protein
9,35	0,95	1,93187266	0,00001258	0,00222118	SCO2323	putative integral membrane protein
11,9	1,16	2,23457428	0,00000276	0,00108555	SCO2633	sodF, superoxide dismutase [Fe-Zn] (EC 1,15,1,1)
9,43	1,2	2,29739671	0,0000347	0,00381923	SCO2695	hypothetical protein
9,19	1,49	2,80888975	0,00003119	0,00356943	SCO3105	hypothetical protein
13,98	0,98	1,97246541	0,00002834	0,00347258	SCO3413	tipA, transcriptional regulator
10,64	-1,13	-2,1885874	0,00000349	0,00124683	SCO3662	hypothetical protein
9,95	-1,02	-2,02791896	0,00000518	0,00140201	SCO4027	putative anti sigma factor antagonist
13,47	-1,28	-2,42838977	0,00000244	0,00107236	SCO4036	RpoX sigma factor hypothetical protein
9,36	-1,1	-2,14354693	0,00004898	0,00478164	SCO4141	phosphate ABC transport system permease protein
9,17	1,73	3,31727818	0,00000042	0,00045808	SCO4252	hypothetical protein
9,24	1,65	3,13833639	0,00000662	0,00158436	SCO4253	hypothetical protein
9,49	-0,93	-1,905276	0,00002386	0,00329732	SCO4294	hypothetical protein
11,59	-0,94	-1,91852824	0,00001207	0,00217289	SCO4727	rpsM, 30S ribosomal protein S13
7,96	-1,17	-2,25011697	0,00000527	0,00140215	SCO4878	possible glycosyltransferase

13,1	0,76	1,69349062	0,00007294	0,00636562	SCO4921	accA2, putative acyl-CoA carboxylase complex A subunit
10,6	1,51	2,84810039	0,00000259	0,00107236	SCO4926	pccB, propionyl-CoA carboxylase complex B subunit
10,55	3,87	14,6213032	0,00008546	0,00674315	SCO5071	ORFA hydroxylacyl-CoA dehydrogenase
12,31	1,73	3,31727818	0,00008665	0,00677132	SCO5072	ORF1 hydroxylacyl-CoA dehydrogenase
10,78	2,96	7,78123958	0,000001	0,00074702	SCO5073	ORF2, possible oxidoreductase
10,38	5,28	38,8542363	0,00000002	0,00009685	SCO5074	possible dehydratase
10,36	2,64	6,23331664	0,00000002	0,00009685	SCO5077	actVA2, hypothetical protein
10,56	2,61	6,10503684	0,00000035	0,00039922	SCO5079	actVA4, conserved hypothetical protein
11,26	1,71	3,27160823	0,00000678	0,00158436	SCO5080	actVA5, possible hydrolase
10,4	2,89	7,4127045	0,00000276	0,00108555	SCO5081	actVA6, hypothetical protein
9,19	2,21	4,62675274	0,00005608	0,00534584	SCO5083	actII-2, probable actinorhodin transporter
8,54	2,48	5,57897467	0,00000355	0,00124683	SCO5084	actII-3, putative membrane protein,
9,6	3,43	10,7778686	0,00000002	0,00009685	SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein
11,53	2,85	7,2100037	0,00000886	0,00184499	SCO5086	actIII, ketoacyl reductase
11,24	2,85	7,2100037	0,0000006	0,00061273	SCO5089	actIORF3, actinorhodin polyketide synthase acyl carrier prot
9,75	4,19	18,2522195	0,00000021	0,00027732	SCO5090	actVII, act polyketide synth bifunctional cyclase/dehydratase
10,29	2,87	7,3106516	0,00000149	0,000858	SCO5091	actIV, cyclase
9,86	4,92	30,2738447	0,00000012	0,00017922	SCO5092	actVB, actinorhodin polyketide possible dimerase
9,2	1,25	2,37841423	0,00000252	0,00107236	SCO5150	tatB putative membrane protein
9,04	1,14	2,20381023	0,0000277	0,00342094	SCO5254	sodN, superoxide dismutase
9,76	1	2	0,00000477	0,00140201	SCO5288	hypothetical protein
9,6	2,39	5,24157362	0,0000075	0,00171901	SCO5293	possible oxygenase subunit
10,26	1,71	3,27160823	0,00002281	0,00325697	SCO5317	polyketide beta-ketoacyl synthase beta
9,15	-1,36	-2,5668518	0,00000819	0,00176569	SCO5522	leuB, probable 3-isopropylmalate dehydrogenase
8,58	1,16	2,23457428	0,00000248	0,00107236	SCO5632	hypothetical protein
10,31	-0,97	-1,9588406	0,00001285	0,00222118	SCO5650	putative membrane protein
9,69	1,62	3,07375036	0,00000108	0,00074702	SCO6069	putative large secreted protein
8,67	-1,05	-2,07052985	0,00002933	0,00353943	SCO6096	putative lipoprotein
9,33	-1,72	-3,29436407	0,00000595	0,00149026	SCO6098	cysD, sulfate adenyltransferase subunit 2

8,68	-1,12	-2,17346973	0,00002919	0,00353943	SCO6100	cysH, phosphoadenosine phosphosulfate reductase
12,46	1,06	2,08493152	0,00003413	0,00380445	SCO6273	cpkC, probable type I polyketide synthase
11,67	1,54	2,90794503	0,00000495	0,00140201	SCO6274	cpkB, probable type I polyketide synthase
12,42	1,05	2,07052985	0,00001278	0,00222118	SCO6276	cpkD, secreted monooxygenase
11,72	0,88	1,8403753	0,00001415	0,00237409	SCO6277	cpkE, possible epoxide hydrolase
11,66	1,24	2,36198532	0,0000018	0,00096984	SCO6279	cpkG, probable diaminobutyrate-pyruvate aminotransferase
9,06	0,94	1,91852824	0,00004347	0,00444437	SCO6280	cpkO, SARP regulator
12,18	2,06	4,16986304	0,00000007	0,00016685	SCO6284	cpkK, acetyl-CoA carboxylase beta-subunit
12,58	1,6	3,03143313	0,00000979	0,00195323	SCO6285	cpkL, unknown hypothetical protein
8,62	2,05	4,1410597	0,00000175	0,00096984	SCO6288	cpkN, SARP regulator
8,44	-0,91	-1,8790455	0,00000519	0,00140201	SCO6506	gvpL, probable gas vesicle protein
10,49	1,16	2,23457428	0,00004272	0,00439446	SCO6540	hypothetical protein
10,07	-1,15	-2,21913894	0,00000082	0,00074609	SCO6551	putative oxidoreductase
9,43	0,96	1,94530989	0,00002096	0,00309507	SCO6624	putative membrane protein
8,68	1,02	2,02791896	0,00001777	0,0028703	SCO6797	cvnD7, possible ATP/GTP binding protein
8,5	-1,16	-2,23457428	0,00003052	0,00353943	SCO6819	aroA, 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase
8,13	-1,17	-2,25011697	0,00002229	0,00320974	SCO6820	possible oxidoreductase
9,02	-1,17	-2,25011697	0,00001277	0,00222118	SCO6821	putative transferase,
12,02	1,24	2,36198532	0,00000347	0,00124683	SCO6850	hypothetical protein
8,17	-1,08	-2,11403608	0,00000189	0,00099186	SCO6941	cvnC8 hypothetical protein with unknow function
8,44	-2,57	-5,93809428	0,00000005	0,00015065	SCO6949	hypothetical protein
7,92	-0,99	-1,98618499	0,00003295	0,00369776	SCO6950	hypothetical protein
11,75	1,18	2,26576777	0,00000433	0,00138572	SCO7014	probable LacI-family transcriptional regulatory protein
11,57	1,07	2,09943337	0,00003571	0,00390528	SCO7016	putative LacI-family transcriptional regulatory protein (duplicated)
10,4	1,11	2,15845647	0,00001308	0,00223816	SCO7311	probable amino acid decarboxylase

9.- ANEXO II

Lista total de genes expresados diferencialmente en el experimento **M145 contra M145Δ3015**. Los genes en verde representan un p-valor o logM por encima del valor de corte.

