

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO BIOLOGÍA APLICADA A LA
SOSTENIBILIDAD DE RECURSOS NATURALES

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL
(ÁREA DE MICROBIOLOGÍA)**

**Caracterización mediante Biología de Sistemas
del ciclo de desarrollo de *Streptomyces* y sus
aplicaciones biotecnológicas**

Paula Yagüe Menéndez

Oviedo, 2012

RESUMEN (en Inglés)

Despite the fact that most industrial processes for secondary metabolite production are performed with submerged cultures, a reliable developmental model for *Streptomyces* under these culture conditions was lacking. With the exception of a few species which sporulate under these conditions, it was assumed that no morphological differentiation processes take place. In this thesis, we describe new developmental features of *Streptomyces* growing in liquid cultures and integrate them into a developmental model analogous to the one previously described for solid sporulating cultures. We also discovered by first time in *Streptomyces* the mycelial structure producing secondary metabolites.

In addition, we compare the proteomes and transcriptomes of the different developmental stages in liquid and solid *S. coelicolor* cultures. We demonstrate that differentiation in *S. coelicolor* liquid cultures is comparable to solid cultures. The most remarkable differences between solid and liquid cultures were associated with the final stages of hyphae compartmentalization and spore formation, but not those involved in the onset of differentiation and secondary metabolite production.

We also used transcriptomics and high-throughput quantitative proteomics to analyse genes and proteins involved in *Streptomyces* cell death. We demonstrated that this process involves the induction of specific proteins and genes, fulfilling the characteristics of a programmed cell death (PCD). Results gave us a new perspective about *Streptomyces* development in which PCD would be part of a competence-like process essential for the differentiation of a reproductive phase (k-state) producing antibiotics and spores. We hypothesize about the biological meaning of *Streptomyces* PCD, as a process in which differentiated hyphae would become competent and would take free DNA fragments released by dying cells. This, in conjunction with the vast recombination and transposition activities induced during PCD would suppose an extraordinary ecologic advantage generating a huge genetic variability in spores in an analogous way to eukaryotic meiosis.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL ANTONIO FUEYO

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN
BIOLOGÍA APLICADA A LA SOSTENIBILIDAD DE RECURSOS NATURALES**

A mis padres

Agradecimientos

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a mucha gente que dentro y fuera del mundo científico me han prestado su ayuda, apoyo y confianza.

Al Catedrático Jesús Sánchez Martín, director de esta tesis doctoral, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y su enseñanza a lo largo de estos años.

Al Dr. Ángel Manteca Fernández, codirector de este trabajo, por la ayuda prestada, los sabios consejos y la paciencia demostrada.

Al Catedrático Juan Francisco Martín, por permitirme la estancia en el Instituto de biotecnología de León sin la cual no habría sido posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Antonio Rodríguez García, por su paciencia, su capacidad docente y el tiempo invertido en mi formación y en el tratamiento estadístico de nuestros datos, que le han dado más de un dolor de cabeza.

También han sido muy importantes durante esta andadura la Dra. Anabel Peláez, la voz de la experiencia para todos los doctorandos del "J", y el apoyo en los momentos de estrés. Celia, Iván, Victoria y Luis por su fuerza y sus ganas de trabajar, su generosidad a la hora de ayudar dentro y fuera del laboratorio y su increíble ingenio en todas las situaciones.

A Jessica, David, Roberto, Esther y Desiré, los "*Gijarritos*", con los que he tenido las mejores conversaciones sobre política, ética, religión, y en ocasiones incluso ciencia! "*palabra de Brock*". Porque son gente con la que siempre me iría de cañas aunque "*hay una cosa que se llama investigación*" y la tenemos muy presente.

A Maite, *BeaLab* y *Bea Tec*, mis nuevas compañeras de laboratorio, por las risas compartidas en estos sus primeros meses aquí que han sido los míos de escritura de tesis. Por hacerme reír siempre y aguantarme pretésica y como no, por su inestimable ayuda con esta herramienta infernal llamada Microsoft Word.

A OVIEDOTEC; Rubén, Vanesa, Rebeca, Mafe, Fernando, Jose, Charly, por la buena acogida que siempre han tenido para mí en tierras leonesas.

A mis estimadas doctoras: Miriam, por su meticulosa ayuda con *Tsuku*, los mojitos y las croquetas. A Lorena, mi casa en León, por "*show me and support me to mutate*", por sus enseñanzas sobre ciencia y porque nunca le falta una sonrisa.

A Pilar, Rafa, Cova, Carlos, y Sofía por seguir estando ahí diez años después, porque "*Sólo los mejores sobreviven*".

A Anna, porque empezamos juntas esta "aventura" que ahora está a punto de terminar para las dos, y desde entonces hemos aprendido, madurado y cambiado nuestra forma de ver la ciencia y la vida. "*grazie per tutto Itañoia*"

A Willy por intentar entender la biología desde el punto de vista de una microbióloga y "olvidar" las matemáticas, y la "*química*". Por su confianza.

Por último, me gustaría agradecer a mis padres y mi hermana su continuo apoyo, su interés, y su ánimo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO <i>STREPTOMYCES</i>	3
I.2. CICLO DE VIDA DE <i>STREPTOMYCES</i>	4
I.2.1. CICLO DE VIDA TRADICIONAL.....	4
I.2.2. UN NUEVO MODELO DE DESARROLLO.....	7
I.2.3. RUTAS BIOQUÍMICAS REGULANDO LA DIFERENCIACIÓN DE <i>STREPTOMYCES</i>	8
I.3. LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA (MCP): UN SUCESO CLAVE PARA LA DIFERENCIACIÓN Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	10
I.3.1. EL ORIGEN DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN EUKARIOTAS.....	10
I.3.2. LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN <i>STREPTOMYCES</i>	12
I.4. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL GÉNERO <i>STREPTOMYCES</i>	14
I.5. CICLO DE VIDA EN CULTIVOS LÍQUIDOS (FERMENTACIONES).....	16
I.6. LA ERA “ÓMICA”. FUNDAMENTOS DE TRANSCRIPTÓMICA Y PROTEÓMICA.....	17
I.6.1. TRANSCRIPTÓMICA.....	18
I.6.2. PROTEÓMICA.....	20
I.7. OBJETIVOS.....	24
II. MATERIAL Y MÉTODOS	25
II.1. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DEL CICLO DE VIDA.....	27
II.1.1. DISEÑO DEL EXPERIMENTO.....	27
II.1.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE <i>STREPTOMYCES</i>	28
a) Muerte celular programada: separación de células vivas y muertas.....	28
b) Desarrollo en cultivos sólidos: separación del micelio I y el micelio II.....	28
II.1.3. LISIS Y HOMOGENEIZACIÓN DEL MICELIO.....	29
II.1.4. EXTRACCIÓN CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LA PUREZA DEL ARN.....	29
II.1.5. MARCAJE DEL ARN Y EL ADN CROMOSÓMICO CON CY3 Y CY5.....	30
II.1.6. HIBRIDACIÓN CON MATRICES AGILENT TECHNOLOGIES.....	30
II.1.7. LAVADO DE LAS MATRICES, ESCANEADO Y LECTURA DE DATOS.....	31
II.1.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	31
II.2. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS PROCESOS DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA.....	32
II.2.1. RECOGIDA DE MUESTRA Y FRACCIONAMIENTO.....	32

II.2.2. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS, DIGESTIÓN Y MARCAJE ISOBÁRICO (ITRAQ).....	32
II.2.3. ANÁLISIS DE PÉPTIDOS MARCADOS POR ITRAQ MEDIANTE NANO HPLC Y ESPECTOMETRÍA DE MASAS EN TANDEM.....	33
II.2.4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS.....	34
II.3. OBTENCIÓN DE MUTANTES MEDIANTE LA COLECCIÓN DE CÓSMIDOS CON INSERCIONES DEL TRASPOSÓN TN5062.....	35
II.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE CULTIVOS LÍQUIDOS DE <i>STREPTOMYCES</i> : FERMENTACIONES.....	37
II.4.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	37
II.4.2. MEDIOS DE CULTIVO.....	38
II.4.3. CONDICIONES DE CULTIVO.....	40
II.4.4. CUANTIFICACIÓN DE ANTIBIÓTICOS.....	41
II.4.5. MEDIDA DE ACTIVIDAD HEXOQUINASA.....	42
II.4.6. GELES DE ACTIVIDAD NUCLEOLÍTICA: ZIMOGRAMAS.....	42
II.4.7. CUANTIFICACIÓN DE LOS RIBO-DESOXIRIBONUCLEÓTIDOS LIBRES.....	42
II.4.8. TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA.....	43
a) Tinción de viabilidad celular.....	43
b) Tinción de membranas.....	43
c) Tinción de paredes celulares.....	44
d) Expresión de la proteína verde fluorescente.....	44
II.4.9. ANÁLISIS FLUORIMÉTRICOS DE LA DIFERENCIACIÓN EN FERMENTACIONES.....	44
III. RESULTADOS.....	46
III.1. ANÁLISIS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS (TRANSCRIPTÓMICA Y PROTEÓMICA) DE LOS PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN DE <i>STREPTOMYCES</i>	48
III.1.1. TRANSCRIPTÓMICA DE LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS DURANTE LAS FASES DE MI Y MII EN CULTIVOS SÓLIDOS DE <i>S. COELICOLOR</i>	48
a) Fraccionamiento de las fases de MI y MII en cultivos sólidos de <i>S. coelicolor</i> M145.....	48

b) Identificación y cuantificación de los genes de <i>S. coelicolor</i> M145 diferencialmente expresados durante el desarrollo.....	49
III.1.2. PROTEÓMICA Y TRANSCRIPTÓMICA DE LAS PROTEÍNAS Y GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS DURANTE LOS PROCESOS DE MCP	54
a) Fraccionamiento de células vivas y muertas durante los procesos de MCP en <i>Streptomyces coelicolor</i> M145.....	54
b) Identificación y cuantificación de las proteínas de <i>Streptomyces coelicolor</i> M145 diferencialmente expresadas durante la MCP.....	57
c) Identificación y cuantificación de los genes de <i>S. coelicolor</i> M145 diferencialmente expresados durante la MCP.....	59
d) Diferencias más importantes entre los proteomas/transcriptomas de las células vivas y muertas.....	61
III.2. ANÁLISIS FUNCIONAL: MUTAGÉNESIS.....	63
III.3. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN CULTIVOS LÍQUIDOS DE <i>STREPTOMYCES</i>	67
III.3.1. DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN DE <i>STREPTOMYCES COELICOLOR</i> M145 EN CULTIVOS LÍQUIDOS.....	67
a) Estudio mediante microscopía láser confocal de los procesos de muerte y diferenciación.....	67
b) Estudio de la compartimentalización de las hifas en cultivos líquidos de <i>s. coelicolor</i>	70
c) Los procesos de muerte/diferenciación en cultivos líquidos de <i>s. coelicolor</i> se reflejan en las curvas de crecimiento.....	72
d) Marcadores bioquímicos evidencian la existencia de una muerte celular programada en cultivos líquidos de <i>S. coelicolor</i>	74
e) La producción de antibiótico en cultivos líquidos de <i>streptomyces coelicolor</i> m145 se correlaciona con los procesos de desarrollo/diferenciación.....	76
III.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICO EN DISTINTAS ESPECIES DE <i>STREPTOMYCES</i> MEDIANTE LA MODIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESARROLLO/DIFERENCIACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO.....	78
a) <i>Streptomyces cattleya</i> : producción de tienamicina.....	78
b) <i>Streptomyces tsukubaensis</i> : productor de tacrolimus.....	82

III.3.3. UN NUEVO MÉTODO DE MONITORIZACIÓN “ON LINE” DE LAS FERMENTACIONES INDUSTRIALES.....	86
IV. DISCUSIÓN.....	90
V. CONCLUSIONES.....	103
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	107

Abreviaturas

ADNc: ADN complementario

ADNg: ADN genómico

Amp: Ampicilina

ATCC: *“american type culture collection”*

BSA: seroalbumina bovina

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

Clo: Cloranfenicol

Cy3: Cianina 3

Cy5: Cianina 5

DTT: ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FM4-64: N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-diethylaminophenylhexatrienyl)

pyridinium dibromide.

GFP: Green fluorescein protein

GLM: glucosa, levadura, malta

IP: ioduro de propidio

iTRAQ: *“isobaric tags for relative and absolute quantitation”*

Km: Kanamicina

LB: Luria Bertani

LC-MS/MS: Cromatografía Líquida acoplada a espectrometría de masas

MCP: Muerte celular programada

MI: Micelio I

MII: Micelio II

MOPS: ácido 3-(Nmorfolino) propanesulfónico

ORF: *“Open Reading Frames”*

PBS: *“Phosphate Buffer Saline”*

PLG: *“Phase Lock Gel”*

SDS: dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: *“sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”*

SFM: *“Soy Flavour Manitol”*

THG: Transmisión horizontal de genes

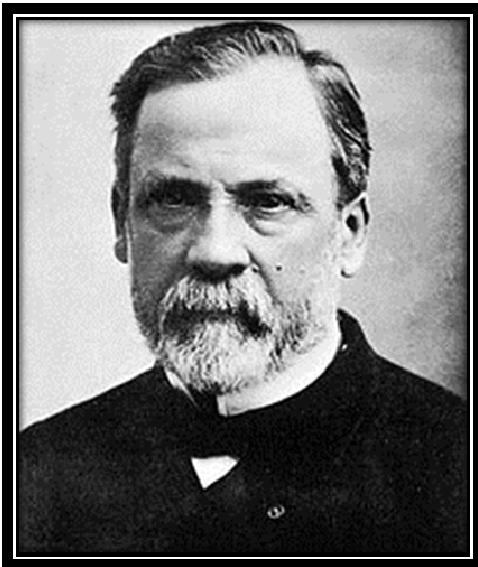
TSB: *“Tryptic Soy Broth”*

WGA: Aglutinina de germen de trigo

YEDPA: *“Yeast Extract Dextrose Peptone Agar”*



Ferdinand Julius Cohn



Louis Pasteur

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO *STREPTOMYCES*

Streptomyces pertenece a la familia Streptomycetaceae y al orden de los Actinomycetales (Garrity *et al.*, 2007, Lilburn y Garrity 2004). Los actinomicetos fueron descubiertos a finales del siglo XIX como los organismos productores de compuestos a los que son sensibles los causantes de algunas enfermedades mortales como la lepra o la tuberculosis (Hansen, 1874; Koch, 1982, citado por Hopwood, 2007). Este orden, engloba bacterias filamentosas, miceliales, gram-positivas (Christian Gram, 1884), aerobias, capaces de utilizar un gran número de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo el suelo su hábitat más común, donde contribuyen a los ciclos biogeoquímicos de degradación de la materia orgánica.

Actualmente hay caracterizadas más de 500 especies (<http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesb.html>). El primer *Streptomyces* descrito data del año 1875 (Cohn 1875, citado por Hopwood, 2007). Y nombrado así (hongo enrollado), tras la clasificación del grupo de los Actinomycetales realizada por Waksman y Henrici en 1943. En ese mismo año, el estudiante de doctorado Albert Schatz abordó el reto de la búsqueda de un antibiótico para combatir la tuberculosis. Trabajó sólo, en un laboratorio instalado en un sótano en el Cook College en la Universidad de Rutgers (New Jersey). El 19 de octubre de 1943 aisló dos cepas de *Streptomyces griseus* que podían detener el crecimiento de ciertas bacterias resistentes a la penicilina debido a la producción de estreptomicina. El alto poder antibiótico de la estreptomicina contra *Mycobacterium tuberculosis* se consideró de tal importancia que en 1952 se le otorgó a Selman Waksman, supervisor del trabajo de Schatz, el premio Nobel de medicina. Durante las siguientes décadas, (especialmente entre los años 1950 y 1980), se descubrieron muchos antibióticos en diversas especies de actinomicetos (la llamada “Edad de Oro” de los antibióticos), convirtiéndose éstos en el grupo de microorganismos más utilizados en la industria farmacéutica (Hopwood, 2007).

Desde el punto de vista biotecnológico, la importancia de estos microorganismos radica en su capacidad de producir una gran diversidad de

metabolitos secundarios, la mayoría de ellos con actividad biológica. Dentro de estos metabolitos secundarios se encuentran desde antibióticos y antitumorales hasta inmunosupresores o antifúngicos. Las bacterias del género *Streptomyces* son productoras de más de la mitad de los antibióticos de interés en biomedicina y agricultura. La mayoría de las especies de *Streptomyces* producen geosmina (del griego; “aroma de la tierra”), un metabolito secundario responsable de su típico olor a tierra mojada. Además, se ha comprobado que ciertos gusanos son atraídos por esta sustancia, por lo que parece que las esporas de *Streptomyces* podrían estar adaptadas tanto para la dispersión aérea como zoogénica (Hopwood, 2007).

Los estreptomicetos también son productores de gran cantidad de enzimas extracelulares de interés en el sector industrial, entre las que destacan proteasas (Henderson *et al.*, 1987), celulasas, nucleasas, amilasas (Long *et al.*, 1987), lipasas (Jiménez *et al.*, 1987), quitinasas y xilanasas (Morosoli *et al.*, 1986).

I.2. CICLO DE VIDA DE *STREPTOMYCES*

I.2.1. CICLO DE VIDA TRADICIONAL

El hábitat principal de *Streptomyces* es el suelo (Hagedorn, 1976), aunque existen especies capaces de habitar el agua dulce o marina (Cross, 1981) y el aire (Lloyd, 1969). Unas pocas son patógenas de plantas y animales (Bouchek-Mechiche *et al.*, 2006; Quintana *et al.*, 2008), aunque se han encontrado cepas en pulmones de pacientes con infecciones crónicas (Manteca *et al.*, 2008) o inmunodeprimidos tras un postoperatorio (Manteca *et al.* 2009).

Streptomyces es capaz de utilizar como fuente de carbono azúcares, polisacáridos, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos aromáticos (Williams *et al.*, 1983). Su habilidad para colonizar el suelo se debe principalmente a la capacidad de formar esporas resistentes a la sequedad que en muchos casos se da en dicho sustrato. Las esporas pueden permanecer latentes en el suelo varias décadas hasta que las condiciones ambientales proporcionen la humedad y los nutrientes necesarios para que éstas germinen.

Los estreptomicetos presentan un ciclo de vida complejo que implica procesos de diferenciación morfológica y fisiológica. Estas bacterias son capaces de colonizar sustratos relativamente secos con restos de materia orgánica, formando una red de

hifas ramificadas que dan lugar al llamado micelio sustrato. Estas hifas obtienen los nutrientes de la degradación del material orgánico insoluble gracias a numerosas enzimas hidrolíticas (Chater, 1984). De forma clásica, se describe cómo las zonas del micelio sustrato más alejadas de la fuente de nutrientes empiezan a acumular sustancias de reserva (lípidos, glucógeno,...), hasta que en un determinado momento y debido a la carencia de nutrientes, se reciben una serie de señales que disparan la expresión de genes implicados en la formación del llamado micelio aéreo. Se produce así, el desarrollo de las hifas aéreas que emergen desde el micelio sustrato, se desarrollan en el aire, y forman cubiertas hidrofóbicas en su superficie. Estas hifas se van a nutrir de los productos de degradación del micelio sustrato, y en una segunda etapa van a sufrir un proceso de enrollamiento, formación de septos y engrosamiento de la pared celular para dar lugar a cadenas de esporas uninucleares, que se liberarán al medio y en las condiciones adecuadas, germinarán y desarrollarán un nuevo micelio sustrato (Figura 1). Ambos micelios, sustrato y aéreo son multinucleados, siendo las esporas la única fase uninucleada (Claessen *et al.*, 2006; Flärdh y Buttner, 2009).

A pesar de que el ciclo de desarrollo de *Streptomyces* se ha estudiado fundamentalmente en medio sólido, la mayoría de las fermentaciones industriales se realizan en cultivos líquidos (grandes biorreactores), condiciones en las cuales no hay procesos de esporulación ni formación de las cubiertas hidrofóbicas; por lo que se asumía que no había diferenciación. En consecuencia, los metabolitos secundarios serían producidos por el micelio sustrato (Stocks y Thomas, 2001; Denser *et al.*, 2002; Denser *et al.*, 2004).

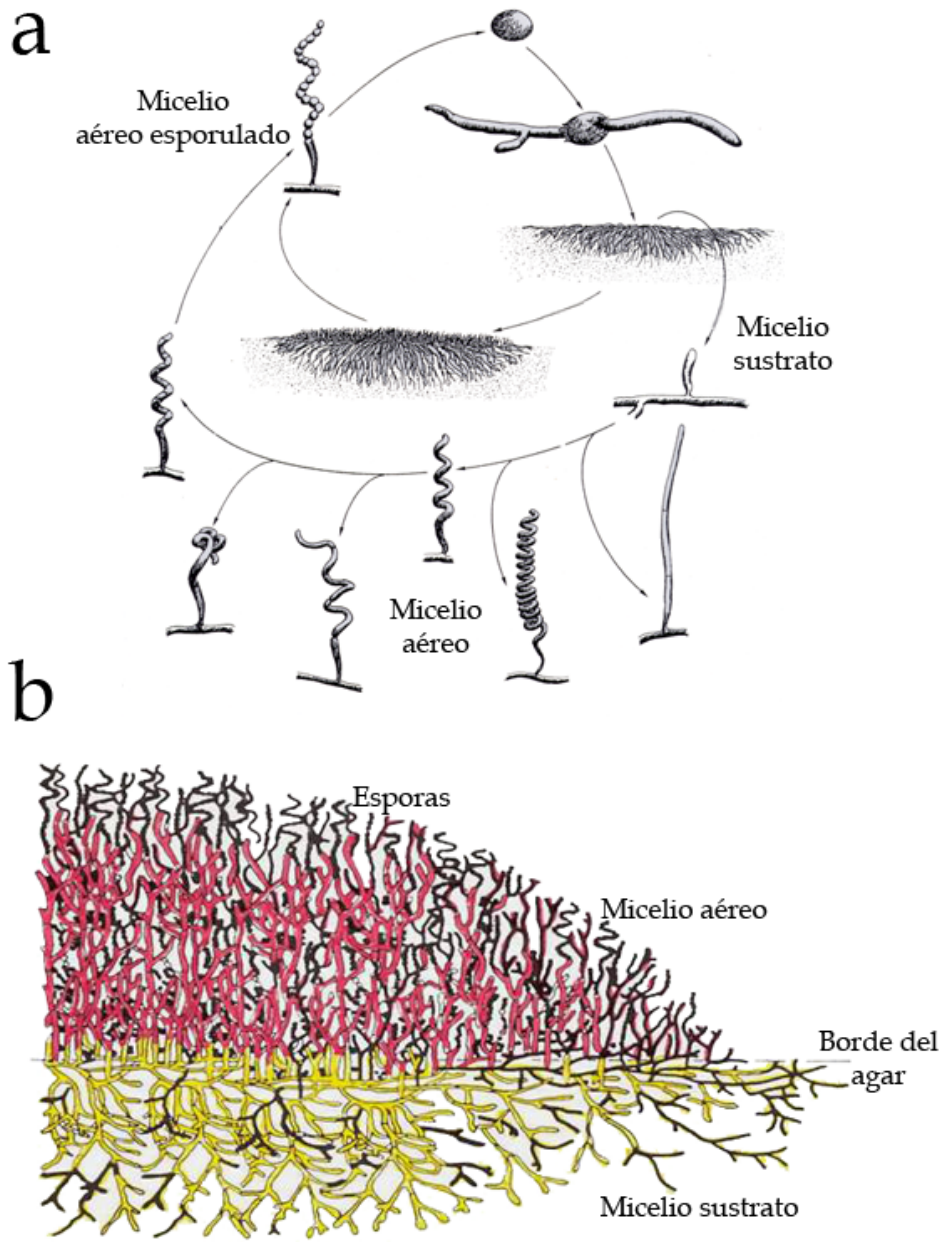


Fig.1.1. (a) Ciclo de desarrollo de *Streptomyces* en cultivos de sólidos; (b) Estructura transversal de la capa de micelio (adaptado de Kieser *et al.*, 2000).

I.2.2. UN NUEVO MODELO DE DESARROLLO

En los últimos años nuestro grupo de investigación ha realizado un análisis detallado del ciclo de diferenciación de *Streptomyces* en cultivos sólidos (en placa), condiciones en las cuales *Streptomyces* sufre un proceso de diferenciación que conduce a la formación de esporas (Véase apartado anterior y Fig. I.1). Para ello se han utilizado colorantes fluorescentes de viabilidad y membranas, indicadores fluorescentes de actividad celular, microscopía de fluorescencia confocal y diversos marcadores bioquímicos de muerte celular (nucleasas, aminoácidos libres, y liberación del enzima citosólico hexoquinasa al medio extracelular), crecimiento (peso y proteína) y diferenciación (producción de antibiótico). Con todo esto, se descubrió la existencia de un micelio joven totalmente compartimentalizado (MI) que se muere tempranamente siguiendo un patrón muy ordenado que conduce a la alternancia de segmentos vivos y muertos en la misma hifa (Manteca *et al.*, 2005a, b; Manteca *et al.*, 2006a). Posteriormente, los segmentos de este MI que permanecían viables comienzan a alargarse y crecer como un micelio multinucleado (MII). En cultivos sólidos existen dos tipos de MII en función de la ausencia (desarrollo temprano) o la presencia (desarrollo tardío) de las cubiertas hidrofóbicas características de las hifas aéreas (Manteca *et al.*, 2007). El llamado micelio sustrato (vegetativo) en el ciclo de desarrollo tradicional se corresponde con el MII multinucleado temprano que carece de las cubiertas hidrofóbicas (Manteca *et al.*, 2007) (Fig.I.2). Se ha propuesto que el MI compartimentalizado es el auténtico micelio vegetativo de *Streptomyces* en los suelos naturales (Manteca y Sánchez, 2009b), y que los MII temprano (sustrato) y tardío (aéreo) deberían ser considerados como parte de la misma fase reproductiva, dado que ambos están destinados a la esporulación (Manteca y Sánchez, 2009b).

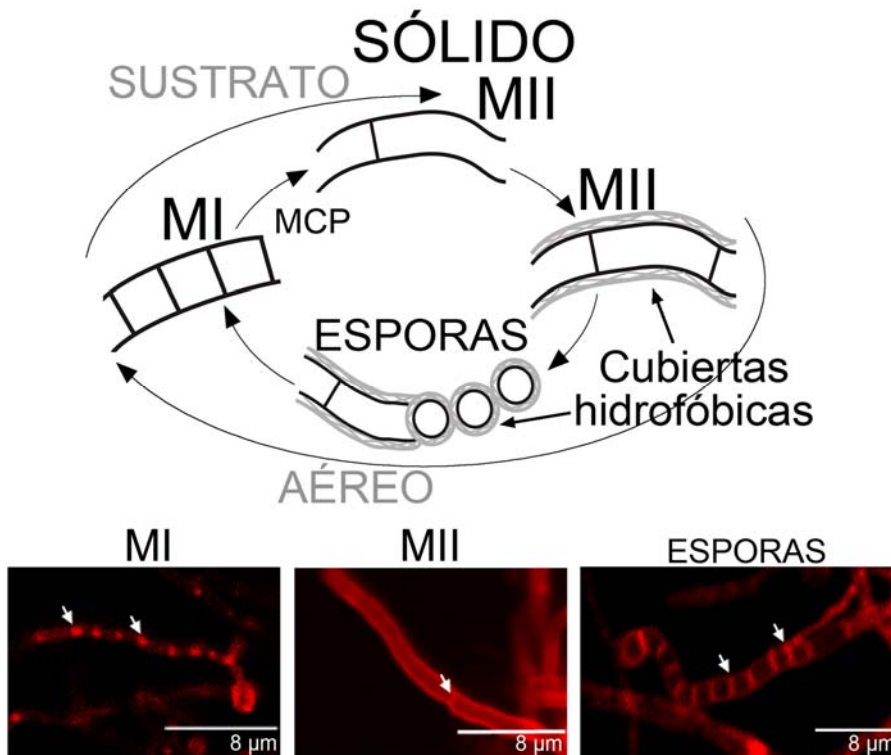


Fig.1.2. Ciclo de desarrollo de *S. coelicolor* en cultivos sólidos (esporulantes) Panel superior: esquema ilustrando los diferentes tipos de micelio (MI y MII). Se muestra la nomenclatura clásica de micelio sustrato y aéreo, así como las cubiertas hidrofóbicas del micelio aéreo. MCP; muerte celular programada Panel inferior: Imágenes de microscopía láser confocal mostrando los septos (flechas) de los diferentes tipos de micelio teñidos con el colorante de membranas FM4-64, en el caso del MI, o el colorante de pared celular WGA en el caso del MII y las esporas.

I.2.3. RUTAS BIOQUÍMICAS REGULANDO LA DIFERENCIACIÓN DE *STREPTOMYCES*

Tal como se comentó arriba, el ciclo de desarrollo tradicional se ha centrado principalmente en las fases de esporulación que tienen lugar en cultivos sólidos (Fig. 1). Los análisis de cepas mutantes bloqueadas en diferentes estadios de esporulación o formación de cubiertas hidrofóbicas han conducido al descubrimiento de los genes que regulan estos procesos: los genes "*bald*", cuya mutación implica la ausencia de micelio aéreo ("calvo"), regulan la activación de la "*sky-pathway*" que controla la producción de las proteínas que formarán las cubiertas hidrofóbicas del micelio aéreo (rodlinas, chaplinas, ramS); a continuación se activan los llamados genes "*white*", cuyos mutantes son defectivos en las fases de esporulación (se mantienen en fase de micelio aéreo, caracterizado por un color blanquecino); finalmente, tiene lugar la fase de

septación y de formación de esporas (revisado en Claessen *et al.*, 2006; Flårdh y Buttner, 2009). Los procesos de germinación de *Streptomyces* han sido muy poco estudiados. Recientemente se ha caracterizado una proteína (NepA) que forma parte de las cubiertas de las esporas, y contribuye a mantener el estado de dormancia de las mismas (de Jong *et al.*, 2009); Noens *et al.*, (2007) han caracterizado SsgA como la proteína que marca los sitios de germinación; aunque aún falta mucho por entender sobre la germinación de *Streptomyces* (Fig.1.3).

En el contexto del ciclo de desarrollo tradicional, las rutas biomoleculares que regulan las fases de pre-esporulación en *Streptomyces* (Fig.1.2) han sido ignoradas. Tal como se detalla en “Objetivos”, la caracterización de estas rutas biomoleculares (“transición MI-MII”, y activación de la producción de metabolitos secundarios) (Fig.1.3), es uno de los objetivos principales de esta tesis doctoral.

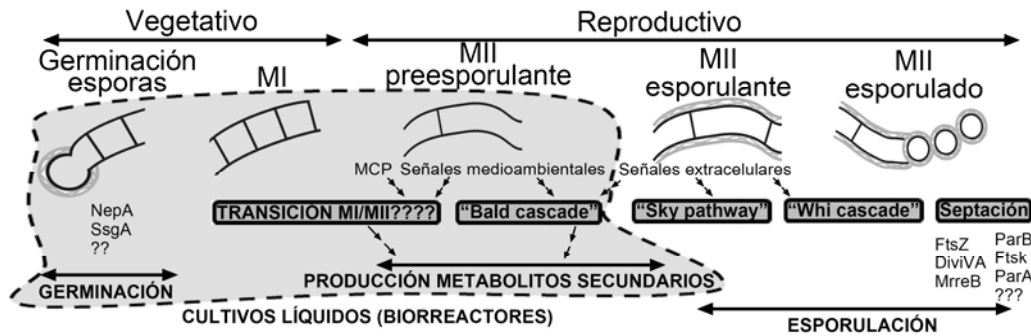


Fig.1.3. Principales rutas bioquímicas regulando los procesos de diferenciación de *Streptomyces*. Se muestran las rutas biomoleculares bien caracterizadas y que están implicadas en la formación de cubiertas hidrofóbicas (“bald”, “sky”) y esporulación (“whi” e implicados en septación). La regulación de la diferenciación de las fases pre-esporulantes, diferenciación de MI a MII (“transición MI/MII”), que activa la producción de metabolitos secundarios en biorreactores industriales, será uno de los objetivos principales de esta tesis doctoral.

I.3. LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA (MCP): UN SUCESO CLAVE PARA LA DIFERENCIACIÓN Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

Eliminado: ¶

I.3.1. EL ORIGEN DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN EUCARIOTAS.

Algunos autores han considerado que las bacterias de ciclo de vida complejo en general, y los estreptomicetos en particular, son el origen evolutivo de algunos de los dominios proteicos implicados en los procesos de apoptosis o muerte celular programada (MCP) (Koonin y Aravind, 2002), constituyendo estas bacterias un modelo sencillo en el que estudiar ese importante fenómeno. Las AP-ATPasas (ATPasas apoptóticas) son reguladores de la MCP que interactúan con las caspasas formando el apoptosoma (citado en Koonin y Aravind, 2002), y abundan significativamente en *Streptomyces* y otras bacterias con ciclos de vida complejos, desde donde podrían haber pasado a los eucariotas superiores (animales, plantas) y también a los hongos (pero no a las levaduras, donde no están presentes). En *Streptomyces*, el dominio AP-ATPasa se encuentra fusionado con el dominio adenil-ciclasea o con el dominio TIR (Aravind *et al.*, 1999; Koonin y Aravind, 2002), lo que sugiere la existencia de interacciones funcionales proteína-proteína, características de la apoptosis. El dominio TIR es la única molécula adaptadora de la MCP encontrada en bacterias, estando muy representada en *Streptomyces*. La función de esos dominios bacterianos "apoptóticos" no se conoce, excepto en el caso de la proteína AfsR de *S. coelicolor* (que contiene tanto el dominio AP-ATPasa como el TIR), y es un regulador global de la diferenciación (Umeyama *et al.*, 1999), y en el caso de una "caspasa" de *Myxococcus*, relacionada con la regulación del morfógeno que interviene en la esporulación (Gronewold y Kaiser, 2001). Lo que sí es asumible, es que los homólogos bacterianos de las proteínas apoptóticas interactúan funcionalmente, y tal vez también físicamente, en rutas de transducción de señales aún no conocidas: se ha sugerido que precisamente en bacterias como *Streptomyces* los agregados de dominios "apoptóticos" podrían ser análogos funcionales o incluso predecesores del apoptosoma eucariótico (Koonin y Aravind, 2002). Las evidencias anteriores, el hecho de que los dominios apoptóticos no se encuentren en las archaea pero sí en bacterias y la mayor diversidad de estos dominios bacterianos con respecto a los eucarióticos, sugieren su transmisión horizontal desde bacterias a eucariotas. De hecho, se ha propuesto un origen polifilético de los dominios de muerte: desde bacterias de ciclo de vida complejo

(*Streptomyces*) y desde α -proteobacterias pro-mitocondriales. Todos ellos formarían la maquinaria central de la apoptosis eucariota, que evolucionaría después hacia otros dominios (efectores, CARD, etc.) (Koonin y Aravind, 2002) (Fig.I.4).

A las evidencias comentadas arriba de *Streptomyces* como predecesor de los procesos de muerte celular programada, se unen la presencia de un elevado número de proteín-quinasa de tipo eucariota que podrían estar relacionadas con señalización y el desarrollo (Zhang, 1996; Aravind *et al.*, 1999; Petrickova y Petricek, 2003). Al menos tres de ellas están asociadas a la membrana: AfsK, que fosforila la proteína reguladora AfsR mencionada antes (Matsumoto *et al.*, 1994); Pkg2, otra serina/treonina quinasa (Nadvornik *et al.*, 1999), cuya mutación provoca lisis en algunos medios (revisado en Bakal y Davies, 2000); y otra serina/treonina quinasa dependiente de Ca^{2+} (Elizarov y Danilenko, 2001).

Las caspasas están implicadas en la regulación de la apoptosis en animales (Nicholson y Thornberry, 1997). Esta familia de proteasas tiene un plegamiento común denominado caspasa-hemoglobinasa (Eichinger *et al.*, 1999). Una subclase de esta familia, el grupo paracaspasa-metacaspasa, está presente en el genoma de *Streptomyces*, asociado con una proteín-quinasa (Aravind *et al.*, 2001) y se ha sugerido que la hipotética proteasa podría funcionar dentro de complejos señalizadores (Koonin y Aravind, 2002). Las metacaspasas podrían haber sido adquiridas por los eucariotas mediante transmisión horizontal de genes (supuestamente por medio del endosimbionte promitocondrial), con la adquisición simultánea de otros componentes del sistema señalizador bacteriano ya existente, unido funcionalmente a las metacaspasas y paracaspasas, como las AP-ATPasas (Aravind *et al.*, 2001). Mediante este mecanismo también se habrían adquirido otras proteínas como por ejemplo determinados grupos de ciclofilinas (Manteca *et al.*, 2006c), y otros muchos genes (Doroghazi y Buckley, 2010). Estos procesos de transferencia horizontal de genes podrían haber tenido un papel decisivo en la evolución del sistema apoptótico eucariota (Aravind *et al.*, 2001).

