

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Análisis molecular de una nueva poliquétido sintetasa en  
*Streptomyces antibioticus*

Memoria presentada para optar al grado de  
Doctor en Farmacia por la licenciada

**María Fernández de Heredia González-Chamarro**

**Director: Francisco Malpartida Romero**  
**Investigador Científico del CSIC**

*Lo que tiene que ser será; y aquéllo que es  
una necesidad para el que lucha, es poco más  
que una elección para el que está dispuesto.*

*Séneca*

*A Fernando*

Quiero expresar mi agradecimiento:

Al Dr. Francisco Malpartida, director de esta Tesis, por su paciencia y dedicación, a pesar de las no pocas dificultades encontradas a lo largo de estos años.

A la Dra. Margarita Lorenzo por haber aceptado ser tutora de mi Tesis.

Al Dr. Manuel Ruiz Amil, por su constante ayuda a lo largo de mi trayectoria científica.

A la Caja de Madrid por la ayuda concedida para la realización de esta Tesis.

Quiero agradecer de forma muy especial al Dr. Claudio

Fernández de Heredia, su ayuda incondicional y sus consejos;

además de ser un gran padre, es un gran maestro.

M U C H A S   G R A C I A S

A mis compañeros de laboratorio actuales y a todos aquéllos que han pasado por él. Sus charlas, sugerencias, canciones y bromas, me levantaron el ánimo en esos momentos en los que es bueno sentirse apoyada y acompañada.

Al resto de los compañeros de la Facultad de Medicina de la UAM y del Instituto de Investigaciones Biomédicas; siempre es agradable encontrarse con un saludo, una sonrisa ó una grata conversación.

A Ana, por cederme el material necesario para comenzar este trabajo.

A Rosa y Jesús por haberme ayudado en la preparación del material gráfico. A Antonio por su técnica en los montajes fotográficos.

A mis hermanos por su cariño y ayuda.



## INDICE

	página
<b>ABREVIATURAS</b>	
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
1.- CICLO BIOLOGICO DE <i>Streptomyces</i> .....	2
2.- ORGANIZACION GENICA EN <i>Streptomyces</i> .....	4
3.- METABOLISMO EN <i>Streptomyces</i> .....	6
4.- POLIQUETIDOS	
4.1.- Características.....	9
4.2.- Biosíntesis de poliquétidos	
4.2.1.- Análisis bioquímico.....	12
4.2.2.- Análisis genético.....	15
5.- REGULACION DE LA EXPRESION DE GENES DE BIOSINTESIS DE ANTIBIOTICOS EN <i>Streptomyces</i> .....	18
6.- APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS: ANTIBIOTICOS HIBRIDOS.....	19
7.- ANTECEDENTES DEL TRABAJO.....	21
<b>OBJETIVOS</b> .....	23
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	
1.- MICROORGANISMOS.....	24
2.- PLASMIDOS Y FAGOS	
3.- PRODUCTOS QUIMICOS	
4.- PRODUCTOS RADIATIVOS	
5.- ENZIMAS	
6.- MEDIOS DE CULTIVO	
6.1.- <i>Escherichia coli</i>	
6.2.- <i>Streptomyces</i> .....	28
7.- SOLUCIONES Y TAMPONES.....	29
8.- OBTENCION DE DNA	
8.1.- Preparación de DNA cromosómico de <i>Streptomyces</i> .....	30
8.2.- Minipreparaciones de plásmidos tanto de <i>Streptomyces</i> como de <i>Escherichia coli</i> .....	31
8.3.- Preparación de DNA plasmídico en gradientes de densidad de ClCs.....	32

8.4.- Preparación de DNA de fagos de <i>Streptomyces</i>	
8.5.- Extracción de DNA de colifagos:	
8.5.1.- Derivados del fago lambda.....	33
8.5.2.- Derivados del fago M13. Cadena doble y cadena sencilla.....	34
9.- MANIPULACION DE ACIDOS NUCLEICOS	
9.1.- Digestión enzimática del DNA.....	35
9.2.- Defosforilación de extremos 5' de DNA	
9.3.- Relleno de extremos cohesivos de DNA	
9.4.- Ligación de fragmentos de DNA con extremos romos y cohesivos	
9.5.- Digestión de DNA con Exonucleasa III.....	36
9.6.- Electroforesis en geles de agarosa	
9.7.- Electroforesis en geles de acrilamida	
9.8.- Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.....	37
9.9.- Preparación de sondas radiactivas de DNA	
9.10.- Transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa e hibridación de ácidos nucleicos.....	38
9.11.- Secuenciación del DNA.....	39
9.12.- Fraccionamiento en gradiente de sacarosa.....	40
9.13.- Empaquetamiento "in vitro"	
10.- CONSERVACION Y SELECCION DE CEPAS	
11.- PREPARACION DE ORGANISMOS Y FAGOS	
11.1.- <i>Streptomyces</i> .....	41
11.1.1.- Suspensión de esporas	
11.1.2.- Preparación de micelio.....	42
11.1.3.- Preparación de protoplastos	
11.1.4.- Conservación de actinofagos	
11.2.- <i>Escherichia coli</i> .....	43
11.2.1.- Preparación de células competentes	
11.2.2.- Preparación de células sensibles	
11.2.3.- Conservación de colifagos	
12.- TRANSFORMACION GENICA	
12.1.- <i>Streptomyces</i> .....	44

12.2.- <i>Escherichia coli</i>	
13.- TRANSFECCION GENICA	
13.1.- <i>Streptomyces</i>	
13.1.1.- Obtención de lisógenos.....	45
13.1.2.- Preparación de liposomas.....	46
13.2.- <i>Escherichia coli</i>	
14.- CONJUGACION ENTRE CEPAS DE <i>Streptomyces</i> .....	47
15.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLOGICA	
16.- EXTRACCION DE SUSTANCIAS DERIVADAS DE ISOCROMANOQUINONAS.....	48
17.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA	
18.- SOPORTE INFORMATICO.....	49

## RESULTADOS

1.- LOCALIZACION DE GENES HOMOLOGOS A LA ACTINORRODINA SINTETASA EN <i>S.antibioticus</i>	
1.1.- Construcción de una genoteca de DNA total de <i>S.antibioticus</i> .....	50
1.2.- Análisis de los clones obtenidos.....	52
1.3.- Nuevo rastreo de la genoteca de <i>S.antibioticus</i> .....	55
2.- ANALISIS MOLECULAR.	
2.1.- Secuenciación de los genes homólogos a la actinorrodina sintetasa en <i>S.antibioticus</i> .....	59
2.2.- Deducción de las funciones de las presuntas proteínas obtenidas a partir de la secuencia	
2.2.1.- ORF1 y ORF2.....	70
2.2.2.- ORF3.....	74
2.2.3.- ORF4.....	77
2.2.4.- ORF5.....	79
3.- ANALISIS GENETICO.....	83
3.1.- Complementación heteróloga en <i>S.coelicolor</i> .....	85
3.1.1.- Construcción de los clones en <i>Streptomyces</i> .....	86
3.1.2.- Transformación de <i>S.lividans</i> TK21.....	90

3.1.3.- Complementación de las mutaciones <i>act</i> en <i>S.coelicolor</i>	
3.2 .- Expresión en <i>S.lividans</i> .....	95
4.- LOCALIZACION DE SECUENCIAS ACTIVADORAS EN ZONAS ADYACENTES A LA PRESUNTA POLIQUETIDO SINTETASA EN <i>S.antibioticus</i> .....	99
<b>DISCUSION</b> .....	111
<b>CONCLUSIONES</b> .....	124
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	126



## ABREVIATURAS

AcOK	acetato potásico.
ACP	"Acyl Carrier Protein" ó proteína transportadora de acilos.
ADH	alcohol deshidrogenasa
ADP	adenina difosfato.
AGS	ácido graso sintetasa.
amp <sup>r</sup>	resistente a ampicilina.
bp	pares de bases.
BrEt	bromuro de etidio.
BSA	"Bovine serum albumin" ó albúmina de suero bovino.
cm <sup>r</sup>	resistencia a cloramfenicol.
CoA	coenzima A.
col.	colaboradores.
cpm	cuentas por minuto.
DNA	ácido desoxirribonucleico.
DO	densidad óptica.
DTT	ditiotreitól.
EDTA	ácido etilén diamino tetracético.
ExoIII	exonucleasa III.
g	gramos.
GDH	glucosa deshidrogenasa.
gra	granaticina.
Hyg	higromicina.
hyg <sup>r</sup>	resistencia a higromicina.
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.
Kb	kilobase.
6-MSA	ácido 6-metil salicílico.
6-MSAS	ácido 6-metil salicílico sintetasa.
M <sub>r</sub>	Masa relativa.
mRNA	ácido ribonucleico mensajero.
NAD	nicotinamida adenina dinucleótido.
NADP	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
neo <sup>r</sup>	resistencia a neomicina.
nm	nanometros.
ORF	"Open Reading Frame" o fase de lectura abierta.
otc	oxitetraciclina.
PKS	poliquétido sintetasa.