logSignal (A)	logRatio (M)	fold change	p value	adj, p value	ProbeID	Description
9,09	-1,55	-2,92817139	0,00084724	0,0483674	SCO0141	possible calcium-binding protein
10,15	1,95	3,86374532	0,0003521	0,03654733	SCO0200	unknown
10,71	1,4	2,63901582	0,00270161	0,08503478	SCO0204	probable luxR family two-component response regulator (narL)
9,24	1,12	2,17346973	0,00163914	0,06511329	SCO0213	possible nitrate/nitrite transporter protein
9,92	1,55	2,92817139	0,00085776	0,0483674	SCO0256	possible short chain oxidoreductase
9,43	1,01	2,0139111	0,00084065	0,0483674	SCO0258	hypothetical protein
12,67	-3,39	-10,4831472	0,00006189	0,02376387	SCO0409	sapA spore-associated protein precursor
10,07	1,3	2,46228883	0,00046278	0,03820502	SCO0712	lipR, putative transcriptional activator
12,49	-1,48	-2,78948733	0,00081289	0,0483674	SCO0736	possible secreted protein
11,04	2,53	5,77571678	0,0005147	0,03952925	SCO0762	sti1, protease inhibitor precursor
11,08	2,1	4,28709385	0,00017017	0,02935499	SCO0773	soyB2, probable ferredoxin
10,91	2,48	5,57897467	0,00028202	0,03500426	SCO0774	probable cytochrome P450
9,77	0,91	1,8790455	0,00040298	0,03654733	SCO0775	conserved hypothetical protein
10,14	1,89	3,70635225	0,00032894	0,03651771	SCO0795	unknown
10,07	-1,6	-3,03143313	0,0002903	0,03500426	SCO0930	possible lipoprotein
11,47	1,29	2,44528056	0,00040616	0,03654733	SCO0955	unknown
10,37	1,78	3,43426175	0,00012708	0,02802865	SCO0958	hypothetical protein
9,77	0,9	1,86606598	0,00031413	0,03524803	SCO0989	unknown
10,59	2,37	5,16941132	0,00004226	0,02293262	SCO0991	conserved hypothetical protein
11,6	1,69	3,22656704	0,00031409	0,03524803	SCO0992	possible cysteine synthase
11,26	1,63	3,09512999	0,00071106	0,04500807	SCO0993	conserved hypothetical protein
10,98	2,03	4,0840485	0,00020434	0,03070486	SCO0995	possible methyltransferase

10,12	1,19	2,28152743	0,00023317	0,03302083	SCO0996	possible lipoprotein
9,92	-1,18	-2,26576777	0,00039399	0,03654733	SCO1160	cvnA3, possible membrane protein,
11,66	0,86	1,81503831	0,00028832	0,03500426	SCO1230	possible secreted tripeptidylaminopeptidase
10,41	1,1	2,14354693	0,00034908	0,03654733	SCO1234	ureC, urease alpha subunit
10,29	1,51	2,84810039	0,00014592	0,02822164	SCO1235	ureB, urease beta subunit
10,83	1,6	3,03143313	0,00019611	0,03010117	SCO1236	ureA, urease gamma subunit
10,83	2	4	0,0001874	0,03010117	SCO1293	hypothetical protein
10,5	1,02	2,02791896	0,00051876	0,03966448	SCO1374	putative secreted protein
9,8	0,92	1,89211529	0,00091857	0,04923398	SCO1443	probable riboflavin synthase
12,45	-1,56	-2,94853843	0,00083722	0,0483674	SCO1626	rarE, possible cytochrome P450
10,95	-2,04	-4,11245531	0,00008688	0,02695399	SCO1627	rarD, cvnD9, probable ATP-GTP binding protein
11,03	-2,04	-4,11245531	0,00013289	0,02802865	SCO1628	rarCcvnC9, hypothetical protein
11,22	-2,15	-4,43827789	0,0003752	0,03654733	SCO1629	rarB, cvnB9, unknown
11,42	-2,02	-4,05583792	0,00077485	0,0468762	SCO1630	rarA, cvnA9, possible integral membrane protein,
10,59	-1,31	-2,4794154	0,00042835	0,03671369	SCO1674	chpC, possible secreted protein
13,29	-1,86	-3,63007662	0,00029575	0,03500426	SCO1800	chpE, possible small secreted protein
11,23	-1,98	-3,94493082	0,00094099	0,04979095	SCO1860	putative secreted protein
10,65	-1,07	-2,09943337	0,00035827	0,03654733	SCO1909	unknown
12,58	1,12	2,17346973	0,00074318	0,04602929	SCO1947	gap1, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
10,51	1,62	3,07375036	0,00002678	0,02293262	SCO1968	probable secreted hydrolase
10,69	0,74	1,67017584	0,00085461	0,0483674	SCO2150	qcrC, cytochrome C heme-binding subunit
11,48	2,79	6,91629785	0,00002695	0,02293262	SCO2195	unknown
12,08	2,6	6,06286627	0,00000096	0,0120337	SCO2196	possible integral membrane protein
10,73	1,81	3,50642289	0,00005103	0,02376387	SCO2198	glnA, glutamine synthetase I
10,13	-1,85	-3,60500185	0,00007969	0,02692407	SCO2207	hypothetical secreted protein
12,27	2,53	5,77571678	0,00030912	0,03524803	SCO2210	glnII, glutamine synthetase
9,38	-1,79	-3,45814893	0,00012423	0,02802865	SCO2217	probable secreted protein
10,17	1,35	2,54912125	0,00062396	0,04265382	SCO2471	possible secreted protein,
10,22	0,97	1,9588406	0,00388936	0,09970412	SCO2486	nirB, probable nitrite reductase

9,96	1,94	3,83705648	0,00013876	0,02802865	SCO2487	nirB, probable nitrite reductase large subunit
10,52	1,43	2,69446715	0,00134431	0,05866097	SCO2488	nirC, probable nitrite reductase small subunit
9,63	-0,94	-1,91852824	0,00061321	0,04255448	SCO2513	hypothetical protein
11,67	-1,93	-3,81055199	0,00057375	0,04148282	SCO2519	probable membrane protein
10,9	-1,62	-3,07375036	0,00076716	0,04684305	SCO2530	unknown
12,17	-1,88	-3,6807506	0,00060202	0,04231482	SCO2705	chpF, possible membrane protein
10,34	-1,53	-2,88785839	0,00054509	0,04060001	SCO2717	chpD, possible small membrane protein
10,42	-2,33	-5,0280535	0,00037062	0,03654733	SCO2718	rdIA, putative secreted protein
10,55	-1,21		0,00247995	0,08202763	SCO2719	rdIB, putative secreted protein
10,25	-1,93	-3,81055199	0,00015214	0,02844361	SCO2805	hypothetical protein
10,37	1,08	2,11403608	0,00090076	0,04910116	SCO2878	unknown
9,87	-1,32	-2,4966611	0,00092029	0,04923398	SCO2954	sigU, probable RNA polymerase sigma factor,
12,15	-3	-8	0,00003894	0,02293262	SCO3113	Transposase remnant
11,13	2,66	6,32033049	0,00004877	0,02340768	SCO3152	unknown
11,91	1,35	2,54912125	0,00017496	0,02935499	SCO3197	probable 1-phosphofructokinase
10,51	1,14	2,20381023	0,00004416	0,02293262	SCO3211	trpC2, probable indoleglycerol phosphate synthase
10,91	0,71	1,63580412	0,00083888	0,0483674	SCO3214	trpE2, anthranilate synthase component I,
12,7	1,64	3,11665832	0,00000594	0,01234209	SCO3217	cdaR, transcriptional activator protein,
12,9	1,15	2,21913894	0,00063007	0,0426602	SCO3218	small conserved hypothetical protein
11,97	1,7	3,24900959	0,00004636	0,02293262	SCO3220	putative secreted protein
11,42	1,27	2,41161566	0,00065272	0,04353236	SCO3221	probable oxidoreductas
10,89	1,02	2,02791896	0,00042248	0,03671369	SCO3228	probable glycolate oxidase
11,39	1,3	2,46228883	0,00054348	0,04060001	SCO3229	probable 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase,
10,5	1,02	2,02791896	0,00068472	0,04398478	SCO3230	cdaPSI, CDA peptide synthetase
11,73	0,94	1,91852824	0,00066465	0,04366996	SCO3234	possible phosphotransferase
12,15	1,12	2,17346973	0,00042605	0,03671369	SCO3235	probable ABC transporter
12,4	1,17	2,25011697	0,00016191	0,02898417	SCO3236	possible oxygenase
10,49	1,07	2,09943337	0,00071995	0,04540427	SCO3237	unknown
10,38	0,92	1,89211529	0,00089417	0,04905181	SCO3238	unknown