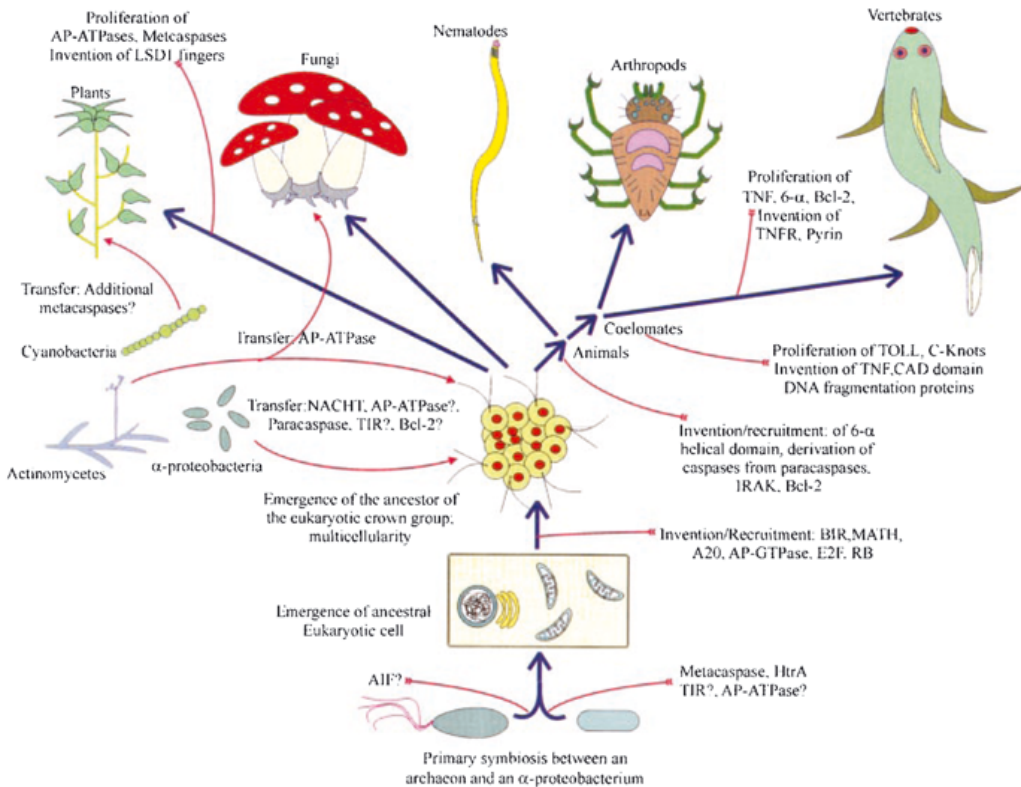


Fig.1.4. Esquema simplificado del origen y evolución de la MCP eucariota. (Koonin y Aravind, 2002).

1.3.2. LA MUERTE CELULAR PROGRAMA EN *STREPTOMYCES*

La muerte celular es un suicidio celular activo que sucede en eucariotas y bacterias en respuesta a situaciones de estrés tanto biológico como ambiental. La muerte celular eucariota (apoptosis) es un proceso muy estudiado cuya regulación bioquímica se conoce relativamente bien. Sin embargo, rutas biomoleculares que regulan la MCP en bacterias aun son desconocidas. Miguelez *et al.*, (1999), y Manteca *et al.*, (2006b) demostraron, que los procesos de muerte que acompañan el desarrollo de *Streptomyces* presentan las características de una MCP, en la que se activan enzimas degradativos involucrados en el desmantelamiento celular (pared celular, ácidos nucleicos, proteínas, etc.) (Fig.1.5).

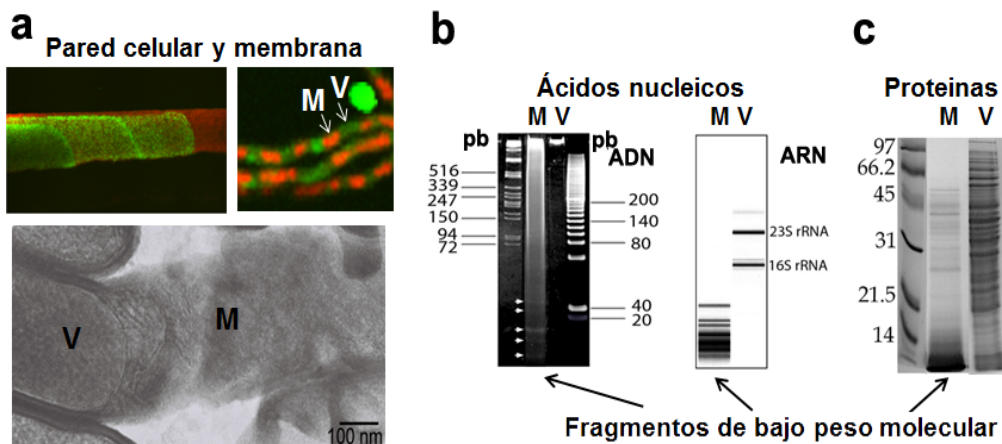


Fig.1.5. Características de la MCP de *Streptomyces*. (a) Imágenes al microscopio confocal de cultivos teñidos con SYTO9-Ioduro de Propidio (células muertas en rojo, vivas en verde), y al microscopio electrónico. (b) Estado de degradación de los ácidos nucleicos (ADN y ARN). (c) Estado de degradación de las proteínas. M, células muertas; V, células vivas. (Tomado de Manteca *et al.*, 2006 y Yagüe *et al.*, 2012, enviado)

Nuestro grupo de investigación ha realizado un análisis proteómico de la MCP de *Streptomyces* mediante geles bidimensionales, demostrando que la MCP se acompañaba de la aparición de enzimas implicadas en la degradación de los componentes celulares, así como de proteínas reguladoras y proteínas de estrés (Manteca *et al.*, 2006a). Entre estas proteínas se encontraban muchas proteínas implicadas en los procesos de estrés oxidativo, lo que sugiere a estos procesos de estrés como la causa o la consecuencia de la MCP. Entre las proteínas reguladoras encontradas en las células que se morían y no en las que permanecían viables se encontró una AAA ATPasa (SCO1648), cuyos homólogo eucariota es uno de los enzimas que componen el proteosoma; ClpC1 (SCO3373), la subunidad de unión al ATP del complejo proteolítico Clp, que está presente en la mayoría de los organismos vivos y tiene un papel en la homeostasis celular durante condiciones de estrés; una sintasa de inositol-1-fosfato (SCO3899) que participa en la formación de inositol fosfato, una molécula señalizadora en bacterias y eucariotas; varias proteínas de unión al AMPc de función desconocida (SCO2368, SCO4277); y varios reguladores transcripcionales (SCO5405, SCO1490) (Manteca *et al.*, 2006a).

En consecuencia, aun falta mucho trabajo para comprender en detalle las rutas biomoleculares que regulan la MCP de *Streptomyces*, y lo que es más importante, su papel en la biología de esta bacteria y sus aplicaciones biotecnológicas. En esta tesis doctoral, hemos profundizado en estos aspectos.

1.4. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL GÉNERO *STREPTOMYCES*

Una de las principales características del género *Streptomyces* es el elevado contenido en guaninas y citosinas (74% G+C) en su genoma (Woese, 1987). Mediante el análisis de fragmentos de restricción, en electroforesis de campo pulsado, de cromosomas de diferentes especies de *Streptomyces* como *S. coelicolor* (Kieser *et al.*, 1992), *S. ambofaciens* (Leblond *et al.*, 1990), *S. lividans* (Leblond *et al.*, 1993), *S. griseus* (Lezhava *et al.*, 1995) o *S. rimosus* (Pandza *et al.*, 1997), se ha llegado a demostrar la linealidad de su genoma (Lin *et al.*, 1993) así como su tamaño aproximado de 8 Mb. Se piensa, que su gran tamaño pueda deberse a la presencia de gran número de regiones no codificantes (Robinson *et al.*, 1981), repeticiones de ADN en tándem (Shrempf, 1985) o duplicación de genes con la misma función aparente (Ohnuki *et al.*, 1985; Tohyama *et al.*, 1987). Posee proteínas unidas covalentemente a los extremos 5' del cromosoma (Chang y Cohen, 1994). Dichas proteínas teloméricas (Tpg) actúan como cebadores para la replicación de los telómeros del cromosoma (Bao y Cohen, 2001). La proteína con función helicasa Tap (proteína asociada al telómero) también interviene en este proceso (Bao y Cohen, 2004). Por lo general estas proteínas teloméricas están bien conservadas entre las especies del género *Streptomyces*, con algunas excepciones como *S. griseus* (Ohnishi *et al.*, 2008). La replicación del cromosoma de *Streptomyces* tiene lugar bidireccionalmente desde un oriC localizado centralmente en el cromosoma (Musialowski *et al.*, 1994; Jakimiwicz *et al.*, 1998). El hecho de que el oriC se conserve centrado en el cromosoma sugiere una presión selectiva sobre dicho posicionamiento (Bentley *et al.*, 2002). Por el contrario, los extremos del cromosoma están formados por secuencias repetidas e invertidas de entre 20 y 600 Kb denominadas TIRs (acrónimo inglés de repeticiones invertidas terminales) y por zonas de inserción de fagos, plásmidos y elementos transponibles que causan la conocida inestabilidad genética del cromosoma de *Streptomyces* (Volf y Altenbuchner, 1998). Se postula que estas regiones tengan la función de evitar la delección de otras regiones

del cromosoma que sean imprescindibles (Redenbach *et al.*, 1996). En la actualidad se encuentran secuenciados en su totalidad el genoma de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.*, 2002), *Streptomyces avermitilis* (Omura *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2003), *S. scabies* (Sanger institute y Loria R.), *S. griseus* (Ohnishi Y *et al.*, 2008) y *S. clavuligerus* (Song *et al.*, 2010), lo que ha aportado un gran avance en el conocimiento de la organización génica en *Streptomyces*. La comparación de los cromosomas de *S. coelicolor*, *S. avermitilis* y *S. griseus* muestra un núcleo central de 6 Mb muy conservado en el que residen mayoritariamente genes relacionados con el metabolismo primario (Ohnishi *et al.*, 2008). El núcleo central se sitúa ligeramente hacia la izquierda del cromosoma por lo que deja dos regiones terminales asimétricas de 1 y 2 Mb aproximadamente. En estas regiones, denominadas brazos, se encuentran mayoritariamente genes no esenciales, incluidos genes y agrupaciones del metabolismo secundario (Bentley *et al.*, 2002).

El genoma de la primera cepa secuenciada, considerada cepa tipo (*Streptomyces coelicolor*), es un cromosoma lineal de 8.667.507 pb con la presencia de 7.825 probables genes, 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”, (genes implicados en la división celular, en la replicación del ADN, transcripción, traducción y biosíntesis de aminoácidos) se encuentran en el centro del cromosoma, mientras que los genes codificantes para funciones tales como la síntesis de metabolitos secundarios se encuentran en los brazos del cromosoma. De hecho, los cromosomas de *Streptomyces* ocasionalmente sufren pérdidas espontáneas de sus extremos, tras lo cual son capaces de unirse y formar cromosomas circulares que se replican como los del resto de las bacterias (Hopwood, 2007). La transmisión horizontal de ADN en los extremos del cromosoma pudo provocar el incremento del tamaño del cromosoma de *Streptomyces* durante la evolución reciente (Bentley *et al.*, 2002). Se han detectado una gran cantidad de plásmidos en *Streptomyces*, entre los

que se incluyen: plásmidos lineales, integrativos, grandes plásmidos circulares de bajo número de copias y pequeños plásmidos circulares de alto número de copias (Kieser *et al.*, 2000). Además diversos fagos y transposones presentes en *Streptomyces* se utilizan en estudios de biología molecular; destacando el fago Φ C31 y el transposón *IS117*, utilizados como vectores integrativos, y los transposones *IS493*, *Tn4556*, y *Tn5062*, utilizados para procesos de mutagénesis aleatoria (Kieser *et al.*, 2000; Fernández-Martínez LT *et al.*, 2011).

I.5. CICLO DE VIDA EN CULTIVOS LÍQUIDOS (FERMENTACIONES)

La diferenciación en cultivos líquidos se ha estudiado, en general, mucho menos que en cultivos de sólidos, debido principalmente a que la mayoría de las cepas no esporulan en estas condiciones por lo que se asumía que no había diferenciación. No obstante, la mayoría de los procesos industriales de producción de metabolitos secundarios se realizan precisamente en estas condiciones. En consecuencia, la optimización de los procesos de fermentación se ha realizado tradicionalmente de forma empírica, existiendo grandes problemas en la reproducibilidad de los mismos.

Hasta ahora, todos los trabajos sobre la diferenciación de *Streptomyces* en cultivos líquidos, y la producción de antibiótico se han centrado en el análisis de la morfología del micelio (Stocks y Thomas, 2001; Denser *et al.*, 2002). Así, se han diferenciado cuatro clases morfológicas: “pellets” (masas compactas de unas 950 μ m de diámetro), “clumps” (masas menos compactas de unas 600 μ m de diámetro), hifas ramificadas, e hifas no ramificadas (Denser *et al.*, 2002). También se ha demostrado que la formación de estas estructuras puede ser considerada como la de una biopelícula (Kim y Kim 2004). Se acepta de forma casi unánime que la morfología del micelio se correlaciona con la producción de metabolitos secundarios, pero a su vez, existe bastante controversia respecto a la relación causa-efecto, de manera que, algunos autores afirman que la agregación celular y por tanto la formación de “pellets” y “clumps” son fundamentales a la hora de obtener una buena producción de metabolitos secundarios; Por ejemplo la retamicina en el caso de *S. olindensis* (Hobbs *et al.*, 1989; Denser *et al.*, 2004); las nikomicinas en el caso de *S. tendae* (Vecht-Lifshitz *et al.*, 1992); antibióticos híbridos en *S. lividans* (Sarrá *et al.*, 1997). Por otro lado, otros autores afirman lo contrario: la formación de “pellets” implica una

menor tasa de producción de antibiótico; nistatina en *S. noursei* (Jonsbu *et al.*, 2002); producción de proteínas recombinantes en *S. lividans* (Yun *et al.*, 2001); tiolisina en *S. fradiae* (Park *et al.*, 1997); actinorrodina en *S. coelicolor* A3(2) (Doull y Vining 1989). También se ha descrito que en algunas cepas no existe relación entre la morfología y la producción de metabolitos secundarios: producción de virginiamicina por *S. virginiae*; (Yang *et al.*, 1996.). Por tanto, la conclusión, bastante desalentadora, es que no se han encontrado pautas generales para relacionar morfología y producción (no son predecibles para cada cepa utilizada) y que los factores que influyen en la agregación son tanto físico-químicos como genéticos (Vecht-Lifshitz, 1990). Dicho de otra forma, la falta de un modelo de desarrollo coherente en el género *Streptomyces*, ha impedido describir fenotipos claros y fiables a la hora de analizar y optimizar los procesos de fermentación.

Existen numerosos grupos de investigación trabajando en la caracterización genética de rutas de síntesis de antibióticos y otros metabolitos secundarios por *Streptomyces*, o en la obtención, mediante mutagénesis al azar o dirigida, de cepas sobreproductoras para la producción de diferentes metabolitos secundarios; no obstante, existen muy pocos grupos que trabajen en la optimización de los procesos de fermentación desde el punto de vista del ciclo de desarrollo y diferenciación del microorganismo. Tal como se detalla en resultados (apartado III.3.I), uno de los objetivos realizados en esta tesis doctoral fue la descripción de los procesos de diferenciación y desarrollo de *Streptomyces* en medio líquido, lo que nos ha permitido definir por vez primera la fase del ciclo de desarrollo productora de metabolitos secundarios (apartado III.3.1e) (Manteca *et al.*, 2008b; Yagüe *et al.*, 2010).

Comentario [P1]: Esta ref estaba mal es del 90 y son tres autores el primero no es Braun es este

1.6. LA ERA "ÓMICA". FUNDAMENTOS DE TRANSCRIPTÓMICA Y PROTEÓMICA.

Eliminado: ¶

En la última década, las metodologías experimentales que se basan en el análisis sistemático y a gran escala de las moléculas reguladoras y efectoras de los procesos celulares (proteínas, genes, metabolitos, etc.) han tomado especial relevancia debido a su gran utilidad para la ciencia. El sufijo "-oma" tiene un origen latino, que significa "conjunto de", es por tanto que la adición de este sufijo a diferentes estudios cubre las nuevas aproximaciones masivas en las que se está enfocando la biología recientemente. Todo este tipo de estudios han de combinarse con exhaustivos análisis

bioinformáticos de los resultados y de técnicas rápidas y automatizadas de alto rendimiento (*"high-throughput techniques"*) debido al gran volumen de información que se genera durante las investigaciones realizadas a gran escala.

El término *"ómicas"* hace referencia a las disciplinas como la genómica, la proteómica, la transcriptómica, la metabolómica, etc... A estas tres últimas también se las agrupa bajo la denominación de *"genómica funcional"*, ya que estudian a los productos de la expresión de los genes.

La transcriptómica estudia y compara transcriptomas, es decir, los conjuntos de ARN mensajeros o transcritos presentes en una célula, tejido u organismo. Los transcriptomas son muy variables, ya que muestran qué genes se están expresando en un momento dado. La transcriptómica se vale de la bioinformática y las micromatrices. La idea básica de las micromatrices (o *"microarrays"*) es construir, sobre una membrana o lámina de vidrio, muestras que contienen fragmentos de ADN utilizados como sondas representativas de los genes de interés. Por otro lado, se marca el ADN copia (*"cDNA"*) de una población celular con fluorescencia o radioactividad, y se usa esta preparación para hibridar con el ADN de la micromatriz. Generalmente se hibrida simultáneamente la misma micromatriz con una muestra de ADN copia de referencia, para facilitar la comparación (Figura I.6).

I.6.1 TRANSCRIPTÓMICA.

Los *"microarrays"* o micromatrices de ADN surgen de la necesidad de analizar la cantidad de información procedente de los grandes proyectos de secuenciación de genomas. El primer *"microarray"* fue usado por Schena *et al.*, (1995) para comparar la expresión de genes en células tumorales con la expresión en células sanas (Figura I.6).

Los *"microarrays"* permiten la medida simultánea de los niveles de expresión de miles de genes (sondas) en un solo experimento de hibridación con una mezcla compleja de ADN o ARN (dianas). Las Sondas, son secuencias de ADN conocidas (oligonucleótidos o productos de PCR) inmovilizadas ordenadamente sobre una superficie sólida, cada sonda de la micromatriz está diseñada para unirse a un gen de forma específica y está dispuesta de forma ordenada sobre el mismo y las dianas, son la muestra problema de ADN o ARN marcada cuya abundancia será determinada por

hibridación. Un experimento básico de transcriptómica mediante el empleo de micromatrices de DNA consiste en:

- 1- Diseño y fabricación del microarray.
- 2- Preparación de la muestra e hibridación.
- 3- Escaneo del microarray.
- 4- Análisis de la imagen.
- 5- Análisis estadístico y normalización de los datos.

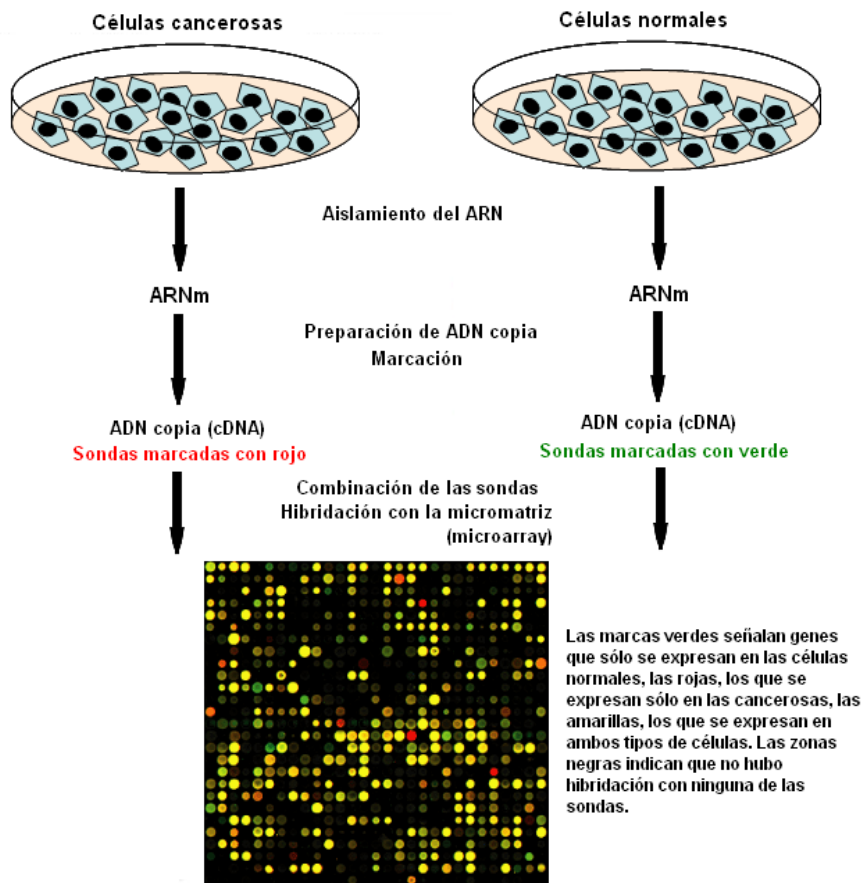


Fig.1.6. Representación sencilla de un experimento de transcriptómica. Después de aislar el ARN de cada muestra problema (cancerosa y normal) éste se convierte en cDNA (RT-PCR) a la vez que se marca con distintos fluoróforos (rojo y verde). Los cDNA se hibridan con la micromatriz tras lo cual ésta se escanea cuantificándose las intensidades de los fluoróforos en relación a la mayor o menor expresión de cada gen.

Tal como se expone en los resultados (apartados III.I.1 y III.I.2), en esta tesis doctoral hemos aplicado estas técnicas de transcriptómica al estudio de los procesos de diferenciación en cultivos sólidos (MI y MII), así como al análisis de los procesos de muerte celular programada.

I.6.2 PROTEÓMICA

Tal como se ha comentado arriba, la proteómica consiste en el estudio del proteoma de las células. La proteómica tradicional se ha desarrollado mediante el empleo de geles bidimensionales y la identificación de las proteínas (“spots”) mediante el patrón de pesos moleculares (huella peptídica) de las mismas obtenido mediante digestión con una proteasa (generalmente tripsina), y su análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) (Figura I.7). Aunque el uso de geles bidimensionales es una técnica muy poderosa para el estudio de los proteomas celulares, que ha dado y sigue dando excelentes resultados en diversos microorganismos, incluyendo *Streptomyces* (Kim *et al.*, 2005, Hesketh *et al.*, 2007, Rodríguez-García *et al.*, 2007,), su principal limitación es el consumo de tiempo, que es elevado en experimentos de proteómica a gran escala (aquellos que consiguen identificar cientos e incluso miles de proteínas).

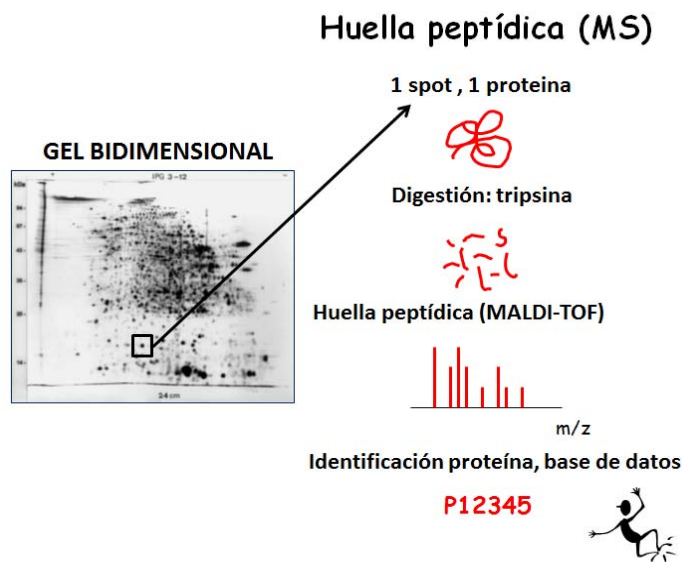


Fig.I.7. Esquema ilustrativo del fundamento de la “proteómica clásica”. Las proteínas se separan mediante un gel bidimensional; se digieren con tripsina; se identifican los pesos moleculares de sus péptidos tripticos mediante espectrometría de masas (huella peptídica); se identifica la proteína en base de datos

Durante la última década, se han producido avances muy significativos en técnicas de cromatografía y espectrometría de masas que están revolucionando el campo de la proteómica. Todos estos avances han llevado al desarrollo de las llamadas técnicas libres de gel: técnicas de nano-HPLC combinadas con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Estas técnicas se resumen en la figura I.8: en este caso se digiere con tripsina la muestra original (formada por tres proteínas en el ejemplo); la mezcla de fragmentos tripticos se separa por un nano HPLC, y cada fracción cromatográfica del nano HPLC se separa en el primer espectrómetro de masas (MS), se fragmenta en una celda de colisión, y el análisis de los pesos moleculares de estos fragmentos en el segundo espectrómetro de masas permite deducir la secuencia aminoacídica de esos péptidos, que en última instancia permiten identificar las proteínas de partida (Fig.I.8).

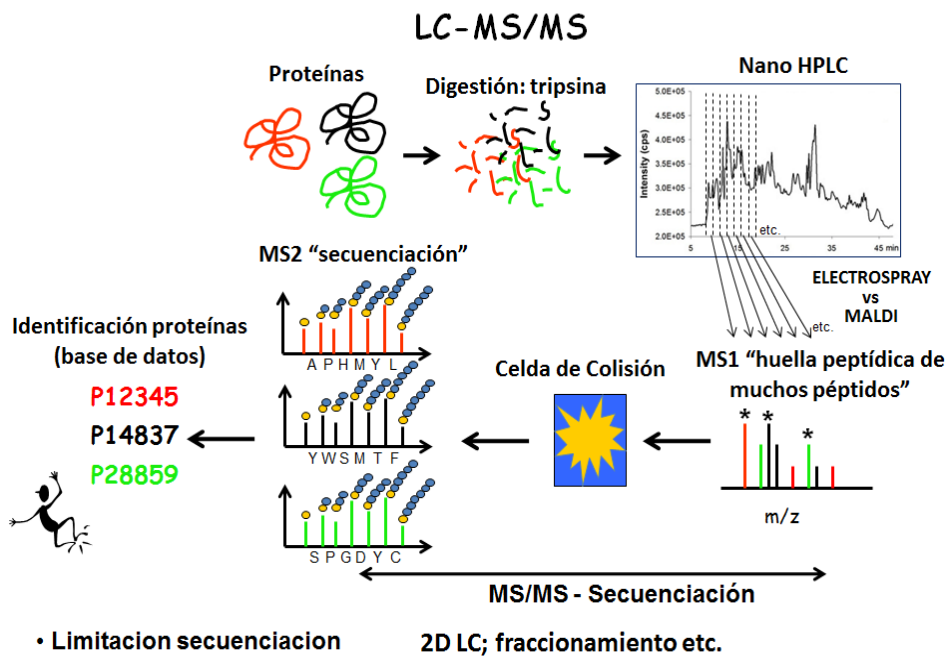


Fig.I.8. Esquema ilustrativo del fundamento de la proteómica libre de gel (LC-MS/MS). La mezcla de proteínas se digiere con tripsina; los péptidos tripticos se separan mediante nano HPLC; las fracciones del nano HPLC se analizan en un primer espectrómetro de masas (MS1); los péptidos aislados en el MS1 se fragmentan en la celda de colisión; los fragmentos se analizan en el segundo espectrómetro de masas (MS2); los fragmentos del MS2 nos permiten deducir la secuencia aminoacídica e identificar la proteína comparando con una base de datos.

Además, se han desarrollado técnicas de marcaje de las muestras que permiten hacer cuantitativa la técnica del LC-MS/MS. Uno de los marcajes más extendidos en proteómica cuantitativa es el marcaje isobárico: “*Isobaric tags for relative and absolute quantitation*” (iTRAQ), que ha sido optimizado por nuestro grupo de investigación para el estudio de *Streptomyces* (Manteca *et al.*, 2010a, b), y que también hemos aplicado en esta tesis doctoral (apartado III.1.2). El fundamento del iTRAQ se muestra de forma resumida en la figura I.9: tras la digestión con tripsina, cada una de las muestras (hasta 8) se marcan con uno de los 8 reactivos iTRAQ; se mezclan; se separan en el primer espectrómetro de masas; se fragmentan en la celda de colisión, y en esta fragmentación se rompe el enlace entre el reactivo iTRAQ y el péptido dando lugar a los llamados “*iones reporter*”; se identifican las proteínas por su secuencia de aminoácidos, y se identifican y cuantifican las cantidades de los péptidos en las muestras originales mediante los pesos moleculares e intensidades de los “*iones reporter*” que se usaron en el marcaje original (Fig.I.9).

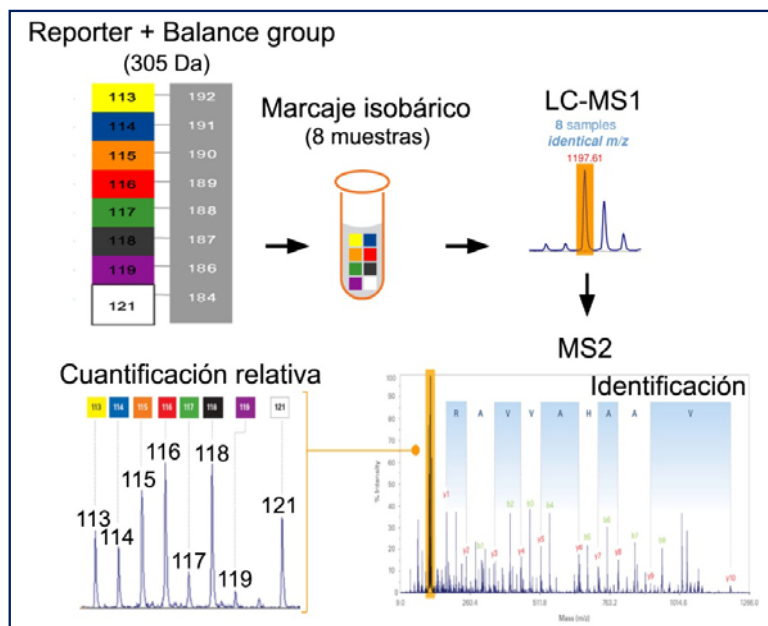


Fig.I.9. Esquema de la técnica de marcaje isobárico (iTRAQ). Hay 8 reactivos iTRAQ formados por 8 “*iones reporter*” unidos a un grupo de balanceo (la suma de la masa del “*ion reporter*” más el grupo de balanceo es 305 Da). Cada muestra se marca con un reactivo iTRAQ, incrementando su peso molecular en 305 Da (isobárico; peso molecular de todas las proteínas se incrementan en 305 Da). MS1-separación péptidos tripticos; en la celda de colisión se fragmentan los péptidos, y también se fragmenta el reactivo iTRAQ liberando el “*ion reporter*”. MS2-identificación y cuantificación; la proporción entre las áreas de los “*iones reporter*” nos da la concentración de la proteína en la muestra original.

Mediante el empleo de estas técnicas de proteómica cuantitativa (LC-MS/MS, iTRAQ), nuestro grupo de investigación ha realizado un estudio de las variaciones en los proteomas del MI vegetativo, y del MII reproductivo durante el desarrollo de *Streptomyces* en cultivos sólidos (Manteca *et al.*, 2010a). Los resultados, que se resumen en la figura I.10, demostraron que la diferenciación morfológica (formación del MI y MII) se correlaciona con un cambio fisiológico: el cambio del metabolismo primario (MI) al secundario (MII): las inmensa mayoría de las proteínas implicadas en el metabolismo primario están reguladas al alza en el MI, mientras que aquellas implicadas en metabolismo secundario, proteínas transportadoras, proteínas relacionadas con el estrés, y proteínas reguladoras están reguladas al alza en el MII (Fig.I.10). Además, se identificaron muchas proteínas reguladoras (reguladores transcripcionales, quinasas, etc.) que se expresan diferencialmente en los MI y MII. Estas proteínas posiblemente estén regulando las fases pre-esporulantes de *Streptomyces*, y su caracterización contribuirá a discernir las rutas biomoleculares regulando esta diferenciación, que en última instancia permitirán un mejor entendimiento de las fermentaciones industriales que utilizan *Streptomyces*.

En esta tesis doctoral, hemos empleado la misma aproximación experimental (iTRAQ LC-MS/MS) al estudio de los procesos de muerte celular programada, en combinación con las técnicas de transcriptómica descritas arriba (apartado II.1.2; Yagüe *et al.*, 2012 enviado).

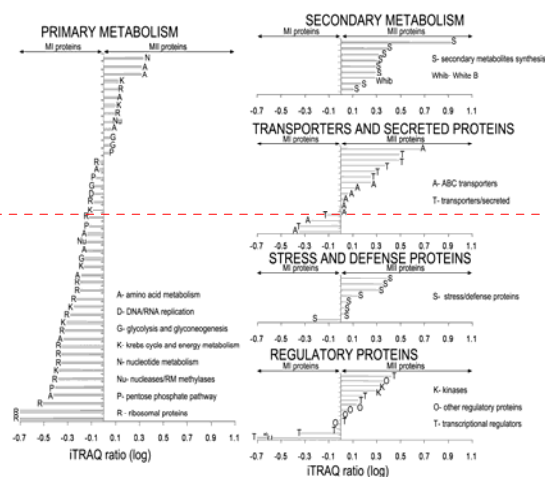


Fig.I.10. Valores de abundancia relativa (log iTRAQ MII/MI) de los principales grupos funcionales de proteínas identificados durante el desarrollo de *Streptomyces* en medio sólido (Manteca *et al.*, 2010).

I.7. OBJETIVOS

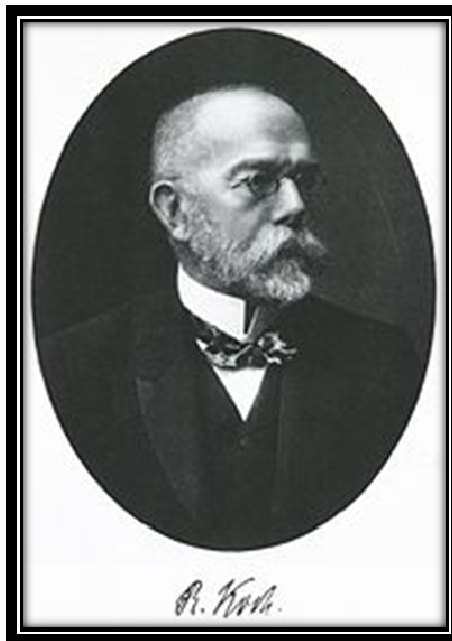
Tal como se ha comentado a lo largo de la introducción el grupo de investigación en el que he realizado mi tesis doctoral ha estado trabajando en el estudio de los procesos de desarrollo y diferenciación de *Streptomyces* en cultivos sólidos esporulantes, ampliando significativamente el ciclo de desarrollo tradicional de esta bacteria (apartado I.2.2). Por esta razón, el objetivo principal de esta tesis doctoral fue ahondar en el conocimiento de las fases clave en el ciclo de desarrollo en medio sólido mediante biología de sistemas y definir el ciclo en medio líquido, para sus aplicaciones industriales.

Más concretamente los objetivos son:

1. Caracterización de los genes (transcriptómica) y las proteínas (proteómica) regulando los procesos de diferenciación (MI y MII; MCP) (Biología de sistemas).
2. Búsqueda de las rutas biomoleculares que controlan las fases preesporulantes de diferenciación (formación de MI-MII; MCP) mediante experimentos de mutagénesis y estudios fenotípicos de los genes identificados. en el contexto del objetivo 1.
3. Estudio morfológico y funcional de los procesos de diferenciación en cultivos líquidos de *Streptomyces*: formación de MI compartimentalizado – MII multinucleado; medida del crecimiento y producción de metabolitos secundarios; análisis de los procesos de muerte celular programada.
4. Aplicaciones del conocimiento generado en el objetivo anterior a las fermentaciones industriales de *Streptomyces* y a los procesos de búsqueda de nuevos metabolitos secundarios a partir de cepas de *Streptomyces*.



Anton van Leeuwenhoek



Robert Koch

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.MATERIAL Y MÉTODOS

II.1. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DEL CICLO DE VIDA

II.1.1. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Para el análisis de los genes expresados al alza en los procesos de muerte celular programada se utilizaron 4 réplicas biológicas de cada condición (protoplastos vivos 16 h y protoplastos comenzando a morir 12 h, véanse detalles en el párrafo siguiente) hibridadas entre sí alternando los fluoróforos (CY3, CY5) de la siguiente manera en una micromatriz de Agilent Technologies®:

ARN VIVOS 1 CY3 + ARN MUERTO 1 CY5	ARN VIVOS 2 CY5 + ARN MUERTOS 2 CY3
ARN MUERTOS 3 CY3 + ARN VIVO 3 CY5	ARN MUERTOS 4 CY5 + ARN VIVO 4 CY3

Para el análisis de los genes expresados diferencialmente en el MI y en el MII se hibridó ARN de las muestras marcado con Cy3 (3 réplicas biológicas de cada tiempo, R) con ADN genómico de referencia de *Streptomyces coelicolor* marcado con Cy5 (Gadgil *et al.*, 2005) en tres micromatrices de Agilent Technologies®:

ARN 16 R1 Cy3 + ADNg Cy5	ARN 48 R1 Cy3 + ADNg Cy5
ARN 24 R1 Cy3 + ADNg Cy5	ARN 72 R1 Cy3 + ADNg Cy5
ARN 16 R2 Cy3+ ADNg Cy5	ARN 48 h2 Cy3+ ADNg Cy5
ARN 24 R2 Cy3+ ADNg Cy5	ARN 72 h2 Cy3+ ADNg Cy5
ARN 16 R3 Cy3+ ADNg Cy5	ARN 48 R3 Cy3+ ADNg Cy5
ARN 24 R3 Cy3+ ADNg Cy5	ARN 72 R3 Cy3+ ADNg Cy5

II.1.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRAS DE *STREPTOMYCES*

Eliminado: ¶

A) MUERTE CELULAR PROGRAMADA: SEPARACIÓN DE CÉLULAS VIVAS Y MUERTAS.