PVP	polivinil pirrolidona.
RDH	ribitol deshidrogenasa.
RNA	ácido ribonucleico.
rpm	revoluciones por minuto.
tc <sup>r</sup>	resistencia a tetraciclina.
tcm	tretracenomicina.
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia.
ts	tiostreptón.
ts <sup>r</sup>	resistencia a tiostreptón.
u.f.p.	unidades formadoras de placa.
V	voltios
X-gal	5-bromo,4-cloro,3-indolil, $\beta$ -galactopiranosido.
$\mu$ g	microgramo.

## **INTRODUCCION**

Desde los años 50 en los que empezó a conocerse la estructura de los ácidos nucleicos (Watson y Crick,1953), se han producido numerosos avances en el campo de la biología molecular. En relación con las nuevas tecnologías en este campo, cabe destacar el descubrimiento de las enzimas de restricción, la posibilidad de formar DNAs híbridos "in vitro", el desarrollo de nuevos sistemas de expresión, etc. Todo un conjunto de técnicas que han hecho posible el clonaje y manipulación de genes.

El conocimiento de la organización génica, así como la regulación de su expresión, en microorganismos de interés industrial, permite la manipulación del genoma y la variación de las condiciones de producción de los metabolitos que sintetizan (Hopwood,1989). Ello tiene como fin, disminuir el coste de producción y la biosíntesis de moléculas nuevas como, por ejemplo, antibióticos con mayor espectro de acción y capaces de evitar los mecanismos de resistencia que puedan aparecer. Dentro de este grupo de microorganismos se encuentran bacterias, como *Streptomyces* y hongos como *Penicillium*, que producen sustancias de gran interés industrial.

Los *Streptomyces* son un grupo de bacterias gram positivas, cuyo hábitat natural es el suelo. Durante muchos años han sido confundidos con hongos, dado que presentan una morfología filamentosa al igual que éstos (Hopwood,1986). Se caracterizan por tener un complejo ciclo celular (Figura 1), donde tiene lugar una diferenciación morfológica (que implica la formación de un micelio aéreo y posterior esporulación), y una diferenciación bioquímica (que comprende la síntesis de una gran variedad de compuestos muy interesantes tanto desde el punto de vista de investigación básica como aplicada). Estas dos características implican un complejo sistema bioquímico y de diferenciación en la expresión génica, tanto a nivel temporal como espacial. Ello hace de estos microorganismos un sistema muy interesante para dilucidar cómo están organizados los genes implicados en estos procesos y los mecanismos que intervienen en su regulación.

## 1.- CICLO BIOLÓGICO DE *Streptomyces*

El ciclo biológico de *Streptomyces* (Figura 1) comienza con la germinación de una espora, momento en el que se ponen en marcha una gran cantidad de procesos metabólicos, como es síntesis de proteínas, DNA, RNA, etc; utilizando como energía la acumulada en el material de reserva almacenado en la espora. El micelio solubiliza los restos orgánicos del medio en el que crece (Chater, 1984), gracias a las enzimas hidrolíticas que segrega. Esta zona de la colonia se conoce como micelio sustrato.

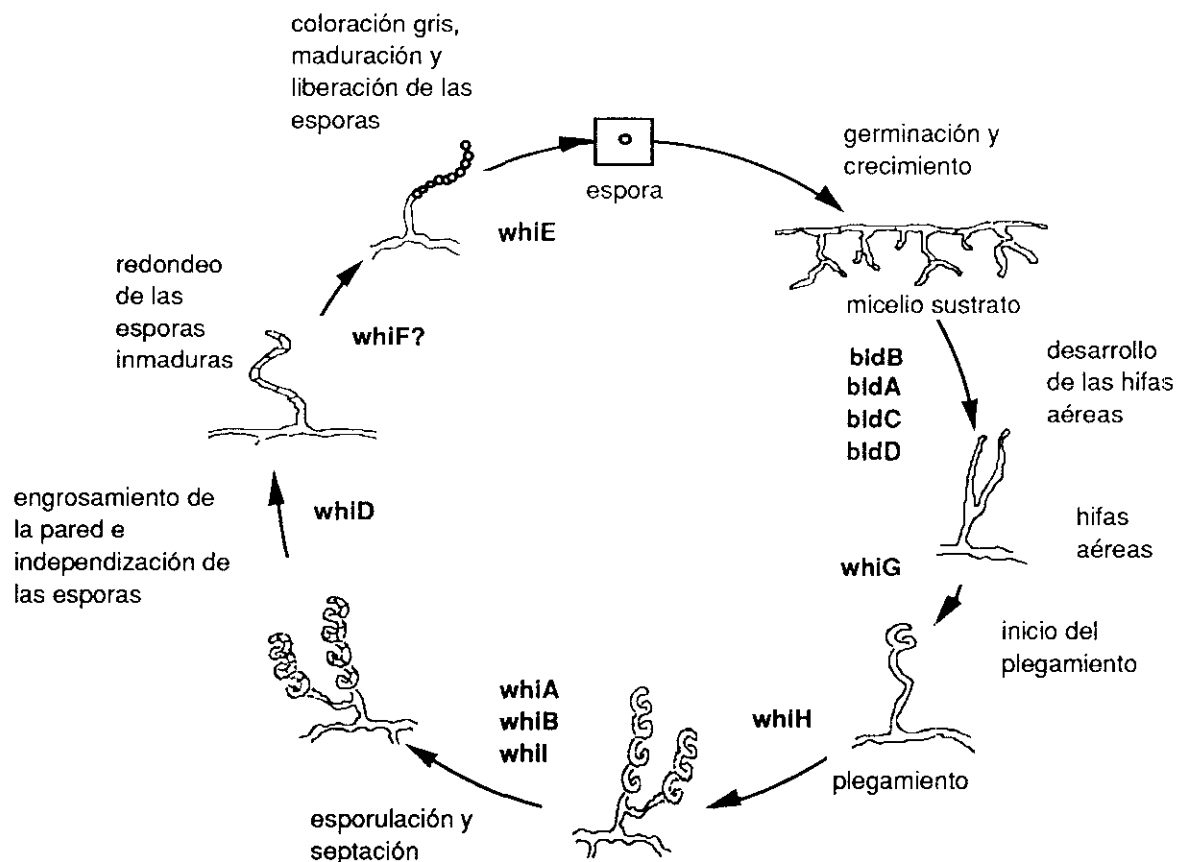
El micelio sustrato, una vez formado, comienza a degradarse y estos productos de degradación sirven de nutrientes para el desarrollo de las hifas aéreas (micelio aéreo). Posteriormente las hifas comienzan a plegarse, se enrollan y subdividen mediante la formación de unos septos, dando lugar a las esporas. Cada espora contiene una única copia del genoma. Las esporas maduran y adquieren una coloración grisácea y posteriormente se liberan al medio, cerrando de esta manera el ciclo; presentan una pared engrosada de naturaleza hidrofóbica que las protege contra la desecación y les permite dispersarse en el medio que las rodea, al igual que ocurre con otros microorganismos. La diferencia fundamental con otros es que no son formas de termorresistencia.

Existe una gran especulación sobre cuáles son las señales metabólicas que disparan los procesos de diferenciación. ¿Puede hablarse de segundos mensajeros?. Por el momento no se tienen datos suficientes. Lo que sí está claro es que en determinadas zonas de la colonia, a medida que ésta va creciendo, se produce una limitación de nutrientes y como consecuencia de esto, comienza la esporulación. En *Bacillus subtilis*, se sabe que tras esta carencia de nutrientes disminuye la cantidad de nucleósidos polifosfatos, como es el guanosina trifosfato (GTP), relacionándose con el comienzo de la esporulación (Freese, 1982). En *Streptomyces* se ha visto una posible relación entre los niveles de nucleótidos cíclicos y nucleósidos polifosfato, y el principio de la diferenciación morfológica. En *Streptomyces griseus* se ha observado que tras una carencia de nutrientes los niveles de GTP

disminuyen y aumentan los niveles de ppGpp (Ochi,1987). Además de éstos, existen otros metabolitos difusibles, como el factor A, que activan tanto la esporulación como la biosíntesis de metabolitos secundarios (Chater,1989<sub>a,b</sub>) ó sustancias antibióticas como la pamamicina, que además de ser un antibiótico acelera la formación del micelio aéreo en *Streptomyces alboniger* (Kondo y col.,1988).

Todos ellos son hechos puntuales que no explican totalmente cuáles son los mensajeros que transmiten las señales metabólicas a lo largo del micelio para que comience la diferenciación morfológica y dar lugar a las esporas.