10,79	1,21	2,31337637	0,00035576	0,03654733	SCO3239	unknown
10,86	0,87	1,8276629	0,00074059	0,04602929	SCO3240	unknown
10,96	1,08	2,11403608	0,00039072	0,03654733	SCO3241	possible isomerase
11,43	1,12	2,17346973	0,00035974	0,03654733	SCO3243	possible myo-inositol phosphate synthase
12,39	1,34	2,53151319	0,00018121	0,03010117	SCO3248	fabF3, probable 3-oxoacyl-[acyl carrier protein] synthase II
12,14	1,06	2,08493152	0,00060321	0,04231482	SCO3249	probable acyl carrier protein
11,95	-0,89	-1,85317612	0,00057144	0,04148282	SCO3356	sigE, ECF sigma factor
9,44	-1,26	-2,39495741	0,0006596	0,04366996	SCO3612	possible membrane protein
10,7	-2,15	-4,43827789	0,00038241	0,03654733	SCO3715	possible ECF sigma factor
11,62	-1,8	-3,48220225	0,00056207	0,04148282	SCO4002	possible secreted protein
10,03	1,56	2,94853843	0,00040914	0,03654733	SCO4031	probable integral membrane transport protein
10,53	1,18	2,26576777	0,00039305	0,03654733	SCO4159	glnR, transcriptional regulatory protein
11,25	1,95	3,86374532	0,00077584	0,0468762	SCO4198	probable DNA-binding protein
10,75	-0,95	-1,93187266	0,00056957	0,04148282	SCO4266	probable oxidoreductase
13,94	1,64	3,11665832	0,0001005	0,02802865	SCO4295	scoF4, cold shock protein
9,82	-1,55	-2,92817139	0,00084919	0,0483674	SCO4347	unknown
10,06	-1,28	-2,42838977	0,00091848	0,04923398	SCO4348	hypothetical protein
9,37	-1,09	-2,12874036	0,00068943	0,04412336	SCO4349	hypothetical protein, TTA codons
10,08	-1,5	-2,82842712	0,00014014	0,02802865	SCO4350	possible integrase
10,72	-2,16	-4,46914855	0,00039366	0,03654733	SCO4412	possible regulatory protein
11,54	-3,15	-8,87655578	0,00009801	0,02802865	SCO4442	hypothetical protein
11,52	-0,86	-1,81503831	0,00086669	0,0483674	SCO4659	rpsL, 30S ribosomal protein S12
10,66	-1,32	-2,4966611	0,00061641	0,04255448	SCO4675	hypothetical protein
11,82	-1,9	-3,73213197	0,00091554	0,04923398	SCO4920	probable deoR-family transcriptional regulator
9,71	0,86	1,81503831	0,00080624	0,0483674	SCO4944	possible DNA-binding protein
11,94	2,45	5,46416103	0,00088693	0,04883212	SCO4947	narG3, nitrate reductase alpha chain
11,84	1,8	3,48220225	0,00067548	0,04369082	SCO4948	narH3, nitrate reductase beta chain
11,56	1,68	3,20427951	0,00076586	0,04684305	SCO4949	narJ3, nitrate reductase delta chain
11,43	1,83	3,55537072	0,00047533	0,03856158	SCO4950	narI3, nitrate reductase gamma chain

13,05	1,27	2,41161566	0,00010203	0,02802865	SCO5071	ORFA hydroxylacyl-CoA dehydrogenase
13,27	1,39	2,62078681	0,00014659	0,02822164	SCO5072	ORF1 hydroxylacyl-CoA dehydrogenase
13,4	1,64	3,11665832	0,00000714	0,01234209	SCO5073	ORF2, possible oxidoreductase
13,6	1,04	2,05622765	0,00019444	0,03010117	SCO5076	actVA1, probable integral membrane protein
13,78	1,28	2,42838977	0,0001088	0,02802865	SCO5077	actVA2, hypothetical protein
13,31	1,21	2,31337637	0,00025894	0,03368196	SCO5078	actVA3, hypothetical protein
13,89	1,27	2,41161566	0,00004284	0,02293262	SCO5079	actVA4, conserved hypothetical protein
13,09	1,58	2,9896985	0,0000733	0,02638635	SCO5080	actVA5, possible hydrolase
12,81	1,65	3,13833639	0,00002866	0,02293262	SCO5081	actVA6, hypothetical protein
9,68	1,62	3,07375036	0,0005379	0,04041238	SCO5082	actII-1, probable transcriptional regulatory protein
12,37	-2,12	-4,34693945	0,00030388	0,03524803	SCO5083	actII-2, probable actinorhodin transporter
12	-1,97	-3,91768119	0,00082357	0,0483674	SCO5084	actII-3, putative membrane protein
13,16	0,76	1,69349062	0,00088734	0,04883212	SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein
12,86	1,8	3,48220225	0,00039282	0,03654733	SCO5087	actIORF1, act polyketide beta-ketoacyl synthase alpha subunit
12,42	1,88	3,6807506	0,0000847	0,02695399	SCO5088	actIORF2,act polyketide β -ketoacyl synthase subunit
13,38	1,92	3,78423059	0,00000441	0,0120337	SCO5089	actIORF3, actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein
13,34	1,93	3,81055199	0,00000324	0,0120337	SCO5090	actVII, act polyketide synthase bifunctional cyclase/dehydratase
12,63	2,17	4,50023394	0,00004645	0,02293262	SCO5091	actIV, cyclase
12,92	1,97	3,91768119	0,00011704	0,02802865	SCO5092	actVB, actinorhodin polyketide possible dimerase
11,37	2,08	4,22807216	0,0001406	0,02802865	SCO5101	onserved hypothetical protein
11,35	1,77	3,41053957	0,00002086	0,02252389	SCO5112	bldKA, possible ABC transport system integral membrane prot
11,71	1,74	3,34035168	0,00010278	0,02802865	SCO5113	bldKB, possible ABC transport system lipoprotein
10,74	1,45	2,73208051	0,00012093	0,02802865	SCO5114	bldKC, possible ABC transport system integral membrane prot
9,95	-1,77	-3,41053957	0,00044199	0,03725627	SCO5174	possible transferase
9,49	-1,01	-2,0139111	0,0002568	0,03368196	SCO5175	possible integral membrane protein
10,49	1,03	2,04202425	0,00028261	0,03500426	SCO5222	eizA, possible lyase
9,79	1,22	2,32946717	0,00041501	0,03654733	SCO5223	probable cytochrome P450
9,99	1,52	2,8679105	0,00014112	0,02802865	SCO5300	hypothetical protein
12,39	1,69	3,22656704	0,0000181	0,02233684	SCO5405	probable transcriptional regulator

11,55	1,27	2,41161566	0,00052716	0,03977879	SCO5476	probable oligopeptide transport integral membrane protein
12,54	0,92	1,89211529	0,00023696	0,03302083	SCO5477	probable oligopeptide-binding lipoprotein
11,57	2,52	5,73582099	0,00014862	0,02822164	SCO5519	unknown
11,66	1,67	3,18214594	0,00084968	0,0483674	SCO5535	probable carboxyl transferase
10,58	2,51	5,69620078	0,00003104	0,02293262	SCO5583	amtB, ammonium transporter
11,47	1,31	2,4794154	0,0001627	0,02898417	SCO5650	possible membrane protein
10,32	-1,23	-2,3456699	0,00084241	0,0483674	SCO5819	whiH, sporulation transcription factor
11,06	-2,58	-5,97939699	0,00049724	0,03887588	SCO5826	putative membrane protein
10,78	1,05	2,07052985	0,00012549	0,02802865	SCO5887	redQ, probable acyl carrier protein
10,38	1,12	2,17346973	0,00048592	0,0388452	SCO6010	probable ABC-transport system ATP binding protein
10,35	1,68	3,20427951	0,00021793	0,03191338	SCO6075	unknown
12,74	0,76	1,69349062	0,00084812	0,0483674	SCO6189	possible transferase
10,76	1,89	3,70635225	0,00006637	0,02440111	SCO6320	, possible transport integral membrane protein
10,47	-2,04	-4,11245531	0,00063447	0,0426602	SCO6440	conserved hypothetical protein
11,66	-1,24	-2,36198532	0,00040317	0,03654733	SCO6624	putative membrane protein
10,08	-1,4	-2,63901582	0,00083333	0,0483674	SCO6650	unknown
10,34	-1,09	-2,12874036	0,0007715	0,0468762	SCO6655	ribA2, GTP cyclohydrolase II
9,88	-1,57	-2,96904714	0,00014766	0,02822164	SCO6749	unknown
10,36	1,3	2,46228883	0,00036818	0,03654733	SCO6764	probable squalene-hopene cyclase
10,66	1,67	3,18214594	0,00063379	0,0426602	SCO6774	unknown
9,48	-0,96	-1,94530989	0,00059448	0,04231482	SCO6945	possible membrane protein
11,95	-1,65	-3,13833639	0,00041666	0,03654733	SCO6992	absR1, regulatory protein,
9,16	-2,41	-5,31474326	0,00011416	0,02802865	SCO7246	unknown
8,41	-1,43	-2,69446715	0,00052534	0,03977879	SCO7249	unknown
10,25	-3,77	-13,6421583	0,00003376	0,02293262	SCO7252	possible regulatory protein
10,06	0,93	1,905276	0,00088158	0,04882593	SCO7311	probable amino acid decarboxylase,
9,36	-1,08	-2,11403608	0,00008735	0,02695399	SCO7325	anti-sigma factor antagonist
9,91	-1,56	-2,94853843	0,00073218	0,04584055	SCO7383	doubtful CDS
10,1	-1,52	-2,8679105	0,00013485	0,02802865	SCO7400	possible ABC-transport protein, ATP-binding component,