Tal como se comenta en resultados (apartado III.1.2a), uno de los retos a la hora de estudiar la MCP en una bacteria filamentosa como es *Streptomyces*, es el de separar las células vivas de las que están comenzando a morir. Para ello, hemos utilizado la metodología creada previamente en nuestro grupo de investigación que consiste en la obtención de protoplastos celulares (Manteca *et al.*, 2006b) tras 12-16 horas de cultivo, según estemos buscando una muestra enriquecida en células muertas o vivas, se extrajo el micelio fresco del celofán utilizando una espátula roma y se depositó en un tubo falcon para pesarlo. Se añade tampón P (Kieser *et al.*, 2000) de forma que quede denso pero hidratado para que se agite bien y esté accesible a la lisozima (4 ml de tampón P por cada 2 g de micelio). Se añade la lisozima (15 mg/ml), y se agita con la mano mediante golpes secos. Se incuba a 37°C durante 5-10 minutos. Se mezcla con la pipeta de 5 ml y se vuelve a incubar durante 5 minutos. Se añaden 5 ml más de tampón P y se mezcla de nuevo con la punta de 5 ml. Se deja incubando 3-4 minutos más y se mira la muestra en el microscopio de contraste de fases para comprobar que se han formado los protoplastos.

A continuación se filtra la muestra con una jeringa de 20 ml y algodón graso (algodón hasta unos 2 ml de la medida de la jeringa) y se centrifuga 10 min a 1000 gs. Se decanta el sobrenadante, se resuspende el sedimento con 10 ml de tampón P, y se repite el proceso tres veces, tras el tercer lavado se analiza una pequeña alícuota de la muestra en el microscopio confocal (colorantes vitales disueltos en tampón P) para observar el estado de viabilidad de los protoplastos (verdes=vivos, rojos= comenzando a morir). El resto de protoplastos se reparte en alícuotas de 200 µl y se guarda congelado a -80°C hasta su utilización (Manteca *et al.*, 2006b).

B) DESARROLLO EN CULTIVOS SÓLIDOS: SEPARACIÓN DEL MICELIO I Y EL MICELIO II

Se recogió el micelio de placas de GLM con celofán a distintos tiempos. El MI se recogió a las 12 horas, y el MII a las 24, 48 y 72 horas. La cantidad de muestra recogida

II. MATERIAL Y MÉTODOS

se limitó a 0,1 g en peso fresco por muestra y réplica con el objeto de no saturar las columnas de extracción de ARN.

Seguimos el protocolo publicado por Manteca *et al.*, (2010), en el que se describe la obtención de las muestras de micelio I y II para un análisis proteómico, con las modificaciones necesarias para la obtención de ARN: llenar el fondo cónico de un tubo falcon de 50 ml con bolas de vidrio de 5 mm de diámetro (Sigma Aldrich®); añadir 5 ml de “RNA Protect” (Quiagen®) y agitar en vortex durante 1 minuto; dejar reposar durante 5 minutos; recoger la muestra con una punta de pipeta de 1 ml (cortándola si fuera necesario); lavar las bolas de vidrio con 1 ml adicional de “RNA Protect” para recuperar el micelio restante; centrifugar 10 minutos a máxima velocidad y descartar el sobrenadante. Las muestras se guardaron congeladas a -80°C.

II.1.3. LISIS Y HOMOGENEIZACIÓN DEL MICELIO

Las muestras se descongelan y se les añaden 170 µl de lisozima (15 mg/ml) en TE (1mM EDTA, 10 mM Tris pH 8), se pasan a un tubo de 2 ml. Posteriormente se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos (en el caso de los protoplastos este paso no hace falta). Se añaden 600 µl de RLT-β-ME a cada tubo. (RLT: *RNeasy Protect Mini kit* de Qiagen®). Se agita en vortex enérgicamente y se preempaqueta en Tubos *Phase Lock Gel (PLG) Heavy (5-PRIME®)* 20-30 s al máximo de rpm; se transfirieren 750 µl del homogeneizado a un nuevo tubo PLG; se añaden 750 µl de Aquafenol-CIA; se agita vigorosamente hasta formar una suspensión (1 min aprox.; no usar vortex); se centrifuga durante 5 min a 13000 g; la fase superior acuosa se pasa a otro tubo PLG por decantación; se repite la extracción con Aquafenol-CIA; se pasa la fase acuosa a microtubos de 2 ml por decantación; se añaden 395 µl de etanol absoluto y se mezcla por inversión.

Eliminado:

II.1.4. EXTRACCIÓN CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LA PUREZA DEL ARN

Terminada la fase de pre-purificación y lisado por fenolización las muestras de micelio el ARN se purifica mediante columnas (*RNeasy Protect Mini kit* de Qiagen® Ref. 74524), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Tras la extracción del ARN el siguiente paso es su cuantificación mediante el nanodrop (Agilent Technologies®) (2 µl de muestra). Para el control de calidad del ARN

(estado de degradación y pureza) se utilizó un gel en chip para el bioanalizador de Agilent Technologies® (5 µl de muestra).

II.1.5. MARCAJE DEL ARN Y EL ADN CROMOSÓMICO CON CY3 Y CY5.

La primera consideración a tener en cuenta en el marcaje es trabajar con la menor luz posible y manteniendo los reactivos en oscuridad (posteriormente las mezclas), siendo el Cy5 especialmente sensible al ozono y la humedad.

Se mezcla la cantidad de ARN necesaria en cada caso con los cebadores y se somete la mezcla a 70°C durante 10 minutos favoreciendo la desnaturalización del ARN y la unión de los cebadores. Posteriormente se pasa a hielo. Se prepara la premezcla con el enzima transcriptasa reversa (enzima que sintetiza ADNc a partir de ARN) y Cy5-dCTPs/Cy3-dCTPs (nucleótidos trifosfato marcados con Cy5 ó Cy3 utilizados para la síntesis de ANDc a partir de ARN). Se añade la premezcla a la mezcla ARN-cebadores y se incuba en el termociclador 10 minutos a 25°C y 5 horas a 46°C. Una vez terminada la reacción, se eliminan los restos de ARN que puedan quedar presentes mediante una lisis con NaOH 1 N, añadiendo 1/3 del volumen de la mezcla e incubando en oscuridad 10 minutos a 70°C. Finalmente se añade 1/3 del volumen de reacción de HCl 1 N para neutralizar la sosa y se guarda el ADNc-Cy5/ADNc-Cy3 en oscuridad a -20°C.

En el caso de las muestras de protoplastos vivos y muertos el marcaje se hizo con Cy3 y Cy5 para ambos ARN, alternando el tipo de marcaje en las réplicas.

En el caso de las muestras de micelio I y micelio II los ARN se marcan con Cy3 y se enfrentan a ADN genómico de referencia que marcamos con Cy5. (apartado II.1.1 diseño del experimento).

Las muestras marcadas se purifican mediante minicolumnas de purificación PCR "MinElute" (Qiagen®, ref. 28004), y se cuantifican mediante el equipo nanodrop (Agilent Technologies®).

II.1.6. HIBRIDACIÓN DE MICROMATRICES

Las micromatrices utilizadas fueron adquiridas en Oxford Gene Technology. Contienen 1417 sondas control y 43798 sondas sintetizadas *in situ* por medio de la tecnología Agilent con ácidos nucleicos procedentes de *S. coelicolor*.

Se mezclan los marcajes por parejas de hibridación y se desnaturalizan a 94°C durante 3 minutos. A continuación los ácidos nucleicos marcados y desnaturalizados se mezclan inmediatamente con la solución de hibridación (NaCl 5 M, formamida 100 %, EDTA 0,5 M, Tritón 10 %).

Se prepara la cámara de hibridación (Agilent Technologies®) con el soporte a usar; se ponen 100 µl de la mezcla anterior evitando la formación de burbujas y se cierra la cámara de hibridación. En orientación vertical se rota el conjunto 2-3 veces en sentido horario para humedecer las superficies eliminando las posibles burbujas mediante golpes en vertical sobre una superficie firme.

La cámara se incuba a 55°C durante 60 horas en un horno de hibridación colocando la micromatriz en el rotor verticalmente respecto al eje de giro a una velocidad de 4 rpm (conviene revisar cada 12 h la posible formación de burbujas).

II.1.7. LAVADO DE LAS MATRICES, ESCANEADO Y LECTURA DE DATOS.

Tras las 60 h la micromatriz se saca de la cámara y se lava abundantemente con dos soluciones de lavado comerciales (Agilent Technologies®) y finalmente se seca al aire. En este momento la matriz ya está lista y se procede a su escaneado utilizando el escáner Agilent G2565BA. La cuantificación de las intensidades de fluorescencia correspondientes a cada sonda se realizó con el programa *FeatureExtraction* v9.5.1 (Agilent). Se obtienen miles de datos brutos de intensidades de Cy3, Cy5 y mezcla de ambos (genes que se expresan en ambas fases). El genoma de *Streptomyces coelicolor* tiene 7.825 genes (dentro de cada micromatriz existen repeticiones como controles internos), por todo esto es muy importante la bioinformática como herramienta para filtrar los datos utilizando los estadísticamente fiables para sacar conclusiones acertadas.

II.1.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

Los datos de cuantificación se procesaron por el Dr. Antonio Rodríguez García del Instituto de biotecnología de León, utilizando los paquetes de análisis del proyecto *Bioconductor* en el entorno *R* (R Development Core Team, 2011; versión 2.12.2). Por medio de las funciones incluidas en el paquete *limma* (Bioconductor 2.7, limma 3.6.9; Smyth, 2004) se realizaron la normalización y el análisis estadístico.

La normalización utilizada fue “Scale” (en el caso de la transcriptómica vivo-muerto) y “clm” (en el caso de la transcriptómica MI-MII). Log (M/V) = datos negativos al alza en lo vivo, y positivos al alza en lo muerto. Log (MII/MI) = datos negativos al alza en el MI y positivos en el MII. Considerando solamente los datos estadísticamente significativos, es decir, con un p valor menor de 0,05 y en los que los datos de intensidad de todas las sondas para un mismo gen son reproducibles.

II.2. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LOS PROCESOS DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA.

II.2.1. RECOGIDA DE MUESTRA Y FRACCIONAMIENTO

El micelio se recogió y procesó para el fraccionamiento de células vivas y muertas del mismo modo que se describió en el apartado II.1.2a para los experimentos de transcriptómica. Se hicieron duplicados (réplicas biológicas), y los extractos libres de células se prepararon mediante un choque osmótico de los protoplastos en tampón A (50 mM Tris HCl pH 7, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 7 mM beta-mercaptoetanol, “protease inhibitor cocktail tablets” de Roche®), y sonicación en hielo. Las fracciones de citosol y membrana se obtuvieron mediante el método descrito por Quirós *et al.*, (1986), mediante ultracentrifugación a 100000 g en la ultracentrífuga Beckman® LB-70 M. El sobrenadante constituye la fracción citosólica mientras que el sedimento representa la fracción de membrana. Ambas fracciones se dializaron frente a agua destilada a 4°C (durante una hora con cuatro cambios de agua, y usando tubos de diálisis benzoilados (D7884 Sigma®). La cantidad de proteína se cuantificó mediante el método Bradford (Bradford 1976), se liofilizó y se conservó a -80°C.

II.2.2. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS, DIGESTIÓN Y MARCAJE ISOBÁRICO (iTRAQ)

Las proteínas (50 µg /pocillo), se separaron mediante geles de proteínas SDS-PAGE usando geles prefabricados PAGEr en gradiente 4-20 % Tris-glicina (Lonza®) y teñidos con azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250). Para las proteínas intrínsecas de membrana, extractos de 50 µg de proteína se hirvieron en tampón de

carga con SDS durante 5 minutos y se corrieron directamente en el gel. Las dos muestras (células vivas y muertas) de cada fracción subcelular y las dos réplicas biológicas se cargaron 2 veces (réplicas metodológicas) en 2 geles independientes, uno para las proteínas citosólicas y otro para las proteínas de membrana. Cada calle del gel se cortó posteriormente con un bisturí en 6 fracciones. Las porciones del gel se lavaron con agua destilada y se deshidrataron con acetonitrilo. Los residuos de cisteína se redujeron con DTT, se alquilaron con iodoacetamida, se rehidrataron con una solución de 10 ng/ μ l de tripsina (Promega®) en un tampón de digestión (50 mM bicarbonato de trietilamonio) y se incubó toda la noche a 37°C. Después de la digestión, los sobrenadantes se recuperaron y los péptidos del resto de los fragmentos del gel se extrajeron con ácido fórmico al 5 % durante 30 minutos, después de los cuales se añadió el mismo volumen de acetonitrilo puro y las muestras se incubaron durante 30 minutos más a temperatura ambiente. Los extractos se secaron en vacío. Los péptidos se marcaron mediante marcaje isobárico (iTRAQ, Applied Biosystems®) de acuerdo al protocolo publicado previamente (Manteca *et al.*, 2010). Se usaron los reactivos 113, 114, 115 y 116 para llevar a cabo dos experimentos iTRAQ por separado: uno para las proteínas citosólicas y otro para las de membrana. Después del marcaje (durante dos horas a temperatura ambiente) las muestras se combinaron (6 muestras que se corresponden con los trozos originales del gel). El solvente orgánico se concentró en un *Speedvac* y la purificación de los péptidos se realizó manualmente mediante cromatografía hidrofóbica en puntas de micropipeta GELoader (Eppendorf®) preparadas con C18 (discos de extracción 3M Empore®) y R3 (POROS®).

II.2.3. ANÁLISIS DE PÉPTIDOS MARCADOS POR iTRAQ MEDIANTE NANO HPLC Y ESPECTOMETRÍA DE MASAS EN TANDEM.

Los péptidos trípticos se separaron usando un sistema de nano HPLC "ULTIMATE 3000 LC system" (Dionex, Idstein, Alemania). La fase móvil A fue 0,1% de ácido fórmico en agua destilada y la fase móvil B fue 0,1 % de ácido fórmico en 90 % de acetonitrilo (Fisher Scientific®). Se utilizaron dos columnas con una precolumna de 1 cm (100 μ m diámetro interior, 350 μ m diámetro exterior) y una columna analítica de 15 cm (75 μ m diámetro interior, 350 μ m diámetro exterior) empacada con resina C18 (ReproSil, Pur C18AQ 3 μ m, Dr. Maisch, Alemania). En la precolumna se cargaron 5 μ l

de muestra en ácido trifluoroacético al 1%. El gradiente de elución fue de 2-7 % B en 4 min, 7-30% B en 60 min, 30-60% B en 15 min, y 60-90% B en 5 min con un flujo de 300 µl/min. La columna se lavó con 90% B durante 2 min seguido del equilibrado durante 22 min a un flujo de 300 µl/min. La solución de bloqueo de masa para MS y MS/MS estaba compuesta por 500 µmol/µl de [Glu¹]-Fibrinopeptide B (Sigma®). El sistema "Ultimate 3000" fue la interfaz de un espectrómetro de masas en tándem Q-TOF (Synapt, Waters Corporation®). El analizador TOF (v-mode) del espectrómetro de masas se calibró externamente con fragmentos iónicos de [Glu¹]-Fibrinopeptide B desde m/z 50 a 1500. Los datos LC-MS/MS se obtuvieron usando el método dato-dependiente. El voltaje capilar fue 4.5 kV La energía de colisión se intensificó de 20 a 45 eV. El estudio MS se realizó durante 0,48 s con un retraso de 0,02 s. El rango de escaneado MS fue 350-1500 m/z y el rango de escaneado del MS/MS fue 50-1500 m/z. Los fragmentos iónicos de los dos precursores iónicos más abundantes se detectaron con una tasa de integración de 0,48 s con 0,02 s de retraso. Cada muestra se analizó dos veces; los precursores iónicos seleccionados durante el primer análisis LC-MS/MS fueron excluidos en el segundo.

II.2.4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS

El programa utilizado para convertir los datos brutos del análisis LC-MS/MS en archivos pkl fue Data Analysis ProteinLynx Global server (PLGS) versión 2.3. Los archivos pkl fueron utilizados para las búsquedas en "MASCOT search engine" (version 2.2) utilizando la base de datos NCBI nr con la taxonomía limitada a *Streptomyces coelicolor* (2 diciembre, 2009, 8573 entradas). Los parámetros de búsqueda utilizados fueron: tolerancia de la masa del péptido (MS) 10 ppm; fragmento tolerancia masa MS/MS, 0,1 Da; iTRAQ, cisteínas carbidometiladas, y metioninas oxidadas como modificaciones. Las tasas de de identificación de falsos positivos para los péptidos se calcularon usando la opción *decoy* del MASCOT resultando en 1,2 % de falsos positivos para las muestras de citosol y 1,1 % para las proteínas de membrana.

La cuantificación relativa se realizó usando el programa PLGS (waters®) con normalización automática. El algoritmo de cuantificación PLGS utiliza métodos Bayesianos muy potentes a la hora de realizar una cuantificación fiable. Los resultados obtenidos por PLGS se exportaron en Microsoft Excel para continuar con su

procesamiento. Las proteínas que no estaban representadas por ningún péptido por encima del umbral de la homología del MASCOT se descartaron. Cuando una proteína se detectó en más de una de las seis fracciones de gel procesadas, la proteína con la puntuación MASCOT más alta fue la que se usó. Las abundancias relativas se consideraron significativas si el promedio de sus ratios iTRAQ era consistente en las dos réplicas biológicas analizadas ($CV < 0,25$), y si su ratio iTRAQ entre réplicas metodológicas (vivo/vivo, y muerto/muerto) está incluido en el intervalo 0,81-1,23 (Log₂ ratio iTRAQ de $\pm 0,3$; sin variación).

II.3. OBTENCIÓN DE MUTANTES MEDIANTE LA COLECCIÓN DE CÓSMIDOS CON INSERCIONES DEL TRASPOSÓN TN5062.

Mediante un sistema de mutagénesis de alto rendimiento mediada por el trasposón Tn5062, se ha realizado mutagénesis sistemática del 83 % del genoma de *Streptomyces coelicolor* (Fernández- Martínez *et al.*, 2011). La base de datos de todas las inserciones se encuentra en <http://strepdb.streptomyces.org.uk/>.

En esta tesis doctoral, se ha utilizado esta colección de cósmidos para los experimentos de mutagénesis. Para ello utilizamos los cósmidos con las inserciones interrumpiendo cada gen de interés. Las inserciones se enviaron desde la Universidad de Swansie en *E. coli* JM109. Las cepas se crecieron durante una noche en agitación a 37°C en medio LB con apramicina (resistencia que llevan los cósmidos). A estas células se les extrajo el cósmido mediante el kit “GenElute HP Plasmid Miniprep” (sigma®). Con este ADN se transformaron células electrocompetentes *E. coli* ET12567 dam⁻ que llevan el plásmido conjugativo pUZ8002 (Paget *et al.*, 1999). Se utilizó el programa EC I (1,8 v) del electroporador *Micropulser* (Biorad®). Con un tiempo de recuperación óptimo de entre 3,80 y 5,40 ms.

Las células se dejaron en 1 ml de LB a 37°C durante 1 h-1,30 h y posteriormente se sembraron en placas de medio 2xTY que llevan cloranfenicol (resistencia propia de las *E. coli* ET12567 dam⁻) kanamicina (resistencia del plásmido conjugativo) y apramicina (resistencia del trasposón Tn5062). Tras 2 días de incubación a 37°C, una de las colonias transformantes se pone a crecer una noche en 5 ml de LB + 1% glucosa con los tres antibióticos de resistencia (Clo, Km, Amp). Los 5 ml se concentran en 0,5

II. MATERIAL Y MÉTODOS

ml y se hacen 3 lavados con LB para eliminar el antibiótico. Paralelamente se extraen esporas frescas de una placa de *S. coelicolor* y se resuspenden en 0,5 ml de R5. Estas esporas se incuban 10 minutos a 50°C, transcurrido este tiempo se mezclan las esporas y las células ET12567 Δ am⁻ (transformadas con el cósmido que lleva la inserción en el gen de interés), y se siembran en placas de SFM enriquecido con 10mM de MgCl₂. Al día siguiente se cubren las placas con ácido nalidíxico (para impedir el crecimiento de las células de *E. coli*) y apramicina (para seleccionar los transformantes de *S. coelicolor*), las placas se dejan incubando a 30°C durante 48-72 horas tras las cuales se comienza la siembra de las colonias aisladas de *Streptomyces*, en forma de pequeños parches, en placas de kanamicina y apramicina de forma paralela. Las colonias resultantes de una doble recombinación crecerán en las placas de apramicina (resistencia del transposón Tn5062) pero no en placas con kanamicina. Tras resemebrar entre 200-600 colonias y dejar incubar las placas 3-4 días se obtienen entre 1-4 colonias de *S. coelicolor* doble-recombinantes (crecen en am y no en km). A estas colonias se les dan varios pases de siembra en placas de GLM con am y paralelamente en placas con km (para confirmar la doble recombinación) y finalmente se siembran en placas de SFM con apramicina para guardar las esporas a partir de una colonia aislada. Los mutantes son comprobados por PCR con los oligonucleotidos:

ApraF: 5' ATTTAATGCGGATGTTGCG 3'

ApraR: 5' CTCACGGTAACTGATGCC 3'

KanaR: 5' TCGGTCATTCGAACCCC 3'

KanaF: 5' GATGGCTTCTTGCCGCC 3'

Dándose por buenos aquellos en los que amplifica la banda del gen de la apramicina (1300 pb) y no del gen de la kanamicina (794 pb).

Posteriormente y para una comprobación completamente fiable se realizan hibridaciones tipo Southern Blot en las que se utiliza como sonda el fragmento de 3442 pb resultante de la digestión *PvuII* del vector pQM5062 (5795 pb), que se corresponde con el trasposón Tn5062 marcándolo con digoxigenina. Para la realización del Southern se extrae ADN cromosómico de los mutantes y se digiere con *Sall* (se digiere como control también el ADN de los cósmidos correspondientes), que corta en el trasposón dejando un fragmento de 835 pb (unido al resto del cósmido hasta el siguiente corte de *Sall*) y otro fragmento de 2600 pb (unido al resto del cósmido hasta el siguiente

corte de *Sall*). Para el cálculo del tamaño de las bandas que han de salir en cada Southern se busca la secuencia del cósmido correspondiente y la posición y orientación de la inserción, (base de datos de <http://www.strepdb.com>) se digiere virtualmente la secuencia del cósmido con *Sall* (NEBcutter V2.0), y de esta forma podemos calcular los primeros cortes *Sall* aguas arriba y aguas abajo en relación a la posición del trasposón y sumándoles 835 o 3600 pb según la orientación del mismo tenemos los tamaños de las bandas.

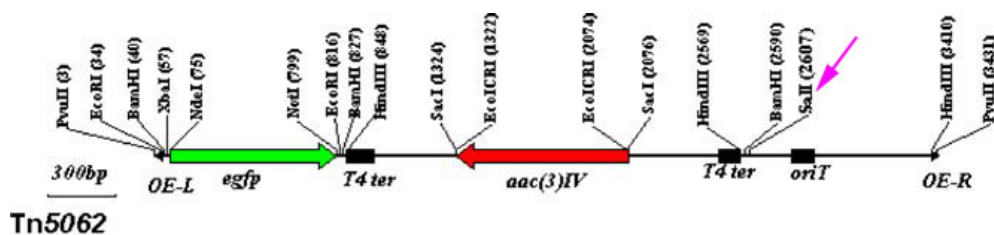


Fig.II.1. Esquema del trasposón Tn5062 tomado de Fernández-Martínez *et al.*, 2011. La flecha rosa indica el corte *Sall* dentro de la inserción.

II.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE CULTIVOS LÍQUIDOS DE *STREPTOMYCES*: FERMENTACIONES.

II.4.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.

En la siguiente tabla se muestran los microorganismos empleados en este trabajo:

<i>Organismo</i>	<i>Cepa</i>
<i>Streptomyces coelicolor</i>	M145
<i>Streptomyces coelicolor</i>	M600
<i>Streptomyces cattleya</i>	NRRL8057
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
<i>Streptomyces tsukubaensis</i>	NRRL 18488
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TB-23
<i>Escherichia coli dam⁻ dcm⁻</i>	ET12567

Las cepas de *Streptomyces* se conservaron en forma de esporas en glicerol al 20% a -80°C (Kieser *et al.*, 2000). El resto de microorganismos se conservaron en forma de células vegetativas también en glicerol al 20% y a -80°C.

II.4.2. MEDIOS DE CULTIVO.

a) Medios para *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces cattleya*.

Medio GLM: (para el seguimiento del ciclo de vida en medio sólido)

- 5 g/l de glucosa.
- 4 g/l de levadura.
- 5 g/l extracto de malta.
- 0,5 g/l MgSO₄·7H₂O.
- 20 g/l de agar.

Después de esterilizar y antes de repartir en placas se suplementa con una concentración final de 0,5 g/l K₂HPO₄ también estéril.

Medio R5A: (para el seguimiento del ciclo de vida en medio líquido)

- 0,25 g/l K₂SO₄
- 10,12 g/l MgCl₂·6H₂O
- 10 g/l glucosa.
- 0,1 g/l casaminoácidos Difco®.
- 200 µl (10x) oligoelementos (Kieser *et al.*, 2000)
- 5 g/l Extracto de levadura.
- 21 g/l MOPS.

Ajustar el pH a 6,8 con KOH de una solución concentrada.

- 20 g/l Agar.

Medio SFM (para la esporulación)

- 20 g/l Harina de Soja.
- 20 g/l Manitol.
- 20 g/l Agar.

b) Medios para *Streptomyces tsukubaensis*

Medio ISP4 de Difco® (para la esporulación)

Medio MG (definido para el crecimiento y producción en medio líquido)

- 50 g/l de Almidón (Difco®)
- 8,83 g/l ácido glutámico
- 21 g/l MOPS
- 0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1 ml/l CaCl_2 9 mM
- 1 ml/l NaCl 17 mM
- 166,6 ml KH_2PO_4 + K_2HPO_4 15 mM (2,5 mM final)
- 0,450 ml/l oligoelementos 10x

Ajustar a PH 6,5 con NaOH

Oligoelementos MG para 100 ml de una solución 100x;

- 0,39 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- 0,057 g H_3BO_3
- 0,037 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 0,061 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 8,8 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

c) Medios para *Staphylococcus*

Medio TSB:

- 15 g/l TSB Merk®.
- 10 g/l agar.

Medio LB: Sambrook *et al.*, (2001).

d) Medios para *Saccharomyces cerevisiae*

Medio YEDPA:

- 20 g/l Bacto peptona
- 10 g/l Extracto de levadura
- 20 g/l Glucosa
- 20 g/l Agar

e) Medios de cultivo para *E. coli*

Medio 2XTY:

- 5 g NaCl.
- 15 g Triptona.
- 10 g Extracto de levadura.

Se reparte en botellas de 100 ml. En caso de que se quiera sólido se añade 1,5 g de agar por botella.

Medio LB enriquecido con glucosa:

- 5 g NaCl.
- 5 g de extracto de levadura.
- 10 g de triptona.

Añadir 1% de glucosa a la mezcla. Se reparte en botellas de 100 ml. En caso de que se quiera sólido se añade 1,5 g de agar por botella.

II.4.3. CONDICIONES DE CULTIVO.

Los cultivos en medio sólido para el seguimiento del ciclo de vida se hicieron en placas Petri de 8,5 cm de diámetro con 25 ml de medio GLM (Novella *et al.*, 1992) por placa. El medio de cultivo se cubrió con discos estériles de celofán antes de la incubación (Méndez *et al.*, 1985). Las placas fueron inoculadas con 100 μ l de una suspensión de esporas frescas previamente obtenidas en medio de cultivo SFM/ISP4 (dependiendo de la cepa) y cuantificadas (10^8 esporas/ml). La incubación se realizó a 30°C (28°C para *S. cattleya*).

Eliminado:

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Los cultivos en medio líquido se hicieron en matraces de 100 ml con 20 ml de medio R5A/MS a 30°C (28°C para *S. cattleya*) y 200 rpm, los matraces fueron inoculados directamente con esporas frescas (no congeladas) a diferentes concentraciones (normalmente 10^5 a 10^7 esporas/ml).

Eliminado: o

En este trabajo, se ha desarrollado una nueva metodología de cultivo a partir de lo que hemos denominado “inóculos condicionados” dichos inóculos, consisten en la incubación de un matraz con una concentración de esporas frescas del orden de $6,6 \times 10^8$ esporas/ml (aprox.), durante 14 días. Estos cultivos se emplean como inóculos para iniciar nuevos cultivos que hemos denominado “cultivos condicionados” (Resultados III.3.2a).

II.4.4. CUANTIFICACIÓN DE ANTIBIÓTICOS.

La cuantificación de **tienamicina** se ha realizado mediante bioensayo frente a un organismo sensible: *Staphylococcus aureus*. Los caldos de cultivo fueron añadidos directamente a discos de antibiograma estériles de 5 mm de diámetro. Dichos discos se colocaron sobre placas de petri de 8,5 cm de diámetro con 10 ml de medio TSB con el microorganismo indicador previamente inoculado. Estas placas se dejaron 1 hora a 4°C, y posteriormente 24 horas a 37°C. La concentración de antibiótico se cuantificó extrapolando el diámetro de los halos obtenidos con curvas patrón realizadas previamente utilizando imipenem (Merck®), derivado comercial de la tienamicina (González J. A., 2003).

Eliminado: .

Eliminado:

Eliminado:

La **actinorrodina** y la **undecilprodigiosina** se cuantificaron espectrofotométricamente siguiendo la metodología descrita por Kiesser *et al.*, (2000).

El **tacrolimus** (FK-506) se cuantificó mediante bioensayos frente a la levadura sensible *Saccharomyces cerevisiae* TB-23 (Arndt *et al.*, 1999). La levadura se resiembró para su mantenimiento en placas de YEDPA, se incubó a 30°C 2-3 días y se conserva a 4°C. Para el bioensayo se inoculan matraces con 100 ml de YEDPA con el asa de siembra tras raspar la levadura de la placa previamente guardada y se ponen a incubar a 30°C y 300 rpm hasta que el cultivo alcance una densidad óptica de 2 a 600 nm. Una vez alcanzada la densidad óptica se añaden 3 ml del cultivo a 60 ml de YEDPA (1,5 % agar) a una temperatura máxima de 42°C. Posteriormente se vierte el medio con el microorganismo en placas Petri (25 ml por placa) y se deja 15 min en campana para

que el agar solidifique, en estas placas se hacen pocillos con un “*sacabocados*” de 4 cm de diámetro. En cada pocillo se colocan 50 µl de muestra y las placas se dejan bocarriba durante 2 horas a 4°C para permitir la difusión del tacrolimus. Después se dejan a 30°C durante 24 h para permitir el crecimiento de la levadura. Finalizado este tiempo se mide el diámetro de los halos de inhibición y se estima la concentración utilizando una recta patrón generada con tacrolimus puro (aportado por la empresa Antibioticos S.A., León).

II.4.5. MEDIDA DE ACTIVIDAD HEXOQUINASA.

La presencia de actividad hexoquinasa en el medio extracelular se analizó en las fracciones del micelio por el método Chou y Wilson (1975). Los reactivos empleados fueron de Sigma®.

II.4.6. GELES DE ACTIVIDAD NUCLEOLÍTICA: ZIMOGRAMAS.

Las nucleasas se separaron en un gel SDS-PAGE al 12% (Laemmli, 1970) conteniendo 10 µg/ml de ADN de timo de ternera (Sigma®). El SDS de estos experimentos fue de USB-US75819 de Amersham Biosciences®. Después de la electroforesis, las proteínas se renaturalizaron mediante lavados repetidos del gel con un tampón de renaturalización (Tris-HCl 25 mM pH 8.8, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 7 mM) durante dos horas a 4°C. La actividad nucleolítica se visualizó por incubación de los geles durante 2 horas a 37°C en tampón 20 mM Tris-HCL pH 8, 7 mM, β-mercaptoetanol, 10 mM MgCl₂, 10% DMSO (Nicieza *et al.*, 1999), seguido por tinción con bromuro de etidio y análisis bajo luz UV. Como controles positivos se emplearon nucleasa micrococcal y DNAasa I de páncreas bovino (Amersham Pharmacia Biotech®).

Eliminado: .0

II.4.7. CUANTIFICACIÓN DE LOS RIBO-DESOXIRIBONUCLEÓTIDOS LIBRES.

Los ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos libres fueron cuantificados en los extractos celulares después de la extracción con ácido perclórico. Para ello, las proteínas y los ácidos nucleicos se precipitaron en 0,625 N de ácido perclórico durante 30 minutos en hielo. Los sedimentos conteniendo los ácidos nucleicos se descartaron por centrifugación a 10000 rpm y los sobrenadantes conteniendo los ribo- y desoxirribonucleótidos libres se usaron para calcular las cantidades de estos

Eliminado: .

monómeros. Los ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos fueron analizados de acuerdo con los métodos de Schneider (1957) y Burton (1956) respectivamente. Las determinaciones fueron repetidas tres veces. Los valores se estandarizaron con respecto al peso fresco.

II.4.8. TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA.

a) Tinción de viabilidad celular.

Se utilizó el ensayo descrito con anterioridad en *Streptomyces* (Fernández y Sánchez, 2001; Fernández y Sánchez, 2002). Éste ensayo implica la tinción de las células con un yoduro de propidio (IP), y con SYTO 9, colorantes fluorescentes que tiñen ácidos nucleicos (LIVE/DEAD Bac-Light Bacterial Viability Kit, Invitrogen®, L-13152). El SYTO 9 (fluorescencia verde) tiñe el ADN de todas las células estén sus membranas dañadas o no. El IP (fluorescencia roja) por el contrario, penetra sólo en las bacterias con las membranas dañadas, y en las proporciones empleadas desplaza al SYTO 9, causando una reducción en la fluorescencia verde cuando ambos colorantes están presentes. Así, en la presencia de ambos, las bacterias con las membranas intactas aparecen con fluorescencia verde, mientras que las que tienen su membrana comprometida aparecen rojas (Haugland, 2002). La mezcla de colorantes se preparó como recomienda la firma comercial (Invitrogen®), y se añadió directamente sobre la muestra micelial. Las muestras se tiñeron durante 10 minutos, y se observaron en un microscopio de fluorescencia láser confocal (Leica® TCS-SP2-AOBS) a una longitud de onda de 488 nm y 568 nm de excitación, y 530 nm (verde) y 630 nm (rojo) emisión. Las imágenes se combinaron usando el programa “*Leica Confocal Software*”. En algunos casos las muestras también fueron observadas en el microscopio de contraste de interferencia de *Normanski* que está accesible en el mismo equipamiento.

b) Tinción de membranas.

Se empleó el colorante fluorescente “*N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(*p*-diethylaminophenyl-hexatrienyl) pyridinium dibromide” (FM 4-64), que tiñe la membrana plasmática de las células (Vida y Emr, 1995) y que ya había sido usado con anterioridad en *Streptomyces* (Grantcharova *et al.*, 2003; Manteca *et al.*, 2005a). El colorante se añadió directamente al medio de cultivo, a una concentración final de 1 µg/ml, condiciones que no afectaron al crecimiento (Fishov y Woldringh, 1999). En los

II. MATERIAL Y MÉTODOS

tiempos apropiados, se tomaron muestras de cultivo que se procesaron para microscopía del mismo modo descrito arriba para los ensayos de viabilidad. Las secciones se observaron al microscopio láser confocal a una longitud de onda de 550 de excitación y 700 de emisión.

c) Tinción de paredes celulares.

Las células se fijaron en 2.8% de paraformaldehído, 0.0045% de glutaraldehído en PBS (0.14M NaCl, 2.6mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄) durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron dos veces con PBS, y se bloquearon con 2% de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma®) en PBS durante 5 minutos. La vancomicina BODIPY FL (Invitrogen®, V34850) se utilizó a una concentración de 0.5 µg ml⁻¹ en PBS durante 15 minutos. Después las muestras fueron lavadas dos veces con PBS y observadas en el microscopio confocal a una longitud de onda de la excitación de 505 nanómetros y de la emisión de 513 nanómetros.

d) Expresión de la Proteína verde fluorescente.

Se utilizó la cepa *S. coelicolor* M600 con el promotor del gen *redD* fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) (Sun *et al.*, 1999), analizándose los cultivos a las 90 h en el microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS (480 nm).

II.4.9. ANÁLISIS FLUORIMÉTRICOS DE LA DIFERENCIACIÓN EN FERMENTACIONES

La medida de los procesos de diferenciación en cultivos líquidos (fermentaciones) se ha automatizado mediante el empleo de los colorantes fluorescentes de viabilidad comentados arriba unidos a medidas de intensidad de fluorescencia mediante el empleo de un fluorímetro (Perkin-Elmer® LS 50B) (Longitudes de onda de excitación 480 nm para el IP y 545 nm para el SYTO9; longitudes de onda de emisión 500 y 610 nm respectivamente). Utilizando 1 ml de cultivo de *Streptomyces coelicolor* en cada cubeta de fluorímetro mezclados con 1 ml de mezcla de colorantes vitales (0,5 ml IP y 0,5 ml SYTO9). Se realizaron cultivos por duplicado (dos réplicas biológicas) y 3 medidas de cada cultivo (réplicas metodológicas). Las medidas se tomaron cada 10 horas de cultivo desde las 10 h hasta las 100 h y cada 20 h hasta las 160 h. (Yagüe *et al.*, 2010). El uso de volúmenes de medida relativamente grandes (2 ml) fue importante para conseguir medidas

Eliminado: .

Eliminado: .

Eliminado: .

Eliminado: .

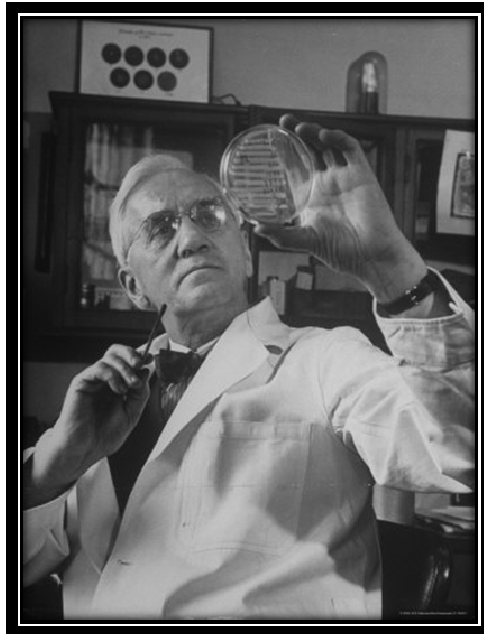
Eliminado: .