Figura 1.- Ciclo biológico de *Streptomyces*



Actualmente se conocen algunos genes que intervienen en distintas fases del ciclo biológico, como se detalla en la Figura 1. Caben destacar: los genes *bld*, en *Streptomyces coelicolor*, que intervienen

en la formación del micelio aéreo y que en algún caso, como el gen *bldA*, actúan tanto en la esporulación como en la biosíntesis de antibióticos; el gen *whiE* que interviene en el proceso de pigmentación de las esporas, cuyos genes están organizados de forma muy semejante a los genes de una poliquétido sintetasa (Davis and Chater, 1990).

## 2.- ORGANIZACION GENICA EN *Streptomyces*

La especie de *Streptomyces* mejor caracterizada a nivel genético es *Streptomyces coelicolor* A3(2). En ella se han localizado mediante mapas de ligamiento genético numerosos marcadores que parecen encontrarse en un único cromosoma circular. Estos marcadores genéticos se distribuyen de forma polarizada, en dos regiones físicamente enfrentadas, quedando las regiones flanqueantes del cromosoma aparentemente con muy poca información localizada.

Un aspecto peculiar del genoma de *Streptomyces* es la distribución simétrica de marcadores auxotróficos a lo largo del cromosoma. Puede verse que genes implicados en distintos pasos de una misma ruta biosintética, se localizan de forma simétrica en ambos polos del genoma. Tal es el caso de *cysA* frente a *cysC* y *D*; *hisA, B, F, G, I* frente a *hisD*, *leuA* frente a *leuB*, etc. Basados en esta observación, Hopwood y colaboradores (Hopwood y Kieser, 1990) sugieren que en algún momento de la historia evolutiva de estas bacterias, se haya producido una duplicación del genoma por cruzamiento entre dos genomas homólogos localizados en el mismo compartimento celular. A continuación, el tamaño se ha ido reduciendo mediante delecciones de la mayoría ó de todos los genes que inicialmente se encontraran duplicados.

En *Streptomyces* existen genes que por distintas razones, como represión catabólica por glucosa ó bien por la falta de un gen activo, no se expresan en condiciones normales. Se denominan genes "silentes". Tal es el caso de los genes de la fenoxazinona sintetasa, enzima implicada en la biosíntesis de actinomicina D en *Streptomyces antibioticus*, cuya expresión está sometida a represión catabólica

(Gallo y Katz,1972) ó los genes de biosíntesis de actinorrodina en TK21, cuya expresión necesita la inducción de otros genes como *actIIORF4* (M. Fernández-Moreno y col.,1991), *abaA* (M. Fernández-Moreno, en prensa), *afsR* (Stein y col.,1989), entre otros.

El genoma de *Streptomyces* es particularmente inestable apareciendo mutaciones de forma espontánea con una frecuencia muy elevada (del orden del 1%), algunas de las cuales se traducen en la aparición de auxotrofías ó sensibilidad a determinados antibióticos (Hopwood y Kieser,1990). Estas mutaciones, en la mayoría de los casos, son debidas a deleciones en el cromosoma de la cepa original. La existencia de secuencias repetidas en tándem (Schrempf,1985) en *Streptomyces*, pueden originar un sobrecruzamiento en el que se delecione, por recombinación, una larga zona del cromosoma. Generalmente, estas deleciones tienen lugar en zonas no esenciales del DNA, ya que la célula sobrevive y el carácter adquirido puede transmitirse de generación en generación.

El tamaño del cromosoma se ha estimado, mediante análisis cinéticos, que oscila en un rango de 6 a 9 megabases, datos que fueron ratificados mediante electroforesis de campo pulsante del cromosoma de *S.coelicolor* A3(2) (Hopwood,D.A.comunicación personal). Este tamaño, es del orden de dos veces el tamaño del genoma de *Escherichia coli* (Smith y col.,1987) y *Bacillus subtilis* (Young y Wilson,1974). Esta diferencia de tamaño no se explica por la presencia de genes implicados en la diferenciación morfológica ni por los genes que son necesarios para la síntesis de metabolitos secundarios, ya que *B.subtilis* tienen un ciclo de la misma complejidad que *Streptomyces* y es productor de antibióticos, mientras que el tamaño de su genoma es prácticamente igual al genoma de *E.coli*. En la biosíntesis de un antibiótico en *Streptomyces* intervienen aproximadamente entre 10 y 30 genes (Hopwood,1988). De esta manera, aunque una especie sintetizara una docena de metabolitos secundarios muy pocas kilobases serían suficientes para especificarlos; ni aún suponiendo que existan largas regiones de DNA no codificantes, implicadas en la regulación fina de la expresión génica en *Streptomyces* (Hopwood y col.,1986), es posible



explicar la diferencia de miles de kilobases entre *Streptomyces* y otras bacterias.

Pese a todas las peculiaridades del genoma de *Streptomyces* con respecto al resto de los procariotas, existen algunas características comunes, como la disposición de genes implicados en una misma ruta biosintética ó catabólica de encontrarse agrupados en una misma zona del cromosoma. Así, por ejemplo, los genes implicados en el catabolismo del glicerol se encuentran agrupados en una misma zona del cromosoma (Seno y col.,1984). También existen genes agrupados parcialmente, como es el caso de los genes de biosíntesis de histidina en los que cinco genes se encuentran agrupados (Carere y col.,1973) quedando el resto repartidos por el cromosoma. En el caso de los genes implicados en la síntesis de metabolitos secundarios se encuentra una gran tendencia a su agrupamiento. Concretamente la mayoría de los casos conocidos de genes de biosíntesis de antibióticos en *Streptomyces* están agrupados (Tabla 1).

### 3.- METABOLISMO EN *Streptomyces*

*Streptomyces* se caracteriza por tener un metabolismo muy variado en el que se sintetizan sustancias tanto imprescindibles para la supervivencia de la célula, como no necesarias para los procesos vitales y sin los que el organismo sigue siendo viable. En el primer caso se habla de metabolismo primario dentro del cual se encuentran aquéllas sustancias que intervienen por ejemplo en síntesis de DNA, síntesis de proteínas, etc, (aspecto común a otro ser vivo) y en el segundo caso hablamos de metabolismo secundario. Dentro de estos metabolitos secundarios se encuentran sustancias muy diversas y de gran interés tanto básico como aplicado. Son enzimas (hidrolasas y amilasas), pigmentos (flavonoides), más del 60% de antibióticos conocidos y agentes antivirales y antitumorales, entre otros. Un gran número de estas sustancias son utilizadas en medicina, veterinaria, agricultura, etc. Por estas razones existen actualmente numerosos estudios encaminados al conocimiento de la organización de los genes que intervienen en la biosíntesis de estos compuestos, así como al conocimiento de los mecanismos que regulan su expresión. El objetivo

Tabla 1.- Agrupamientos de genes implicados en la biosíntesis de antibióticos en diferentes especies de *Streptomyces*

<u>ANTIBIOTICO</u>	<u>ORGANISMO</u>	<u>CARACTERISTICAS</u>	<u>REFERENCIA</u>
Actinorrodina	<i>S.coelicolor</i>	En un fragmento de 25 Kb, se localizan todos los genes estructurales de expresión temprana, media y tardía. Dentro de esta zona se encuentra un gen regulador y dos genes de resistencia.	Rudd y Hopwood,1979 Malpartida y col.,1987 M. Fernández-Moreno, (tesis doctoral) J.L. Caballero y col.,1991
Granaticina	<i>S.violaceoruber</i>	Se han identificado 6 ORFs contiguas por homología con los genes <i>act</i> en una zona de 4,6 kb del cromosoma	Sherman y col.,1989
Tetracenomicina	<i>S.glauscenscens</i>	Existe un fragmento de 25kb que complementa las mutaciones <i>tcm</i> <sup>-</sup> . Se han localizado 4 genes estructurales por secuencia, además de un gen de resistencia.	Motamedi y Hutchinson,1987 Bibb y col.,1989
Metilenomicina	<i>S.coelicolor</i> <i>S.violaceoruber</i>	Se encuentran agrupados en 17 Kb al menos 4 genes estructurales de biosíntesis, un gen regulador y un gen de resistencia.	Chater K.F y C.Bruton,1985
Bialaphos	<i>S.Higroscopicus</i>	Se han encontrado 5 genes biosintéticos, 4 de ellos son genes estructurales y 1 de ellos es el gen regulador.	Anzai y col.,1987 Murakami y col.,1986 Raibaud y col.,1991
Eritromicina	<i>Saccharopolyspora erithraea</i>	En una zona de 70 kb se encuentran diferentes módulos que son distintas unidades de síntesis. Se encuentran también dos genes de resistencia.	Stanzak y col.,1985 Weber y Losick,1988 Donadio y col.,1991
Daunorrubicina	<i>S.peucetius</i>	Existen 5 fragmentos no solapantes homólogos a los genes en los que al menos uno contiene además de los genes de biosíntesis un gen de resistencia.	Stutzman y col.,1989
Oxitetraciclina	<i>S.rimosus</i>	Todos los genes estructurales se encuentran en un fragmento de 47 kb. En esta misma zona se localizan dos genes de resistencia.	Sherman y col.,sin publicar Rhodes y col.,1981 Pigac y Alacevic,1979
Prodigiosina	<i>S.coelicolor</i>	Tanto los genes estructurales como el gen regulador, <i>redD</i> , están agrupados en el cromosoma.	Malpartida y col., 1990 Feitelson y col., 1985