9,66	-2,99	-7,94473996	0,00049217	0,03887588	SCO7449	possible secreted/membrane
9,43	-1,13	-2,1885874	0,00082632	0,0483674	SCO7460	possible lipoprotein
9,26	-1,99	-3,97236998	0,00015424	0,02844361	SCO7481	conserved hypothetical protein
10,58	-2,23	-4,6913398	0,00024228	0,03347523	SCO7510	cypH, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
11	-2,4	-5,27803164	0,00082442	0,0483674	SCO7536	possible integral membrane protein
9,3	-1,53	-2,88785839	0,00008258	0,02692407	SCO7653	hypothetical fusion protein
12,32	-4,62	-24,5900029	0,00031326	0,03524803	SCO7657	possible secreted protein
10,31	-3,78	-13,737047	0,00027951	0,03500426	SCO7658	unknown
8,73	-1,33	-2,51402675	0,00073091	0,04584055	SCO7664	onserved hypothetical protein, len
9,67	-3,14	-8,81524093	0,00012489	0,02802865	SCO7717	possible secreted protein
8,86	-1,16	-2,23457428	0,00033531	0,03654733	SCO7727	possible marR-family regulatory protein
8,5	-0,93	-1,905276	0,00060761	0,04233686	SCO7728	conserved hypothetical protein
8,3	-1,4	-2,63901582	0,00003285	0,02293262	SCO7765	possible transcriptional regulator
9,36	-1,15	-2,21913894	0,00083383	0,0483674	SCO7837	possible membrane protein,

10.- ANEXO III

Tabla 1: 65-35

Genes expresados diferencialmente que aparecen en ambas listas		Genes expresados diferencialmente que aparecen únicamente en 6-5		Genes expresados diferencialmente que aparecen únicamente en 3-5	
ProbeID	Description	ProbeID	Description	ProbeID	Description
SCO0379	katA, catalase (1.11.1.6)	SCO0998	frtE, Fe uptake system permease	SCO0422	putative two-component sensor kinase
SCO0999	sodF2, superoxide dismutase	SCO1442	putative integral membrane protein	SCO0762	protease inhibitor precursor sti1
SCO1244	bioB, biotin synthase	SCO1480	prot hipo	SCO0912	conserved hypothetical protein SCM1,45,
SCO1245	bioA, adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	SCO1550	putative small membrane protein	SCO0965	hypothetical protein
SCO2633	sodF, superoxide dismutase [Fe-Zn] (EC 1,15,1,1)	SCO1675	chpH, possible small membrane protein	SCO2085	ftsW, probable cell division protein
SCO3105	hypothetical protein	SCO2258	probable ABC-transporter, transmembrane component,	SCO2323	putative integral membrane protein
SCO4252	hypothetical protein	SCO2929	putative transposase	SCO2695	hypothetical protein
SCO4253	hypothetical protein	SCO3211	putative indoleglycerol phosphate synthase	SCO3413	tipA, transcriptional regulator
SCO4921	accA2, putative acyl-CoA carboxylase complex A subunit	SCO3216	putative integral membrane ATPase	SCO3662	hypothetical protein
SCO4926	pccB, propionyl-CoA carboxylase complex B subunit	SCO3217	cdaR, transcriptional activator protein	SCO4027	putative anti sigma factor antagonist
SCO5071	ORFA hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	SCO3218	prot hipo	SCO4036	RpoX sigma factor hypothetical protein
SCO5072	ORF1 hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	SCO3221	probable oxidoreductase	SCO4141	phosphate ABC transport system permease protein
SCO5073	ORF2, possible oxidoreductase	SCO3224	putative ABC transporter ATP-binding protein	SCO4294	hypothetical protein
SCO5074	possible dehydratase	SCO3229	putative 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase	SCO4727	rpsM, 30S ribosomal protein S13
SCO5077	actVA2, hypothetical protein	SCO3230	CDA peptide synthetase I	SCO4878	possible glycosyltransferase
SCO5079	actVA4, conserved hypothetical protein	SCO3233	probable hydrolase	SCO5288	hypothetical protein
SCO5080	actVA5, possible hydrolase	SCO3235	probable ABC transporter	SCO5317	polyketide beta-ketoacyl synthase beta
SCO5081	actVA6, hypothetical protein	SCO3236	possible oxygenase	SCO5522	leuB, probable 3-isopropylmalate dehydrogenase
SCO5083	actII-2, probable actinorhodin transporter	SCO3237	unknown	SCO5632	hypothetical protein
SCO5084	actII-3, putative membrane protein,	SCO3239	unknown	SCO5650	putative membrane protein

SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein	SCO3241	possible isomerase	SCO6096	putative large secreted protein
SCO5086	actIII, ketoacyl reductase	SCO3248	fabF3, probable 3-oxoacyl-[acyl carrier protein] synthase II	SCO6098	putative lipoprotein
SCO5089	actIORF3, actinorhodin polyketide synthase acyl carrier prot	SCO4159	glnR, transcriptional regulatory protein	SCO6100	cysH, phosphoadenosine phosphosulfate reductase
SCO5090	actVII, act polyketide synth bifunctional cyclase/dehydratase	SCO4229	phoR putative sensor kinase	SCO6273	cpkC, probable type I polyketide synthase
SCO5091	actIV, cyclase	SCO4230	phoP putative response regulator	SCO6274	cpkB, probable type I polyketide synthase
SCO5092	actVB, actinorhodin polyketide possible dimerase	SCO4280	putative reductase	SCO6276	cpkD, secreted monooxygenase
SCO5150	tatB putative membrane protein	SCO4714	50S ribosomal protein L5	SCO6277	cpkE, possible epoxide hydrolase
SCO5254	sodN, superoxide dismutase	SCO4920	deoR-family transcriptional regulator	SCO6279	cpkG, probable diaminobutyrate-pyruvate aminotransferase
SCO5293	possible oxygenase subunit	SCO5025	putative transcriptional regulator	SCO6280	cpkO, SARP regulator
SCO6069	putative large secreted protein	SCO5076	actVA1, probable integral membrane protein	SCO6288	cpkN, SARP regulator
SCO6284	cpkK, acetyl-CoA carboxylase beta-subunit	SCO5082	actII-1, probable transcriptional regulatory protein	SCO6506	gvpL, probable gas vesicle protein
		SCO5087	actIORF1, actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase alpha subunit	SCO6540	hypothetical protein
		SCO5088	actIORF2, act polyketide beta-ketoacyl synthase beta subunit	SCO6551	putative oxidoreductase
		SCO6009	probable solute-binding protein of transmembrane transport system	SCO6624	putative membrane protein
		SCO6030	prot hipo	SCO6797	cvnD7, possible ATP/GTP binding protein
		SCO7573	putative anti-sigma factor antagonist	SCO6819	aroA, 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (EC 2,5,1,19)
		SCO7717	putative secreted protein	SCO6820	possible oxidoreductase
		SCP1,131	hypothetical protein	SCO6821	putative transferase,
		SCP2,07c	hypothetical protein	SCO6850	hypothetical protein
		SCP2,37	hypothetical protein	SCO6941	cvnC8 hypothetical protein with unknow function
				SCO6950	hypothetical protein
				SCO7014	probable LacI-family transcriptional regulatory protein
				SCO7016	putative LacI-family transcriptional regulatory protein(duplicated)