II. MATERIAL Y MÉTODOS

reproducibles, ya que los cultivos de *Streptomyces* no son homogéneos: *Streptomyces* forma pellets de gran tamaño que al usar volúmenes de medida pequeños generan gran variabilidad.



Selman Waksman



Alexander Fleming

III. RESULTADOS

III.RESULTADOS

III.1. ANÁLISIS MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS (TRANSCRIPTÓMICA Y PROTEÓMICA) DE LOS PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN DE *STREPTOMYCES*

Tal como se ha comentado en la introducción, nuestro grupo de investigación ha realizado recientemente experimentos de proteómica cuantitativa sobre las diferencias en la expresión de proteica durante las fases de MI y MII en cultivos sólidos (Manteca *et al.*, 2010), con el objetivo último de descubrir las proteínas que están regulando las fases del ciclo de desarrollo descrito inicialmente desde un punto de vista fundamentalmente morfológico. En esta tesis doctoral hemos continuado con el desarrollo de estos experimentos, aplicando esta vez transcriptómica en lugar de proteómica para el estudio de las fases de MI y MII, y también hemos extendido estos experimentos al estudio de los procesos de muerte celular programada, mediante el empleo de ambas técnicas (proteómica y transcriptómica).

III.1.1. TRANSCRIPTÓMICA DE LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS DURANTE LAS FASES DE MI Y MII EN CULTIVOS SÓLIDOS DE *S. COELICOLOR*

a) Fraccionamiento de las fases de MI y MII en cultivos sólidos de *S. coelicolor* M145

Uno de los principales problemas a la hora de hacer experimentos de biología de sistemas en una bacteria micelial como es *Streptomyces*, es el hecho de que las distintas fases de diferenciación, así como los procesos de MCP coexisten durante el ciclo de desarrollo. En un trabajo previo de proteómica, hemos solventado este problema desarrollando una técnica de fraccionamiento celular del MI viable, mediante la obtención de protoplastos a las 16 horas de cultivo (las células muertas del MI tienen sus membranas dañadas y forman protoplastos inestables); y del MII mediante lavados repetidos con tampones salinos para eliminar la proteína extracelular liberada durante la lisis del MI (Manteca *et al.*, 2010) (Fig.III.1.). Siguiendo esta metodología, se prepararon cuatro muestras diferentes: una muestra de MI viable (protoplastos obtenidos a las 16 horas, MI_{16h}); y tres muestras de MII obtenidas a las 24 horas (sin cubiertas hidrofóbicas, micelio sustrato del ciclo de desarrollo tradicional), a las 48 horas (con cubiertas hidrofóbicas, micelio aéreo del ciclo tradicional), y a las 72 horas (micelio esporulante) (Fig.III.1)

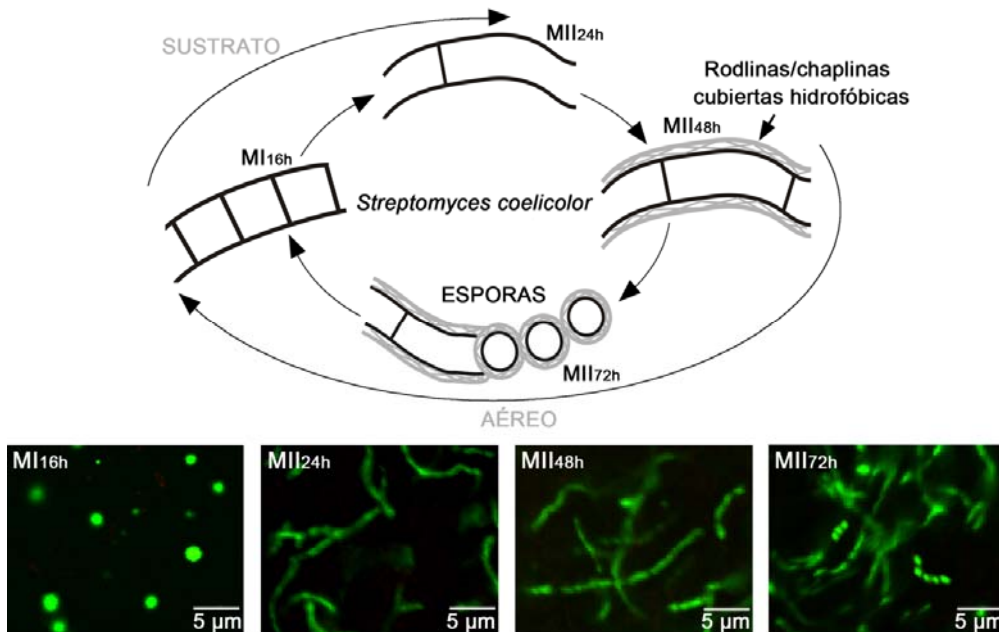


Fig.III.1. Arriba, representación gráfica de las fases del desarrollo en las que hemos estudiado la expresión diferencial de genes. Abajo, fotografías de microscopía láser confocal (colorantes de viabilidad IP y SYTO9) de las muestras recogidas para el estudio después de su fraccionamiento. Nótese la ausencia de micelio muerto (tinción roja con IP) en todas ellas.

b) Identificación y cuantificación de los genes de *S. coelicolor* M145 diferencialmente expresados durante el desarrollo

Tal como se ha indicado en el apartado anterior, en este experimento se analizaron 4 muestras (MI_{16h}, MII_{24h}, MII_{48h} y MII_{72h}), de las cuales se tomaron tres réplicas biológicas (12 muestras en total). Se usaron tres micromatrices independientes para cada réplica biológica, normalizando los valores de abundancia frente a ADN genómico (Fig.III.2). Los datos se normalizaron utilizando una normalización tipo "clm", y se seleccionaron los valores de abundancia de los genes con un valor p menor o igual de 0,05. Posteriormente se filtraron los valores seleccionados en función de su reproducibilidad entre réplicas biológicas. Se seleccionaron los valores de abundancia de aquellos genes con un coeficiente de variación menor o igual de 0,25 entre las tres réplicas biológicas analizadas, seleccionándose un total de 1901 genes (24% de todas las ORFs de *S. coelicolor*). La reproducibilidad de los valores de abundancia de estos genes se ilustra en la figura III.3.

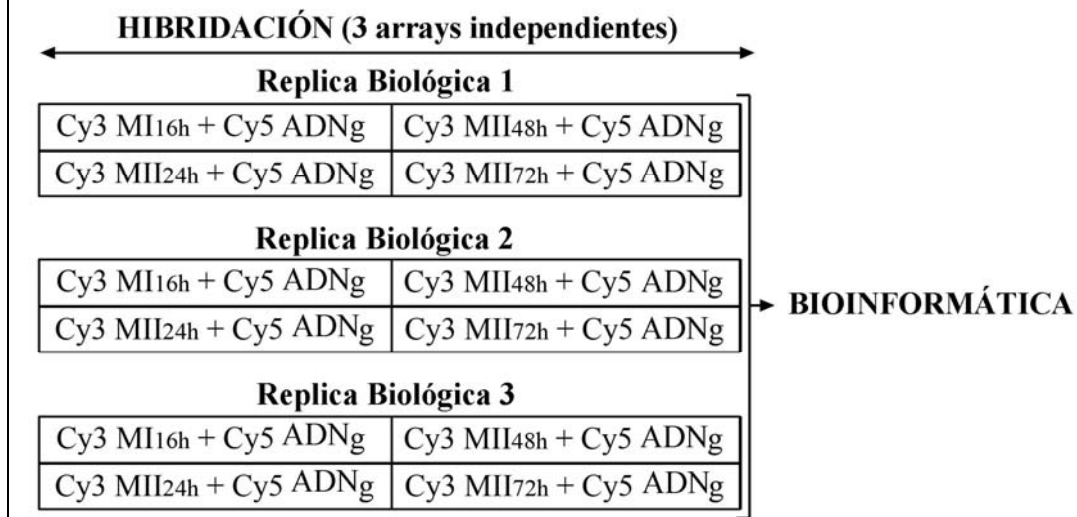
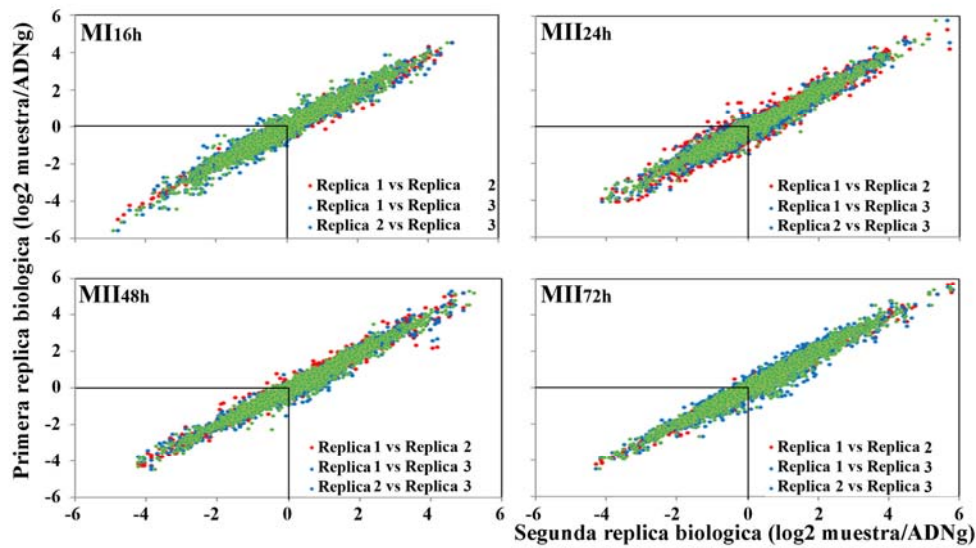


Fig.III.2. Representación esquemática del diseño experimental de los análisis de transcriptómica de las fas MI-MII.

Una vez que filtramos por los valores reproducibles entre réplicas biológicas (Fig.III.3a), hemos ordenado los valores de abundancia de cada gen (\log_2 MII/MI) en orden creciente (Fig.III.3b). Como era de esperar, los valores de abundancia de la mayoría de los 1901 genes cuantificados no presentan grandes variaciones entre los MI y MII (valores logarítmicos de abundancia cercanos a 0), mientras que unos pocos genes están claramente regulados al alza en el MII (valores positivos) o en el MI (valores negativos) (Fig.III.3b). En consecuencia, los valores obtenidos son reproducibles entre réplicas biológicas (Fig.III.3a), y además tienen significado biológico (Fig.III.3b).

a



b

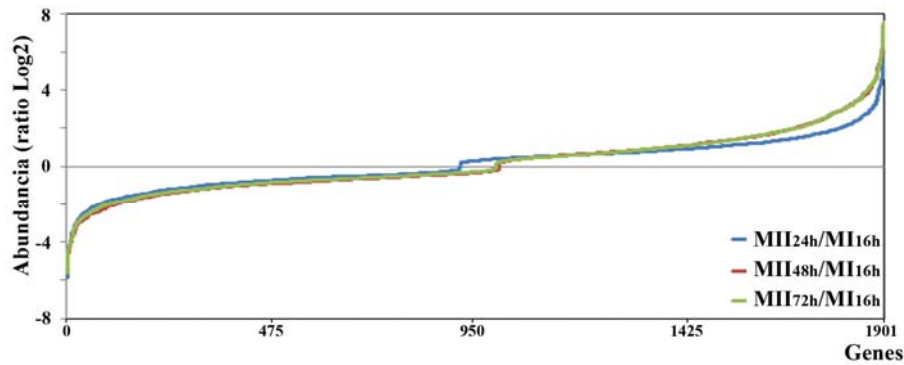


Fig.III.3. a) Valores de abundancia relativa de las 3 réplicas biológicas de cada muestra frente el ADN genómico. b) Valores de abundancia relativa medios de las tres réplicas biológicas (Log2 MII/MI) para cada uno de los 1901 genes cuya abundancia se cuantificó en este trabajo. Los genes con valores cercanos a cero (la mayoría) varían poco entre MI-MII. Los genes con valores positivos están regulados al alza en MII. Los genes con valores negativos están regulados al alza en MI.

A continuación, se agruparon los valores de abundancia de estos 1901 genes, identificados y cuantificados de forma fiable en categorías funcionales (Figs.III.4 y III.5). En todos los casos se tomó como referencia el MI_{16h}, y se mostraron los cocientes de los MII_{24h}/MI_{16h}, MII_{48h}/MI_{16h} y MII_{72h}/MI_{16h} en valor logarítmico. En consecuencia, valores negativos indican genes regulados al alza en el MI, y valores positivos indican genes regulados al alza en el MII (Figs.III.4 y III.5). Al igual que sucedía con el proteoma

(Manteca *et al.*, 2010a, b), con muy pocas excepciones, los mismos genes están regulados al alza o la baja en todas las fases de MII analizadas (MII_{24h}, sustrato; MII_{48h}, aéreo; MII_{72h}, esporas). Además, la inmensa mayoría de los genes codificando proteínas implicadas en el metabolismo primario están reguladas al alza en el MI, mientras que los de metabolismo secundario lo están en el MII (Fig.III.4). También se ha visto que la mayoría de los genes que codifican transposones y secuencias de inserción están regulados al alza en el MII, mientras que los genes relacionados con la conjugación, recombinación y mutagénesis lo están en el MI (Fig.III.5). El posible significado de todos estos datos se discutirá en la Discusión.

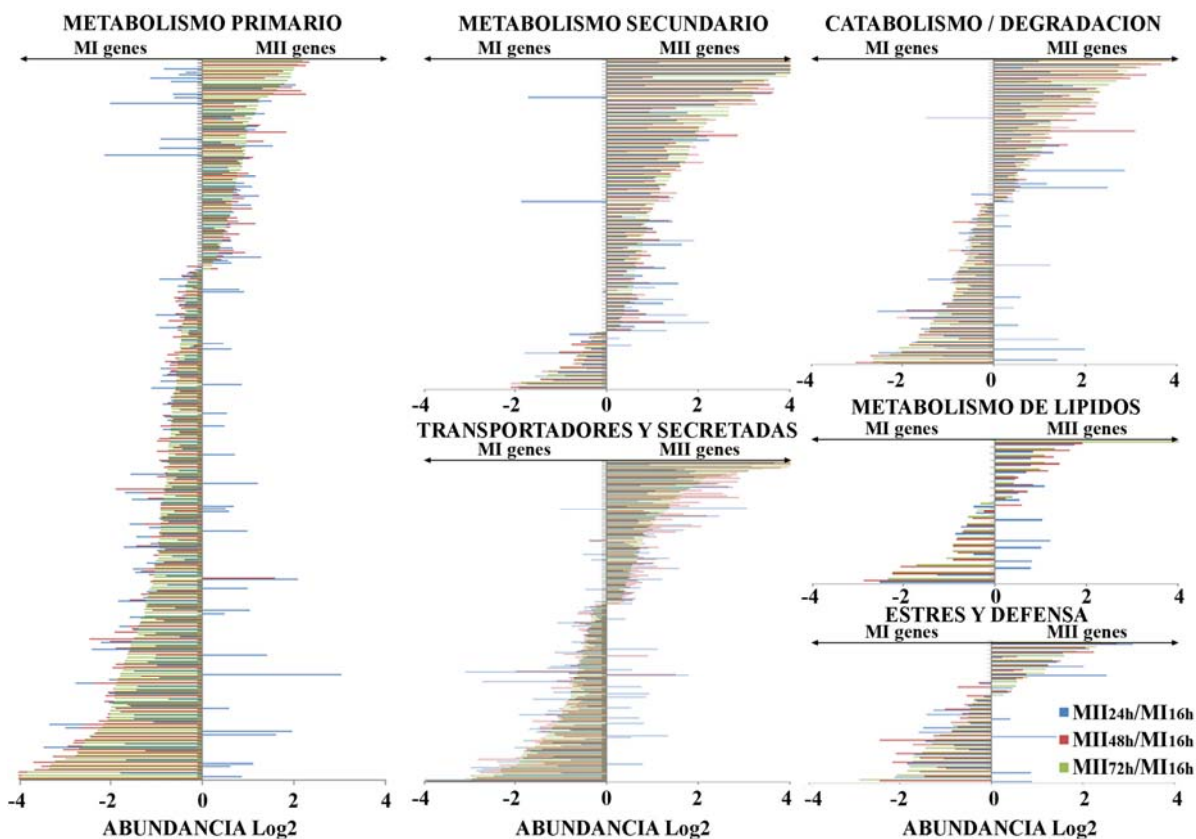


Fig.III.4. Agrupación de los genes diferencialmente expresados en las fases MI-MII en categorías funcionales. La categoría de metabolismo primario incluye: Genes codificando proteínas de replicación de ADN/ARN, cadena respiratoria y ciclo de Krebs, glucólisis y gluconeogénesis, ruta de las pentosas fosfato, metabolismo de aminoácidos y del nitrógeno, metabolismo de nucleótidos, otros enzimas anabólicos, traducción y plegamiento de proteínas, nucleasas y metilasas; la de metabolismo secundario incluye tanto genes codificando proteínas de síntesis de metabolitos secundarios, como de diferenciación, septación de las hifas y esporulación.

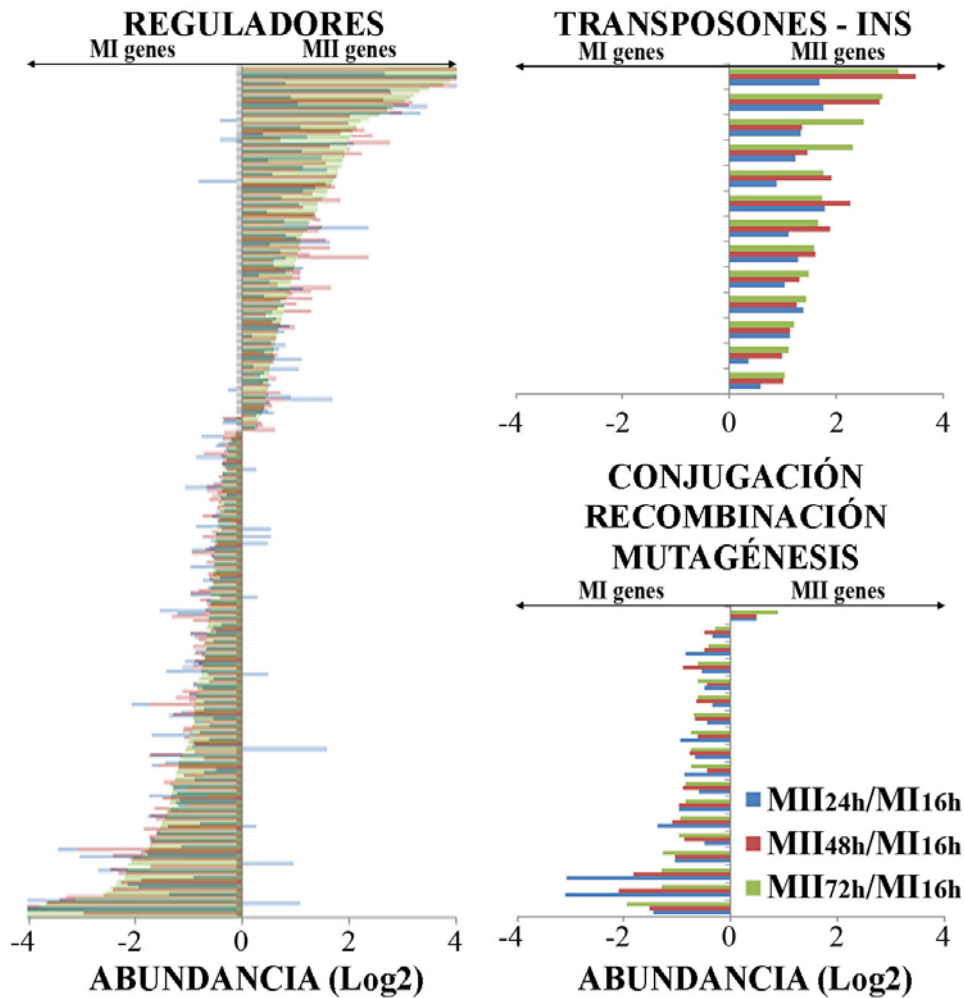


Fig.III.5. Continuación de la figura III.20. La categoría funcional de proteínas reguladoras incluye reguladores transcripcionales, kinasas/fosfatasa y otras proteínas reguladoras.

Tal como se discutirá en detalle más adelante, estos resultados corroboran los datos que nuestro grupo de investigación ha obtenido durante los últimos 10 años: el MI compartimentalizado es el micelio vegetativo de *Streptomyces* y tiene mayor expresión de los genes del metabolismo primario; mientras que el MII multinucleado es el micelio diferenciado productor de metabolitos secundarios, destinado a la esporulación y con mayor expresión de los genes implicados en la síntesis de antibióticos (ActVA, SCO5077; actII-4, SCO5085; redF, SCO5898 etc.), formación de cubiertas hidrofóbicas (rdIA, SCO2718; chpE, SCO1800; ramS, SCO6682, etc) y esporulación (divIVA, SCO2077; Sfr, SCO2607; “partitioning or sporulating protein”,

SCO1772; etc.) desde tiempos tan tempranos como las 24 horas (micelio sustrato) (Tabla suplementaria 1).

Cuando se compara la abundancia de los genes identificados en esta tesis mediante transcriptómica, con las abundancias de las proteínas identificadas previamente en nuestro grupo de investigación mediante proteómica (Manteca *et al.*, 2010a, b), podemos ver que de las 53 ORFs identificadas en ambos casos, 30 tienen unos valores de abundancia similares (proteínas/genes de MII o MI en ambos casos); mientras que 23 tienen valores de abundancia diferentes en función de si analizamos genes o proteínas, o las distintas fases de MII (Fig.III.6). Además, de estas últimas 23 ORFs sólo 10 tenían discrepancias en sus valores de abundancia significativos (mayores de 2; $\log_2 1$), lo que nos deja con una correlación muy buena entre los datos de proteómica y transcriptómica.

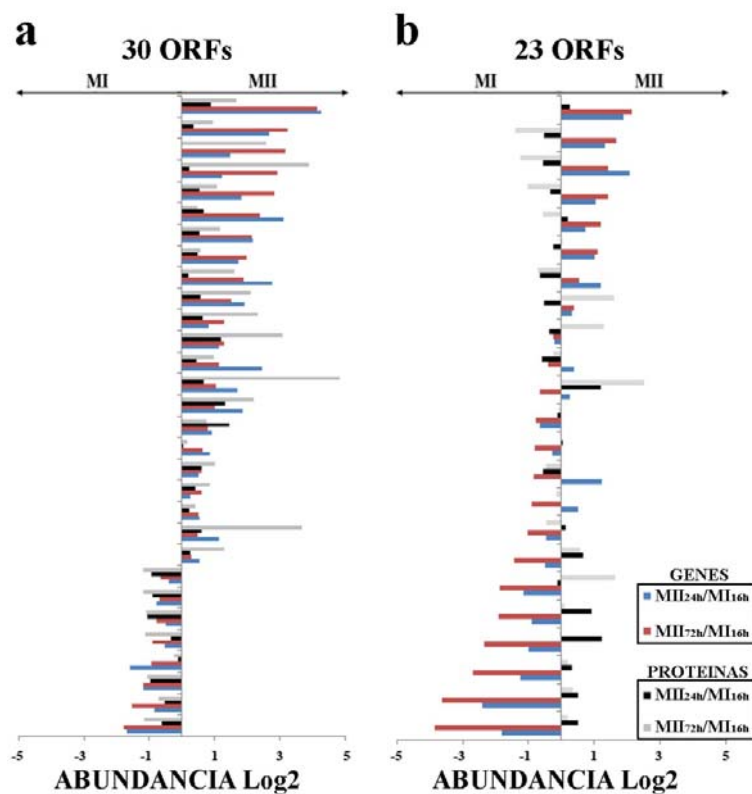


Fig.III.6. Valores de abundancia de los 53 ORFs que encontrados por proteómica y transcriptómica. 30 valores coinciden en ambos análisis mientras que 23 son diferentes.

III.1.2. PROTEÓMICA Y TRANSCRIPTÓMICA DE LAS PROTEÍNAS Y GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS DURANTE LOS PROCESOS DE MCP

a) Fraccionamiento de células vivas y muertas durante los procesos de MCP en *Streptomyces coelicolor* M145

Tal y como se ha comentado varias veces a lo largo de esta tesis doctoral, *Streptomyces* es una bacteria micelial con un ciclo de desarrollo en el que se producen fenómenos de MCP. Los segmentos vivos y muertos coexisten en la misma hifa durante la MCP del MI que precede a la diferenciación del MII (Fig.III.7), y su separación es uno de los principales retos metodológicos a la hora de hacer un estudio de biología de sistemas de este proceso.

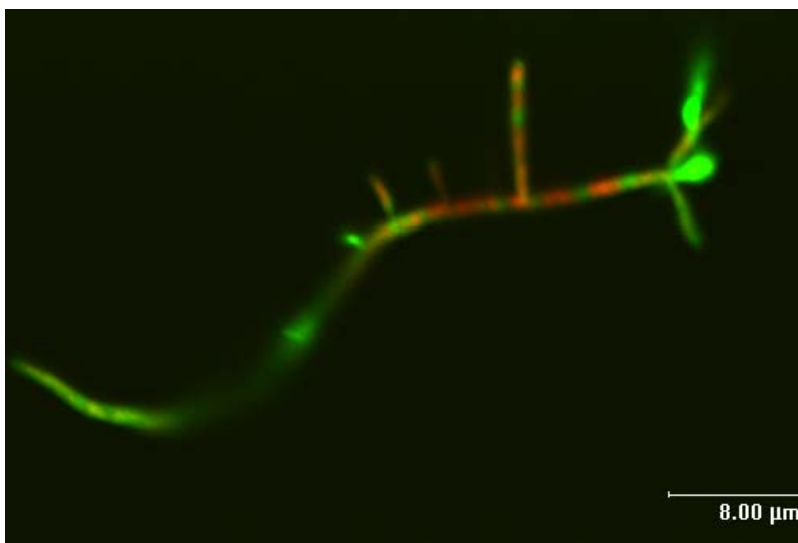
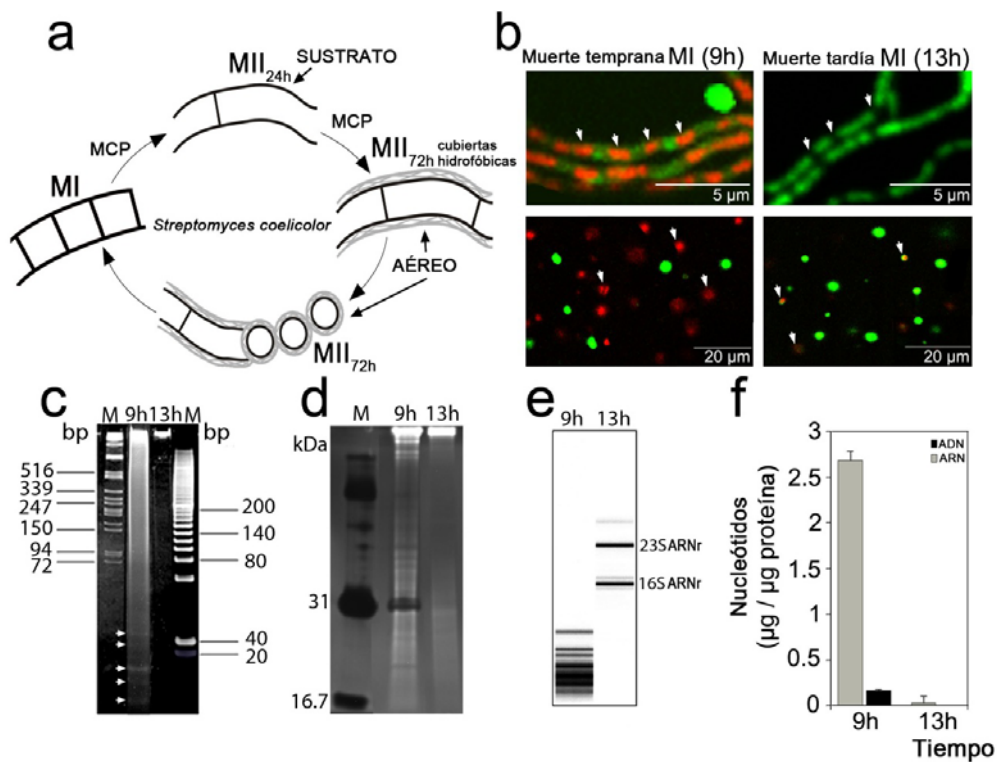


Fig.III.7. Microscopía láser confocal de una hifa joven de MI (*S. coelicolor*) durante la fase de MCP. Se aprecian los segmentos vivos (verde) y muertos (rojo) en la misma hifa de MI. Nótese la espora de la que se originó la hifa en el extremo derecho de la imagen.

Para ello, en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación se desarrolló una metodología consistente en la obtención de protoplastos durante la fase de MCP del primer micelio compartimentalizado (MI) (Manteca *et al.*, 2006a). En tiempos tempranos (9 horas) se pueden obtener muestras de protoplastos enriquecidos en células que se están muriendo (tinción roja con IP); en tiempos más tardíos (13 horas) se obtienen muestras de protoplastos enriquecidas en células viables (tinción verde con SYTO 9) (Fig.III.8b), lo que se debe a que las membranas de los segmentos muertos

del MI ya están demasiado dañadas para permitir la formación de protoplastos estables. A pesar de que el fraccionamiento de células vivas y muertas no fue eficiente al 100%, un análisis del estado de integridad del ADN cromosómico (Fig.III.8c), de las actividades nucleolíticas inducidas durante la MCP (Nicieza *et al.* 1999) (Fig.III.8d), el estado del ARN (Fig.III.8e) y las cantidades de nucleótidos libres (Fig.III.8f) demostraron que las muestras estaban lo suficientemente enriquecidas en protoplastos vivos y muertos para detectar la degradación del ADN y ARN, así como las bandas de actividad característica de la nucleasa de 29 kDa selectiva de secuencias ricas en GC (Cal *et al.* 1995; Manteca *et al.* 2006b), y grandes cantidades de nucleótidos libres (sobre todo ribonucleótidos) en la muestra de células muertas (9 horas), pero no en la de células vivas (13 horas).



Con esta metodología sencilla, además de separar células vivas de muertas, se está seleccionando por las células que están en los estados más tempranos de la MCP, aquellos en que la membrana está dañada (tinción con IP), pero que tienen estabilidad suficiente para formar protoplastos. Estos protoplastos “muertos” suponen un estado muy transitorio, y se pueden obtener en tiempos tempranos de la MCP (9 horas), pero no en tiempos más tardíos (13 horas). De hecho, los protoplastos muertos son muy inestables, y deben ser procesados rápidamente ya que de lo contrario se lisan y desaparecen.

b) Identificación y cuantificación de las proteínas de *Streptomyces coelicolor* M145 diferencialmente expresadas durante la MCP

Tal como se detalla en material y métodos, se usaron dos réplicas biológicas de células vivas y muertas que a su vez se fraccionaron en citosol y membranas. Las proteínas se procesaron para su análisis proteómico mediante la técnica de marcaje isobárico (iTRAQ) seguido de un análisis de LC-MS/MS (Fig.III.9).

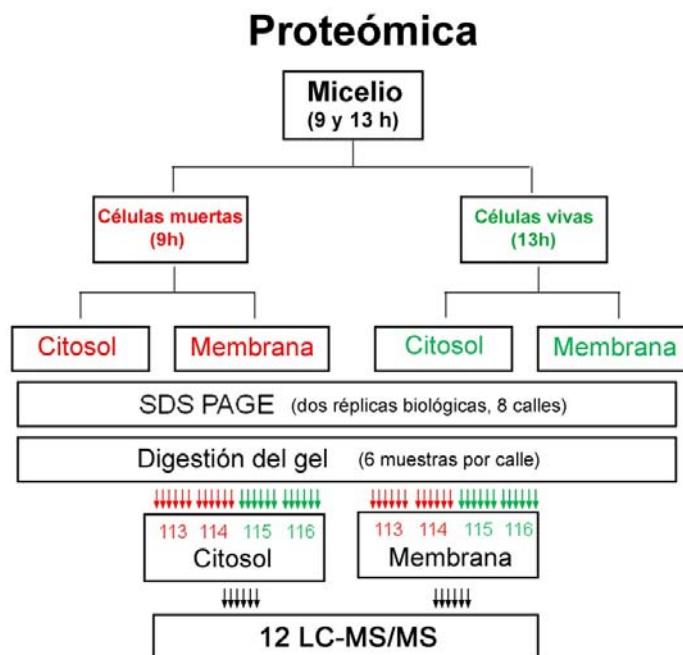
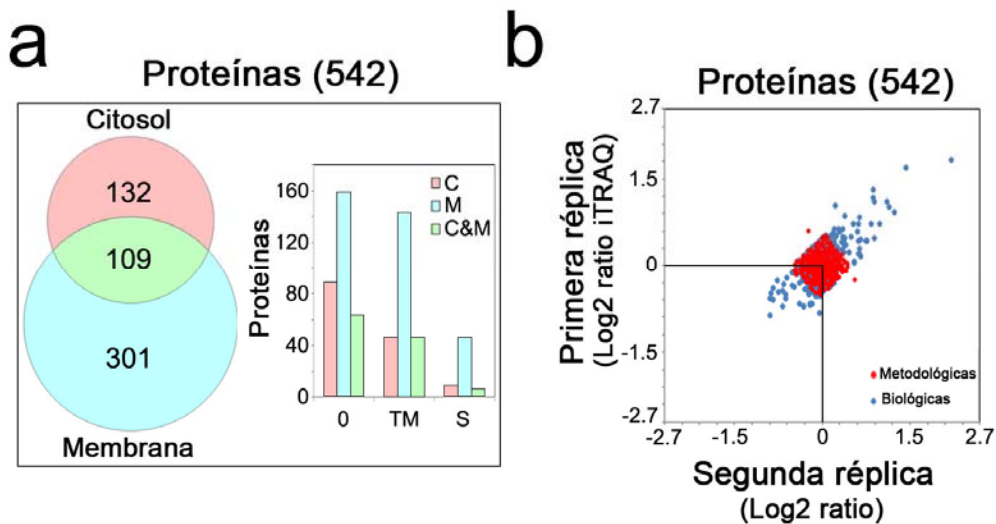


Fig.III.9. Diseño experimental del análisis proteómico de las fases de muerte celular programada.

Usando los criterios de identificación detallados en material y métodos, se identificaron de forma fiable un total de 542 proteínas (7% del proteoma de *S. coelicolor*) (Fig.III.10a). La mayoría de las proteínas identificadas (301), se localizaban

en la fracción de membrana; 132 se localizaban en la fracción citosólica; y 109 se detectaron en ambas fracciones (Fig.III.10a). Los valores de abundancia relativa (ratio vivo/muerto) fueron reproducibles entre las réplicas biológicas (Fig.III.10b). Además, y como es esperable, los valores de abundancia fueron menos variables entre réplicas metodológicas de la misma muestra (\log_2 ratios muerto/muerto y \log_2 ratios vivo/vivo cercanos a 0; puntos rojos en Fig.III.10b) que entre las células vivas y muertas (puntos



azules en la Fig.III.10b).

Fig.III.10. a) Izquierda, diagrama de Venn ilustrando las proteínas identificadas en las fracciones citosólica y de membrana; derecha, número de proteínas sin péptido señal ni dominios transmembrana (0), con al menos un dominio transmembrana (TM), o con un péptido señal (S) en las distintas fracciones (citosol, membrana, citosol y membrana) b) Gráfica de reproducibilidad entre réplicas metodológicas (puntos rojos) y biológicas (puntos azules).

A continuación, y usando los datos de abundancia relativa de estas 542 proteínas, se compararon las diferencias entre los proteomas de las células vivas y muertas (Fig.III.11). Ambos proteomas eran muy similares (\log_2 iTRAQ ratios cercanos a 0). Las únicas proteínas con variaciones significativas (\log_2 iTRAQ ratios mayores que 1 o menores que -1; tal como se describe en material y métodos) fueron proteínas de metabolismo primario: proteína ribosomal 50S L9 (SCO3909, \log_2 Muerto/Vivo 1,49), factor de elongación Ts (SCO5625, \log_2 Muerto/Vivo 1,49), proteína ribosomal 50S L7/L12 (SCO4653, \log_2 Muerto/Vivo 1,59), factor Rho terminador de la transcripción (SCO5357, \log_2 Muerto/Vivo 1,15), ADN ligasa (SCO7522, \log_2 Muerto/Vivo 1,06); una

proteína de estrés como scoF2, proteína de estrés por frío (SCO4505, log2 Muerto/Vivo 2,05); y una proteína reguladora, nagE2 (SCO2907, log2 Muerto/Vivo 1,01), que es una permeasa clave en la captación de N-acetilglucosamina, un importante regulador de la diferenciación de *Streptomyces* (Nothhaft *et al.*, 2010) (Fig.III.11 y Tabla Suplementaria 1).