Puromicina	<i>S.alboniger</i>	En un fragmento de 15kb se localizan los genes estructurales, de resistencia así como un gen regulador.	Vara y col., 1988 Lacalle y col., 1992
Tilosina	<i>S.fradie</i>	Se han identificado varios genes estructurales que se encuentran unidos a, al menos, dos genes de resistencia en una zona de 90kb.	Beckmann y col.,1989 Baltz y Seno,1988
Carbomicina	<i>S.thermotolerans</i>	En una zona de 70kb existen varios genes estructurales junto con genes de resistencia, <i>carA</i> , <i>carB</i> .	Epk y col.,1988
Espiramicina	<i>S.ambofaciens</i>	Se han localizado tres genes implicados en procesos de biosíntesis, adyacentes a un gen de resistencia <i>smB</i> , mediante complementación heteróloga de <i>S.fradie</i> .	Richardson y col.,1990
Estreptomicina	<i>S.griseus</i>	Los genes estructurales y de resistencia, así como un regulador positivo de transcripción, se localizan en un fragmento de 20kb.	Distler y col.,1987 Ohnuki y col.,1985

primordial va encaminado a obtener nuevos compuestos mediante manipulación genética de los microorganismos productores, la mejora en las condiciones de producción, análisis de factores externos que influyen en el crecimiento ó activadores que aumentan la producción de un determinado metabolito.

Existe una correlación entre la diferenciación morfológica y la síntesis de metabolitos secundarios. Cabe destacar, por ejemplo, que la producción de antibióticos, coincide con el inicio de la esporulación. Esto hizo pensar en una coordinación estrecha entre metabolismo primario y secundario. Así en *S.coelicolor*, Leskiw y col. (Leskiw y col.,1991) encontraron que el producto génico del gen *blcA* (gen implicado en la esporulación y relacionado con la síntesis de actinorrodina) es un tRNA específico para leucina (tRNA<sup>leu</sup>). Fernández-Moreno y col., demostraron que este leucil-tRNA es necesario para la correcta traducción del gen *actII-ORF4*, cuyo producto génico, a su vez es necesario para la transcripción de los genes estructurales implicados en la biosíntesis del antibiótico actinorrodina (M. Fernández-Moreno y col.,1991); de esta manera el gen *blcA* (implicado en la formación del micelio aéreo) es necesario para la expresión de genes implicados en la biosíntesis de algunos antibióticos, como es el caso de actinorrodina. El estudio de rutas biosintéticas de metabolitos secundarios es un modelo atractivo para conocer diferentes sistemas de control de la expresión génica en *Streptomyces*.

Dentro de los metabolitos secundarios con actividad antibiótica, sintetizados por *Streptomyces*, cabe destacar un grupo de sustancias denominado poliquétidos entre los cuales se encuentran sustancias de aplicación en medicina.

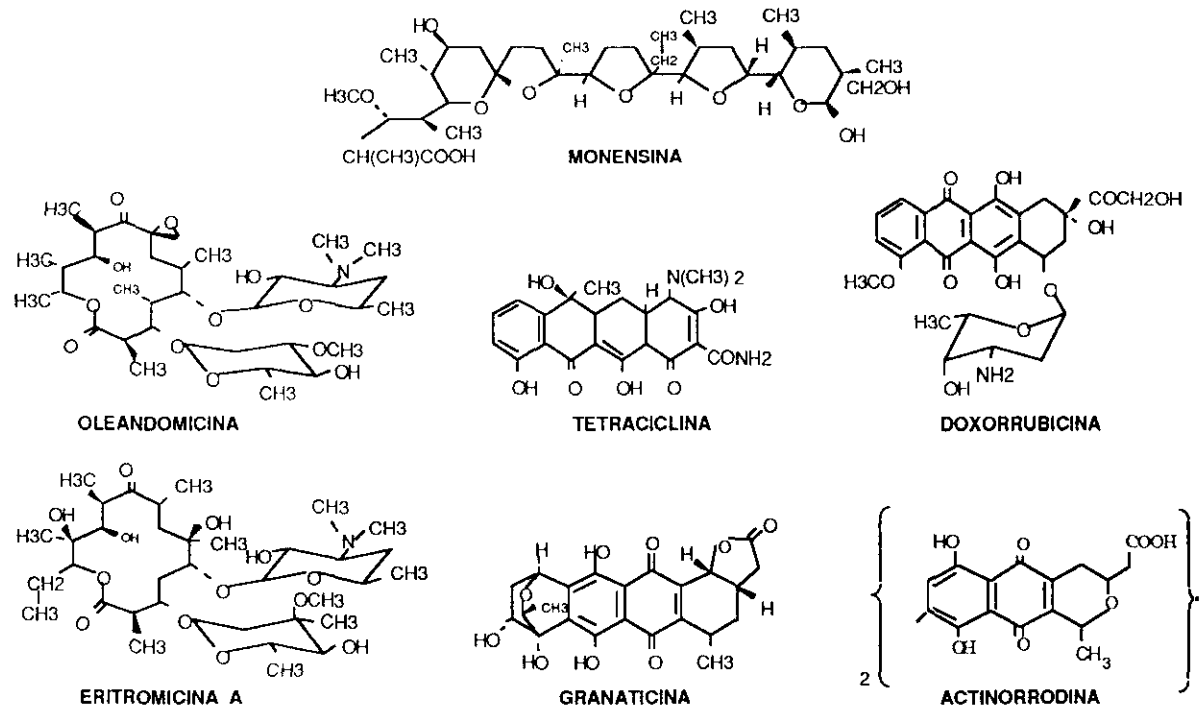
#### **4.- POLIQUETIDOS**

##### **4.1.- Características**

Los poliquétidos son unas sustancias de difusión universal entre los seres vivos. Son sintetizadas por bacterias, hongos, plantas y

animales. Presentan estructuras muy diversas aunque todos comparten un mismo patrón biosintético. Su biosíntesis comienza con la construcción de una cadena carbonada originada por la condensación de unidades de ácidos carboxílicos, entre los que caben destacar residuos de acetato, propionato y butirato, y en algunos casos intervienen residuos acilos más complejos. Cada unidad se ensambla de tal forma que proporciona dos átomos de carbono a la estructura final y se origina un grupo ceto. Después de un número determinado de condensaciones se obtiene como producto final una cadena policetónica. Esta estructura de policetos dió origen al nombre de poliquétidos para este grupo de sustancias.

**Figura 2.- Estructura química de diferentes antibióticos poliquétidos**



Los poliquétidos sintetizados por *Streptomyces* son fundamentalmente compuestos con actividad antibiótica ó alguna otra propiedad quimioterápica. Pueden destacarse antibióticos como tetraciclinas, antraciclinas como daunorrubicina y doxorubicina, macrólidos como eri-

tromicina y oleandomicina, poliéteres, isocromanoquinonas como actinorrodina y granaticina, algunas de cuyas estructuras se muestran en la Figura 2.

Dada la gran variedad de estructuras químicas que existen dentro de este grupo de metabolitos, son muchos los factores implicados en la biosíntesis de los poliquétidos. Entre ellos cabe citar:

- La naturaleza y el número de unidades que se condensan para formar la estructura primaria adecuada.

- La cadencia de reacciones necesarias para llegar a formar la cadena policetónica.

- La estereoisomería de los carbonos asimétricos, bien sea R ó S en el caso de los sustituyentes, ó E ó Z en el caso de los dobles enlaces.

Toda esta información puede encontrarse "programada" en un complejo multienzimático encargado de la biosíntesis de los poliquétidos y denominado poliquétido sintetasa (PKS). Una vez sintetizada la cadena policetónica, tienen lugar una serie de reacciones entre las que cabe destacar la formación de anillos aromáticos ó anillos macrólidos, uniones a moléculas de azúcares, metilaciones y muchas otras reacciones que dan lugar al producto final. En algunos casos es en estas últimas modificaciones en las que aparece la actividad antibiótica.

Las funciones de los poliquétidos son igualmente diversas: existen sustancias como los flavonoides que son pigmentos de plantas y son poliquétidos que aparte de originar la pigmentación de las plantas, intervienen como señales que activan la síntesis de otros compuestos (quimiosensores), como ocurre, por ejemplo, en *Rhizobium*. Se ha visto que algunos flavonoides activan la expresión de genes de nodulación en *Rhizobium meliloti* (genes homólogos a una poliquétido sintetasa) (Johnston, 1989). Existen igualmente algunos casos, como en la biosíntesis de pamamicina ya mencionado, que parece intervenir en la activación del proceso de diferenciación en *S.alboniger* (Kondo, 1988).