Tabla 2: 6-5 4-5

Genes expresados diferencialmente que aparecen en ambas listas		Genes expresados diferencialmente que aparecen únicamente en 6-5		Genes expresados diferencialmente que aparecen únicamente en 4-5	
ProbelID	Description	ProbelID	Description	ProbelID	Description
SCO0379	katA, catalase (1.11.1.6)	SCO0998	fttE, Fe uptake system permease	SCO0213	possible nitrate/nitrite transporter protein
SCO1244	bioB, biotin synthase	SCO0999	sodF2, superoxide dismutase	SCO0408	probable methyltransferase
SCO2929	putative transposase	SCO1245	bioA, adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	SCO0526	possible oxidoreductase
SCO4921	accA2, acyl-CoA carboxylase complex A subunit	SCO1442	putative integral membrane protein	SCO0556	prot hipo
SCO4926	pccB, propionyl-CoA carboxylase complex B subunit	SCO1480	prot hipo	SCO0892	putative integral membrane protein,
SCO5071	ORFA hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	SCO1550	putative small membrane protein	SCO1557	putative lipoprotein
SCO5072	ORF1 hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	SCO1675	chpH, possible small membrane protein	SCO1729	prot hipo
SCO5074	possible dehydratase	SCO2258	probable ABC-transporter, transmembrane component,	SCO2148	cytochrome B subunit
SCO5077	actVA2, hypothetical protein	SCO2633	sodF, superoxide dismutase [Fe-Zn] (EC 1,15,1,1)	SCO2149	qcrA Rieske iron-sulfur protein
SCO5079	actVA4, conserved hypothetical protein	SCO3105	prot hipo	SCO2150	qcrC, cytochrome C heme-binding subunit
SCO5080	actVA5, possible hydrolase	SCO3211	trpC2, probable indoleglycerol phosphate synthase	SCO2151	cox3, cytochrome c oxidase subunit III
SCO5081	actVA6, hypothetical protein	SCO3216	putative integral membrane ATPase	SCO2155	cox1, cytochrome c oxidase subunit I
SCO5083	actII-2, probable actinorhodin transporter	SCO3217	cdaR, transcriptional activator protein	SCO2156	cox2, cytochrome c oxidase subunit II
SCO5084	actII-3, putative membrane protein,	SCO3218	prot hipo	SCO2198	glnA, glutamine synthetase I
SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein	SCO3221	probable oxidoreductase	SCO2463	probable ABC transporter
SCO5086	actIII, ketoacyl reductase	SCO3224	putative ABC transporter ATP-binding protein	SCO2479	putative membrane protein
SCO5087	actIORF1, actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase alpha subunit	SCO3229	putative 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase	SCO2496	putative secreted protein
SCO5088	actIORF2, act polyketide beta-ketoacyl synthase beta subunit	SCO3230	CDA peptide synthetase I	SCO3299	prot hipo
SCO5089	actIORF3, act polyketide synthase acyl carrier protein	SCO3233	probable hydrolase	SCO3397	possible integral membrane lysyl-tRNA synthetase
SCO5090	actVII, act polyketide synthase bifunctional cyclase/dehydratase	SCO3235	probable ABC transporter	SCO3413	tipA, transcriptional regulator
SCO5091	actIV, cyclase	SCO3236	possible oxygenase	SCO3414	putative transcriptional regulator

SCO5092	actVB, actinorhodin polyketide possible dimerase	SCO3237	unknown	SCO3433	prot hipo
SCO5150	tatB putative membrane protein	SCO3239	unknown	SCO3900	prot hipo
SCO5293	putative oxygenase subunit	SCO3241	possible isomerase	SCO4198	putative DNA-binding protein
SCO6009	probable solute-binding protein of transmembrane transport system	SCO3248	fabF3, probable 3-oxoacyl-[acyl carrier protein] synthase II	SCO4199	prot hipo
SCO6069	cvnA6, possible large secreted protein	SCO4159	glnR, transcriptional regulatory protein	SCO4366	putative phosphoserine aminotransferase
SCO6284	putative decarboxylase	SCO4229	phoR putative sensor kinase	SCO4594	putative oxidoreductase
SCO6285	prot hipo	SCO4230	phoP putative response regulator	SCO4762	groEL1, 60 kD chaperonin cpn60
SCO6949	prot hipo	SCO4252	prot hipo	SCO4947	narG3, nitrate reductase alpha chain
		SCO4253	prot hipo	SCO5240	wblE, transcription factor, prot hipo
		SCO4280	putative reductase	SCO5317	whiE ORFIV, polyketide beta-ketoacyl synthase beta
		SCO4714	50S ribosomal protein L5	SCO5632	prot hipo
		SCO4920	deoR-family transcriptional regulator	SCO6042	prot hipo
		SCO5025	putative transcriptional regulator	SCO6101	prot hipo
		SCO5073	ORF2, possible oxidoreductase	SCO6265	scbR, gamma-butyrolactone binding protein
		SCO5076	actVA1, probable integral membrane protein	SCO6266	scbA, possible SCB biosynthesis enzyme
		SCO5082	actII-1, probable transcriptional regulatory protein	SCO6268	possible histidine kinase orfB
		SCO5254	sodN, superoxide dismutase	SCO6269	cpkP α , possible oxidoreductase alfa-subunit
		SCO6030	prot hipo	SCO6270	cpkP β , possible oxidoreductase beta-subunit
		SCO7311	probable amino acid decarboxylase	SCO6273	probable type I polyketide synthase,
		SCO7573	putative anti-sigma factor antagonist	SCO6274	putative type I polyketide synthase
		SCO7717	putative secreted protein	SCO6276	putative secreted protein
		SCP1,131	Hypothetical protein	SCO6277	cpkE, epoxide hydrolase
		SCP1,219	Hypothetical protein	SCO6278	putative integral membrane transport protein
		SCP2,07c	Hypothetical protein	SCO6279	putative diamino butyrate-pyruvate aminotransferase

<u>SCP2,16c</u>	Hypothetical protein	<u>SCO6280</u>	cpkO, SARP regulator
<u>SCP2,28c</u>	Hypothetical protein	<u>SCO6288</u>	cpkN, SARP regulator
<u>SCP2,37</u>	Hypothetical protein	<u>SCO6540</u>	prot hipo
		<u>SCO6764</u>	putative squalene-hopene cyclase
		<u>SCO6819</u>	aroA 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase,
		<u>SCO6820</u>	putative oxidoreductase,
		<u>SCO6850</u>	prot hipo
		<u>SCO7006</u>	putative oxidoreductase,
		<u>SCO7014</u>	probable LacI-family transcriptional regulatory protein
		<u>SCO7306</u>	wbIK, regulatory protein
		<u>SCO7653</u>	hypothetical fusion protein
		<u>SCP1,353</u>	Hypothetical protein
		<u>SCP2,08</u>	Hypothetical protein

Table 3: 6-5 1-4

Genes expresados diferencialmente que aparecen en ambas listas		Genes expresados diferencialmente que aparecen únicamente en 6-5		Genes expresados diferencialmente que aparecen únicamente en 1-4	
ProbeID	Description	ProbeID	Description	ProbeID	Description
SCO1550	putative small membrane protein	SCO0998	ftrE, Fe uptake system permease	SCO0166	putative regulator
SCO3218	putative small conserved hypothetical protein	SCO0999	sodF2, superoxide dismutase	SCO0167	prot hipo
SCO3236	possible oxygenase	SCO1244	bioB, biotin synthase	SCO0168	possible regulator protein
SCO4159	transcriptional regulatory protein	SCO1245	bioA, adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	SCO0169	prot hipo
SCO4252	prot hipo	SCO1442	putative integral membrane protein	SCO0173	hypothetical protein
SCO4253	prot hipo	SCO1480	prot hipo	SCO0174	putative DNA-binding protein
SCO7717	possible secreted protein	SCO1675	chpH, possible small membrane protein	SCO0179	possible zinc-containing dehydrogenase
		SCO2258	probable ABC-transporter, transmembrane component,	SCO0181	hypothetical protein
		SCO2633	sodF, superoxide dismutase [Fe-Zn] (EC 1,15,1,1)	SCO0197	hypothetical protein
		SCO2929	putative transposase	SCO0200	unknown, related to "stress endurance"
		SCO3105	prot hipo	SCO0204	probable luxR family two-component response regulator
		SCO3211	putative indoleglycerol phosphate synthase	SCO0217	narH2, probable nitrate reductase beta chain
		SCO3216	putative integral membrane ATPase	SCO0219	narI2, possible nitrate reductase gamma chain
		SCO3217	cdaR, transcriptional activator protein	SCO0220	hypothetical protein
		SCO3221	probable oxidoreductase	SCO0231	small hydrophobic hypothetical protein
		SCO3224	putative ABC transporter ATP-binding protein	SCO0408	probable methyltransferase
		SCO3229	putative 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase	SCO0518	hypothetical protein
		SCO3230	CDA peptide synthetase I	SCO0936	putative oligosaccharide deacetylase
		SCO3233	probable hydrolase	SCO1366	prot hipo
		SCO3235	probable ABC transporter	SCO1651	prot hipo