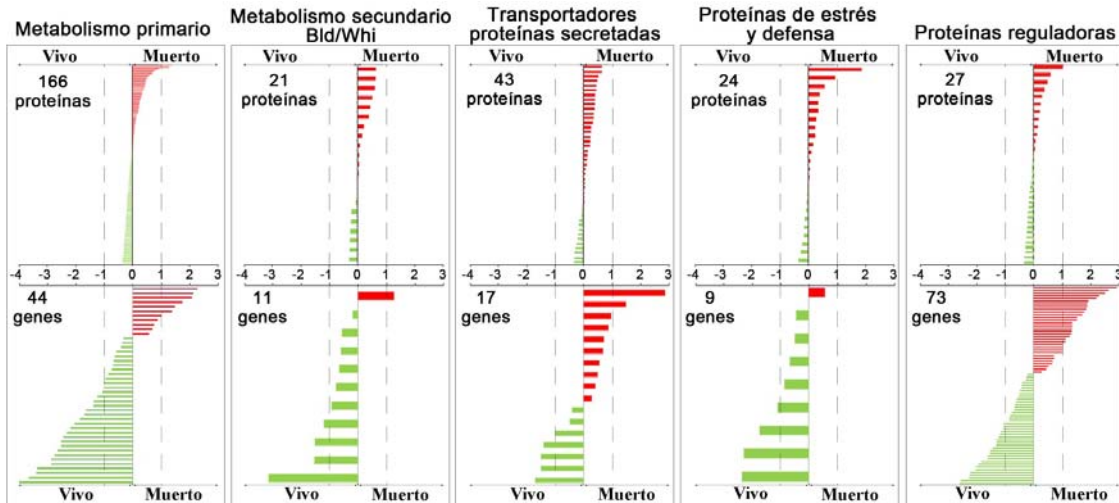


Fig.III.11. Diferencias entre los proteomas (paneles superiores) y transcriptomas (paneles inferiores) de las células vivas y muertas agrupados en categorías funcionales. Las categorías funcionales son las mismas descritas en las figuras III.4 y III.5.

Eliminado: ¶

c) Identificación y cuantificación de los genes de *S. coelicolor* M145 diferencialmente expresados durante la MCP

Tal y como se comenta en Material y Métodos (apartado II.1.1), en el caso de los experimentos de transcriptómica se analizaron 4 réplicas biológicas y sus ARNs se procesaron como se ilustra en la figura.III.12. Para la cuantificación de la abundancia de expresión génica, sólo se usaron las sondas del “array” con secuencias únicas y con valores de abundancia con buena reproducibilidad entre réplicas biológicas (coeficiente de variación menor de 0,25, 28.255 sondas en total). Las sondas tienen una media de 60 nucleótidos, y en consecuencia, la mayoría de los genes están representados por más de una sonda, y este fue el siguiente filtro empleado en este trabajo: de las 28.255 sondas con buena reproducibilidad entre réplicas biológicas,

sólo mantuvimos aquellas con buena reproducibilidad dentro del mismo gen (utilizando un coeficiente de variación menor de 0,25) (Fig.III.13).

Eliminado: ¶

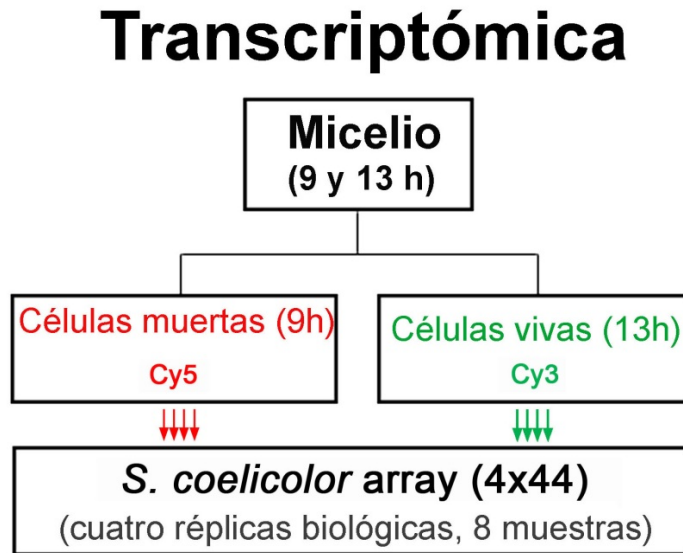
¶
¶
¶
¶Con formato: Sangría:
Primera línea: 0 pto

Fig.III.12. Diseño experimental del análisis transcriptómico de las fases de muerte celular programada.

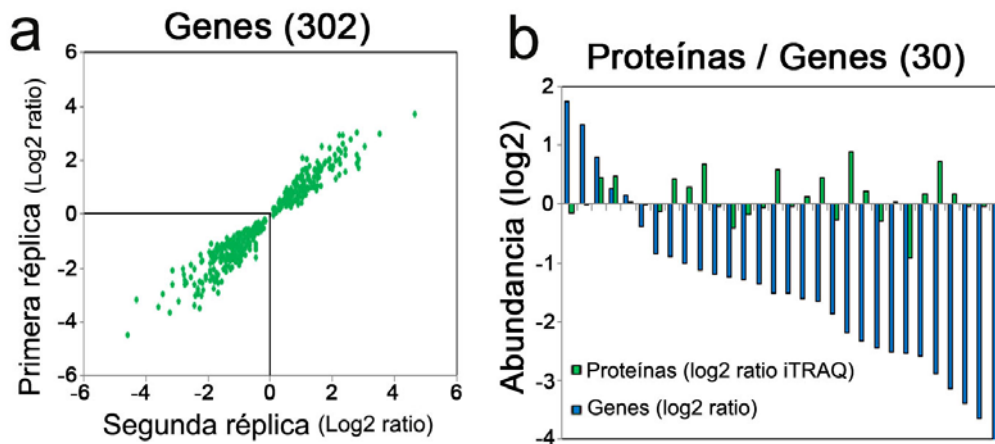


Fig.III.13. a) Reproducibilidad de los valores de abundancia entre réplicas biológicas. b) Comparación de los valores de abundancia de las 30 ORFs cuya abundancia se cuantificó en los experimentos de proteómica (barras verdes) y transcriptómica (barras azules).

Sólo 302 genes pasaron los filtros descritos arriba, una pequeña fracción del genoma de *S. coelicolor* (7825 pautas abiertas de lectura), lo que no es sorprendente si tenemos en cuenta el alto grado de degradación del ARN en las células muertas descrito arriba (Fig.III.8e). A continuación, y de la misma forma que se hizo para los datos de proteómica, se analizaron los valores de abundancia relativa de estos 302 genes agrupados en categorías funcionales (Fig.III.13). Al contrario de lo que sucedía con los proteomas, los transcriptomas de las células vivas y muertas fueron muy diferentes, siendo el cambio de la mayoría de ellos superior a 2 (\log_2 muerto/vivo mayor o menor de ± 1). Esto mismo se observa al comparar los valores de abundancia de las 30 ORFs detectadas por proteómica y transcriptómica (Fig.III.13b).

d) Diferencias más importantes entre los proteomas/transcriptomas de las células vivas y muertas

A continuación nos centramos en el análisis de aquellas proteínas y genes expresados más diferencialmente entre las células vivas y muertas, y cuya función biológica era conocida, o se podía atribuir por homologías a funciones relacionadas

con la diferenciación celular y de generación de variabilidad genética (transformación, conjugación, recombinación, estrés, división celular y esporulación, detención del crecimiento, regulación transcripcional) (Fig.III.14). Estos genes y proteínas incluían BldH (AdpA, SCO2792), una proteína de tipo *AraC* considerada como el “regulador maestro” a través del cual el gen *bldA* ejerce sus efectos en la regulación de la diferenciación y la activación del metabolismo secundario (Chater KF. y Chandra G. 2008), así como la proteína *RecA* (SCO5769) implicada en los procesos de recombinación génica. También hay proteínas y genes de función desconocida pero que portan dominios proteicos con homologías con dominios de función conocida: SCO4885 una proteína de función desconocida que porta un dominio tipo *Med* (proteína de competencia de *Bacillus*; Ogura *et al.*, 2002); SCO1395 porta un dominio tipo *MutT* con función de protección mutagénica (Setoyama *et al.*, 2011); SCO0172 y SCO0937 portan un dominio tipo *Usp* que se ha implicado en la detención del crecimiento celular (Liu *et al.*, 2007) (Fig.III.14).

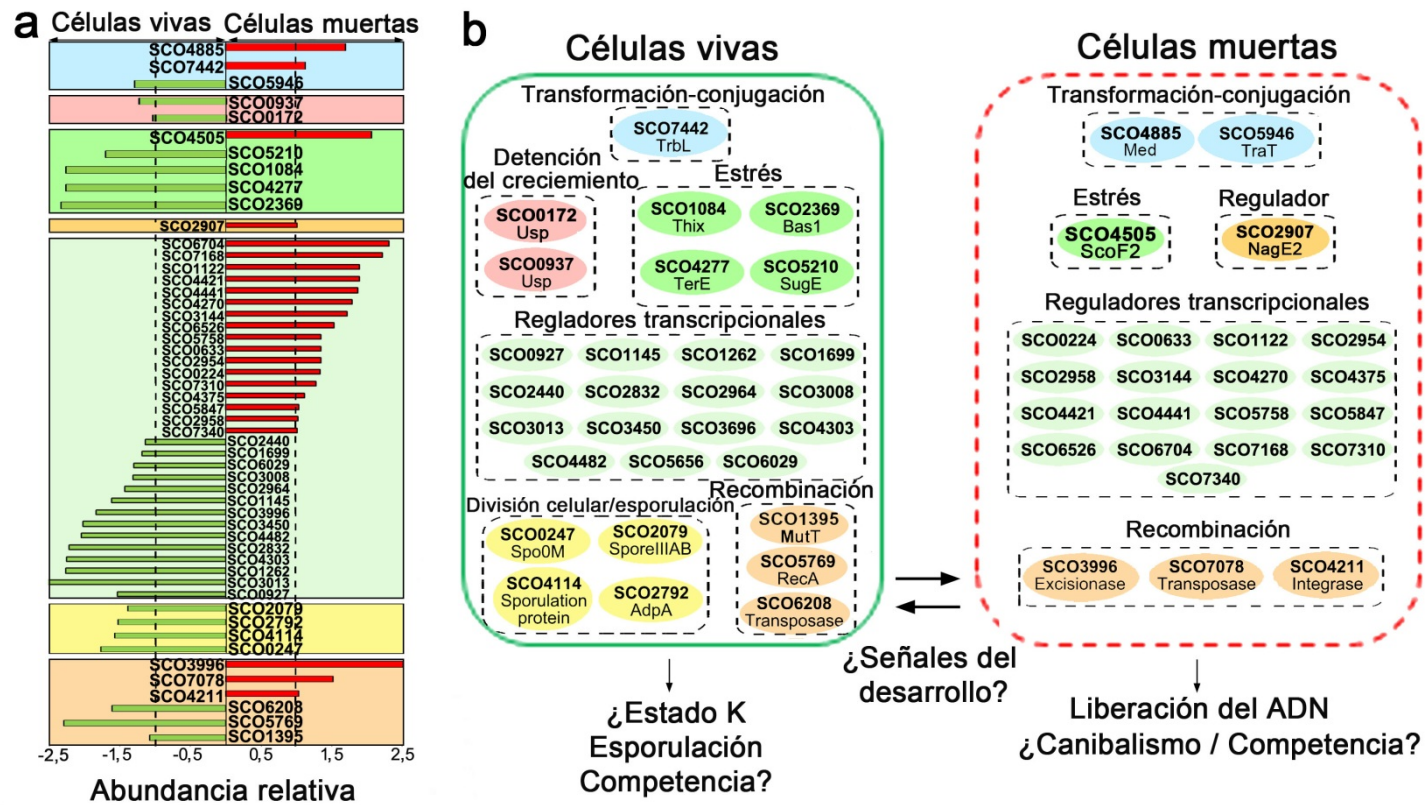


Fig.III.14. a) Esquema de abundancia relativa de los genes expresados al alza en las células vivas (izquierda) y muertas (derecha). b) Representación esquemática de las posibles funciones en las que estarían implicados los genes diferencialmente expresados en cada etapa.

III.2. ANÁLISIS FUNCIONAL: MUTAGÉNESIS

La información obtenida por nuestro grupo de investigación con los experimentos de biología de sistemas descritos en los apartados anteriores, será la base para el diseño de futuros experimentos destinados a caracterizar las rutas moleculares regulando las etapas de diferenciación de las fases preesporulantes (MCP, transición MI/MII) no contempladas en el ciclo de desarrollo tradicional (véase Fig.I.3. en la introducción). Para ello, haremos mutagénesis sistemática de las proteínas y genes diferencialmente expresados durante el desarrollo, seguidos de análisis fenotípicos y análisis de interacción proteína-proteína. Todos estos experimentos se encuentran reflejados en el proyecto de investigación en el que está implicado nuestro grupo de investigación (ERC Starting Grant, Strp-differentiation 280304; 2012-2016). Durante la parte final de esta tesis doctoral hemos empezado a desarrollar este trabajo, escogiendo los genes y proteínas indicados en la Tabla 1 para su mutagénesis y caracterización fenotípica. Tal y como se ha descrito en el apartado Material y Métodos, para la mutagénesis, hemos utilizado la colección de cósmidos creada en el grupo del Prof. Dyson (Universidad de Swansie) (Fernandez-Martínez *et al.*, 2011), en la que se han interrumpido un 83 % de los genes de *S. coelicolor* M145 mediante el trasposón Tn5062 (ver Material y Métodos apartado II.3).

En primer lugar, comenzamos analizando los genes diferencialmente expresados durante los procesos de MCP. Hemos comenzado haciendo la mutagénesis de 8 de los genes mostrados en la Fig.III.14: genes regulados al alza en las células que están comenzando a morir (SCO4885, SCO0633, SCO2954, SCO4505, SCO5946) y otros en las células que permanecían viables (SCO0172, SCO0937, SCO1395). De forma interesante, las 8 cepas mutantes analizadas tenían una esporulación tremendamente acelerada (39 horas en lugar de las 63 horas necesarias para la esporulación de la cepa salvaje; Fig.III.15). Además, los mutantes de 4 de estos genes tenían una producción acelerada de antibióticos (undecilprodigiosina y actinorodina). Estos fenotipos nos permitieron postular la existencia de puntos de bloqueo de la esporulación controlados al menos en parte por estos genes (véase discusión).

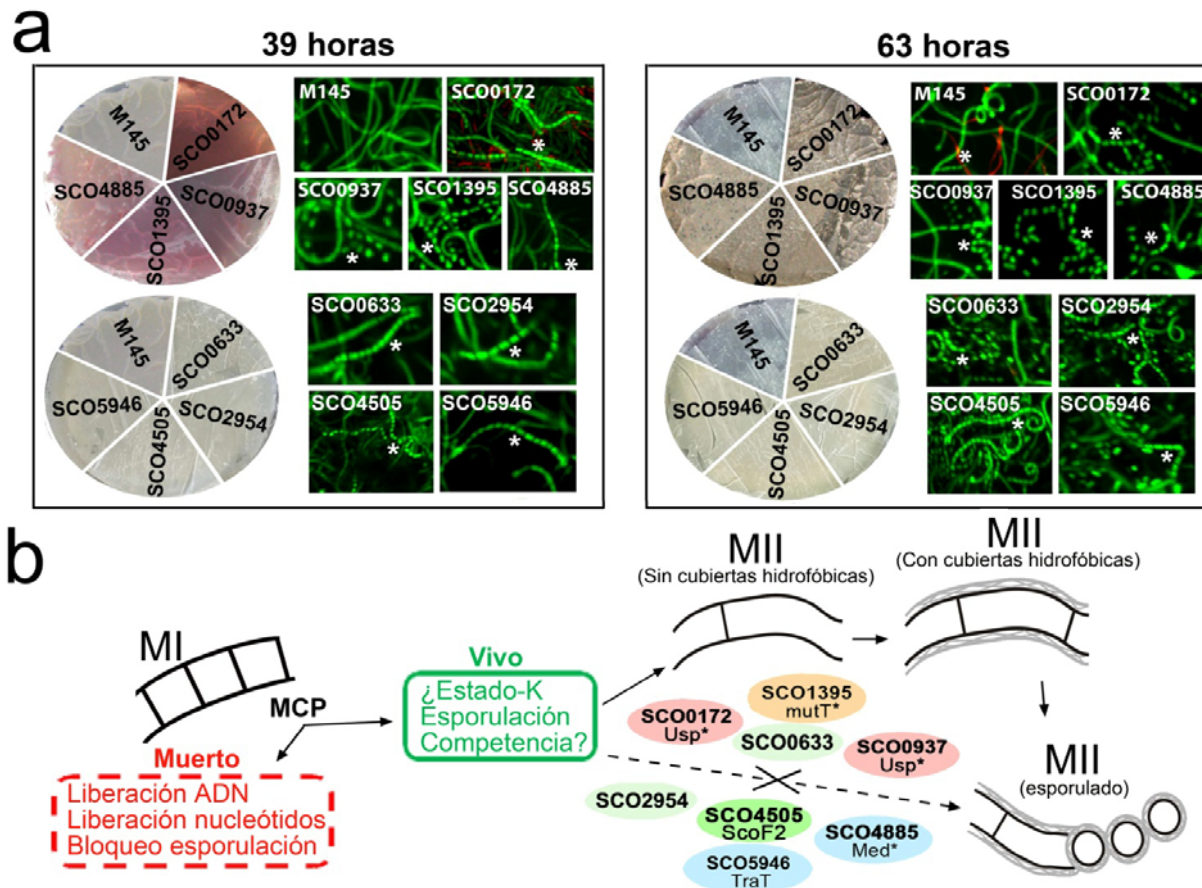


Fig.III.15. a) Fotografías de cultivos en medio sólido, placas (izquierda) y microscopía confocal (colorantes vitales) (derecha) de mutantes de *S. coelicolor*. b) Esquema del ciclo de vida de *Streptomyces* indicando la fase en la que podrían estar implicados los genes mutados.

III. RESULTADOS

También hemos comenzado a hacer mutagénesis de los genes y proteínas detectados diferencialmente expresados durante las fases de MI y MII (17 genes; Tabla 1). La mayoría de los mutantes analizados tenían fenotipos claros en cuanto a un adelanto del crecimiento, la producción de antibióticos o la esporulación, y en estos momentos estamos trabajando en la caracterización detallada de sus fenotipos (véase discusión).

III. RESULTADOS

Tabla 1. En la siguiente tabla se describen de forma general 26 mutantes (en genes que se expresan al alza en las diferentes fases del ciclo de desarrollo; MCP, MI y MII), especificándose su función, su porcentaje de conservación medio dentro de algunas de las cepas de *Streptomyces* cuyo genoma está secuenciado (*S. avermitilis*, *S. griseus*, *S. scabies*) y las diferencias en crecimiento, producción y esporulación respecto a la cepa salvaje. + Fenotipo acelerado; Fenotipo retrasado.

GEN	FUNCIÓN	Conservación (%)	Crecimiento	Producción	Esporulación
SCO1395	MutT	90,2	+	++	++
SCO0172	Usp	67,2	+	++	++
SCO0937	Usp	95	+	++	++
SCO4885	Med	84,6	+	++	+++
SCO4505	Choque térmico	97	-	--	--
SCO0633	Proteína hipotética	64	-	--	--
SCO2954	Factor sigma ARN pol	85	--	---	--
SCO5946	membrane protein	48,6	--	---	--
SCO0148	putative transcriptional regulatory protein	94,5	-	+++	-
SCO0517	hypothetical protein	69,6	=	+++	-
SCO1119	putative asnC-family transcriptional regulatory protein	95,6	=	---	---
SCO1358	putative LysR-family transcriptional regulator	87,6	+++	+++	+++
SCO1490	putative NusB-family protein	92	++	--	---
SCO1504	putative regulator	57,3	=	+	--
SCO2168	hypothetical protein	93,6	+	++	+++
SCO2567	putative integral membrane protein	75	=	+++	+++
SCO3033	putative integral membrane regulatory protein	80,6	+	+	+
SCO3042	putative transcriptional regulator	76	+	+	+
SCO3043	conserved hypothetical protein	76,6	+	+	-
SCO3067	putative anti anti sigma factor	89,6	++	-	-
SCO4117	putative membrane protein	60	+	+	-
SCO4920	putative deoR-family transcriptional regulator	89,3	++	-	-
SCO5249	putative nucleotide-binding protein	92,3	+	+++ +	+++ +
SCO6020	putative transcriptional regulator	79	=	++	-
SCO4505	cold shock protein	97	-	--	-
SCO0527	cold shock protein	95,3	=	++	+

III.3. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS EN CULTIVOS LÍQUIDOS DE *STREPTOMYCES*.

III.3.1. DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN DE *STREPTOMYCES COELICOLOR* M145 EN CULTIVOS LÍQUIDOS.

Tal y como se describe en la introducción (apartado I.2.2), nuestro grupo de investigación ha estado trabajando a lo largo de los últimos años en el estudio de los procesos de MCP y diferenciación de *Streptomyces*. Estos estudios condujeron a la elaboración de un nuevo modelo de desarrollo para esta bacteria en cultivos en medio sólido (esporulantes), así como al desarrollo de una serie de metodologías y protocolos para el análisis de los procesos de diferenciación de esta bacteria: microscopía confocal para el estudio de la viabilidad y la tabicación de las hifas (Manteca *et al.*, 2005a,b); marcadores de lisis celular como la medida de la actividad del enzima hexoquinasa en el medio extracelular (Manteca *et al.*, 2006b); marcadores de muerte celular programada como son las actividades nucleolíticas implicadas en la degradación del ADN cromosómico (Nicieza *et al.*, 1999, Manteca *et al.*, 2006a,b); etc...

En esta tesis doctoral, hemos aplicado estas metodologías al estudio de los procesos de desarrollo y diferenciación en cultivos líquidos, condiciones en las cuales no hay esporulación y se asumía que no había diferenciación.

a) Estudio mediante microscopía láser confocal de los procesos de muerte y diferenciación.

Tal como se describe en el apartado “Material y Métodos”, se analizó el ciclo de desarrollo en dos condiciones experimentales: cultivos con un inóculo inicial de esporas de 10^7 esporas/ml (Fig.III.16); y cultivos con un inóculo de 10^5 esporas/ml (Fig.III.17). En el caso del inóculo concentrado, se observó en tiempos tempranos (8 h) la existencia de un micelio viable compartimentalizado (MI, Fig.III.16a). Las hifas de este micelio comienzan a agruparse formando masas (“pellets”) que sufren procesos de muerte en su interior (Fig.III.16b). Las hifas viables de la periferia de estas masas continúan creciendo de forma que hay un aumento del diámetro de las mismas (Fig. III.16b, c). Entre las 24 y las 36 horas se produce una detención en el aumento del diámetro de estas masas (Fig.III.16c, d), y alrededor de las 48 horas, comienza a apreciarse en el centro de las mismas el desarrollo de hifas en forma de islotes que

III. RESULTADOS

surgen a partir de los segmentos de micelio que permanecían viables (Fig.III.16e). El desarrollo de estos islotes de hifas, así como de las hifas que permanecían viables en la periferia de los "pellets" contribuye a una nueva fase de crecimiento que se refleja de nuevo en el aumento del diámetro de las masas (Fig.III.16f, g). Además, a grandes aumentos (Fig.III.16h, i) se observa que estas hifas, a diferencia de las iniciales de MI (Fig.III.16a), prácticamente carecen de tabiques, siendo por tanto hifas multinucleadas (MII).

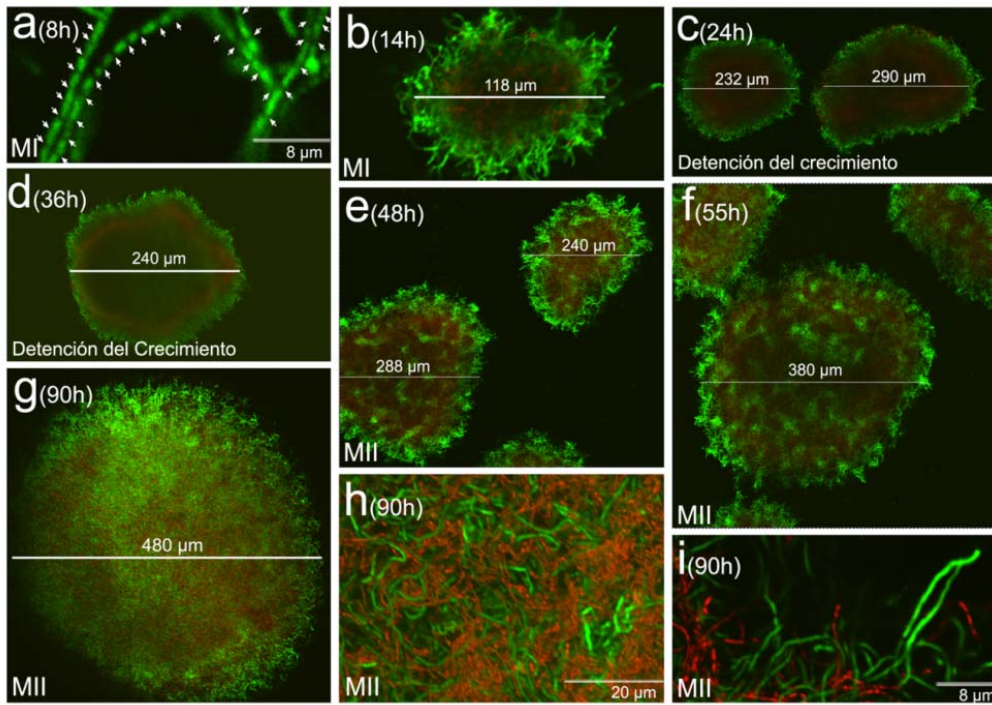


Fig.III.16. Desarrollo de *S. coelicolor* a partir de un inóculo de esporas concentrado (10^7 esporas/ml). Los cultivos fueron teñidos con los colorantes fluorescentes de viabilidad IP y SYTO 9. Las flechas indican los septos del micelio I. Se indican el diámetro de las masas de micelio y los tiempos de desarrollo. MI: Micelio I; MII: Micelio II.

III. RESULTADOS

En la figura III.17 se muestra un análisis del ciclo de desarrollo mediante el empleo de un inóculo de esporas más diluido (10^5 esporas/ml). A grandes rasgos, se observa el mismo ciclo de desarrollo con las siguientes peculiaridades: se retrasan los tiempos de detención del crecimiento y surgimiento del segundo micelio (compárese Fig.III.16d-e con Fig.III.17d-e); las masas se desarrollan con un diámetro muy superior al del inóculo concentrado (compárese Fig.III.16g con III.17h).

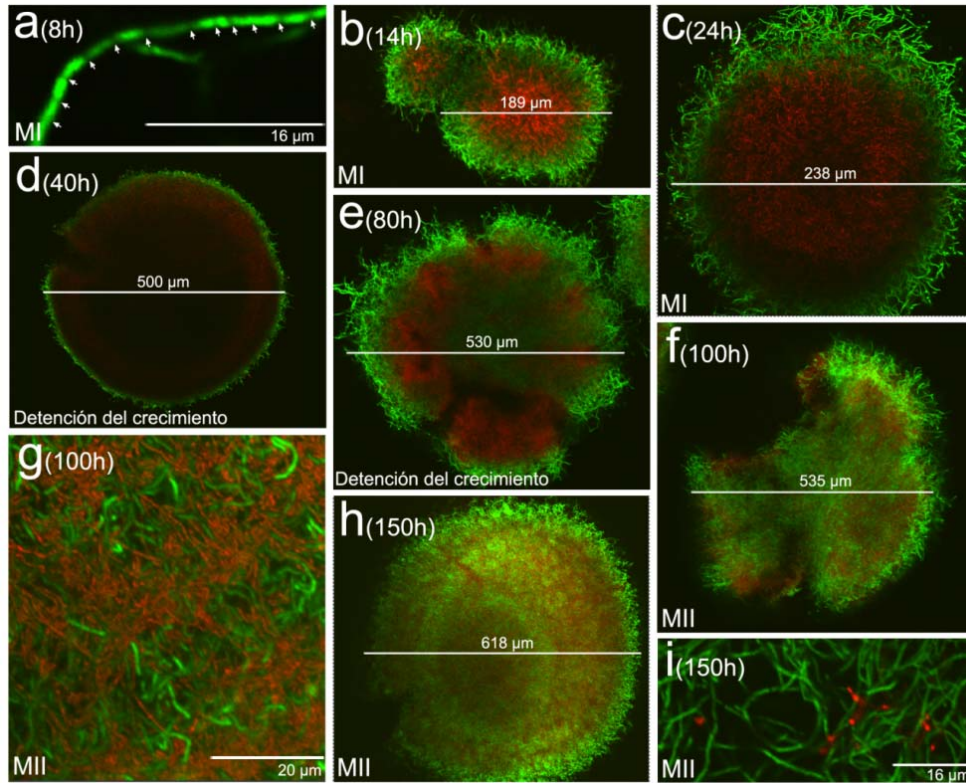


Fig.III.17. Desarrollo de *S. coelicolor* a partir de un inóculo de esporas diluido (10^5 esporas/ml). Los cultivos fueron teñidos con los colorantes fluorescentes de viabilidad IP y SYTO 9. Las flechas indican los septos del micelio I. Se indican el diámetro de las masas de micelio y los tiempos de desarrollo. MI: Micelio I; MII: Micelio II.

b) Estudio de la compartimentalización de las hifas en cultivos líquidos de *S. coelicolor*.

En cultivos en placa (medio sólido) de *Streptomyces*, se ha descrito la existencia de dos estructuras miceliales: una compartimentalizada (Micelio I) y la otra multinucleada (Micelio II) (Manteca *et al.* 2005a). Tal como se ha indicado en el apartado anterior, el mismo tipo de estructuras son visibles en cultivos líquidos con tinciones de viabilidad. No obstante, las tinciones de viabilidad tiñen ácidos nucleicos, y en consecuencia, hemos realizado un estudio detallado de la tabicación de estas hifas mediante el uso de colorantes específicos de pared (vancomicina) y membrana (FM4-64) celulares (Fig.III.18). Lo que observamos es que en tiempos tempranos hay un micelio compartimentalizado (MI) en el que se alternan células (Fig. III.18e-f) separadas por tabiques compuestos por membranas celulares (Fig.III.18j), pero con escasa pared celular (Fig.III.18k). Este micelio, predomina hasta la fase de MCP y detención del crecimiento. El micelio que surge posteriormente en el centro y periferia de los "pellets" tras la detención del crecimiento (ver apartado anterior) es multinucleado con tabiques esporádicos (Fig.III.18d, h, i) formados por membranas (Fig.III.18j, l), y paredes gruesas visibles tras la tinción con vancomicina (Fig.III.18k, m). En la Figura III.18g, h se muestra la fase de transición entre el micelio I compartimentalizado que forma la periferia de las masas (antes de la detención del crecimiento) y el micelio II multinucleado posterior: los segmentos de micelio I comienzan a crecer asincrónicamente como un micelio II multinucleado (Fig.III.3g), el cual será el micelio predominante en tiempos posteriores (Fig.III.18g-h). Resultados similares se obtienen al analizar el inóculo diluido (10^5 esporas/ml), con la salvedad de un retraso en los tiempos de aparición del segundo micelio (datos no mostrados).

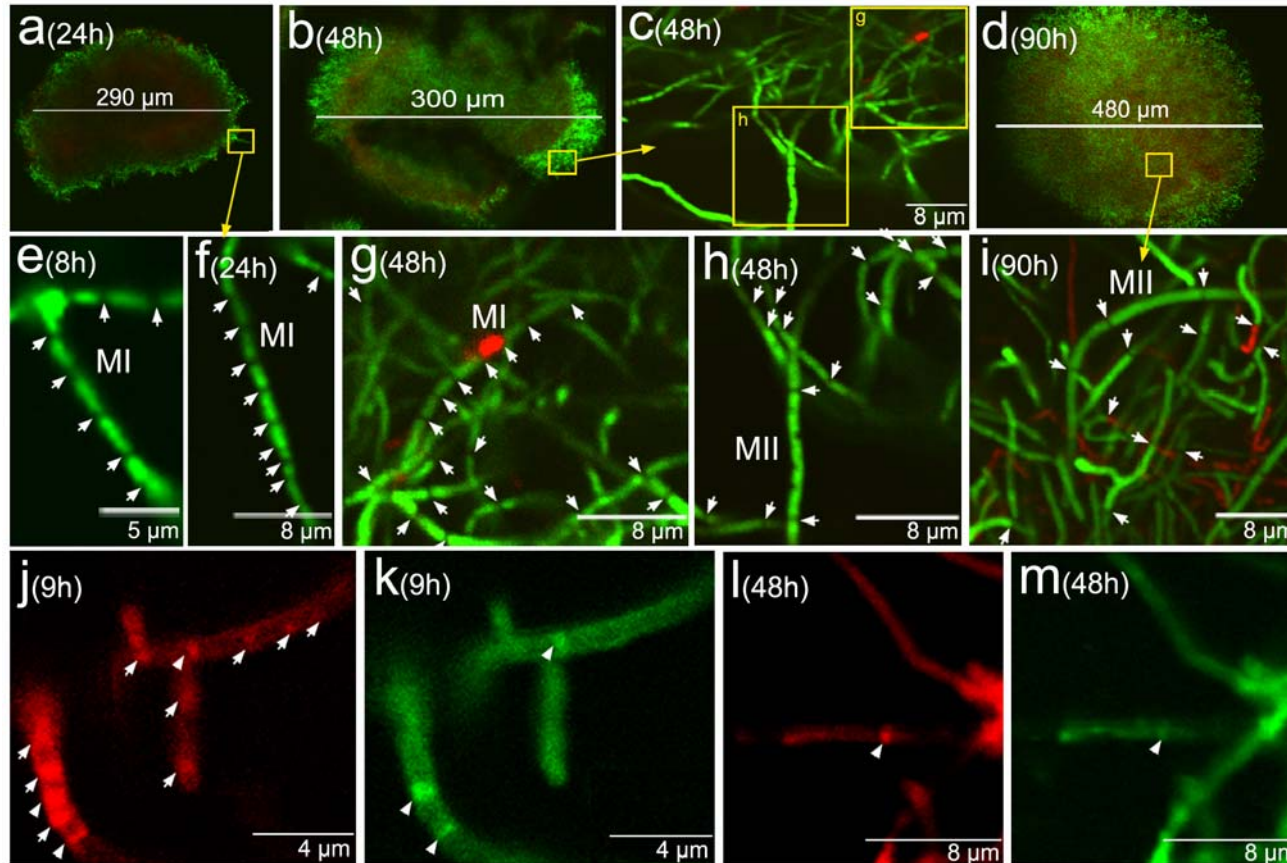


Fig.III.18. Presencia/ausencia de tabicación en las hifas a lo largo del desarrollo en *S. coelicolor* (inóculo de 10^7 esporas/ml). Las imágenes (a-i) se corresponden con tinciones de viabilidad SYTO 9/IP; las imágenes (j) y (l) se corresponden con tinciones de FM4-64 (membranas), las imágenes (k) y (m) se corresponden con tinción de vancomicina (pared celular). Las flechas indican los septos del micelio I. Las puntas de flecha indican septos que se tiñen simultáneamente con FM4-64 y vancomicina. Se indican el diámetro de las masas de micelio y los tiempos de desarrollo. MI: Micelio I; MII: Micelio II.

c) Los procesos de muerte/diferenciación en cultivos líquidos de *S. coelicolor* se reflejan en las curvas de crecimiento.

La Figura III.19 muestra las curvas de crecimiento (peso seco y proteína total) de cultivos en medio líquido de *S. coelicolor* a partir de un inóculo diluido (10^5 esporas/ml) y un inóculo concentrado (10^7 esporas/ml). Tal y como se ha comentado en los apartados anteriores, el crecimiento está claramente retrasado en el inóculo diluido respecto al concentrado. En ambos casos se evidencian dos fases de crecimiento exponencial que se corresponden con el desarrollo del micelio I compartimentalizado y el micelio II multinucleado respectivamente. Ambas fases de desarrollo están separadas por una detención transitoria del crecimiento (Fig.III.19).

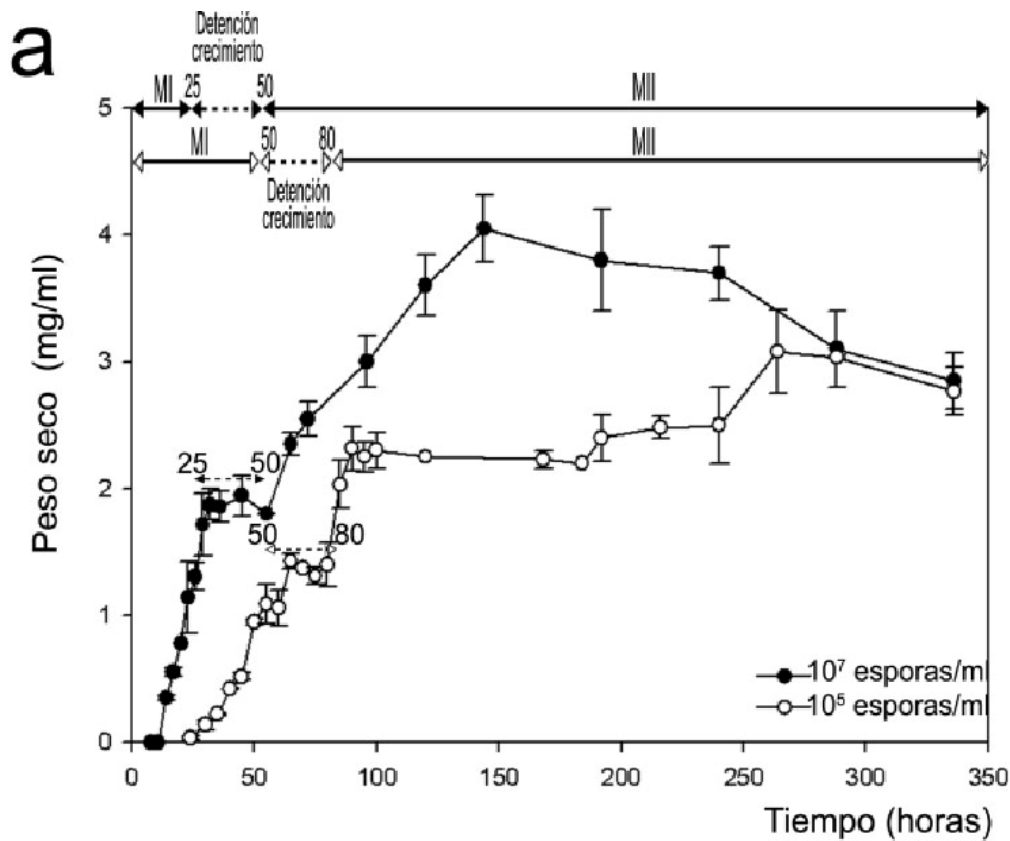


Fig.III.19. Curvas de crecimiento de *S. coelicolor* en cultivos líquidos. **a)** Peso seco (mg/ml) frente al tiempo (horas). En la parte superior de las figuras se indican las fases del desarrollo (micelio I, detención de crecimiento y micelio II). Las barras indican el error estándar de tres muestras independientes.