## 4.2.- Biosíntesis de poliquétidos

### 4.2.1.- Análisis bioquímico

En los años sesenta Birch elaboró una hipótesis en la que se relacionaba la biosíntesis de poliquétidos con la biosíntesis de ácidos grasos (Birch, 1967). Ambos procesos comienzan a partir de moléculas sencillas como residuos de ácidos carboxílicos, que se activan al unirse a la molécula del Coenzima A (CoA) formando el acil-CoA, y que se van condensando hasta llegar a sintetizar ácidos grasos ó poliquétidos según el complejo enzimático que haya intervenido: ácido graso sintetasa (AGS) ó poliquétido sintetasa (PKS).

La ácido graso sintetasa está constituida por un grupo de enzimas que catalizan en primer lugar la condensación de residuos de acetil-CoA y malonil-CoA. Una vez producida la condensación, tienen lugar reducciones, deshidrataciones y enoil reducciones tras las que el grupo ceto de la cadena formado en la primera condensación, se transforma para dar lugar a un radical alquilo. En todas estas reacciones interviene una proteína como es la ACP ("acyl carrier protein") que sirve de soporte de la cadena policarbonada en formación como se observa en la Figura 3. Los residuos de acetil-CoA son en este caso las unidades iniciadoras, mientras que la molécula que extiende la cadena carbonada en la biosíntesis de ácidos grasos es el malonil-CoA.

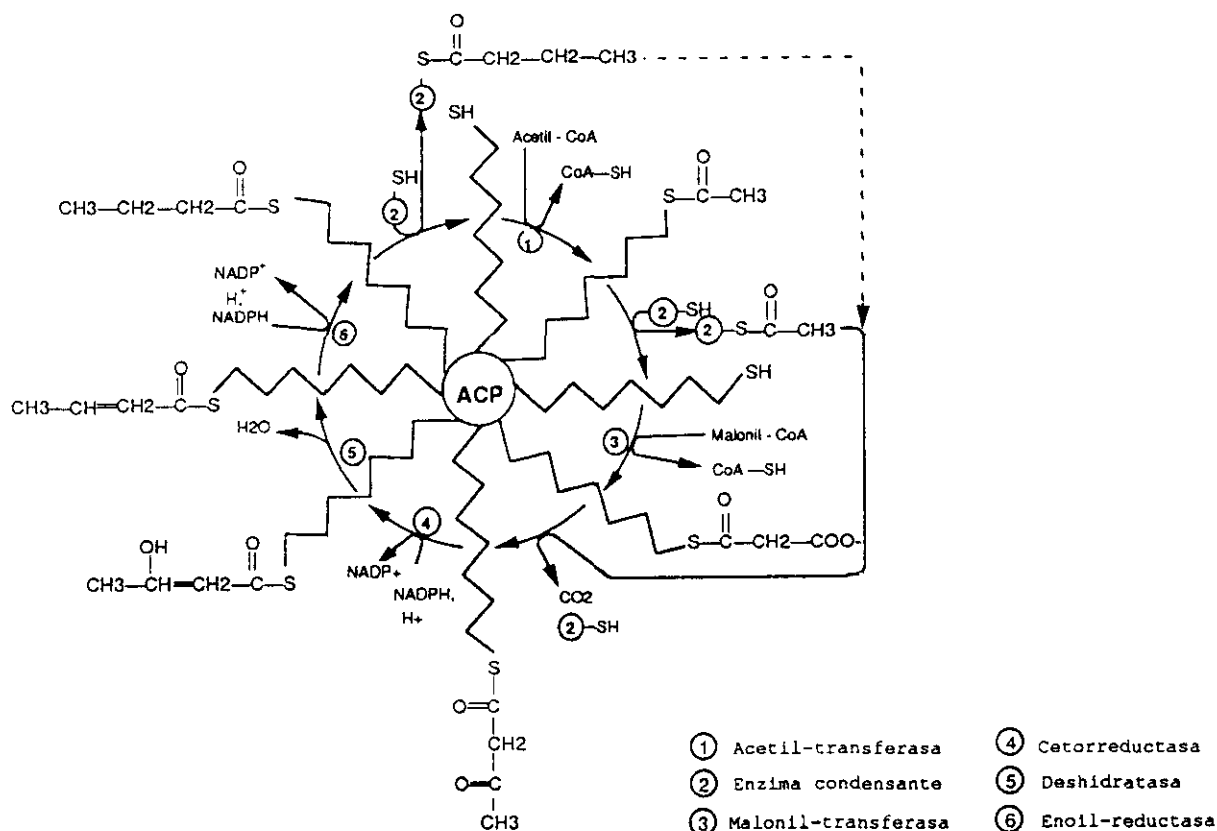
Las reacciones representadas en la Figura 3, se repiten en varios ciclos dando lugar a moléculas como por ejemplo el ácido palmítico, con 16 átomos de carbono ó el ácido esteárico con 18 átomos de carbono. El complejo "ácido graso sintetasa" es un sistema multivalente en el cual están implicadas 8 unidades funcionales: acetil, malonil y acil-transferasas, proteína transportadora de residuos acilos (ACP), ceto-acil-sintetasa, ceto-acil-reductasa, deshidratasa y enoil-reductasa.

La organización de las AGS en los distintos organismos es variable (McCarthy and Hardie, 1984). Existen dos tipos de AGS:

**Tipo I.** Consiste en un polipéptido multifuncional con diferentes dominios encargados de catalizar las distintas reacciones que comprenden la biosíntesis de ácidos grasos. Es característica de vertebrados. En algunos eucariotas, como levadura, la AGS está formada por dos polipéptidos con cinco y tres funciones enzimáticas respectivamente (Mohamed y col., 1988); quedaría igualmente dentro de este tipo de AGS.

**Tipo II.** Engloba las AGS de la mayoría de las bacterias y de plantas. Corresponde a varios polipéptidos independientes formando un complejo que cataliza la biosíntesis de ácidos grasos.

Figura 3.- Reacciones básicas de la biosíntesis de ácidos grasos



\* Figura tomada de Biochemistry Mathews Van-Holde (1990)

Similar a la biosíntesis de ácidos grasos los poli péptidos se sintetizan mediante reacciones de condensación de moléculas de acetil-



CoA, propionil-CoA ó butiril-CoA (Packter, 1980) seguido de posteriores reducciones, deshidrataciones y enoil reducciones. Todo ello siguiendo el "programa" especificado por el complejo poliquétido sintetasa.

Si bien la biosíntesis de ácidos grasos y la biosíntesis de poliquétidos son procesos bastante parecidos, existen una serie de diferencias importantes:

**A)** En el caso de biosíntesis de ácidos grasos, tras una reacción de condensación tiene lugar siempre una reducción con el fin de originar un radical  $-OH$ , con posterior deshidratación para originar un doble enlace y por último una enoil reducción dejando un radical alquilo en el lugar del grupo ceto (Figura 3). Únicamente después de ocurrir este ciclo de reacciones se produce una nueva condensación.

En la biosíntesis de poliquétidos los ciclos no siguen el mismo patrón para todos (como ocurre en la biosíntesis de los ácidos grasos). Así pueden ocurrir casos como:

- 1) Condensación-reducción-deshidratación-reducción que origina una cadena saturada.
- 2) Condensación-reducción-deshidratación, dando lugar a un doble enlace.
- 3) Condensación-reducción, quedando un radical  $-OH$ .
- 4) Condensación-condensación que mantiene dos grupos ceto muy próximos.

**B)** En la síntesis de ácidos grasos, la molécula iniciadora siempre es acetil-CoA y la unidad que extiende la cadena es siempre malonil-CoA. En el caso de los poliquétidos, las unidades iniciadoras pueden ser residuos acilos diferentes a acetil-CoA al igual que en la extensión de la cadena pueden intervenir moléculas más complejas que el malonil-CoA. Sea cuál sea la molécula que interviene, ésta siempre contribuye con dos átomos de carbono en la cadena policetónica, quedando el resto como diferentes sustituyentes en la molécula final. La existencia de estos sustituyentes en un momento determinado hará

que se produzcan unas reacciones concretas como ciclaciones, determinando la estructura final del compuesto.

C) El producto final de la ácido graso sintetasa es aquiral mientras que los poliquétidos tienen varios átomos de carbono que presentan una estereoisomería determinada y en estos casos, la elección de cada enantiómero en el momento preciso, podría estar directamente determinada por la poliquétido sintetasa.