SCO3237	unknown	SCO1773	probable L-alanine dehydrogenase
SCO3239	unknown	SCO1935	tktA1, probable transketolase
SCO3241	possible isomerase	SCO1936	putative transaldolase
SCO3248	fabF3, probable 3-oxoacyl-[acyl carrier protein] synthase II	SCO1937	zwf2, probable glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
SCO4229	phoR putative sensor kinase	SCO1942	pgi2, glucose-6-phosphate isomerase
SCO4230	phoP putative response regulator	SCO2575	prot hipo
SCO4280	putative reductase	SCO2588	putative integral membrane protein,
SCO4714	50S ribosomal protein L5	SCO2971	putative secreted protein
SCO4920	deoR-family transcriptional regulator	SCO3299	prot hipo
SCO4921	accA2, acyl-CoA carboxylase complex A subunit	SCO3663	putative membrane protein
SCO4926	pccB, propionyl-CoA carboxylase complex B subunit	SCO3877	putative 6-phosphogluconate dehydrogenase
SCO5025	putative transcriptional regulator	SCO4031	probable integral membrane transport protein
SCO5071	ORFA hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	SCO4200	putative membrane protein
SCO5072	ORF1 hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	SCO4559	putative electron transfer oxidoreductase
SCO5073	ORF2, possible oxidoreductase	SCO4627	hypothetical protein
SCO5074	possible dehydratase	SCO4659	30S ribosomal protein S12
SCO5076	actVA1, probable integral membrane protein	SCO5020	prot hipo
SCO5077	actVA2, hypothetical protein	SCO5032	ahpC, alkyl hydroperoxide reductase
SCO5079	actVA4, conserved hypothetical protein	SCO5101	conserved hypothetical protein
SCO5080	actVA5, possible hydrolase	SCO5149	putative protease
SCO5081	actVA6, hypothetical protein	SCO5190	wbIC putative DNA-binding protein
SCO5082	actII-1, probable transcriptional regulatory protein	SCO5191	prot hipo
SCO5083	actII-2, probable actinorhodin transporter	SCO5240	wbIE, hypothetical protein
SCO5084	actII-3, putative membrane protein,	SCO5367	atpB, ATP synthase A chain

SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein	SCO5369	atpF, ATP synthase B chain
SCO5086	actIII, ketoacyl reductase	SCO5423	pyruvate kinase
SCO5087	actIORF1, actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase alpha subunit	SCO5582	putative regulator
SCO5088	actIORF2, act polyketide beta-ketoacyl synthase beta subunit	SCO5703	hypothetical protein
SCO5089	actIORF3, act polyketide synthase acyl carrier protein	SCO5742	putative membrane protein
SCO5090	actVII, act polyketide synthase bifunctional cyclase/dehydratase	SCO6274	probable type I polyketide synthase
SCO5091	actIV, cyclase	SCO6334	putative transcriptional regulator
SCO5092	actVB, actinorhodin polyketide possible dimerase	SCO6551	probable oxidoreductase
SCO5150	tatB putative membrane protein	SCO6658	probable 6-phosphogluconate dehydrogenase
SCO5254	sodN, superoxide dismutase	SCO6659	pgi, glucose-6-phosphate isomerase
SCO5293	putative oxygenase subunit	SCO6660	prot hipo
SCO6009	probable solute-binding protein of transmembrane transport system	SCO6661	zwf, probable glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
SCO6030	prot hipo	SCO7000	idh, isocitrate dehydrogenase
SCO6069	cvnA6, possible large secreted protein	SCO7306	regulatory protein
SCO6266	scbA, possible SCB biosynthesis enzyme	SCO7399	possible binding-protein-dependent transport lipoprotein,
SCO6284	putative decarboxylase	SCP2,05c	putative partitioning protein ParA
SCO6285	prot hipo	SCP2,08	hypothetical protein
SCO6949	prot hipo	SCP2,13c	hypothetical protein (fragment)
SCO7311	probable amino acid decarboxylase		
SCO7573	putative anti-sigma factor antagonist		
SCP1,131	Hypothetical protein		
SCP1,219	Hypothetical protein		
SCP2,07c	Hypothetical protein		
SCP2,16c	Hypothetical protein		

Table 4: 3-4 4-5

Genes expresados diferencialmente que aparecen en ambas listas		Genes expresados diferencialmente que aparecen únicamente en 6-5		Genes expresados diferencialmente que aparecen únicamente en 1-4	
ProbeID	Description	ProbeID	Description	ProbeID	Description
SCO0379	katA catalase (EC 1,11,1,6)	SCO0422	putative two-component sensor kinase	SCO0213	possible nitrate/nitrite transporter protein
SCO1244	bioB, biotin synthase	SCO0762	protease inhibitor precursor sti1	SCO0408	probable methyltransferase
SCO3413	tipA, transcriptional regulator	SCO0912	conserved hypothetical protein SCM1,45,	SCO0526	possible oxidoreductase
SCO4921	accA2, putative acyl-CoA carboxylase complex A subunit	SCO0965	hypothetical protein	SCO0556	prot hipo
SCO4926	pccB, propionyl-CoA carboxylase complex B subunit	SCO0999	sodF2, superoxide dismutase	SCO0892	putative integral membrane protein,
SCO5071	ORFA hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	SCO1245	bioA, adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	SCO1557	putative lipoprotein
SCO5072	ORF1 hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	SCO2085	ftsW, probable cell division protein	SCO1729	prot hipo
SCO5074	possible dehydratase	SCO2323	putative integral membrane protein	SCO2148	cytochrome B subunit
SCO5077	actVA2, hypothetical protein	SCO2633	sodF, superoxide dismutase [Fe-Zn] (EC 1,15,1,1)	SCO2149	qcrA Rieske iron-sulfur protein
SCO5079	actVA4, conserved hypothetical protein	SCO2695	hypothetical protein	SCO2150	qcrC, cytochrome C heme-binding subunit
SCO5080	actVA5, possible hydrolase	SCO3105	hypothetical protein	SCO2151	cox3, cytochrome c oxidase subunit III
SCO5081	actVA6, hypothetical protein	SCO3662	hypothetical protein	SCO2155	cox1, cytochrome c oxidase subunit I
SCO5083	actII-2, probable actinorhodin transporter	SCO4027	putative anti sigma factor antagonist	SCO2156	cox2, cytochrome c oxidase subunit II
SCO5084	actII-3, putative membrane protein,	SCO4036	RpoX sigma factor hypothetical protein	SCO2198	glnA, glutamine synthetase I
SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein	SCO4141	phosphate ABC transport system permease protein	SCO2463	probable ABC transporter
SCO5086	actIII, ketoacyl reductase	SCO4252	hypothetical protein	SCO2479	putative membrane protein
SCO5089	actIORF3, actinorhodin polyketide synthase acyl carrier prot	SCO4253	hypothetical protein	SCO2496	putative secreted protein
SCO5090	actVII, act polyketide synth bifunctional cyclase/dehydratase	SCO4294	hypothetical protein	SCO2929	putative transposase
SCO5091	actIV, cyclase	SCO4727	rpsM, 30S ribosomal protein S13	SCO3299	prot hipo
SCO5092	actVB, actinorhodin polyketide possible dimerase	SCO4878	possible glycosyltransferase	SCO3397	possible integral membrane lysyl-tRNA synthetase
SCO5150	tatB putative membrane protein	SCO5073	ORF2, possible oxidoreductase	SCO3414	putative transcriptional regulator
SCO5293	possible oxygenase subunit	SCO5254	sodN, superoxide dismutase	SCO3433	prot hipo