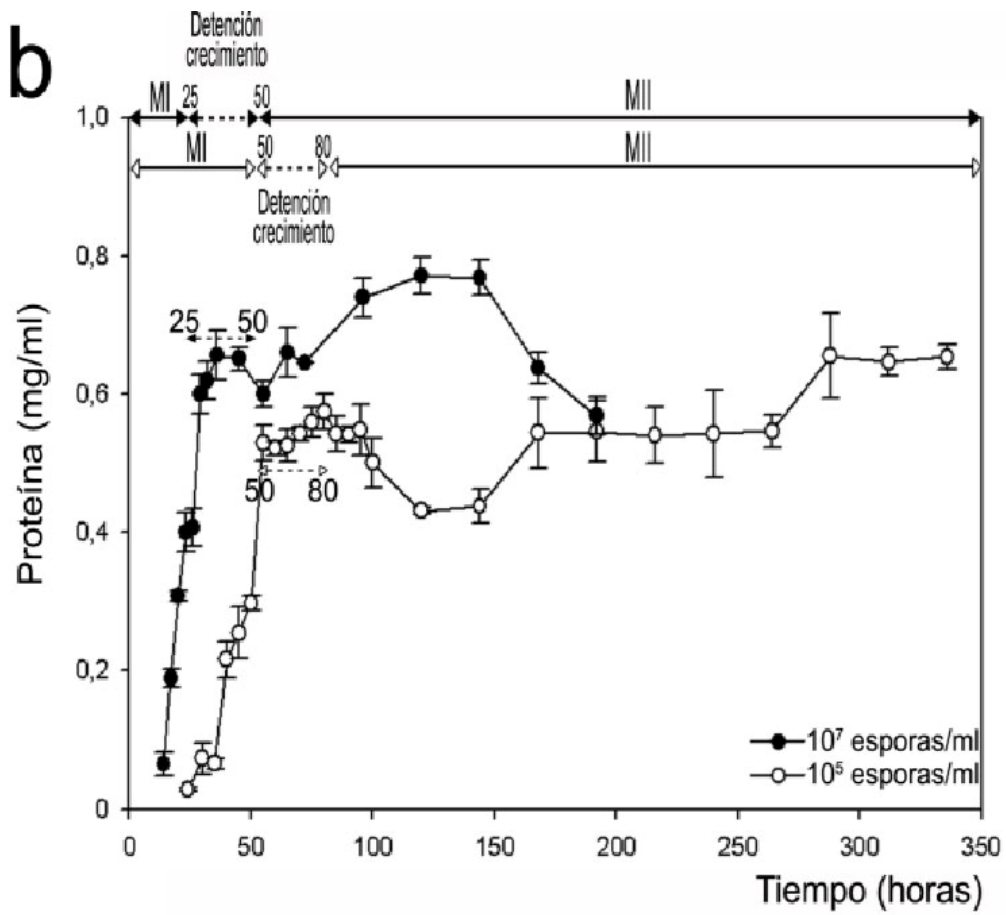


Fig.III.19. Curvas de crecimiento de *S. coelicolor* en cultivos líquidos. **b)** Proteína (mg/ml) frente al tiempo (horas). En la parte superior de las figuras se indican las fases del desarrollo (micelio I, detención de crecimiento y micelio II). Las barras indican el error estándar de tres muestras independientes.

d) Marcadores bioquímicos evidencian la existencia de una muerte celular programada en cultivos líquidos de *S. coelicolor*.

En cultivos sólidos se ha descrito la existencia de una muerte celular programada (Manteca *et al.*, 2006b), cuya característica principal es la de ser un proceso lítico durante el cual se activan de forma específica y ordenada una serie de enzimas efectores de muerte, entre los que destacan las nucleasas encargadas de la degradación del ADN cromosómico de la propia bacteria (Manteca *et al.*, 2006a, 2006b). Con el fin de analizar la existencia de estos procesos en cultivos líquidos, se han empleado dos marcadores bioquímicos: por un lado, y como marcador de lisis, se ha analizado la presencia del enzima citosólico hexoquinasa en el medio extracelular; por otro, se ha analizado mediante zimogramas la inducción de las nucleasas inespecíficas que caracterizan la muerte celular programada de *Streptomyces* (Manteca *et al.*, 2006b). Los resultados se muestran en la figura III.20. Hay una correlación perfecta entre los procesos descritos en los párrafos anteriores mediante tinciones de viabilidad y microscopía láser confocal, y la cinética de estos marcadores bioquímicos. La liberación de hexoquinasa y la inducción de actividad nucleolítica se ponen de manifiesto en el momento en el que vemos procesos de muerte en el centro de las masas de micelio (Fig.III.20 y apartados anteriores). Además, se aprecia un claro retraso en los procesos de muerte en el inóculo diluido (10^5 esporas/ml) con respecto al inóculo concentrado (10^7 esporas/ml).

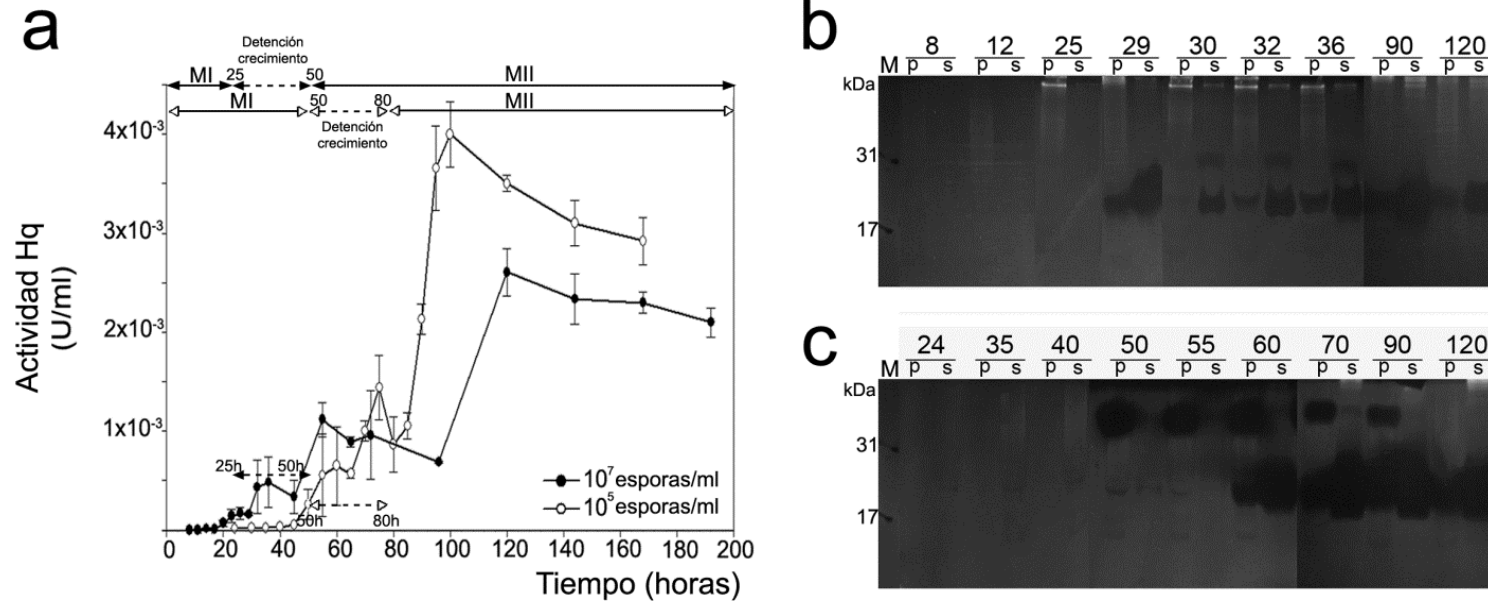


Fig.III.20. Marcadores bioquímicos de lisis y muerte celular programada. (a) aparición del enzima citosólico hexoquinasa en el medio extracelular. En la parte superior de la gráfica se indican las fases del desarrollo (micelio I, detención de crecimiento y micelio II). Las barras indican el error estándar. (b) y (c) zimogramas mostrando la variación de la actividad nucleolítica. El tiempo de desarrollo se indica en horas. p corresponde a la fracción celular ("pellet"); s corresponde a la fracción extracelular ("sobrenadante").

e) La producción de antibiótico en cultivos líquidos de *Streptomyces coelicolor* M145 se correlaciona con los procesos de desarrollo/diferenciación.

Streptomyces coelicolor produce, entre otros, los antibióticos undecilprodigiosina y actinorrodina (Hopwood *et al.*, 1995). Un análisis detallado de la cinética de producción de ambos antibióticos ha demostrado la correlación entre la aparición del micelio multinucleado (MII), y la producción de antibiótico (Fig.III.21a, b). De hecho, esta es la primera vez en que la producción de antibiótico pudo correlacionarse con la diferenciación de *Streptomyces* (Manteca *et al.*, 2008). De nuevo, hay un retraso en la fase de producción en el inóculo diluido respecto al concentrado, y dicho retraso es exactamente el mismo que se produce en la fase de detención del crecimiento y desarrollo posterior del segundo micelio. Estos datos sugieren, aunque no lo demuestran, que el MII es el micelio productor de antibiótico.

Con el fin de ver físicamente que estructura/micelio está produciendo el antibiótico, se analizó mediante microscopía láser confocal en una cepa de *S. coelicolor* M600 la expresión de la proteína verde fluorescente bajo el control del promotor de uno de los genes implicados en la síntesis de undecilprodigiosina (*redD*) (Fig.III.21c, d; ver Material y Métodos apartado II.4.9d). En la figura III.21c se muestra una fotografía de la fase de máxima producción para la condición de inóculo concentrado (10^7 esporas/ml), que coincide con la fase en que el MII ocupa el centro y periferia de los "pellets" (compárese la Fig.III.16g con Fig.III.21c). En la figura III.21d se puede observar directamente la producción del antibiótico bajo microscopía de contraste de fases (color rojo). Resultados similares se obtienen en condiciones de inóculo diluido, con la salvedad de un retraso apreciable en los tiempos de desarrollo.

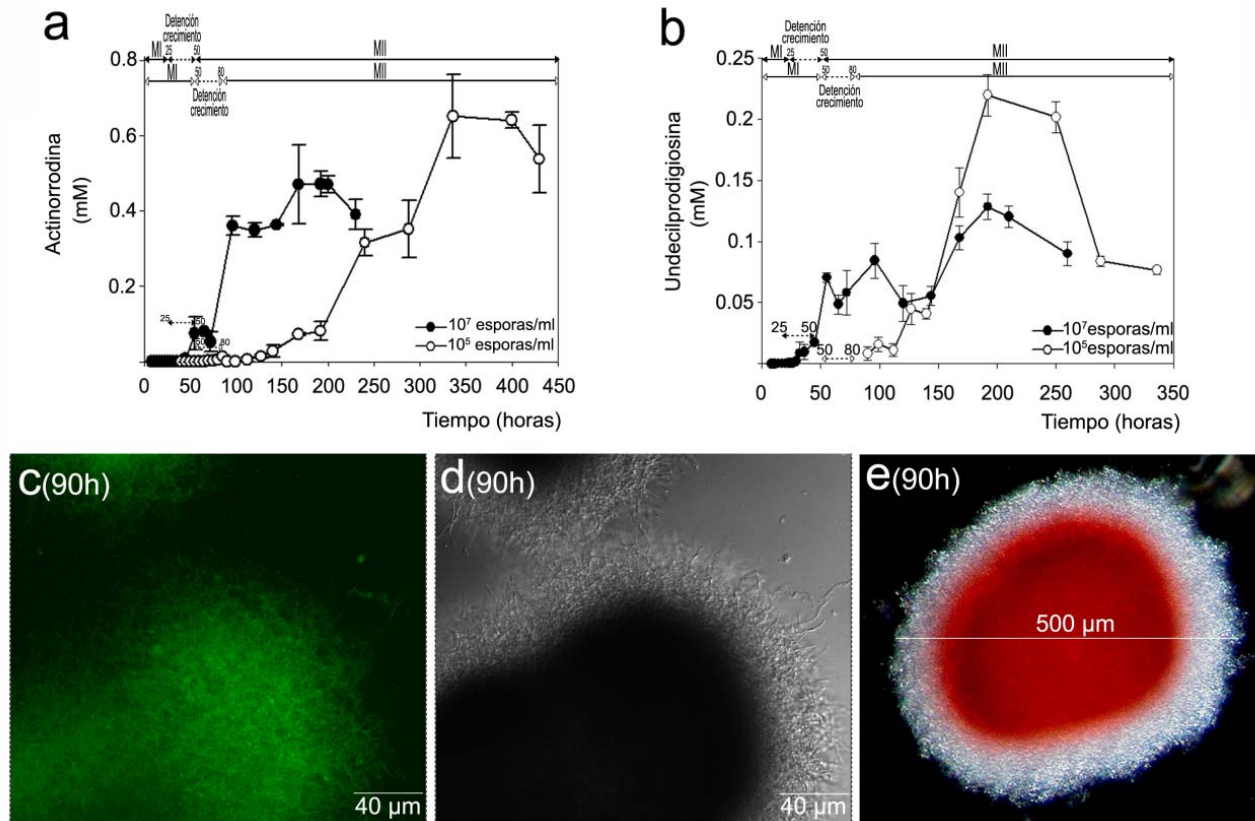


Fig.III.21. Cinética de producción de antibiótico en cultivos líquidos de *S. coelicolor*. (a) Actinorrodina; (b) Undecilprodigiosina. En la parte superior de las gráficas se indican las fases del desarrollo (micelio I, detención de crecimiento y micelio II). Las barras indican el error estándar de tres muestras independientes. (c) fotografías fluorescencia que muestra la expresión de la proteína verde fluorescente. (d) mismo campo bajo contraste interferencial. (e) fotografía de contraste de fase ilustrando la producción de antibiótico (color rojo) en el centro de las masas de micelio.

III.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICO EN DISTINTAS ESPECIES DE *STREPTOMYCES* MEDIANTE LA MODIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESARROLLO/DIFERENCIACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO.

a) *Streptomyces cattleya*: producción de tienamicina.

Con el fin de optimizar la producción de antibiótico en cepas de interés industrial bajo el punto de vista del ciclo de desarrollo (mejora de la diferenciación del micelio productor: MII) comenzamos a analizar fermentaciones en medio líquido de *S. cattleya* (cepa cedida por Asturpharma S. A). *S. cattleya*, es la cepa de *Streptomyces* de la que se aisló la tienamicina por primera vez. La tienamicina, fue el primer compuesto tipo carbapenema descubierto (España, 1976). Actualmente se conocen más de 50 antibióticos que contienen el anillo carbapenema aunque la mayoría son derivados de la tienamicina. Es un antibiótico β -lactámico de naturaleza inestable, razón por la cual no se utiliza en clínica como tal, sino que se usan derivados como la imipenema y la meropenema en infecciones severas en las que el microorganismo patógeno es resistente a los antibióticos habituales, a pesar de que hace una década han empezado a aparecer cepas resistentes (Nordmann y Poirel, 2002).

La figura III.22 ilustra el ciclo de desarrollo de *S. cattleya* en cultivos sumergidos partiendo de un inóculo de esporas ($6,6 \times 10^8$ esporas/ml). Al igual que sucedía en *S. coelicolor*, tras la germinación de las esporas aparece un micelio compartimentalizado (MI; Fig.III.22a-c), pero en este caso, el micelio se agrupa muy poco, permaneciendo viable durante más tiempo (compárese la figura III.22 con III.16). A las 24 horas (Fig.III.22d-e) comienza la MCP, observándose segmentos vivos y muertos alternándose en la misma hifa (Fig.III.22e). Posteriormente, y en tiempos tardíos, se observa un micelio en el que se pueden ver segmentos “vacíos” (por la degradación del ADN debida a la actividad de las nucleasas, ya no se tiñen con IP), alternando con largos segmentos multinucleados (MII; compárese Fig.III.22a con 22f). Por todo ello, la diferencia más clara entre *S. cattleya* y *S. coelicolor* reside en la menor agrupación en *S. cattleya*, así como el menor desarrollo del MII.

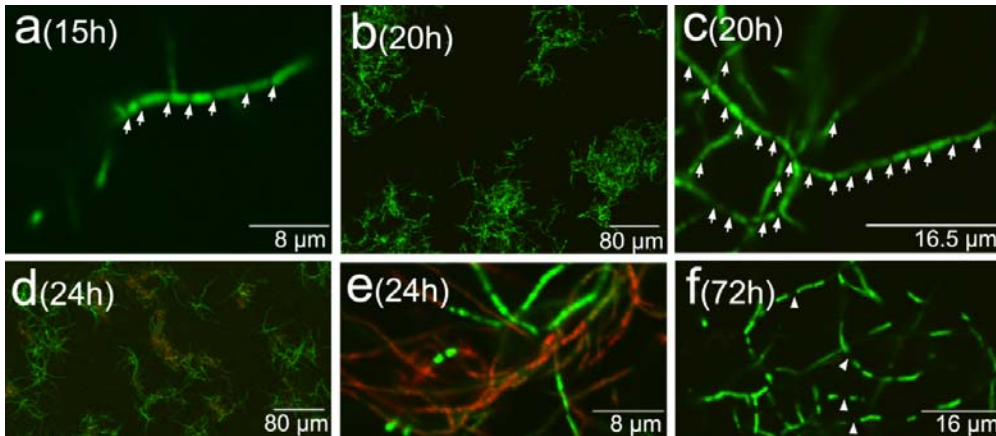


Fig.III.22. Desarrollo en cultivos sumergidos de *S. cattleya* a partir de un inóculo de esporas ($6,6 \times 10^8$ esporas/ml). Las flechas indican los septos del micelio I. Las puntas de flecha en f indican segmentos muertos de micelio I que han perdido su fluorescencia por acción de las actividades nucleolíticas. Se indican los tiempos de desarrollo. MI: Micelio I; MII: Micelio II.

Tal y como se ha apuntado en el apartado anterior, y se ha demostrado posteriormente mediante estudios de biología de sistemas (apartado III.1), el MII es el productor de antibiótico, y dicho micelio surge tras una muerte celular programada y una detención transitoria del crecimiento. Puesto que conocemos que el agrupamiento de las hifas de MI y su MCP son críticos para el desarrollo del MII productor de antibióticos, la aproximación experimental que se siguió fue fomentar estos procesos. Con este fin, se pre-incubó una suspensión de esporas en medio de cultivo (R5A) durante 14 días (en las condiciones de cultivo indicadas en Material y Métodos, 200 rpm y 30°C). Con ello, se consiguieron provocar fenómenos de MCP intensos, así como una detención del crecimiento de gran parte de las hifas/esporas que permanecen viables, pero sin crecimiento (Fig.III.23, fotos superiores). Según nuestra hipótesis, esta MCP liberaría señales de diferenciación a las hifas vivas condicionándolas a desarrollarse en forma de MII. Posteriormente, este pre-cultivo que hemos denominado “inóculo condicionado” se usó para iniciar nuevos cultivos (“cultivos condicionados”). De esta forma observamos un micelio compartimentalizado inicial (Fig.III.23a) que pronto comenzó a desarrollarse como un MII multinucleado (Fig.III.23c). La tasa de crecimiento inicial se aceleró mucho con respecto al cultivo iniciado a partir de esporas, consiguiendo un mayor agrupamiento (Fig.III.23d, e), y una mayor proporción de micelio II (compárese Fig.III.22f con III.23f).

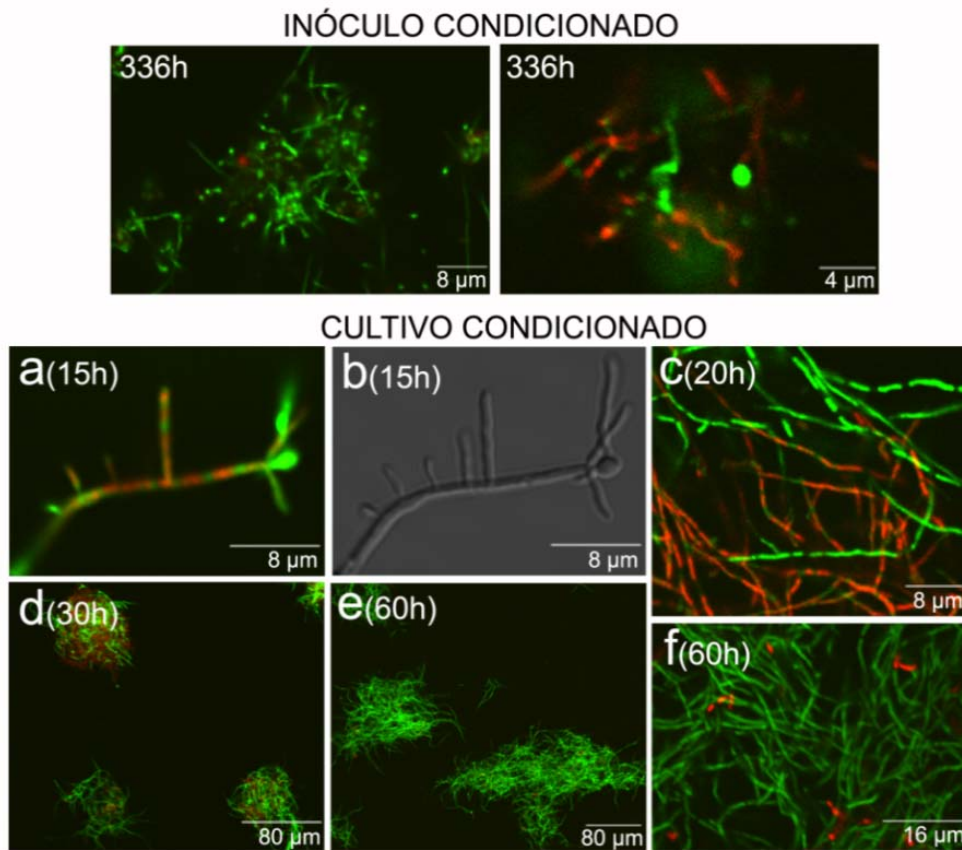


Fig.III.23. Desarrollo de *S. cattleya* en cultivos líquidos iniciados a partir de un inóculo condicionado. Imágenes superiores; estado del inóculo de esporas condicionado tras su incubación durante 14 días (detalles en el apartado III. 2a). Imágenes inferiores; ciclo de desarrollo de un cultivo inoculado a partir del inóculo condicionado. Los cultivos fueron teñidos con los colorantes fluorescentes de viabilidad IP y SYTO 9. La imagen (b) fue obtenida mediante microscopía de contraste interferencial.

En la figura.III.24a se muestra la producción de tienamicina (mg/ml) respecto al tiempo (horas) de un cultivo control, inoculado a partir de esporas, y de un cultivo que ha crecido a partir de un inóculo condicionado. En el cultivo control la producción ronda los 0,8 µg/ml mientras que en el cultivo condicionado se llega a una producción de 2,5 µg/ml, consiguiéndose por tanto aumentar unas 3 veces la producción. En la Figura.III.24b se muestran los máximos de producción en función de la concentración de inóculo en los dos cultivos, observándose como la producción es mayor cuanto mayor es la concentración del inóculo, y siempre es mayor en el cultivo condicionado que en el cultivo control realizado a partir de esporas (no condicionado).

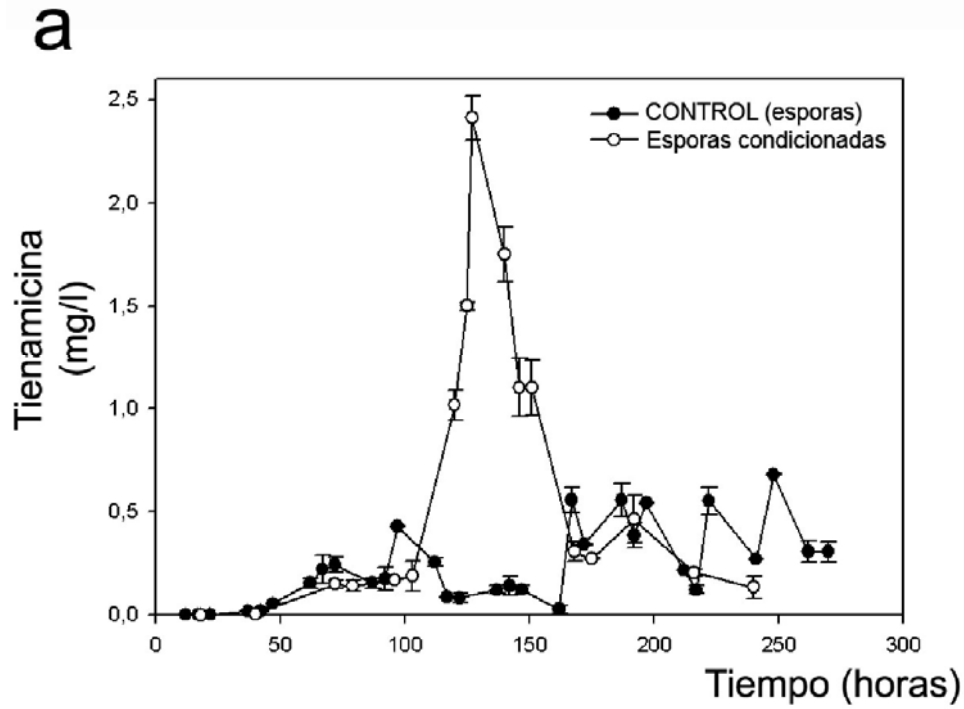


Fig.III.24.a) Cinética de producción de tienamicina en cultivos líquidos control y condicionado de *S. cattleya*.

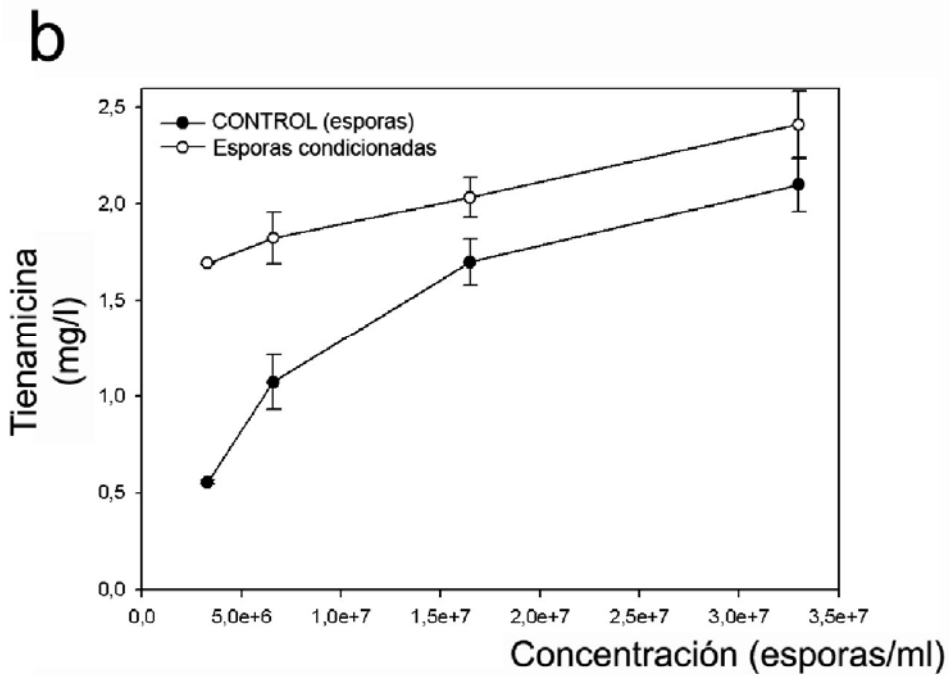


Fig.III.24.b) Máximos de producción de tienamicina de los cultivos control y condicionados respecto a la concentración final de esporas.

b) *Streptomyces tsukubaensis*: productor de tacrolimus.

Uno de los microorganismos más importantes a nivel industrial hoy en día es *S. tsukubaensis* productor del inmunosupresor tacrolimus, también conocido como FK506 o Fujimycin. Este compuesto fue aislado por primera vez en 1984 por la empresa farmacéutica japonesa Fujisawa Pharmaceutical Co. (Goto *et al.*, 1987). El tacrolimus es un macrólido con un anillo lactona de 23 miembros, y pertenece al grupo de los inmunosupresores, utilizándose fundamentalmente para prevenir el rechazo en pacientes trasplantados de hígado, riñón o de corazón.

El siguiente objetivo de esta tesis fue analizar el ciclo de desarrollo y producción de tacrolimus en *Streptomyces tsukubaensis* (cedida por el Instituto de Biotecnología de León, INBIOTEC), aplicando los mismos parámetros e hipótesis previamente estudiadas en otras especies como *S. coelicolor* o *S. cattleya*. En primer lugar utilizamos medio de cultivo R5A (el medio rico de producción que utilizamos de habitualmente) y comparamos la producción en las condiciones previamente estudiadas; inóculo de esporas e “inóculo condicionado” (apartado II.4.4). En este medio, y a diferencia de lo que sucedía en *S. cattleya*, las hifas de MI de *S. tsukubaensis* crecen y se agrupan en “pellets” diferenciándose en un MII siguiendo el esquema de desarrollo descrito en *S. coelicolor*. Existe una diferencia clara en el desarrollo de MII entre las fermentaciones que partían de esporas y las que partían de un “inóculo condicionado”, puesto que en estas últimas a las 24 h de incubación ya se ve MII, no así en las fermentaciones que parten de esporas (figura III.25). A pesar de que en estas condiciones se forma MII, en este medio de cultivo no se consigue producción de tacrolimus. No obstante, sí que se observa la producción de un antibiótico de la familia de las prodigiosinas (datos no mostrados).

Eliminado:

Eliminado:

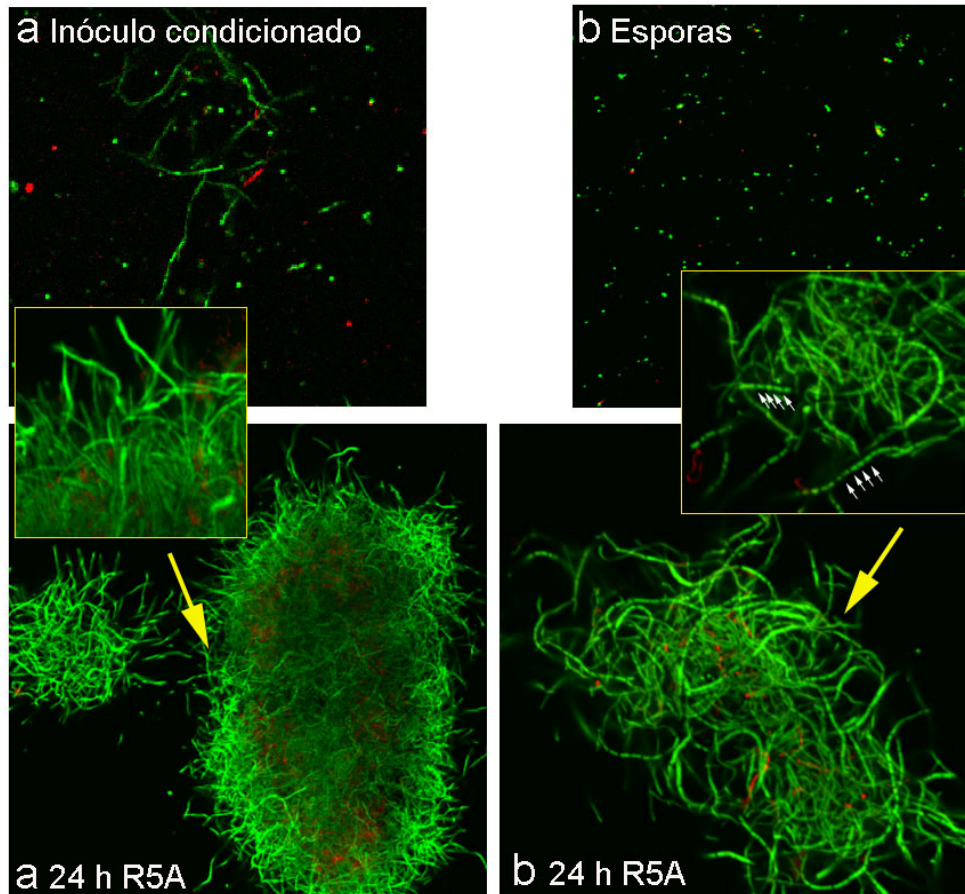


Fig.III.25. Fotografías con microscopio láser confocal (hifas teñidas con los colorantes vitales SYTO9, IP) de *S. tsukubaensis* creciendo en medio R5A. Arriba; dos tipos de inóculo, a) “inóculo condicionado” y b) inóculo de esporas (10^8 esporas/ml). Abajo; a) desarrollo a las 24 h en R5A partiendo del inóculo condicionado (detalle de hifas multinucleadas; MII), b) desarrollo de *S. tsukubaensis* a las 24 h en R5A partiendo de esporas (detalle de hifas tabicadas; MI).

En análisis posteriores, cambiamos el medio R5A por el medio definido MG (descrito en Material y Métodos, apartado II.4.3b) ya que este medio había sido usado con éxito para la producción de tacrolimus por científicos del Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC). Comparamos la producción de un cultivo con un inóculo diluido (10^5 esporas/ml) con la producción de un cultivo inoculado con un inóculo concentrado (10^7 esporas/ml). Como sucedía en *S. coelicolor* (Manteca *et al.*, 2008) y *S. cattleya*, en cultivos líquidos de *S. tsukubaensis* existe un micelio joven compartimentalizado (MI), que sufre un proceso de MCP que precede a la diferenciación de un micelio multinucleado preesporulante (MII) (Fig.III.26 y 27). En estas condiciones se observa producción de tacrolimus, y como era esperable, la

III. RESULTADOS

producción es más temprana (72 h) con el inóculo concentrado (10^7 esporas/ml) que con el diluido (10^5 esporas/ml) (96 h) (Fig.III.27). Sin embargo, la producción de tacrolimus es muy baja en el medio con inóculo concentrado (Fig.III.26), lo que se relaciona con el hecho de que *S. tsukubaensis* esporula en estas condiciones a partir de las 96 h (Fig.III.26), lo que es incompatible con la síntesis de metabolitos secundarios. En los cultivos realizados con inóculos diluidos se observa también esporulación, pero a tiempos tardíos (160 h) (Fig.III.27) lo que permite la síntesis de tacrolimus durante más tiempo, alcanzándose niveles mayores de producción (Fig.III.28).

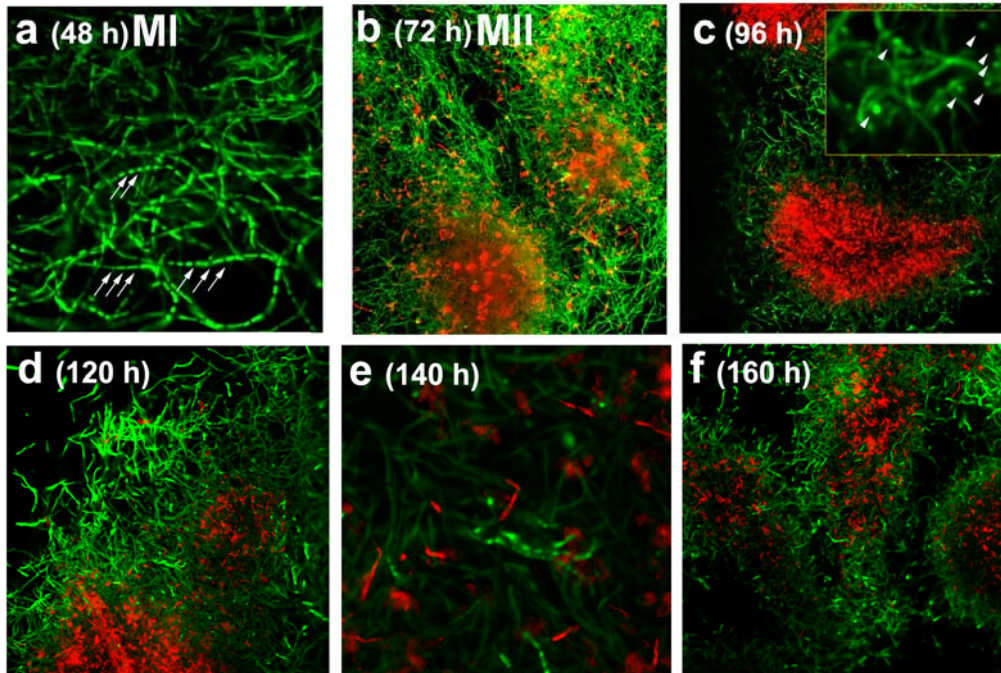


Fig.III.26. Desarrollo de *S. tsukubaensis* en medio líquido MG a partir de un inóculo concentrado (10^7 esporas/ml). Los cultivos fueron teñidos con los colorantes fluorescentes de viabilidad IP y SYTO 9. La MCP se visualiza en rojo. Las flechas muestran los septos del micelio I. Las puntas de flecha indican las esporas.