Estas diferencias hacen pensar en la complejidad del proceso de biosíntesis de poliquétidos, y en el papel que juega la poliquétido sintetasa en la determinación de la estructura del poliquétido. El aislamiento de intermediarios de la ruta de biosíntesis de poliquétidos como eritromicina y actinorrodina (Yue S. y col.,1987; Bartel y col.,1990), con un patrón específico de reducciones, ciclaciones y estereoisomería, parecen demostrar, aunque no son concluyentes, que las poliquétido sintetasas determinan cuál es la reacción que tiene lugar en cada paso del proceso de biosíntesis. Igualmente, cualquier variación en la elección de las distintas unidades a ensamblar, conlleva a un cambio en la estructura y naturaleza final del poliquétido. Tal es el caso de la biosíntesis de avermectinas (Ikeda y col.,1987), monensina (Gorman y col.,1968), etc. Todo ello conduce a la teoría de que las poliquétido sintetasas "seleccionan" en cada caso los pasos que deben seguir para la síntesis de un determinado poliquétido.

En algunas rutas biosintéticas, una vez formada la cadena policetónica tienen lugar reacciones posteriores, como la adición de moléculas de azúcar, metilaciones, que pueden dar lugar a un compuesto con actividad antibiótica.

#### 4.2.2.- Análisis genético

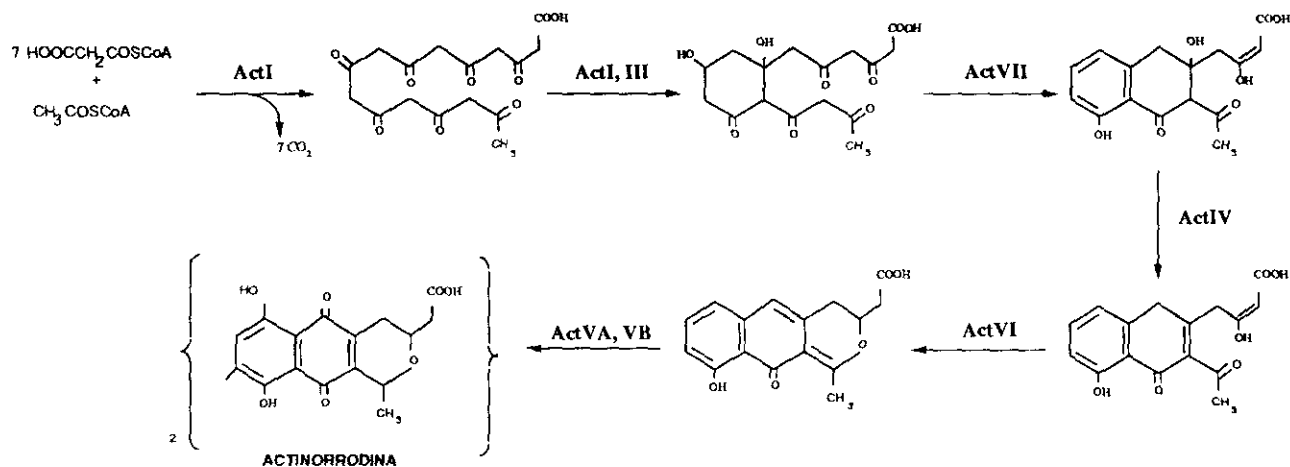
Son numerosos los estudios que se han realizado en los últimos años con el fin de determinar la organización genética de las poliquétido sintetasas. En procariotas, los genes implicados en la biosíntesis de algunos poliquétidos conocidos están agrupados en una

misma zona del cromosoma, en una estructura semejante a un operón. Aunque a nivel bioquímico la biosíntesis de actinorrodina no está bien definida, genéticamente es la mejor conocida. Actinorrodina es un antibiótico poliquétido pigmentado sintetizado por *S.coelicolor*. Los trabajos de Cole (Cole y col.,1987) y de Bartel (Bartel y col.,1991), han llevado a postular una ruta biosintética (Figura 4A). Rudd y Hopwood en el año 1979 aislaron mutantes de *S.coelicolor* cada uno de los cuales tenía interrumpida la ruta biosintética de actinorrodina en una etapa diferente. Agruparon estos mutantes en siete clases fenotípicas distintas y mediante experimentos de cosíntesis correlacionaron la mutación con el orden biosintético en el que intervenían (Figura 4A). Así, las clases actI y actIII se consideraron mutantes afectados en fases tempranas, ya que eran capaces de biotransformar en actinorrodina los productos intermediarios del resto de los mutantes (Rudd y Hopwood, 1979). Utilizando un mutante de la clase actV, Malpartida y Hopwood, aislaron un fragmento de DNA cromosómico de 30Kb que era capaz de complementar mutaciones de todas las clases fenotípicas de la biosíntesis de actinorrodina (Malpartida y Hopwood,1984), y determinar producción de actinorrodina en un sistema heterólogo.

Mediante análisis de transcritos se observó la existencia de, al menos, cuatro unidades de transcripción, algunas de ellas policistrónicas (Malpartida y Hopwood, 1986). Igualmente se determinó que los genes tempranos están agrupados en un extremo del fragmento de DNA cromosómico aislado de *S.coelicolor* mientras que el mRNA policistrónico del otro extremo codifica para los genes tardíos. Un análisis molecular de la zona que contenía los genes tempranos, determinó que éstos están agrupados en un policistrón formado por 6 ORF's (actORF1,2,3,4,5 y 6). ActIORF1 y ActIORF2 presentaban homología con diferentes ceto-acil-sintetasas de otros sistemas. Ambas parecen estar traduccionalmente acopladas, y que mientras ActIORF1 contiene la típica secuencia descrita para el centro activo de ceto-acil-sintetasas (con un crítico residuo de cisteína donde se anclan los distintos residuos acilos), ActIORF2 carece del mismo (Miguel Fernández-Moreno, tesis doctoral). Esta organización génica se ha encontrado además, en otras poliquétido sintetasas como son las de

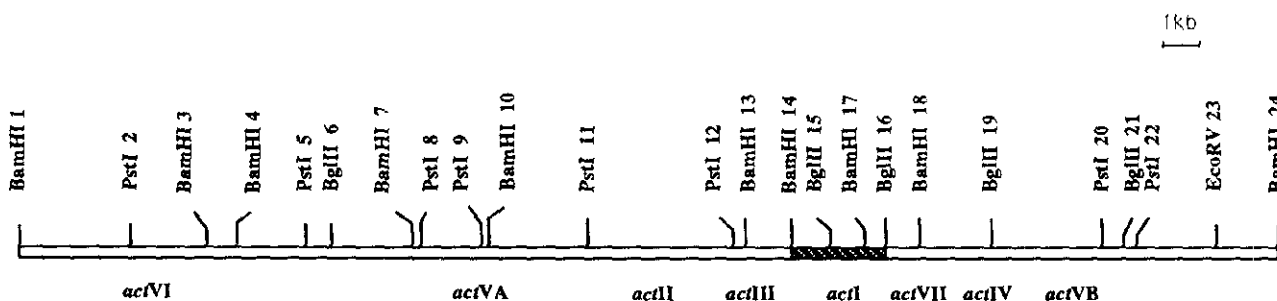
Figura 4.- Ruta de biosíntesis de actinorrodina y disposición física de los genes *act* en *S.coelicolor*.

A.- Presunta ruta bioquímica y orden de intervención de las proteínas deducidas de los genes *act*.



Datos obtenidos de Bartel y col.,1990

B.- Localización de los distintos genes que intervienen en la biosíntesis de actinorrodina.



Datos obtenidos de Fernández-Moreno y col.,1991

granaticina (Sherman y col.,1989), tetracenomicina (Bibb y col.,1989), oxitetraciclina (Sherman, datos sin publicar), *whiE* (Davis and Chater,1990), etc. Así, la existencia de las dos fases de lectura descritas y su presunto acoplamiento traduccional, parecen confirmar la existencia de un modelo de organización estructuralmente conservado en las poliquétido sintetetasas (Hopwood y Sherman, 1990).

En *S.coelicolor*, junto a los genes estructurales de la poliquétido sintetetasa de actinorrodina, se localiza una región de DNA codificante de genes implicados en la regulación de los genes biosintéticos (Malpartida y Hopwood,1986). Una organización análoga se conoce en la biosíntesis de estreptomycinina (Distler y col.,1987; Ohnuki y col.,1985).

Existen algunas poliquétido sintetetasas cuya organización es más compleja. Tal es el caso de la sintetetasa de eritromicina en *Sacchalopolyspora erithraea*, que presenta una organización modular, conociéndose al menos tres módulos (Cortés y col.,1990). Cada módulo parece que constituye una unidad funcional de síntesis y codifica al menos para una proteína multifuncional con dominios de: ceto-acil-sintetasa, proteína transportadora de acilos ACP, cetorreductasa y acetiltransferasa; pudiendo contener, además dominios específicos como deshidratasa y enoilreductasas. El polipéptido resultante participaría específicamente en cada una de las seis reacciones de elongación necesarias para producir la eritromicina a partir de residuos de propionato (Donadio y col.,1991). Otros casos de organización similar es la biosíntesis de espiramicina (Richardson y col.,1990), tilosina, (Baltz y Seno,1988), etc, ambos macrólidos.