SCO5317	polyketide beta-ketoacyl synthase beta	SCO5288	hypothetical protein	SCO3900	prot hipo
SCO5632	hypothetical protein	SCO5522	leuB, probable 3-isopropylmalate dehydrogenase	SCO4198	putative DNA-binding protein
SCO6069	putative large secreted protein	SCO5650	putative membrane protein	SCO4199	prot hipo
SCO6273	cpkC, probable type I polyketide synthase	SCO6096	putative large secreted protein	SCO4366	putative phosphoserine aminotransferase
SCO6274	cpkB, probable type I polyketide synthase	SCO6098	cysD, sulfate adenylyltransferase subunit 2	SCO4594	putative oxidoreductase
SCO6276	cpkD, secreted monooxygenase	SCO6100	cysH, phosphoadenosine phosphosulfate reductase	SCO4762	groEL1, 60 kD chaperonin cpn60
SCO6277	cpkE, possible epoxide hydrolase	SCO6506	gvpL, probable gas vesicle protein	SCO4947	narG3, nitrate reductase alpha chain
SCO6279	cpkG, probable diaminobutyrate-pyruvate aminotransferase	SCO6551	putative oxidoreductase	SCO5087	actIORF1, act polyketide beta-ketoacyl synthase alpha subunit
SCO6280	cpkO, SARP regulator	SCO6624	putative membrane protein	SCO5088	actIORF2, actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase beta subunit
SCO6284	cpkK, acetyl-CoA carboxylase beta-subunit	SCO6797	cvnD7, possible ATP/GTP binding protein	SCO5240	wblE, transcription factor, prot hipo
SCO6285	cpkL, unknown hypothetical protein	SCO6821	putative transferase,	SCO6009	probable solute-binding protein of transmembrane transport system,
SCO6288	cpkN, SARP regulator	SCO6941	cvnC8 hypothetical protein with unknow function	SCO6042	prot hipo
SCO6540	hypothetical protein	SCO6950	hypothetical protein	SCO6101	prot hipo
SCO6819	aroA, 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (EC 2,5,1,19)	SCO7016	putative LacI-family transcriptional regulatory protein(duplicated)	SCO6265	scbR, gamma-butyrolactone binding protein
SCO6820	possible oxidoreductase	SCO7311	probable amino acid decarboxylase	SCO6266	scbA, possible SCB biosynthesis enzyme
SCO6850	hypothetical protein			SCO6268	possible histidine kinase orfB
SCO6949	hypothetical protein			SCO6269	cpkP α , possible oxidoreductase alfa-subunit
SCO7014	probable LacI-family transcriptional regulatory protein			SCO6270	cpkP β , possible oxidoreductase beta-subunit
				SCO6278	putative integral membrane transport protein
				SCO6764	putative squalene-hopene cyclase
				SCO7006	putative oxidoreductase,
				SCO7306	wblK, regulatory protein
				SCO7653	hypothetical fusion protein

Table 5: 3-5 1-4

Genes expresados diferencialmente que aparecen en ambas listas		Genes expresados diferencialmente que aparecen únicamente en 3-5		Genes expresados diferencialmente que aparecen únicamente en 1-4	
ProbeID	Description	ProbeID	Description	ProbeID	Description
SCO4252	hypothetical protein	SCO0379	katA catalase (EC 1,11,1,6)	SCO0166	putative regulator
SCO4253	hypothetical protein	SCO0422	putative two-component sensor kinase	SCO0167	prot hipo
SCO6274	cpkB, probable type I polyketide synthase	SCO0762	protease inhibitor precursor sti1	SCO0168	possible regulator protein
SCO6551	putative oxidoreductase	SCO0912	conserved hypothetical protein SCM1,45,	SCO0169	prot hipo
		SCO0965	hypothetical protein	SCO0173	hypothetical protein
		SCO0999	sodF2, superoxide dismutase	SCO0174	putative DNA-binding protein
		SCO1244	bioB, biotin synthase	SCO0179	possible zinc-containing dehydrogenase
		SCO1245	bioA, adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	SCO0181	hypothetical protein
		SCO2085	ftsW, probable cell division protein	SCO0197	hypothetical protein
		SCO2323	putative integral membrane protein	SCO0200	unknown, related to "stress endurance"
		SCO2633	sodF, superoxide dismutase [Fe-Zn] (EC 1,15,1,1)	SCO0204	probable luxR family two-component response regulator
		SCO2695	hypothetical protein	SCO0217	narH2, probable nitrate reductase beta chain
		SCO3105	hypothetical protein	SCO0219	narI2, possible nitrate reductase gamma chain
		SCO3413	tipA, transcriptional regulator	SCO0220	hypothetical protein
		SCO3662	hypothetical protein	SCO0231	small hydrophobic hypothetical protein
		SCO4027	putative anti sigma factor antagonist	SCO0408	probable methyltransferase
		SCO4036	RpoX sigma factor hypothetical protein	SCO0518	hypothetical protein
		SCO4141	phosphate ABC transport system permease protein	SCO0936	putative oligosaccharide deacetylase
		SCO4294	hypothetical protein	SCO1366	prot hipo
		SCO4727	rpsM, 30S ribosomal protein S13	SCO1550	putative small membrane protein
		SCO4878	possible glycosyltransferase	SCO1651	prot hipo

SCO4921	accA2, putative acyl-CoA carboxylase complex A subunit	SCO1773	probable L-alanine dehydrogenase
SCO4926	pccB, propionyl-CoA carboxylase complex B subunit	SCO1935	tktA1, probable transketolase
SCO5071	ORFA hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	SCO1936	putative transaldolase
SCO5072	ORF1 hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	SCO1937	zwf2, probable glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
SCO5073	ORF2, possible oxidoreductase	SCO1942	pgi2, glucose-6-phosphate isomerase
SCO5074	possible dehydratase	SCO2575	prot hipo
SCO5077	actVA2, hypothetical protein	SCO2588	putative integral membrane protein,
SCO5079	actVA4, conserved hypothetical protein	SCO2971	putative secreted protein
SCO5080	actVA5, possible hydrolase	SCO3218	putative small conserved hypothetical protein
SCO5081	actVA6, hypothetical protein	SCO3236	possible oxygenase
SCO5083	actII-2, probable actinorhodin transporter	SCO3299	prot hipo
SCO5084	actII-3, putative membrane protein,	SCO3663	putative membrane protein
SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein	SCO3877	putative 6-phosphogluconate dehydrogenase
SCO5086	actIII, ketoacyl reductase	SCO4031	probable integral membrane transport protein
SCO5089	actIORF3, actinorhodin polyketide synthase acyl carrier prot	SCO4159	transcriptional regulatory protein
SCO5090	actVII, act polyketide synth bifunctional cyclase/dehydratase	SCO4200	putative membrane protein
SCO5091	actIV, cyclase	SCO4559	putative electron transfer oxidoreductase
SCO5092	actVB, actinorhodin polyketide possible dimerase	SCO4627	hypothetical protein
SCO5150	tatB putative membrane protein	SCO4659	30S ribosomal protein S12
SCO5254	sodN, superoxide dismutase	SCO5020	prot hipo
SCO5288	hypothetical protein	SCO5032	ahpC, alkyl hydroperoxide reductase
SCO5293	possible oxygenase subunit	SCO5101	conserved hypothetical protein
SCO5317	polyketide beta-ketoacyl synthase beta	SCO5149	putative protease
SCO5522	leuB, probable 3-isopropylmalate dehydrogenase	SCO5190	wblC putative DNA-binding protein
SCO5632	hypothetical protein	SCO5191	prot hipo
SCO5650	putative membrane protein	SCO5240	wblE, hypothetical protein

SCO6069	putative large secreted protein	SCO5367	atpB, ATP synthase A chain
SCO6096	putative lipoprotein	SCO5369	atpF, ATP synthase B chain
SCO6098	cysD, sulfate adenyltransferase subunit 2	SCO5423	pyruvate kinase
SCO6100	cysH, phosphoadenosine phosphosulfate reductase	SCO5582	putative regulator
SCO6273	cpkC, probable type I polyketide synthase	SCO5703	hypothetical protein
SCO6276	cpkD, secreted monooxygenase	SCO5742	putative membrane protein
SCO6277	cpkE, possible epoxide hydrolase	SCO6334	putative transcriptional regulator
SCO6279	cpkG, probable diamino-butyr-ate-pyruvate aminotransferase	SCO6658	probable 6-phosphogluconate dehydrogenase
SCO6280	cpkO, SARP regulator	SCO6659	pgi, glucose-6-phosphate isomerase
SCO6284	cpkK, acetyl-CoA carboxylase beta-subunit	SCO6660	prot hipo
SCO6285	cpkL, unknown hypothetical protein	SCO6661	zwf, probable glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
SCO6288	cpkN, SARP regulator	SCO7000	idh, isocitrate dehydrogenase
SCO6506	gvpL, probable gas vesicle protein	SCO7306	regulatory protein
SCO6540	hypothetical protein	SCO7399	possible binding-protein-dependent transport lipoprotein,
SCO6624	putative membrane protein	SCO7717	possible secreted protein
SCO6797	cvnD7, possible ATP/GTP binding protein		
SCO6819	aroA, 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase (EC 2,5,1,19)		
SCO6820	possible oxidoreductase		
SCO6821	putative transferase,		
SCO6850	hypothetical protein		
SCO6941	cvnC8 hypothetical protein with unknow function		
SCO6949	hypothetical protein		
SCO6950	hypothetical protein		
SCO7014	probable LacI-family transcriptional regulatory protein		
SCO7016	putative LacI-family transcriptional regulatory protein(duplicated)		
SCO7311	probable amino acid decarboxylase		