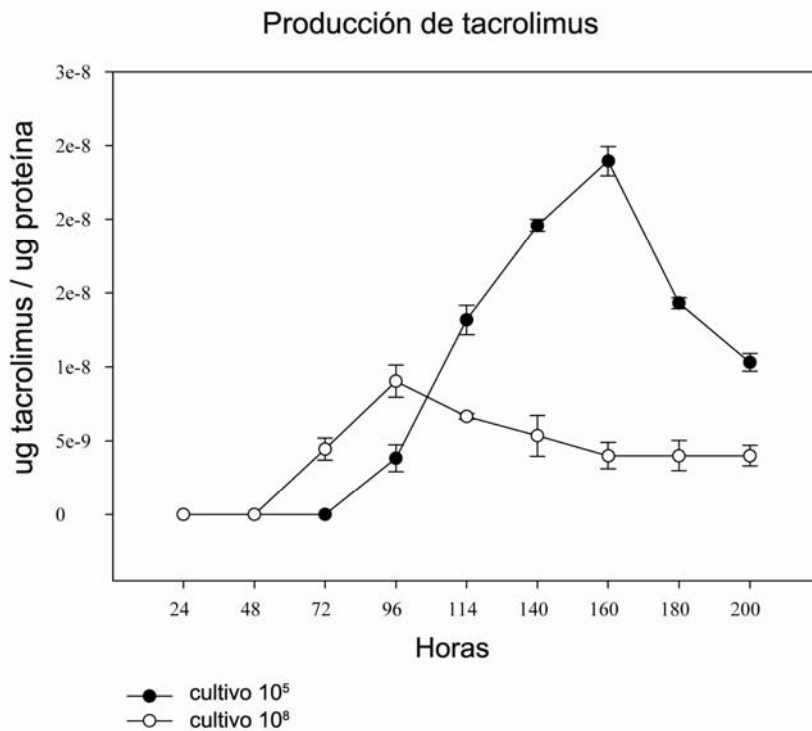
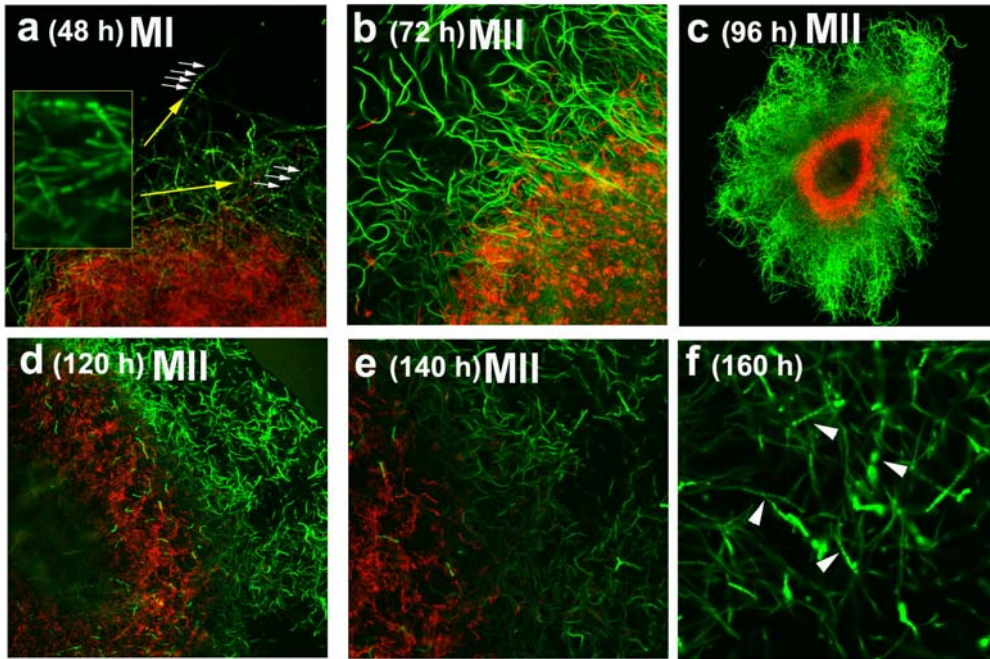


Fig.III.28. Producción de tacrolimus (en función de la proteína) por *S. tsukubaensis* en cultivo líquido (medio MG) con alta (o) y baja (•) concentración de inóculo.

Por último, intentamos aplicar la metodología de los “inóculos condicionados” descrita en el apartado anterior para *S. cattleya* a fermentaciones de *S. tsukubaensis* creciendo en medio MG. En este medio no pudimos reproducir esta metodología, puesto que las esporas en tan alta concentración permanecían en estado de latencia y no germinaban (Fig.III.29).

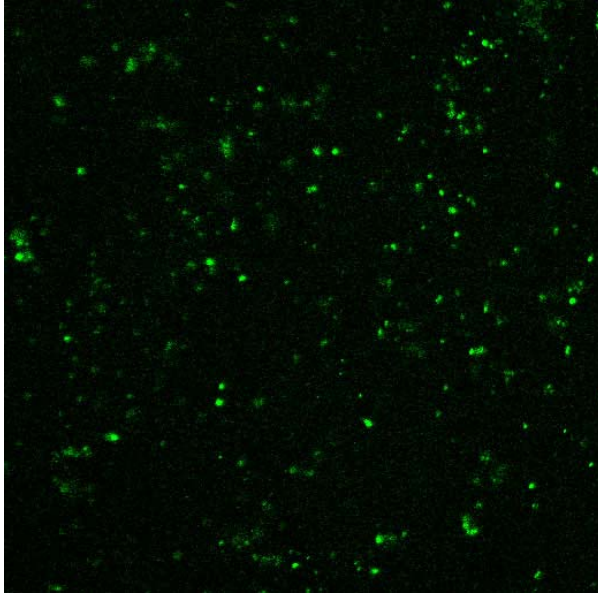


Fig.III.29. Inóculo denso de esporas de *S. tsukubaensis* incubado durante 14 días en medio MG.

III.3.3. UN NUEVO MÉTODO DE MONITORIZACIÓN “ON LINE” DE LAS FERMENTACIONES INDUSTRIALES.

Tal y como se ha comentado en los apartados anteriores, los procesos de MCP son el evento clave que determina la diferenciación en *Streptomyces*, y en última instancia la producción de metabolitos secundarios (Fig.III.30). Una de las técnicas más útiles para el seguimiento de estos procesos, es el uso de los colorantes vitales Ioduro de propidio y SYTO 9, pero su aplicación pasa necesariamente por el uso de un microscopio de fluorescencia, y dependía de la correcta interpretación de las imágenes obtenidas, lo que en la práctica dificulta su implantación como un método de seguimiento de los procesos de diferenciación en las fermentaciones industriales. Con el fin de estandarizar el uso de estos colorantes, los hemos utilizado en combinación con un fluorímetro, lo que nos ha permitido crear un índice cuantificable y fiable de la

diferenciación: el cociente de intensidades vivo/muerto (SYTO/IP; Yagüe *et al.*, 2010). Para ello, hemos reproducido las fermentaciones de *S. coelicolor* descritas arriba (medio R5A con un inóculo de 10^7 esporas/ml; Fig.III.30).

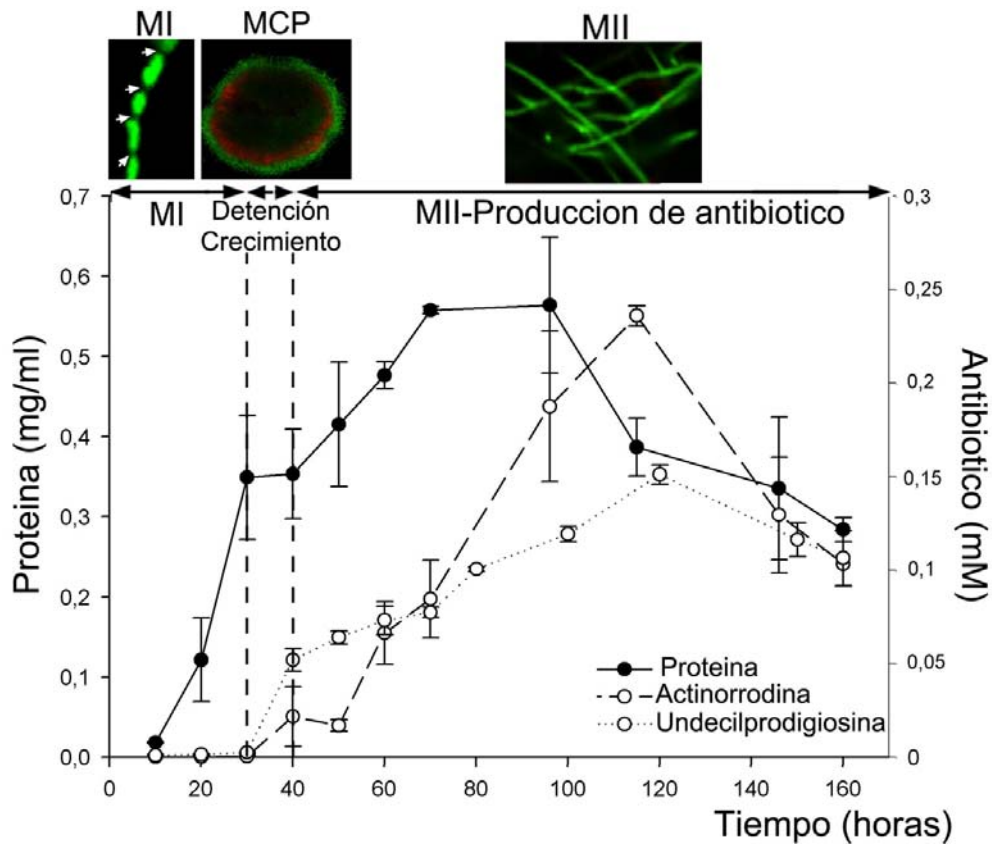


Fig.III.30. Curva de crecimiento y producción de antibióticos (Actinorrodina y Undecilprodigiosina) en cultivos líquidos de *S. coelicolor*. Encima de las gráficas se muestran imágenes de microscopía confocal de los procesos clave en el desarrollo (colorantes Ioduro de propidio y SYTO9), hifa de micelio I compartimentalizada (las flechas indican los tabiques), masa de micelio con procesos de MCP en su interior (rojo) e hifas de segundo micelio multinucleado. Se indica la coincidencia de la fase de detención del crecimiento con la MCP.

Como era de esperar, las intensidades de emisión de los colorantes SYTO9 (células vivas) e IP (células muertas) se correlacionan bien con el desarrollo de *Streptomyces*: en tiempos cortos, el desarrollo del MI vegetativo se traduce en un incremento rápido de la intensidad de la fluorescencia del SYTO9; la intensidad del IP se incrementa lentamente como un resultado de la muerte de las hifas en el interior de las masas celulares (“pellets”) que comienzan a formarse (Fig.III.31); la intensidad del IP aumenta conforme el centro de los “pellets” se va incrementando y muriéndose cada vez más; en la fase de detención transitoria del crecimiento, se produce una rápida caída en la fluorescencia del SYTO9 debido a que la tasa de muerte del MI en el centro de las masas miceliales es mayor que la tasa de crecimiento del MI viable; posteriormente se produce la diferenciación y desarrollo del MII que se traduce en una nueva fase de crecimiento exponencial, y en una estabilización y posterior incremento de la fluorescencia del SYTO9 (Fig.III.31a). A pesar de la correlación entre las intensidades del SYTO9 y el IP, sus valores no eran muy informativos, y así por ejemplo, un valor de 4000 unidades relativas de intensidad SYTO 9 se daba por igual durante las fases de MI y MII, y lo mismo pasaba con el IP (Fig.III.31a). No obstante, cuando los datos se normalizaron como el cociente de las intensidades del SYTO9 / IP, pudimos obtener un índice fiable de diferenciación (Fig.III.31b). En el caso de *S. coelicolor*, el desarrollo del MII y la producción de antibiótico sólo sucedían con valores menores de 1 (Fig.III.31b).

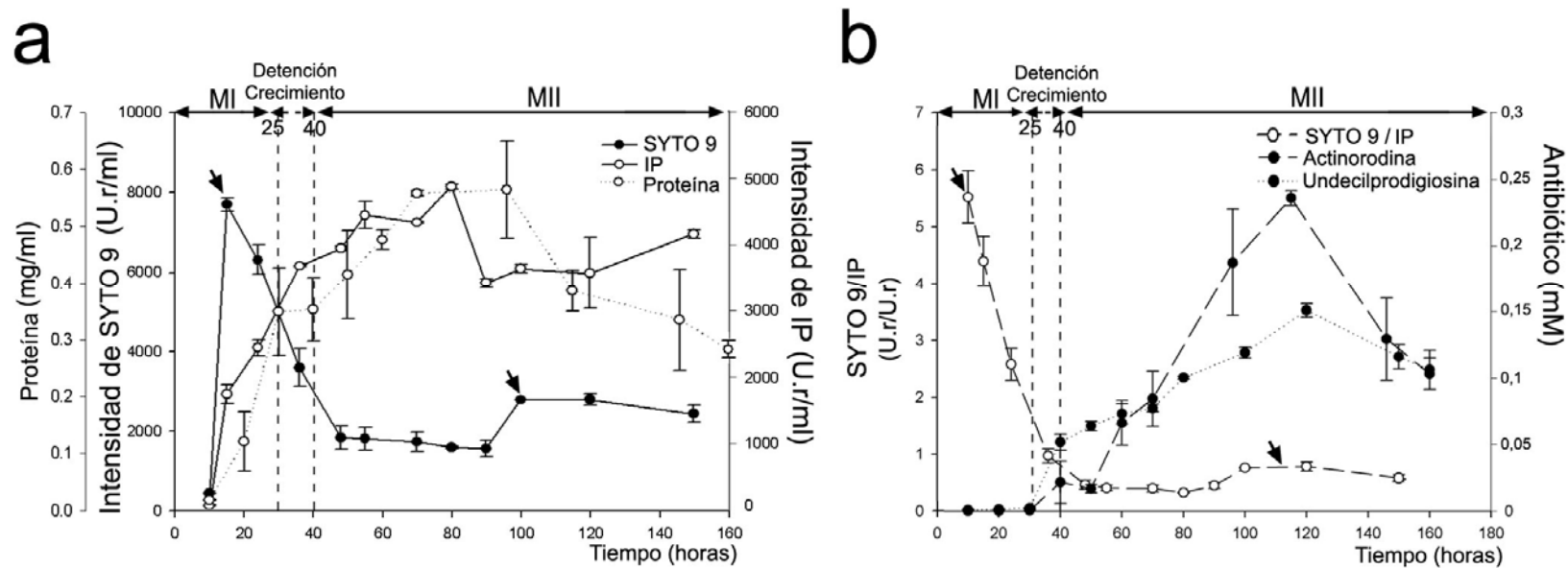


Fig.III.31. Medidas fluorimétricas. (a) Intensidades de emisión del SYTO 9 (células vivas) y IP (células muertas) a lo largo del desarrollo de *S. coelicolor*, se muestran junto a la concentración celular (mg de proteína/ml). (b) Variación del cociente SYTO 9/IP a lo largo del ciclo de desarrollo. También se muestra la producción de antibiótico (actinorrodina y undecilprodigiosina). MI, primer micelio compartimentalizado; MII micelio multinucleado. Las flechas indican la intensidad máxima de SYTO 9 (células vivas) que se corresponde con el micelio I (15 h) y el micelio II (100 H). Se muestran las desviaciones típicas de dos réplicas biológicas medidas tres veces cada una (tres réplicas metodológicas). U.R., unidades relativas.



Francis Crick y James Watson

IV. DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

Tal y como se ha comentado arriba en la introducción (apartado I.2.1), el ciclo de desarrollo tradicional de *Streptomyces* consideraba solamente las fases de micelio sustrato, aéreo y esporulación, y en consecuencia, estas son las fases de desarrollo mejor caracterizadas, y cuya regulación bioquímica se conoce mejor: genes *Bald*, genes *Whi*, formación de las cubiertas hidrofóbicas del micelio aéreo, etc... Por otro lado, las fases preesporulantes no contempladas en el ciclo de desarrollo tradicional (transición MI-MII, MCP), han sido ignoradas (véase Fig.I.3). En esta tesis hemos trabajado en la caracterización de estas fases que, tal como se ha comentado arriba, son la clave para entender la diferenciación en fermentaciones de *Streptomyces*.

Hemos utilizado técnicas de biología de sistemas (transcriptómica y proteómica) con el fin de identificar los genes y proteínas diferencialmente expresados/as durante las fases clave en el desarrollo. En primer lugar comenzamos analizando mediante transcriptómica las fases de MI y MII en medio sólido, complementando los resultados que nuestro grupo de investigación había obtenido recientemente mediante proteómica (Manteca *et al.*, 2010a). Como era de esperar, la mayoría de los genes detectados se expresaban de forma similar en los MI y MII (genes "housekeeping"). Sin embargo, también se detectaron genes cuya expresión variaba significativamente entre las fases de MI o MII. Separados por categorías funcionales nos encontramos con que los genes expresados al alza en el MI están implicados principalmente en metabolismo primario, mientras que los regulados al alza en MII lo están en metabolismo secundario (Figura III.4), lo que demuestra el hecho ya comentado de que el MII es el micelio diferenciado productor de metabolitos secundarios. También se ha observado que la mayoría de los genes que codifican transposones y secuencias de inserción están regulados al alza en el MII (Figura III.5), lo que podría estar indicando la activación de mecanismos de generación de variabilidad genética previos a las fases de esporulación (MII). Los genes relacionados con la conjugación, recombinación y mutagénesis están regulados al alza en el MI (Figura III.5), lo que parece indicar una activación de estos mecanismos durante la fase de MI, justo después de la primera ronda de muerte que afecta al micelio I compartimentalizado. Los datos de transcriptómica obtenidos en esta tesis se correlacionaban bien con los datos de proteómica obtenidos previamente por nuestro

grupo de investigación (Figura III.6), lo que reafirma la validez de los datos aquí obtenidos. Cabe destacar que esto contradice en cierto modo trabajos de otros autores que han descrito que la correlación entre proteómica y transcriptómica en *Streptomyces* no es buena (Jayapal *et al.*, 2008). Actualmente estamos trabajando en la aplicación de estas técnicas de transcriptómica, al estudio de la diferenciación en cultivos líquidos, con el fin de comparar la diferenciación en sólido y líquido, de forma análoga a los experimentos de proteómica realizados recientemente por nuestro grupo (Manteca *et al.*, 2010b).

El siguiente objetivo de esta tesis doctoral fue el de estudiar mediante transcriptómica y proteómica las diferencias en la expresión de genes y proteínas durante los procesos de MCP. La mayoría de las proteínas identificadas durante la MCP están relacionadas con el metabolismo primario, puesto que éstas son las más abundantes. Sorprendentemente, la abundancia relativa de dichas proteínas en las células vivas y “muertas” es casi idéntica, lo que indica que MCP *Streptomyces* es un proceso muy repentino en la que las proteínas “housekeeping” no sufren cambios significativos. Como era de esperar, los datos obtenidos en este trabajo mediante LC-MS/MS se correlacionan bien con aquellos obtenidos anteriormente por nuestro grupo de investigación mediante el uso de geles bidimensionales (Manteca *et al.*, 2006b). Sólo cinco (SCO1395, SCO3996, SCO4211, SCO6208, SCO7078) mostraron discrepancias en sus valores de abundancia. Las diferencias entre las dos metodologías podrían atribuirse a la existencia de isoformas que pueden detectarse mediante geles 2D pero no mediante LC-MS/MS. Como es lógico, el rango dinámico de la técnica de LC-MS/MS (542 proteínas) fue mucho mayor que el de los geles bidimensionales (59 proteínas), aportando mucha más información.

En esta tesis hemos analizado por primera vez la MCP de *Streptomyces* mediante experimentos de transcriptómica, lo que supuso un gran reto, ya que el ARN de las células que se están muriendo estaba muy degradado (Figura III.8e). Sólo un conjunto de ARNs que codifican para 302 genes estaban suficientemente íntegros para proporcionar valores de abundancia reproducibles bajo nuestro diseño experimental (Fig.III.9a). En total, hemos cuantificado de forma fiable la abundancia de 814 ORFs, 542 proteínas, y 302 genes, de las cuales, sólo 30 se detectaron mediante proteómica y transcriptómica, y los valores de abundancia de sus proteínas y ARN mensajeros tenían

una buena correlación (Fig.III.9b). Los datos de transcriptómica están enriquecidos en genes reguladores mientras que los datos de proteómica se lo estaban mayoritariamente en proteínas de metabolismo primario. Los experimentos de proteómica están sesgados hacia las proteínas más abundantes (algo intrínseco a la propia técnica) y en nuestro caso, los experimentos de transcriptómica están sesgados hacia los ARN mensajeros que permanecen estables en las células que se están muriendo. En consecuencia, la transcriptómica nos permitió cuantificar la abundancia relativa de los ARN mensajeros que codifican proteínas implicadas en la MCP, y la mayoría de sus genes no se expresan en cantidad suficiente para ser detectadas por las técnicas de proteómica utilizadas. En consecuencia, ambos experimentos nos han proporcionado información independiente y complementaria sin redundancia; cuantificamos la abundancia relativa de 542 proteínas y 302 genes (814 ORFs en total; 10,5% del total de ORFs de *Streptomyces*). El conocimiento sobre las diferencias entre el proteoma y el transcriptoma de las células vivas y muertas representa un gran avance en la biología de *Streptomyces* y permitirá futuros análisis dedicados a descubrir las proteínas y genes que inducen o contribuyen de alguna manera en la MCP.

Eliminado: ¶

En esta tesis, hemos empezado a explorar estos aspectos, mediante la mutagénesis de ocho de los genes/proteínas más diferencialmente expresados durante la MCP. El fenotipo de todos ellos consistió en una aceleración muy importante de la esporulación (39 horas en lugar de las 69 horas de la cepa salvaje). La existencia de esporulación en el llamado “micelio sustrato” (MII sin cubiertas hidrofóbicas), es un fenotipo muy inusual que se ha descrito en muy pocas ocasiones, y se le había llamado “esporulación ectópica”, o “esporulación desprogramada” (Kelemen *et al.*, 1995; Miguelez *et al.*, 1997; Kwak y Kendrick, 1996; Ohnishi *et al.*, 2002). Este fenotipo es muy sorprendente si tenemos en cuenta el gran retraso entre la fase de desarrollo analizada (9 h) y la esporulación (72 h). No obstante, la diferencia más importante entre las células vivas y muertas está en proteínas y genes relacionados con esporulación, recombinación/mutagénesis y proteínas de estrés. Todo ello sugiere el papel de la MCP como un mecanismo de generación de variabilidad genética, y de regulación de la entrada en la fase de esporulación.

Con formato: Sin Resaltar

Trabajos recientes de nuestro grupo de investigación demostraron que el crecimiento de *Streptomyces* en condiciones naturales, (suelos inoculados con esporas, el crecimiento es muy lento, y el micelio que predomina es el MI siendo el MII una fase muy transitoria que esporularía rápidamente (Manteca y Sánchez 2009). Si consideramos este ciclo “natural”, la relación entre la MCP y la esporulación está clara: el MI (vegetativo) es la fase predominante hasta que aparece el estrés del propio ciclo de desarrollo (agotamiento de nutrientes, alta densidad celular, etc...). La MCP desencadena la diferenciación del MII (multinucleado) que produce antibiótico y esporula. La esporulación podría retrasarse en cultivos de laboratorio debido a que las señales que la desencadenan estarían bloqueadas (probablemente por un exceso de nutrientes). Estas señales podrían ser moduladas, al menos en parte, por genes como SCO0172, SCO0633, SCO0937, SCO1395, SCO2954, SCO4505, SCO4885, y SCO5946, ya que su mutación provocó una esporulación muy adelantada (39 horas Fig.III.15). La existencia de estos puntos de control bloqueando la esporulación en condiciones no adversas es un nuevo aspecto de la biología de *Streptomyces* que no se había descrito con anterioridad y supondría una gran ventaja ecológica; la formación de la spora en condiciones favorables podría implicar la pérdida de competencia contra otros microorganismos presentes en el ambiente. La caracterización detallada del papel de estos y otros genes diferencialmente expresados durante la MCP es uno de nuestros objetivos de futuro, y contribuirá a conocer mejor las rutas bioquímicas que controlan la MCP y los procesos de diferenciación del MII en *Streptomyces*. Estos experimentos podrían tener repercusiones en la industria farmacéutica, ya que la MCP activa la diferenciación del MII productor de antibióticos (Manteca *et al.*, 2010b). Además SCO0172, SCO0937, SCO1395 y SCO4885 están altamente conservados en *Streptomyces* (media de similitud en *S. avermitilis*, *S. scabies*, y *S. griseus*, con respecto a *S. coelicolor* mayor del 90%, Tabla suplementaria 1) y sus mutaciones aceleran la producción de antibióticos (Fig.III.15). En consecuencia, una aplicación potencial de este trabajo podría ser mutar estos genes en cepas de interés industrial para acelerar la producción de antibiótico.

Es bien conocido que las cepas de *Streptomyces* tienen cromosomas lineales muy inestables que contienen elementos transponibles y otros elementos adquiridos mediante procesos de transmisión horizontal de genes, localizados principalmente en sus extremos (Chen *et al.*, 2002). Estas regiones terminales son muy variables y contienen repeticiones invertidas de tamaños muy heterogéneos (Chen *et al.*, 2002). Se postuló que la recombinación homóloga y la transposición podrían ocurrir en algún momento del desarrollo de *Streptomyces*, pero la fase específica aún está por descubrir (Chen *et al.*, 2002). En esta tesis hemos demostrado la expresión de genes implicados en recombinación y transposición durante la MCP (SCO1395, SCO3996, SCO4211, SCO6208, SCO7078), por lo que la MCP tendría un papel importante en estas reorganizaciones cromosomales.

La relación entre la muerte celular programada y la diferenciación/ esporulación es un fenómeno ya descrito en *Streptomyces* y otras bacterias: esporulación en *Bacillus* (Schultz *et al.*, 2009), y *Myxobacterias* (Søgaard-Andersen y Yang 2008); diferenciación en *Caulobacter cereus* (Hochman, 1997); diferenciación de heterocistes en *Anabaena* (Ning *et al.*, 2002) o la formación de células no cultivables, pero viables, en varias bacterias gram-negativas (Hochman, 1997; Bogosian *et al.*, 2001). Sin embargo, el papel biológico específico de la MCP sigue siendo poco claro. La MCP en bacterias es un proceso lítico, y su función más obvia podría ser la generación de nutrientes para la subsistencia de las células de la población que quedan viables, un fenómeno llamado canibalismo y propuesto con anterioridad para *Streptomyces* (Mendez *et al.*, 1985; Miguez *et al.*, 1999) o *Bacillus* (González-Pastor 2010). Sin embargo, nosotros consideramos que el canibalismo no es suficiente para explicar la existencia de la MCP bacteriana. Primero, porque a pesar del hecho de que algunos componentes celulares liberados por las células muertas, son reciclados durante la esporulación de *Streptomyces* (Mendez *et al.*, 1985) hay un exceso de nutrientes y la mayoría de precursores originados por la lisis del MI (amino ácidos, nucleótidos, fosfolípidos, etc...) no son reciclados por las esporas (al menos en cultivos de laboratorio; Manteca *et al.*, 2006a). Segundo, porque el ARN de las células "muertas" está muy degradado, pero el ADN cromosómico, a pesar de estar fragmentado en moléculas de diferentes tamaños, no está degradado completamente hasta nucleótidos libres (Figura III.8c). Estos fragmentos de ADN deben tener un papel biológico más allá de la nutrición. Tercero, el

canibalismo no necesitaría una MCP activa para ocurrir; la muerte pasiva por necrosis sería suficiente para generar nutrientes. Cuarto, si consideramos que el único papel de la MCP es la generación de nutrientes, esto no explicaría la relación entre MCP y esporulación (Manteca *et al.*, 2005a, 2005b, 2006a): en cultivos en medio rico, con exceso de nutrientes, la esporulación debería ocurrir sin muerte celular, y lo que ocurre es precisamente lo contrario, medios ricos (por ejemplo el GLM enriquecido con un 2% de casaminoácidos) bloquean completamente la esporulación (A. Manteca y J. Sanchez, resultados no publicados). La alternativa al canibalismo podría ser la competencia (la habilidad de las células para incorporar ADN exógeno). Así por ejemplo, en *Bacillus* y *Streptococcus*, las bacterias en las que mejor se ha caracterizado la competencia natural, se demostró que la MCP liberaba ADN fragmentado que tomaban las células esporulantes (en el caso de *Bacillus*) (Shultz *et al.*, 2009), o las células vivas en el caso de *Streptococcus* (Guiral *et al.*, 2005). La inducción de la competencia y la MCP es diferente en *Streptococcus* y *Bacillus* (Claverys y Håvarstein, 2007), y requiere condiciones específicas, que no siempre son fáciles de reproducir (Martin *et al.*, 2000, Duitman *et al.*, 2007). La MCP induce en *Bacillus* una adaptación al estrés en la cual la competencia por transformación genética no siempre se alcanza (Berka *et al.*, 2002). A este estado de diferenciación se le llama estado-K, y se corresponde con la fase en la cual se producen los antibióticos (Claverys y Håvarstein 2007). En esta tesis, postulamos que el mismo tipo de proceso podría estar ocurriendo en *Streptomyces* y probablemente en otras bacterias en las que se ha descrito MCP, especialmente aquellas con ciclos de desarrollo complejos. Los análisis bioinformáticos en *Streptomyces* no dejan duda acerca de la existencia de una gran transmisión horizontal de genes (THG) (Wiener *et al.* 1998; Ueda *et al.*, 1999; Egan *et al.*, 2001; Metsä-Ketelä *et al.*, 2002; Garcia-Vallve *et al.*, 2003; Nishio *et al.*, 2004; Kawase *et al.*, 2004; Manteca *et al.*, 2004; Doroghazi y Buckley, 2010). La THG en bacterias puede ocurrir por conjugación (transferencia de plásmidos desde una célula donadora a una receptora mediada por un contacto directo célula-célula), trasnducción (mediada por virus las células intercambian ADN), o tranformación/competencia (cambio de genotipo provocado por la incorporación de ADN libre). La conjugación (Wang y Pettis 2010) y la trasnducción (Burke *et al.*, 2001), se describieron con anterioridad en *Streptomyces*, sin embargo su relación con el desarrollo continúa siendo desconocida.

La conjugación y la transducción pueden contribuir a generar HGT en *Streptomyces* pero, como ocurría con el canibalismo, no necesitan de la MCP. Por todas estas razones, nosotros proponemos la existencia de un proceso de competencia por transformación en *Streptomyces*: la MCP genera en última instancia ADN fragmentado de las células muertas (Manteca *et al.*, 2006a) el cual podría usarse por las células vivas/ esporulantes para la recombinación. En este sentido, tal y como se ha discutido arriba, mediante experimentos de transcriptómica de las fases de MI y MII, se pudo ver que había una activación de los genes relacionados con la conjugación, la recombinación y la mutagénesis en el micelio I, justo después de la MCP, lo que está de acuerdo con la hipótesis de la captación de ADN por parte de las células viables del MI que se diferencian al MII.

La búsqueda de nuevos compuestos bioactivos de interés en biomedicina se está convirtiendo en uno de los mayores retos actuales como consecuencia del preocupante incremento de las resistencias a los principales antibióticos. Dicha búsqueda se ha hecho de forma tradicional mediante el aislamiento de cepas de actinomicetos a partir de suelos de distintos orígenes, microcultivos, y análisis de la actividad mediante bioensayo (inhibición del crecimiento de bacterias tipo). Estos procesos de búsqueda de nuevos antibióticos, han sido tremendamente productivos durante la llamada “edad dorada de los antibióticos” (1940-1960), época en la que se han descubierto la mayoría de los antibióticos conocidos. En la actualidad, estos procesos son más complicados, dado que los antibióticos más comunes ya se conocen. La principal limitación de la búsqueda de estos compuestos a partir de cepas de *Streptomyces*, era el alto número de falsos negativos: cepas descartadas como productoras, porque no se estaban diferenciando hasta la fase de producción MII. Nuestro grupo de investigación está siendo pionero en enfocar este problema mediante un proceso simple: conseguir que las bacterias procedentes del ambiente natural se desarrollen hasta la fase de MII productiva antes de realizar el análisis.

En resumen, en esta tesis doctoral hemos definido por primera vez los procesos de desarrollo y diferenciación de *Streptomyces* en cultivos líquidos identificando claramente el MII como el micelio productor de antibióticos. Además, hemos trabajado en el análisis de las diferencias en los proteomas y transcriptomas de *S. coelicolor* en las distintas fases de desarrollo en cultivos sólidos y líquidos (MI, MII,

MCP). Los resultados han corroborado el cambio del metabolismo primario al secundario entre el MI compartimentalizado y el MII multinucleado, tanto en sólido como líquido, demostrando que el MI es el auténtico micelio vegetativo de *Streptomyces* y el MII (tanto sustrato como aéreo) son el micelio reproductivo productor de antibióticos y destinado a esporular. Además, se han identificado numerosas proteínas y genes reguladores de función desconocida (reguladores transcripcionales, quinasas, etc.) cuya caracterización sin duda será la clave para entender los mecanismos que activan la diferenciación del MII, y lo que es más importante, los mecanismos que activan la producción de metabolitos secundarios en este MII. En definitiva, hemos creado una base de datos con las proteínas y genes diferencialmente expresados durante la diferenciación de *Streptomyces* cuya caracterización será la clave para encontrar las rutas biomoleculares controlando las fases preesporulantes de la diferenciación (MI, MII, MCP), lo que a su vez permitirá entender, y optimizar las fermentaciones y los procesos de búsqueda de nuevos metabolitos secundarios a partir de *Streptomyces*. Todos estos experimentos se encuentran reflejados en el proyecto de investigación en el que está implicado nuestro grupo de investigación (ERC Starting Grant, Strp-differentiation 280304; 2012-2016), y durante esta tesis doctoral hemos empezado a desarrollar este trabajo, realizando mutagénesis y análisis fenotípicos de 26 de estos genes (Tabla 1), obteniendo resultados muy prometedores.

Numerosas industrias producen antibióticos mediante fermentaciones en cultivos líquidos (grandes biorreactores) de *Streptomyces*. En estas condiciones, la mayoría de los autores asumían que no había diferenciación, con la excepción de las pocas especies de *Streptomyces* que esporulan en cultivos líquidos (Daza *et al.*, 1989, Kendrick y Ensig 1983). Uno de los objetivos fundamentales de esta tesis fue extender el nuevo modelo de desarrollo desarrollado por nuestro grupo de investigación en cultivos sólidos esporulantes del género *Streptomyces* (Manteca *et al.*, 2005a, 2005b, 2006a, 2006b) a cultivos líquidos no esporulantes, prestando especial atención a la relación entre diferenciación y producción de antibiótico. Con este fin, se analizó el ciclo de desarrollo de *S. coelicolor*, la especie más estudiada de estreptomicetos. Al igual que sucedía en cultivos sólidos, en medios líquidos también existe un micelio

joven compartimentalizado (micelio I), que sufre un proceso de muerte tras el cual hay una fase de detención del crecimiento que a su vez precede al surgimiento y diferenciación de un micelio multinucleado (micelio II). La muerte del micelio I es un proceso gradual que empieza momentos antes de la detención transitoria del crecimiento (apartado III.3.1a) y alcanza su máximo durante esta fase, la cual también se ha detectado en cultivos sólidos siendo condición necesaria para el surgimiento del micelio aéreo (Chater, 1993; Granozzi *et al.*, 1990; Hopwood, 1999; Chater, 2001; Manteca *et al.*, 2005b). Además, se ha podido demostrar la correlación entre el desarrollo del micelio II y la producción de antibióticos (apartado III.3.1e). Las principales diferencias entre cultivos sólidos y líquidos residen pues en la ausencia, en el caso de cultivos líquidos, de la formación de cubiertas hidrofóbicas (micelio aéreo) y esporulación (Fig.VI.1). Esta es la primera vez que se ha podido demostrar la existencia de diferenciación en cultivos líquidos de *Streptomyces*, y lo que es más importante, la primera vez que se ha podido identificar el micelio productor de metabolitos secundarios (MII).

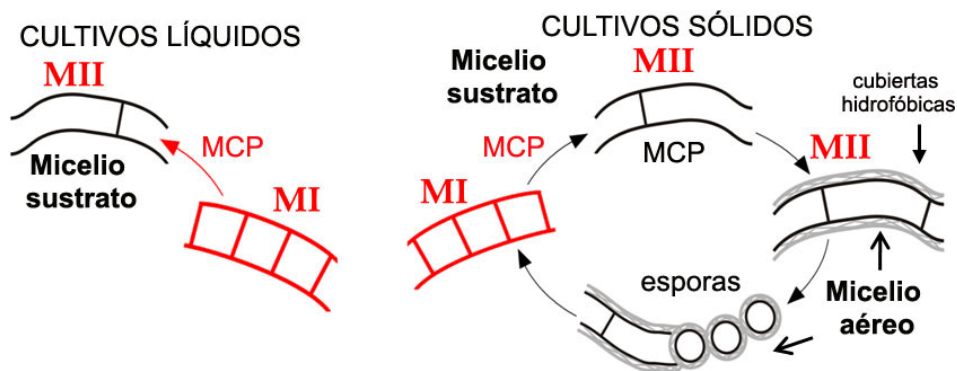


Fig.VI.1. Comparación del ciclo de desarrollo de *Streptomyces* en cultivos líquidos y sólidos. En rojo se muestran las nuevas fases descritas por nuestro grupo de investigación. MCP; muerte celular programada.