##### **5.- REGULACION DE LA EXPRESION DE GENES DE BIOSINTESIS DE ANTIBIOTICOS EN *Streptomyces***

El estudio de la regulación génica en *Streptomyces* ha sido un reto para distintos laboratorios en los últimos años. La información que se tiene hasta el momento, permite establecer en algunos casos, conexión entre la diferenciación morfológica y el comienzo de la biosíntesis de

metabolitos secundarios. La especie sobre la que se han realizado los estudios de regulación es fundamentalmente *S.coelicolor*. En ella se han determinado, por el momento, tres niveles de regulación de la biosíntesis de antibióticos:

**A)** Genes reguladores asociados a los genes biosintéticos. En unos sistemas son genes activadores como ocurre en el caso de actinorrodina (M. Fernández-Moreno y col.,1991), bialaphos (Anzai y col.,1987), estreptomycin (Ohnuki y col.,1985; Distler y col.,1987) y undecilprodigiosina (Narva y Feitelson,1990; Malpartida y col.,1990); en otros son en realidad represores, como ocurre en el caso de los genes biosintéticos de metilenomicina (Chater y Bruton,1985).

**B)** Genes de acción pleiotrópica sobre los genes biosintéticos, aunque no actúan directamente en diferenciación celular. Dentro de este grupo se encuentran el gen *afsB* cuya mutación bloquea la biosíntesis de actinorrodina y undecilprodigiosina sin afectar a la biosíntesis de metilenomicina y CDA (Champness y col.,1990); los genes *absA* y *absB* cuyas mutaciones afectan la biosíntesis de los cuatro antibióticos sintetizados por *S.coelicolor* (actinorrodina, undecilprodigiosina, metilenomicina y CDA) (Adamidis y col.,1990); el gen *abaA*, cuya mutación afecta a la biosíntesis de actinorrodina, prodigiosina y CDA, pero no de metilenomicina (M. Fernández Moreno y col., en prensa).

**C)** Genes implicados en procesos de diferenciación celular y bioquímica. Sus mutaciones afectan tanto a la esporulación como a la biosíntesis de antibióticos. Tal es el caso de los genes *bld* que intervienen en la formación del micelio aéreo, concretamente el gen *bldA* es el más estudiado por el momento.

## **6.- APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS: ANTIBIÓTICOS HÍBRIDOS**

La producción de más del 60% de los antibióticos conocidos, así como el gran número de señales implicadas en los procesos de diferenciación celular, hacen de *Streptomyces* un grupo de bacterias muy interesante, tanto desde el punto de vista básico como aplicado. En los

últimos años, son numerosos los esfuerzos encaminados al estudio de genes implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, así como de los mecanismos que regulan su expresión. Sin embargo, aún son muchos los puntos que quedan por dilucidar. Desde el punto de vista biotecnológico, el interés se centra en la obtención de nuevas sustancias de interés industrial. Concretamente, en el caso de los antibióticos, se intentan obtener antibióticos con mayor espectro de acción ó menos toxicidad que los ya conocidos. La utilización masiva de antibióticos en clínica, entre otros inconvenientes genera la aparición de estirpes resistentes; por ello la demanda de nuevos compuestos se incrementa progresivamente. El aislamiento y caracterización de los genes implicados en la biosíntesis de antibióticos, contribuye a que pueda manipularse el genoma de tal forma que se originen antibióticos "híbridos", bien por intercambio en las secuencias que codifican para los centros activos de las proteínas ó bien introduciendo genes heterólogos dentro de una ruta biosintética determinada.

La síntesis de antibióticos híbridos por ingeniería genética, comenzó con la síntesis de mederrodina y dihidrogranatinorrodina (Hopwood y col.,1985b). Estos híbridos se obtuvieron mediante la transformación heteróloga de las especies de *Streptomyces*, *Streptomyces violaceoruber* Tü22 y *Streptomyces* AM-7161, productoras respectivamente de granaticina y medermicina, con un fragmento de DNA de *S.coelicolor* implicado en la biosíntesis de actinorrodina.

En la actualidad pueden obtenerse nuevos compuestos siguiendo distintas estrategias. Cabe destacar:

1) La complementación heteróloga de mutantes que tienen interrumpida la ruta biosintética, con DNA de otra especie de *Streptomyces* productora de antibióticos semejantes. Así por ejemplo, un mutante de *Saccharopolyspora erythraea* que no produce eritromicina, cuando se transforma con DNA que proviene de *S.antibioticus*, productor de oleanomicina, se origina un nuevo compuesto antibiótico: 2-noreritromicina (McAlpine y col.,1987).

2) La optimización de las condiciones de cultivo con el fin de conseguir la expresión de genes que intervienen en la biosíntesis de antibióticos y que están sometidos a represión catabólica. Tal es el caso de la fenoxazinona sintetasa, enzima que interviene en la síntesis de actinomicina D en *S. antibioticus* (Jones y Hopwood, 1984).

3) La mutagénesis de una cepa silvestre, originando un intermedio que se procesa (Bartel y col., 1990) "in vitro" por otros productos génicos.

## 7.- ANTECEDENTES DEL TRABAJO

A nivel genético los genes de biosíntesis de poliquétidos mejor conocidos son los que constituyen el agrupamiento de genes implicado en la biosíntesis de actinorrodina en *S. coelicolor*. Los genes se encuentran en un fragmento de DNA de aproximadamente 25kb siendo capaz de complementar todas las mutaciones *act* descritas y de determinar la producción de antibiótico en una especie no productora. La región clonada se analizó y se localizó el gen *actI* (uno de los genes tempranos) en un fragmento *BamHI* de 2,2kb (Figura 4B). Este fragmento de DNA, se utilizó como sonda frente a diferentes DNA genómicos de otras especies de *Streptomyces* que sintetizan poliquétidos; en geles de agarosa se observaron bandas homólogas en la mayoría de las especies analizadas (Malpartida y col., 1987); en *S. antibioticus* ATCC 11981 se detectaron tres bandas en el digerido genómico con *BamHI*, con unos tamaños de 8kb, 5,6kb y 1,8kb.

La utilización de un fragmento del gen *actI* como sonda frente a genotecas de distintas especies de *Streptomyces*, ha sido una herramienta muy útil para localizar genes implicados en la biosíntesis de poliquétidos en otras especies. Tal es el caso de los genes que sintetizan granaticina en *S. violaceoruber* (Sherman y col., 1989) ó antraciclina en *S. peucetius* (Stutzman y col., 1989). Por ello se comenzó el clonaje de las bandas homólogas al gen *actI*, con el fin de aislar y caracterizar la presunta poliquétido sintetasa en *S. antibioticus*.



El aislamiento de nuevas actividades "poliquétido sintetasa" puede aportar herramientas que ayuden a conocer aspectos básicos de la biosíntesis de poliquétidos: cómo "dirige" la poliquétido sintetasa la secuencia de reacciones que tienen lugar en la biosíntesis de poliquétidos y cuáles son las señales que determinan la síntesis de metabolitos secundarios; cómo y porqué ha tenido lugar en la naturaleza la dispersión de estos genes en tan variados sistemas biosintéticos. El conocimiento molecular de distintas poliquétido sintetetas, abre además la posibilidad de manipulación genética en los organismos productores.

## **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo final de este trabajo, basado en los datos de homología antes descritos, es el clonaje de los genes de una poliquétido sintetasa en *S. antibioticus* que presenta homología con el gen *actI* (gen implicado en la primera reacción de la biosíntesis de actinorrodina). Para ello fué necesario plantear la siguiente estrategia:

1) Construcción de una genoteca de DNA total de *S. antibioticus* en el fago de *E. coli*, EMBL4 (Frischauf y col., 1983), con el fin de localizar con una sonda específica que contiene el gen *actI*, aquéllos genes de *S. antibioticus* implicados en la biosíntesis de poliquétidos.

2) Complementación heteróloga en *S. coelicolor* para buscar secuencias de DNA de *S. antibioticus* capaces de complementar mutaciones reguladoras de actinorrodina. Esto permitiría en un futuro poder analizar las señales de regulación en las distintas especies de *Streptomyces* que se están estudiando en el laboratorio (*S. coelicolor*, *S. ambofaciens* y *S. antibioticus*).

3) Complementación heteróloga en *S. coelicolor*, con el fin de localizar en los fragmentos clonados genes biosintéticos de poliquétidos.