Tabla5: 4-5 1-4

Genes expresados diferencialmente que aparecen en ambas listas		Genes expresados diferencialmente que aparecen únicamente en 3-5		Genes expresados diferencialmente que aparecen únicamente en 1-4	
ProbelID	Description	ProbelID	Description	ProbelID	Description
SCO0408	probable methyltransferase	SCO0213	possible nitrate/nitrite transporter protein	SCO0166	putative regulator
SCO3299	prot hipo	SCO0526	possible oxidoreductase	SCO0167	prot hipo
SCO5240	wblE, transcription factor, prot hipo	SCO0556	prot hipo	SCO0168	possible regulator protein
SCO6274	cpkB, probable type I polyketide synthase	SCO0892	putative integral membrane protein,	SCO0169	prot hipo
SCO7306	wblK, regulatory protein	SCO1244	bioB, biotin synthase	SCO0173	hypothetical protein
SCP2_08	hypothetical protein	SCO1557	putative lipoprotein	SCO0174	putative DNA-binding protein
		SCO1729	prot hipo	SCO0179	possible zinc-containing dehydrogenase
		SCO2148	cytochrome B subunit	SCO0181	hypothetical protein
		SCO2149	qcrA Rieske iron-sulfur protein	SCO0197	hypothetical protein
		SCO2150	qcrC, cytochrome C heme-binding subunit	SCO0200	unknown, related to "stress endurance"
		SCO2151	cox3, cytochrome c oxidase subunit III	SCO0204	probable luxR family two-component response regulator
		SCO2155	cox1, cytochrome c oxidase subunit I	SCO0217	narH2, probable nitrate reductase beta chain
		SCO2156	cox2, cytochrome c oxidase subunit II	SCO0219	narI2, possible nitrate reductase gamma chain
		SCO2198	glnA, glutamine synthetase I	SCO0220	hypothetical protein
		SCO2463	probable ABC transporter	SCO0231	small hydrophobic hypothetical protein
		SCO2479	putative membrane protein	SCO0518	hypothetical protein
		SCO2496	putative secreted protein	SCO0936	putative oligosaccharide deacetylase
		SCO2929	putative transposase	SCO1366	prot hipo

SCO3397	possible integral membrane lysyl-tRNA synthetase	SCO1550	putative small membrane protein
SCO3413	tipA, transcriptional regulator	SCO1651	prot hipo
SCO3414	putative transcriptional regulator	SCO1773	probable L-alanine dehydrogenase
SCO3433	prot hipo	SCO1935	tktA1, probable transketolase
SCO3900	prot hipo	SCO1936	putative transaldolase
SCO4198	putative DNA-binding protein	SCO1937	zwf2, probable glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
SCO4199	prot hipo	SCO1942	pgi2, glucose-6-phosphate isomerase
SCO4366	putative phosphoserine aminotransferase	SCO2575	prot hipo
SCO4594	putative oxidoreductase	SCO2588	putative integral membrane protein,
SCO4762	groEL1, 60 kD chaperonin cpn60	SCO2971	putative secreted protein
SCO4921	accA2, putative acyl-CoA carboxylase complex A subunit	SCO3218	putative small conserved hypothetical protein
SCO4926	pccB, propionyl-CoA carboxylase complex B subunit	SCO3236	possible oxygenase
SCO4947	narG3, nitrate reductase alpha chain	SCO3663	putative membrane protein
SCO5071	ORFA hydroxylacyl-CoA dehydrogenase	SCO3877	putative 6-phosphogluconate dehydrogenase
SCO5072	possible dehydratase	SCO4031	probable integral membrane transport protein
SCO5074	possible dehydratase	SCO4159	transcriptional regulatory protein
SCO5077	actVA2, hypothetical protein	SCO4200	putative membrane protein
SCO5079	actVA4, conserved hypothetical protein	SCO4252	prot hipo
SCO5080	actVA5, possible hydrolase	SCO4253	prot hipo
SCO5081	actVA6, hypothetical protein	SCO4559	putative electron transfer oxidoreductase
SCO5083	actII-2, probable actinorhodin transporter	SCO4627	hypothetical protein
SCO5084	actII-3, putative membrane protein	SCO4659	30S ribosomal protein S12
SCO5085	actII-4, actinorhodin cluster activator protein	SCO5020	prot hipo
SCO5086	actIII, ketoacyl reductase	SCO5032	ahpC, alkyl hydroperoxide reductase

SCO5087	actIORF1, act polyketide beta-ketoacyl synthase alpha subunit	SCO5101	conserved hypothetical protein
SCO5088	actIORF2, actinorhodin polyketide beta-ketoacyl synthase beta subunit	SCO5149	putative protease
SCO5089	actIORF3, actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein	SCO5190	wbIC putative DNA-binding protein
SCO5090	actVII, act polyketide synthase bifunctional cyclase/dehydratase	SCO5191	prot hipo
SCO5091	actIV, cyclase	SCO5367	atpB, ATP synthase A chain
SCO5092	actVB, actinorhodin polyketide possible dimerase	SCO5369	atpF, ATP synthase B chain
SCO5150	tatB putative membrane protein	SCO5423	pyruvate kinase
SCO5293	putative oxygenase subunit	SCO5582	putative regulator
SCO5317	whiE ORFIV, polyketide beta-ketoacyl synthase beta	SCO5703	hypothetical protein
SCO5632	prot hipo	SCO5742	putative membrane protein
SCO6009	probable solute-binding protein of transmembrane transport system,	SCO6334	putative transcriptional regulator
SCO6042	prot hipo	SCO6551	probable oxidoreductase
SCO6069	cvnA6, possible large secreted protein	SCO6658	probable 6-phosphogluconate dehydrogenase
SCO6101	prot hipo	SCO6659	pgi, glucose-6-phosphate isomerase
SCO6265	scbR, gamma-butyrolactone binding protein	SCO6660	prot hipo
SCO6266	scbA, possible SCB biosynthesis enzyme	SCO6661	zwf, probable glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
SCO6268	possible histidine kinase orfB	SCO7000	idh, isocitrate dehydrogenase
SCO6269	cpkP α , possible oxidoreductase alfa-subunit	SCO7399	possible binding-protein-dependent transport lipoprotein,
SCO6270	cpkP β , possible oxidoreductase beta-subunit	SCO7717	possible secreted protein
SCO6273	probable type I polyketide synthase,	SCO0166	putative regulator
SCO6276	putative secreted protein	SCO0167	prot hipo
SCO6277	cpkE, epoxide hydrolase	SCO0168	possible regulator protein
SCO6278	putative integral membrane transport protein	SCO0169	prot hipo
SCO6279	putative diamminobutyrate-pyruvate aminotransferase	SCO0173	hypothetical protein

<u>SCO6280</u>	cpkO, SARP regulator	<u>SCO0174</u>	putative DNA-binding protein
<u>SCO6284</u>	putative decarboxylase	<u>SCO0179</u>	possible zinc-containing dehydrogenase
<u>SCO6285</u>	prot hipo	<u>SCO0181</u>	hypothetical protein
<u>SCO6288</u>	cpkN, SARP regulator	<u>SCO0197</u>	hypothetical protein
<u>SCO6540</u>	prot hipo	<u>SCO0200</u>	unknown, related to "stress endurance"
<u>SCO6764</u>	putative squalene-hopene cyclase	<u>SCO0204</u>	probable luxR family two-component response regulator
<u>SCO6819</u>	aroA 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase,	<u>SCO0217</u>	narH2, probable nitrate reductase beta chain
<u>SCO6820</u>	putative oxidoreductase,	<u>SCO0219</u>	narI2, possible nitrate reductase gamma chain
<u>SCO6850</u>	prot hipo	<u>SCO0220</u>	hypothetical protein
<u>SCO6949</u>	prot hipo	<u>SCO0231</u>	small hydrophobic hypothetical protein
<u>SCO7006</u>	putative oxidoreductase,	<u>SCO0518</u>	hypothetical protein
<u>SCO7014</u>	probable LacI-family transcriptional regulatory protein		
<u>SCO7653</u>	hypothetical fusion protein		