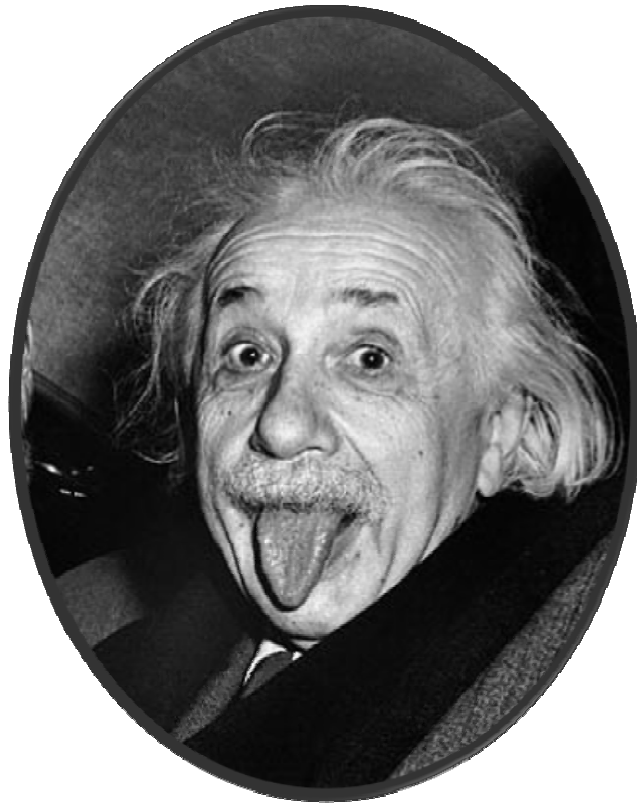
La carencia de un modelo de desarrollo que explicara la diferenciación en cultivos líquidos, hizo que la optimización de los procesos de fermentación se haya realizado tradicionalmente de forma empírica, existiendo grandes problemas de reproducibilidad. La mayoría de los grupos de investigación que trabajan en la optimización de la producción de metabolitos secundarios a partir de cepas de *Streptomyces*, lo están haciendo mediante mutagénesis al azar o dirigida. Existen muy pocos grupos que trabajen en la optimización de las fermentaciones desde el punto de vista del ciclo de desarrollo del microorganismo: la optimización del desarrollo del MII productor. ~~Estos~~ resultados tienen ~~como~~ aplicación biotecnológica ~~monitorizar y~~ optimizar los procesos de producción de antibióticos, incluyendo la búsqueda de nuevas cepas productoras a partir de muestras medioambientales, un aspecto crítico en biomedicina como consecuencia del alarmante incremento de las resistencias a los antimicrobianos. En cuanto a la aplicación del nuevo ciclo de desarrollo al estudio de las fermentaciones de cepas de *Streptomyces* de interés industrial, hemos trabajado con dos especies: *Streptomyces cattleya* y *Streptomyces tsukubaensis* productoras del antibiótico tienamicina y el inmunosupresor tacrolimus respectivamente. La tienamicina es un antibiótico β -lactámico con un gran poder bactericida y un espectro de acción muy amplio, por lo que puede usarse en monoterapia, siendo muy útil para tratar infecciones hospitalarias. Debido a su inestabilidad, la tienamicina, tiene que modificarse químicamente para que pueda ser usada en clínica, convirtiéndose en imipenem y/o meropenem (Verbist *et al.*, 1981; Horadam *et al.*, 1980; Shadomy *et al.*, 1981). Actualmente la tienamicina se está produciendo mediante síntesis química, debido a que las bajas concentraciones a las que la produce *Streptomyces* no pueden competir económicamente con los procesos de síntesis química. Los niveles de producción de la cepa salvaje de *S. cattleya* están en concentraciones de 0,8-1 mg/l (Kahan *et al.*, 1979, Rodríguez *et al.*, 2008). En este trabajo, mediante la modificación de las condiciones de cultivo, usando como guía la optimización de los procesos de muerte celular programada y surgimiento del micelio II, hemos llegado a niveles de producción de 2,5 mg/l, es decir, hemos conseguido triplicar la producción de la cepa salvaje. Aunque estos niveles de producción siguen sin ser suficientes para competir con los procesos de síntesis química de tienamicina, constituyen la prueba palpable de

Eliminado: Nuestros

Eliminado: una

Eliminado: clara para

que el ciclo de desarrollo descrito en este trabajo es aplicable a especies de estreptomicetos de interés industrial. También hemos estudiado las fermentaciones de *S. tsukubaensis*, productor de tacrolimus, un importante inmunosupresor utilizado en clínica. Al igual que en el resto de las cepas analizadas, la producción de tacrolimus sólo se producía tras la diferenciación del MII productor, pero en este caso, nos encontramos con la existencia de requerimientos nutricionales: el tacrolimus sólo se producía en medios de cultivo concretos. En consecuencia, la producción de metabolitos secundarios depende, en algunas ocasiones, además de la formación del MII, de condiciones nutricionales específicas. Por otro lado, y siguiendo con las aplicación industrial del ciclo de desarrollo de *Streptomyces* a la monitorización de los procesos de diferenciación en las fermentaciones industriales, de forma rápida, sencilla y objetiva, hemos desarrollado un protocolo que consistía en la tinción de los cultivos mediante los colorantes de viabilidad SYTO9 y ioduro de propidio, seguido de su cuantificación mediante el uso de un fluorímetro (Yagüe *et al.*, 2010). Los valores de abundancia relativa (cociente de intensidades SYTO9/IP) suponen un índice objetivo que permite conocer el estado de diferenciación de los cultivos sin necesidad de disponer de un microscopio de fluorescencia o confocal, y sin tener un conocimiento profundo del desarrollo de *Streptomyces*. En el caso de *S. coelicolor*, el desarrollo del MII y la producción de antibiótico sólo sucedían con valores menores de 1 (Fig.III.31b). En la actualidad estamos trabajando en un diseño experimental que permita acoplar las tinciones y medidas fluorimétricas a un biorreactor de forma automatizada y en línea, con el objetivo último de implantar este índice en la monitorización de las fermentaciones industriales.



Albert Einstein

V. CONCLUSIONES

|

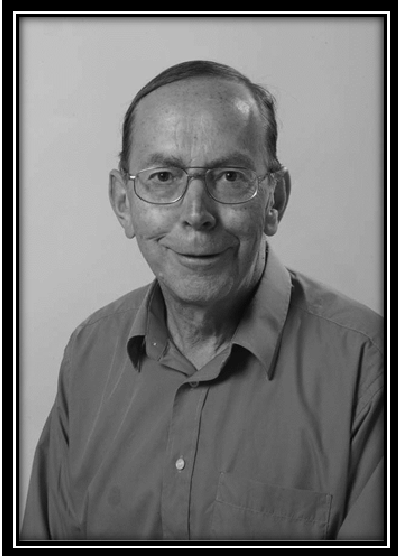
← Con formato: Centrado

V. CONCLUSIONES

1. Experimentos de transcriptómica de los dos tipos de micelio (MI compartimentalizado y MII multinucleado) revelan que el transcriptoma del MI está enriquecido en genes de metabolismo primario, mientras que el MII lo está en genes de metabolismo secundario. También se han encontrado genes reguladores de función desconocida diferencialmente expresados durante el desarrollo.
2. Experimentos de proteómica y transcriptómica dedicados al estudio de los procesos de muerte celular programada revelan que el proceso implica la activación de genes y proteínas específicos que incluyen ORFs relacionadas con la transformación, conjugación, recombinación, estrés, división celular, esporulación, detención del crecimiento, y regulación transcripcional.
3. Hemos comenzado a analizar la función biológica de los genes y proteínas identificados en los experimentos de biología de sistemas, mediante mutagénesis. Actualmente tenemos un total de 26 mutantes, la mayoría de los cuales tienen fenotipos claros relacionados con el adelanto/retraso del crecimiento, la producción de metabolitos secundarios y la esporulación. La caracterización detallada de las funciones biológicas de éstos y otros genes, así como cual es su interacción en la regulación de la diferenciación de *Streptomyces* (MI/MII, MCP) serán nuestro objeto de investigación durante los próximos años.
4. *Streptomyces* se diferencia en cultivos líquidos no esporulantes de forma similar a como lo hace en cultivos sólidos esporulantes: un micelio vegetativo joven compartimentalizado (MI) sufre procesos de MCP y se diferencia a un micelio multinucleado (MII) que es el micelio diferenciado responsable de la producción de metabolitos secundarios.

5. El conocimiento del ciclo de desarrollo en cultivos líquidos de *Streptomyces* es la clave para entender y en su caso optimizar los procesos de producción de metabolitos secundarios en cultivos líquidos de *S. coelicolor* y otras cepas de interés industrial.

6. En relación a la muerte celular programada, como evento clave para la diferenciación, en esta tesis doctoral se ha descrito un nuevo y sencillo método de monitorización “*on line*” de las fermentaciones, basado en la asociación de los colorantes vitales; yoduro de propidio y SYTO9, con medidas fluorimétricas. El cociente de las intensidades de fluorescencia en cada fase del ciclo nos da un índice fiable del estado de diferenciación en el que se encuentra el cultivo.



David Hopwood



Mervin Bibb

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aravind, L., V. M. Dixit, *et al.* (1999). "The domains of death: evolution of the apoptosis machinery." *Trends Biochem Sci* **24**(2): 47-53.
- Aravind, L., V. M. Dixit, *et al.* (2001). "Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons." *Science* **291**(5507): 1279-1284.
- Arndt, C., M. C. Cruz, *et al.* (1999). "Secretion of FK506/FK520 and rapamycin by *Streptomyces* inhibits the growth of competing *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*." *Microbiology* **145** (Pt 8): 1989-2000.
- Bakal, C. J. and J. E. Davies (2000). "No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria." *Trends Cell Biol* **10**(1): 32-38.
- Bao, K. and S. N. Cohen (2001). "Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*." *Genes Dev* **15**(12): 1518-1527.
- Bao, K. and S. N. Cohen (2004). "Reverse transcriptase activity innate to DNA polymerase I and DNA topoisomerase I proteins of *Streptomyces* telomere complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(40): 14361-14366.
- Bentley, S. D., K. F. Chater, *et al.* (2002). "Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Nature* **417**(6885): 141-147.
- Berka, R. M., J. Hahn, *et al.* (2002). "Microarray analysis of the *Bacillus subtilis* K-state: genome-wide expression changes dependent on ComK." *Mol Microbiol* **43**(5): 1331-1345.
- Bogosian, G. and E. V. Bourneuf (2001). "A matter of bacterial life and death." *EMBO Rep* **2**(9): 770-774.
- Burton, C. J. (1956). "Study of the condition and the mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA." *Biochem. J.* **62**, 315-323.
- Bouček-Mechiche, K., L. Gardan, *et al.* (2006). "*Streptomyces turgidiscabies* and *Streptomyces reticuliscabiei*: one genomic species, two pathogenic groups." *Int J Syst Evol Microbiol* **56**(Pt 12): 2771-2776.
- Bouček-Mechiche, K., L. Gardan, *et al.* (2000). "DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab." *Int J Syst Evol Microbiol* **50** Pt 1: 91-99.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Burke, J., D. Schneider, *et al.* (2001). "Generalized transduction in *Streptomyces coelicolor*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6289-6294.
- Cal, S., J. F. Aparicio, *et al.* (1995). "A novel exocyttoplasmic endonuclease from *Streptomyces antibioticus*." *Biochem J* **306** (Pt 1): 93-100.
- Chandra, G. and K. F. Chater (2008). "Evolutionary flux of potentially bldA-dependent *Streptomyces* genes containing the rare leucine codon TTA." *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**(1): 111-126.
- Chang, P. C. and S. N. Cohen (1994). "Bidirectional replication from an internal origin in a linear *streptomyces* plasmid." *Science* **265**(5174): 952-954.

- Chater, K.F., in: Losick, R. (1984). "Morphological and Physiological Differentiation in *Streptomyces* in Microbial Development". In Shapiro, L. (Eds.). (Monographic Series 16), Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, pp. 89–115.
- Chater, K. F. (1993). "Genetics of differentiation in *Streptomyces*." Annu Rev Microbiol **47**: 685-713.
- Chater, K. F. (2001). "Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex?" Curr Opin Microbiol **4**(6): 667-673.
- Chen, C. W., C. H. Huang, *et al.* (2002). "Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces chromosomes*." Trends Genet **18**(10): 522-529.
- Chou, A. C. and J. E. Wilson (1975). "Hexokinase of rat brain." Methods Enzymol **42**: 20-25.
- Claessen, D., W. de Jong, *et al.* (2006). "Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky!" Trends Microbiol **14**(7): 313-319.
- Claverys, J. P., B. Martin, *et al.* (2007). "Competence-induced fratricide in streptococci." Mol Microbiol **64**(6): 1423-1433.
- Cross, T. (1981). "Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats." J Appl Bacteriol **50**(3): 397-423.
- Daza A, Martín JF, *et al.* (1989). "Sporulation of several species of *Streptomyces* in submerged cultures after nutritional downshift." J Gen Microbiol **135**(9):2483-91
- de Jong, W., A. Manteca, *et al.* (2009). "NepA is a structural cell wall protein involved in maintenance of spore dormancy in *Streptomyces coelicolor*." Mol Microbiol **71**(6): 1591-1603.
- Denser C.R., Guimaraes L.M., Candida M. (2002). "Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture". Braz. J. Microbiol **33**, 17-21.
- Denser C.R., Pamboukian D, Candida M. (2004). "Production of the antitumoral retamycin during continuous fermentations of *Streptomyces olindensis*". Process Biochemistry **39**, 2249-2255.
- Doroghazi, J. R. and D. H. Buckley (2010). "Widespread homologous recombination within and between *Streptomyces species*." ISME J **4**(9): 1136-1143.
- Doull, J. L. and L. C. Vining (1989). "Culture conditions promoting dispersed growth and biphasic production of actinorhodin in shaken cultures of *Streptomyces coelicolor* A3(2)." FEMS Microbiol Lett **53**(3): 265-268.
- Duitman, E. H., D. Wyczawski, *et al.* (2007). "Novel methods for genetic transformation of natural *Bacillus subtilis* isolates used to study the regulation of the mycosubtilin and surfactin synthetases." Appl Environ Microbiol **73**(11): 3490-3496.
- Egan, S., P. Wiener, *et al.* (2001). "Phylogeny of *Streptomyces* species and evidence for horizontal transfer of entire and partial antibiotic gene clusters." Antonie Van Leeuwenhoek **79**(2): 127-133.
- Eichinger, A., H. G. Beisel, *et al.* (1999). "Crystal structure of gingipain R: an Arg-specific bacterial cysteine proteinase with a caspase-like fold." EMBO J **18**(20): 5453-5462.
- Elizarov, S. M. and V. N. Danilenko (2001). "Multiple phosphorylation of membrane-associated calcium-dependent protein serine/threonine kinase in *Streptomyces fradiae*." FEMS Microbiol Lett **202**(1): 135-138.

Eliminado:

- Fernandez, M. and J. Sanchez (2001).** "Viability staining and terminal deoxyribonucleotide transferase-mediated dUTP nick end labelling of the mycelium in submerged cultures of *Streptomyces antibioticus* ETH7451." J Microbiol Methods **47**(3): 293-298.
- Fernandez, M. and J. Sanchez (2002).** "Nuclease activities and cell death processes associated with the development of surface cultures of *Streptomyces antibioticus* ETH 7451." Microbiology **148**(Pt 2): 405-412.
- Fernandez-Martinez, L. T., R. Del Sol, et al. (2011).** "A transposon insertion single-gene knockout library and new ordered cosmid library for the model organism *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Antonie Van Leeuwenhoek **99**(3): 515-522.
- Fishov, I. and C. L. Woldringh (1999).** "Visualization of membrane domains in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **32**(6): 1166-1172.
- Flardh, K. and M. J. Buttner (2009).** "*Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium." Nat Rev Microbiol **7**(1): 36-49.
- Gadgil M, Lian W, et al. (2005).** "An analysis of the use of genomic DNA as a universal reference in two channel DNA microarrays." BMC Genomics **8**:66.
- Garcia-Vallve, S., E. Guzman, et al. (2003).** "HGT-DB: a database of putative horizontally transferred genes in prokaryotic complete genomes." Nucleic Acids Res **31**(1): 187-189.
- Garrity GM, Lilburn TG, et al. (2007).** Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea. Part 10 - The Bacteria:Phylum"Actinobacteria": Class Actinobacteria. Release 7.7: 399-539.
- Gonzalez J. A. (2003).** "Producción del antibiótico β -lactámico Tienamicina por *S. cattleya*". Tesis doctoral Universidad de Oviedo.
- Gonzalez-Pastor, J. E. (2011).** "Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*." FEMS Microbiol Rev **35**(3): 415-424.
- Goranovic, D., G. Kosec, et al. (2010).** "Origin of the allyl group in FK506 biosynthesis." J Biol Chem **285**(19): 14292-14300.
- Goto, T., T. Kino, et al. (1987).** "Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*." Transplant Proc **19**(5 Suppl 6): 4-8.
- Granozzi, C., R. Billelta, et al. (1990).** "A breakdown in macromolecular synthesis preceding differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J Gen Microbiol **136**(4): 713-716.
- Grantcharova, N., W. Ubhayasekera, et al. (2003).** "A missense mutation in *ftsZ* differentially affects vegetative and developmentally controlled cell division in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Mol Microbiol **47**(3): 645-656.
- Gronewold, T. M. and D. Kaiser (2001).** "The act operon controls the level and time of C-signal production for *Myxococcus xanthus* development." Mol Microbiol **40**(3): 744-756.
- Guiral, S., T. J. Mitchell, et al. (2005).** "Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8710-8715.
- Hagedorn, C. (1976).** "Influences of soil acidity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils." Appl Environ Microbiol **32**(3): 368-375.

- Haugland, R.P. (2002).** Nucleotic acid detection and genomics technology. In Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Chapter 8. Ninth Edition. J. Gregory, editor. Molecular Probes, Inc. Eugene, OR.
- Henderson, G., P. Krygsmán, et al. (1987).** "Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*." J Bacteriol **169**(8): 3778-3784.
- Hesketh A, Bucca G, et al. (2007).** "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.
- Hobbs G., Frazer C.M., et al. (1989).** "Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture." Applied Microbiology and Biotechnology. **31**, 272-277.
- Hochman, A. (1997).** "Programmed cell death in prokaryotes." Crit Rev Microbiol **23**(3): 207-214.
- Hopwood, D. A., K. F. Chater, et al. (1995).** "Genetics of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), a model streptomycete." Biotechnology **28**: 65-102.
- Hopwood, D. A. (2007).** "*Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers". New York, Oxford University Press.
- Horadam, V. W., J. D. Smilack, et al. (1980).** "In vitro activity of N-formimidoyl thienamycin (MK0787), a crystalline derivative of thienamycin." Antimicrob Agents Chemother **18**(4): 557-561.
- Ikeda, H., J. Ishikawa, et al. (2003).** "Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*." Nat Biotechnol **21**(5): 526-531.
- Jakimowicz, D., J. Majka, et al. (1998).** "Structural elements of the *Streptomyces* oriC region and their interactions with the DnaA protein." Microbiology **144 (Pt 5)**: 1281-1290.
- Jayapal, K. P., R. J. Philp, et al. (2008).** "Uncovering genes with divergent mRNA-protein dynamics in *Streptomyces coelicolor*." PLoS One **3**(5): e2097.
- Jiménez, A., M. Zalacaín, et al. (1987).** "Clonación y análisis de genes implicados en la biosíntesis de antibióticos." *Nuevas tendencias. Ingeniería genética* (Renard, J. y Vicente, M., ed.): 496-502.
- Jonsbu, E., M. McIntyre, et al. (2002).** "The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*." J Biotechnol **95**(2): 133-144.
- Kahan, J. S., F. M. Kahan, et al. (1979).** "Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties." J Antibiot (Tokyo) **32**(1): 1-12.
- Kawase, T., A. Saito, et al. (2004).** "Distribution and phylogenetic analysis of family 19 chitinases in Actinobacteria." Appl Environ Microbiol **70**(2): 1135-1144.
- Kwak, J. and K. E. Kendrick (1996).** "Bald mutants of *Streptomyces griseus* that prematurely undergo key events of sporulation." J Bacteriol **178**(15): 4643-4650.
- Kelemen, G. H., K. A. Plaskitt, et al. (1995).** "Deletion of DNA lying close to the glkA locus induces ectopic sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Mol Microbiol **17**(2): 221-230.

- Kendrick KE, Ensign JC. (1983).** "Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture." J Bacteriol **155**(1):357-66.
- Kieser, H. M., T. Kieser, et al. (1992).** "A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome." J Bacteriol **174**(17): 5496-5507.
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. (2000).** "Practical *Streptomyces* Genetics". Norwich, UK.: The John Innes Foundation.
- Kim, D. W., K. F. Chater, et al. (2005).** "Effects of growth phase and the developmentally significant bldA-specified tRNA on the membrane-associated proteome of *Streptomyces coelicolor*." Microbiology **151**(Pt 8): 2707-2720.
- Kim, Y. M. and J. H. Kim (2004).** "Formation and dispersion of mycelial pellets of *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J Microbiol **42**(1): 64-67.
- Kino, T. and T. Goto (1993).** "Discovery of FK-506 and update." Ann N Y Acad Sci **685**: 13-21.
- Kino, T., H. Hatanaka, et al. (1987).** "FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro." J Antibiot (Tokyo) **40**(9): 1256-1265.
- Koonin, E. V. and L. Aravind (2002).** "Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection." Cell Death Differ **9**(4): 394-404.
- Laemmli, U. K. (1970).** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Leblond, P., F. X. Francou, et al. (1990).** "Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of *Streptomyces ambofaciens* strains." FEMS Microbiol Lett **60**(1-2): 79-88.
- Leblond, P., M. Redenbach, et al. (1993).** "Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J Bacteriol **175**(11): 3422-3429.
- Lewis RA, Shahi SK, et al. (2011).** "Genome-wide transcriptomic analysis of the response to nitrogen limitation in *Streptomyces coelicolor* A3(2)". BMC Res Notes **23**;4:78.
- Lezhava, A., T. Mizukami, et al. (1995).** "Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*." J Bacteriol **177**(22): 6492-6498.
- Lilburn, T. G. and G. M. Garrity (2004).** "Exploring prokaryotic taxonomy." Int J Syst Evol Microbiol **54**(Pt 1): 7-13.
- Lin, Y. S., H. M. Kieser, et al. (1993).** "The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear." Mol Microbiol **10**(5): 923-933.
- Liu WT, Karavolos MH, et al. (2007).** "Role of the universal stress protein UspA of *Salmonella* in growth arrest, stress and virulence". Microb Pathog **42**: 2-10.
- Lloyd, A. B. (1969).** "Dispersal of Streptomyces in air." J Gen Microbiol **57**(1): 35-40.
- Long, C. M., M. J. Virolle, et al. (1987).** "alpha-Amylase gene of *Streptomyces limosus*: nucleotide sequence, expression motifs, and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate alpha-amylases." J Bacteriol **169**(12): 5745-5754.
- Manteca, A., T. Kamphausen, et al. (2004).** "Cloning and characterization of a *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 cyclophilin related to Gram negative bacteria cyclophilins." FEBS Lett **572**(1-3): 19-26.

- Manteca, A., M. Fernandez, et al. (2005a).** "A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*." Microbiology **151**(Pt 11): 3689-3697.
- Manteca, A., M. Fernandez, et al. (2005b).** "Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves." BMC Microbiol **5**: 51.
- Manteca, A., M. Fernandez, et al. (2006a).** "Cytological and biochemical evidence for an early cell dismantling event in surface cultures of *Streptomyces antibioticus*." Res Microbiol **157**(2): 143-152.
- Manteca, A., U. Mäder, et al. (2006b).** "A proteomic analysis of *Streptomyces coelicolor* programmed cell death." Proteomics **6**(22): 6008-6022.
- Manteca, A., A. I. Pelaez, et al. (2006c).** "Actinobacteria cyclophilins: phylogenetic relationships and description of new class- and order-specific paralogues." J Mol Evol **63**(6): 719-732.
- Manteca, A., D. Claessen, et al. (2007).** "Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event." FEMS Microbiol Lett **274**(1): 118-125.
- Manteca, A., A. I. Pelaez, et al. (2008a).** "A rare case of lung coinfection by *Streptomyces cinereoruber* and *Haemophilus influenzae* in a patient with severe chronic obstructive pulmonary disease: characterization at species level using molecular techniques." Diagn Microbiol Infect Dis **60**(3): 307-311.
- Manteca, A., R. Alvarez, et al. (2008b).** "Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*." Appl Environ Microbiol **74**(12): 3877-3886.
- Manteca, A., A. I. Pelaez, et al. (2009a).** "A rare case of silicone mammary implant infection by *Streptomyces spp.* in a patient with breast reconstruction after mastectomy: taxonomic characterization using molecular techniques." Diagn Microbiol Infect Dis **63**(4): 390-393.
- Manteca, A. and J. Sanchez (2009b).** "*Streptomyces* development in colonies and soils." Appl Environ Microbiol **75**(9): 2920-2924.
- Manteca, A., J. Sanchez, et al. (2010a).** "Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* development demonstrates that onset of secondary metabolism coincides with hypha differentiation." Mol Cell Proteomics **9**(7): 1423-1436.
- Manteca, A., H. R. Jung, et al. (2010b).** "Quantitative proteome analysis of *Streptomyces coelicolor* nonsporulating liquid cultures demonstrates a complex differentiation process comparable to that occurring in sporulating solid cultures." J Proteome Res **9**(9): 4801-4811.
- Martin, B., M. Prudhomme, et al. (2000).** "Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*." Mol Microbiol **38**(4): 867-878.
- Martínez-Castro, M. (2010).** "Control por fosfato en la biosíntesis del inmunosupresor tacrolimus en dos especies del género *Streptomyces*". Tesis doctoral Universidad de León.

- Matsumoto, A., S. K. Hong, et al. (1994).** "Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase." *Gene* **146**(1): 47-56.
- Mendez, C., A. F. Brana, et al. (1985).** "Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*." *Can J Microbiol* **31**(5): 446-450.
- Metsa-Ketela, M., L. Halo, et al. (2002).** "Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequence analysis of polyketide ketosynthase and 16S ribosomal DNA genes from various *Streptomyces* species." *Appl Environ Microbiol* **68**(9): 4472-4479.
- Miguel, E. M., Rueda B., et al. (1997).** Colony development in *Streptomyces carpinensis*: a streptomycete with substrate mycelium spores. *FEMS microbiol lett* **157**:103-107.
- Miguel, E. M., C. Hardisson, et al. (1999).** "Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote." *J Cell Biol* **145**(3): 515-525.
- Morosoli, R., J. L. Bertrand, et al. (1986).** "Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*." *Biochem J* **239**(3): 587-592.
- Musialowski, M. S., F. Flett, et al. (1994).** "Functional evidence that the principal DNA replication origin of the *Streptomyces coelicolor* chromosome is close to the dnaA-gyrB region." *J Bacteriol* **176**(16): 5123-5125.
- Nadvornik, R., T. Vomastek, et al. (1999).** "Pkg2, a novel transmembrane protein Ser/Thr kinase of *Streptomyces granaticolor*." *J Bacteriol* **181**(1): 15-23.
- Nicholson, D. W. and N. A. Thornberry (1997).** Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci. England*. **22**: 299-306.
- Nicieza, R. G., J. Huergo, et al. (1999).** "Purification, characterization, and role of nucleases and serine proteases in *Streptomyces* differentiation. Analogies with the biochemical processes described in late steps of eukaryotic apoptosis." *J Biol Chem* **274**(29): 20366-20375.
- Ning, S. B., H. L. Guo, et al. (2002).** "Salt stress induces programmed cell death in prokaryotic organism *Anabaena*." *J Appl Microbiol* **93**(1): 15-28.
- Nishio, Y., Y. Nakamura, et al. (2004).** "Evolutionary process of amino acid biosynthesis in *Corynebacterium* at the whole genome level." *Mol Biol Evol* **21**(9): 1683-1691.
- Noens, E. E., V. Mersinias, et al. (2007).** "Loss of the controlled localization of growth stage-specific cell-wall synthesis pleiotropically affects developmental gene expression in an ssgA mutant of *Streptomyces coelicolor*." *Mol Microbiol* **64**(5): 1244-1259.
- Nordmann, P. and L. Poirel (2002).** "Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes." *Clin Microbiol Infect* **8**(6): 321-331.
- Nothaft, H., S. Rigali, et al. (2010).** "The permease gene nagE2 is the key to N-acetylglucosamine sensing and utilization in *Streptomyces coelicolor* and is subject to multi-level control." *Mol Microbiol* **75**(5): 1133-1144.
- Novella, I. S., C. Barbes, et al. (1992).** "Sporulation of *Streptomyces antibioticus* ETHZ 7451 in submerged culture." *Can J Microbiol* **38**(8): 769-773.

Con formato: Sangría:
Izquierda: 0 pto, Sangría
francesa: 2,95 ch, Primera
línea: -2,95 ch

Con formato: Fuente: Negrita

Con formato: Sangría:
Izquierda: 0 pto, Sangría
francesa: 2,95 ch, Primera
línea: -2,95 ch

Con formato: Fuente: Negrita

Con formato: Fuente: Negrita

Con formato: Fuente: Negrita

Con formato: Español
(España - alfab. internacional)

Con formato: Fuente: Negrita

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Inglés (Estados
Unidos)

Con formato: Fuente:
Negrita, Inglés (Estados
Unidos)

Con formato: Inglés (Estados
Unidos)

Con formato: Fuente: Sin
Cursiva, Subrayado

Eliminado: ¶

Con formato: Inglés (Reino
Unido)

Con formato: Español
(España - alfab. internacional)

Con formato: Sangría:
Izquierda: 0 pto, Sangría
francesa: 2,95 ch, Primera
línea: -2,95 ch

- Ogura, M., H. Hashimoto, et al. (2002).** "Med, a cell-surface localized protein regulating a competence transcription factor gene, comK, in *Bacillus subtilis*." *Biosci Biotechnol Biochem* **66**(4): 892-896.
- Ohnishi, Y., J. W. Seo, et al. (2002).** "Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*." *FEMS Microbiol Lett* **216**(1): 1-7.
- Ohnishi, Y., J. Ishikawa, et al. (2008).** "Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350." *J Bacteriol* **190**(11): 4050-4060.
- Ohnuki, T., T. Imanaka, et al. (1985).** "Self-cloning in *Streptomyces griseus* of an str gene cluster for streptomycin biosynthesis and streptomycin resistance." *J Bacteriol* **164**(1): 85-94.
- Omura, S., H. Ikeda, et al. (2001).** "Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(21): 12215-12220.
- Paget, M. S., L. Chamberlin, et al. (1999).** "Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaE is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *J Bacteriol* **181**(1): 204-211.
- Pandza, K., G. Pfalzer, et al. (1997).** "Physical mapping shows that the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome." *Microbiology* **143** (Pt 5): 1493-1501.
- Park, Y., Tamura, S., et al (1997).** "Micelial pellet intrastucture visualization and viability prediction in a culture of *Streptomyces fradiae* using confocal scanning laser microscopy." *Journal of fermentation and bioengineering* **84**, 483-486.
- Petrickova, K. and M. Petricek (2003).** "Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*: variations on a common theme." *Microbiology* **149**(Pt 7): 1609-1621.
- Quintana, E. T., K. Wierzbicka, et al. (2008).** "*Streptomyces sudanensis* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma." *Antonie Van Leeuwenhoek* **93**(3): 305-313.
- Quiros, L. M., C. Hardisson, et al. (1986).** "Isolation and properties of *Streptomyces* spore membranes." *J Bacteriol* **165**(3): 923-928.
- Redenbach, M., H. M. Kieser, et al. (1996).** "A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome." *Mol Microbiol* **21**(1): 77-96.
- Robinson, M., E. Lewis, et al. (1981).** "Occurrence of reiterated DNA sequences in strains of *Streptomyces* produced by an interspecific protoplast fusion." *Mol Gen Genet* **182**(2): 336-340.
- Rodriguez, M., L. E. Nunez, et al. (2008).** "Identification of transcriptional activators for thienamycin and cephamycin C biosynthetic genes within the thienamycin gene cluster from *Streptomyces cattleya*." *Mol Microbiol* **69**(3): 633-645.
- Rodriguez-Garcia, A., C. Barreiro, et al. (2007).** "Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a DeltaphoP mutant." *Proteomics* **7**(14): 2410-2429.

Con formato: Español (España - alfab. internacional)

Con formato: Sangría:
Izquierda: 0 pto, Sangría francesa: 2,95 ch, Primera línea: -2,95 chCon formato: Sangría:
Izquierda: 0 pto, Sangría francesa: 2,95 ch, Primera línea: -2,95 ch

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Sangría:
Izquierda: 0 pto, Sangría francesa: 2,95 ch, Primera línea: -2,95 ch

Eliminado: ¶

- Rozas, D., S. Gullon, *et al.* (2012). "A novel two-component system involved in the transition to secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*." PLoS One **7**(2): e31760.
- Sarra, M., C. Casas, *et al.* (1997). "Continuous production of a hybrid antibiotic by *Streptomyces lividans* TK21 pellets in a three-phase fluidized-bed bioreactor." Biotechnol Bioeng **53**(6): 601-610.
- Sambrook J, Russell DW. (2001). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York,: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Schena, M., D. Shalon, *et al.* (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." Science **270**(5235): 467-470.
- Schneider, N. C. (1957). "Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis." Meth Enzimol **3**, 680-689.
- Schultz, D., P. G. Wolynes, *et al.* (2009). "Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(50): 21027-21034.
- Setoyama, D., R. Ito, *et al.* (2011). "Molecular actions of *Escherichia coli* MutT for control of spontaneous mutagenesis." Mutat Res **707**(1-2): 9-14.
- Shadomy, S. and R. S. May (1981). "N-formimidoyl thienamycin (MK0787): in vitro study." Antimicrob Agents Chemother **19**(1): 201-204.
- Shrempf, H. (1985). "Genetic instability: amplification, deletion and rearrangement within *Streptomyces* DNA." Microbiology. American Society for Microbiology.
- Sogaard-Andersen, L. and Z. Yang (2008). "Programmed cell death: role for MazF and MrpC in *Myxococcus* multicellular development." Curr Biol **18**(8): R337-339.
- Song, J. Y., H. Jeong, *et al.* (2010). "Draft genome sequence of *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585, a producer of diverse secondary metabolites." J Bacteriol **192**(23): 6317-6318.
- Stocks, S. M. and C. R. Thomas (2001). "Viability, strength, and fragmentation of *Saccharopolyspora erythraea* in submerged fermentation." Biotechnol Bioeng **75**(6): 702-709.
- Sun, J., G. H. Kelemen, *et al.* (1999). "Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Microbiology **145** (Pt 9): 2221-2227.
- Tohyama, H., Y. Okami, *et al.* (1987). "Nucleotide sequence of the streptomycinphosphotransferase and amidinotransferase genes from *Streptomyces griseus*." Nucleic Acids Res **15**(4): 1819-1833.
- Turlo, J., B. Gutkowska, *et al.* (2006). "Submerged cultivation of *Streptomyces tsukubaensis* in media composed of waste products of food industry." Acta Pol Pharm **63**(5): 463-465.
- Ueda, K., K. Matsuda, *et al.* (1999). "A putative regulatory element for carbon-source-dependent differentiation in *Streptomyces griseus*." Microbiology **145** (Pt 9): 2265-2271.
- Umeyama, T., P. C. Lee, *et al.* (1999). "An AfsK/AfsR system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in *Streptomyces griseus*." Microbiology **145** (Pt 9): 2281-2292.
- Vecht-Lifshitz, S. E., S. Magdassi, *et al.* (1990). "Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*." Biotechnol Bioeng **35**(9): 890-896.

- Vecht-Lifshitz, S. E., Y. Sasson, et al. (1992).** "Nikkomycin production in pellets of *Streptomyces tendae*." J Appl Bacteriol **72**(3): 195-200.
- Verbist, L. and J. Verhaegen (1981).** "In vitro activity of N-formimidoyl thienamycin in comparison with cefotaxime, moxalactam, and ceftazidime." Antimicrob Agents Chemother **19**(3): 402-406.
- Vida, T. A. and S. D. Emr (1995).** "A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast." J Cell Biol **128**(5): 779-792.
- Volff, J. N. and J. Altenbuchner (1998).** "Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome." Mol Microbiol **27**(2): 239-246.
- Waksman, S. A. and A. T. Henrici (1943).** "The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes." J Bacteriol **46**(4): 337-341.
- Wang, J. and G. S. Pettis (2010).** "The tra locus of streptomycete plasmid pIJ101 mediates efficient transfer of a circular but not a linear version of the same replicon." Microbiology **156**(Pt 9): 2723-2733.
- Wiener, P., S. Egan, et al. (1998).** "Evidence for transfer of antibiotic-resistance genes in soil populations of streptomycetes." Mol Ecol **7**(9): 1205-1216.
- Williams, S. T., M. Goodfellow, et al. (1983).** "A probability matrix for identification of some Streptomycetes." J Gen Microbiol **129**(6): 1815-1830.
- Woese, D. (1987).** "Bacterial evolution." Microbiol Rev. **51**: 221-271.
- Yagüe, P., A. Manteca, et al. (2010).** "New method for monitoring programmed cell death and differentiation in submerged *Streptomyces* cultures." Appl Environ Microbiol **76**(10): 3401-3404.
- Yang, Y. K., M. Morikawa, et al. (1996).** "Maximum virginiamycin production by optimization of cultivation conditions in batch culture with autoregulator addition." Biotechnol Bioeng **49**(4): 437-444.
- Yun SI, Yahya AR, et al. (2001).** "Peptidases affecting recombinant protein production by *Streptomyces lividans*". Can J Microbiol. Dec;47(12):1137-40.
- Zhang, C. C. (1996).** "Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases." Mol Microbiol **20**(1): 9-15.