4) Secuenciación de los fragmentos de DNA que contengan los genes de una poliquétido sintetasa en *S. antibioticus*, para poder hacer un análisis comparativo con los genes homólogos en otras especies como *S. coelicolor* (actinorrodina), *S. violaceoruber* (granaticina), *Streptomyces glaucescens* (tetracenomicina), etc., y poder aportar nuevos datos al análisis de la dispersión evolutiva de los genes de biosíntesis de antibióticos de la misma familia (poliquétidos).

5) Manipulación de las secuencias codificantes para fusionarlas con otros genes homólogos, con el fin de forzar las condiciones para formar agrupamientos genéticos híbridos que puedan ser funcionales a nivel de sus productos génicos.

## MATERIALES Y METODOS

## 1.- MICROORGANISMOS

Los microorganismos utilizados en este trabajo se especifican en la Tabla 2.

## 2.- PLASMIDOS Y FAGOS

Para el clonaje de los distintos fragmentos de DNA de *S. antibioticus* se utilizaron como vectores plásmidos y fagos tanto de *Streptomyces* como de *E. coli*. Todos los vectores utilizados están recogidos en la Tabla 3.

## 3.- PRODUCTOS QUIMICOS

En general se han utilizado reactivos procedentes de las firmas Merck, Sigma, Boehringer, Carlo Erba y Pharmacia.

## 4.- PRODUCTOS RADIATIVOS

Todos los productos radiactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos a The Radiochemical Center, Amersham.

## 5.- ENZIMAS

Las enzimas utilizadas en la manipulación de ácidos nucleicos han procedido de las casas comerciales Boehringer, Pharmacia, Biotech, Amersham y New England Biolabs.

## 6.- MEDIOS DE CULTIVO

### 6.1.- *E. coli*

**LB** : Bactotripton 1%. Extracto de levadura 0,5%. Cloruro sódico 0,5%. (Maniatis y col., 1982)

Tabla 2.- Relación de microorganismos utilizados en este trabajo.

Streptomyces

<u>Cepa</u>	<u>Genotipo</u>	<u>Referencia</u>
<i>S. antibioticus</i> ATOC 11981		John Innes Institute

Derivados de *S. coelicolor* A3(2)

M145	SCP1 <sup>-</sup> , SCP2 <sup>-</sup> .	John Innes wild-type
TK16	argA1, guaA1, actIV-117, recA-59 SCP1 <sup>-</sup> , SCP2 <sup>-</sup> .	Feitelson y Hopwood, 1983
TK17	proA1, argA1, strA1, actI-118, recC-1, SCP2 <sup>-</sup> .	"
TK18	argA1, uraA1, strA1, recE-60, actIII-141, recC-1, SCP1 <sup>-</sup> , SCP2 <sup>-</sup> .	"
JF4	proA1, argA1, uraA1, strA1, recE-60, actV <sub>a</sub> -109, SCP1 <sup>-</sup> , SCP2 <sup>-</sup> .	"
JF1	argA1, guaA1, recD-42, actII-177, SCP1 <sup>-</sup> , SCP2 <sup>-</sup> .	"
J1501	hisA1, uraA1, strA1, SCP1 <sup>-</sup> , SCP2 <sup>-</sup> , pgl <sup>-</sup> .	Chater y col., 1982
B140	hisA1, uraA1, strA1, actVII-240, SCP1 <sup>-</sup> , SCP2 <sup>+</sup>	Feitelson y Hopwood, 1983
JF3	hisA1, strA1, actVI-120, recE-60, SCP1 <sup>-</sup> , SCP2 <sup>-</sup> .	"

Derivados de *S. lividans* 66

1326	SLP2 <sup>+</sup> , SLP3 <sup>+</sup>	John Innes wild-type
TK21	SLP2 <sup>-</sup> , SLP3 <sup>-</sup>	Hopwood y col., 1983

Tabla 2.- (continuación)

E. coli


---

<u>Cepa</u>	<u>Genotipo</u>	<u>Referencia</u>
JM101	supE, Thi, $\Delta$ (lac-proAB) [F', traD36, proAB, lacI <sup>q</sup> , Z $\Delta$ M15]	Yanisch-Perron y col., 1985
XL1-blue	recA1, endA1, gyrA96, Thi, hsdR17 (rK <sup>-</sup> , mK <sup>-</sup> ), supE44, rdA1, lac <sup>-</sup> , (F', proAB, lacI <sup>q</sup> , Z $\Delta$ M15, Tn10-Tet <sup>R</sup> )	Bullock y col., 1987
MN621	F <sup>-</sup> hsdR (rK <sup>-</sup> /mK <sup>+</sup> ) mcrA, mcrB, supE44, recB1009	Whittaker y col., 1989

Tabla 3.- Relación de los vectores utilizados en este trabajo.

<u>Vectores</u>	<u>Características</u>	<u>Referencia</u>
pIJ486	Alto nº de copias; ts <sup>r</sup> ; con gen neo <sup>r</sup> sin promotor para ensayo de promotores.	Ward y col., 1986
pIJ940	Bajo nº de copias; derivado de SCP2*; con ts <sup>r</sup> e hyg <sup>r</sup> como marcadores.	Lydiate y col., 1985
pIJ941	Bajo nº de copias; derivado de SCP2*; con genes ts <sup>r</sup> e hyg <sup>r</sup> .	"
pIJ4083	Derivado del pIJ486 por inserción del gen xylE. Utilizado para ensayo de promotores.	Colección John Innes
pIJ702	Alto nº de copias, ts <sup>r</sup> , contiene el gen de la melanina como marcador	Katz y col., 1983
pIJ680	Alto nº de copias, ts <sup>r</sup> , neo <sup>r</sup>	Hopwood y col., 1985 <sub>a</sub>
pIJ922	Bajo nº de copias, ts <sup>r</sup>	Lydiate y col., 1985
PM1	derivado att <sup>-</sup> de $\phi$ C31; ts <sup>r</sup> , hyg <sup>r</sup>	Malpartida y Hopwood, 1986
 <u>E. coli</u>		
pBR329	Cm <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup> y Tc <sup>r</sup>	Covarrubias y col., 1986
pUC18	Amp <sup>r</sup> , $\beta$ gal	Yanisch-Perron y col., 1985.
pUC19	Amp <sup>r</sup> , $\beta$ gal	Yanisch-Perron y col., 1985.
pIJ2921	Amp <sup>r</sup> , $\beta$ gal. Polilinker de pUC18 flanqueado por BglII	Colección John Innes
pIJ2925	Amp <sup>r</sup> , $\beta$ gal	"
M13mp18	Amp <sup>r</sup> , $\beta$ gal	Yanisch-Perron y col., 1985
M13mp19	Amp <sup>r</sup> , $\beta$ gal	"
EMBL4		Frichauf y col., 1983



**M9** :  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  0,6%,  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  0,3%,  $\text{ClNa}$  0,05%,  $\text{ClNH}_4$  0,1%. Ajustar el pH a 7,4 y esterilizar. Cuando está frío añadir  $\text{SO}_4\text{Mg}$  2mM final, glucosa 0,2% final y  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0,1 mM final. (Miller,1972).

**2xTy**: Bactotripton 1%. Extracto de levadura 1%.  $\text{ClNa}$  0,5% (Maniatis y col.1982).

**NZ**: Bactotripton 1%. Casaminoácidos 0,1%.  $\text{ClNa}$  0,5%.  $\text{SO}_4\text{Mg}$  0,25%. Utilizado como medio pobre en el que se favorece la infección por fagos en *E.coli*. Es básicamente como el medio NZM descrito por Maniatis y col., sustituyendo la NZ-amina por bactotripton en la misma proporción y se le añade casaminoácidos.

**P-75**: Se utiliza para el agar de cobertera en las transfecciones de *E.coli*. Es básicamente como el medio NZ al que le falta los casaminoácidos. Se le añade 0,7% de agar.

Para la preparación de medios sólidos, LB, M9, 2xTy y NZ añadimos agar al medio descrito hasta 1,5%. Cuando se necesita un agar blando se añade 0,7% de agar.

## 6.2.- Streptomyces

**Medio mínimo**:  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  0,05%,  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  0,05%,  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,02%,  $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001%, pH 7,2. Tras esterilizar, se añade Manitol estéril hasta 0,5%. (Hopwood, 1967).

Para medio sólido, se añadió agar hasta 2,2%.

**R2YE o R5**: Sacarosa 10,3%,  $\text{SO}_4\text{K}_2$  0,025%,  $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,012%, glucosa 1%, casaminoácidos (DIFCO) 0,01%, extracto de levadura 0,5% tampón TES 0,573%, elementos traza 0,2%. Ajustar a pH 7,3 , añadir agar hasta 2,2% y esterilizar.

Al utilizar, se completó hasta:  $\text{POH}_2\text{K}$  0,005%,  $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  20mM, L-Prolina 0,3% y NaOH 7mM. (Thompson y col.,1980).

**DNB**: DIFCO NUTRIENT BROTH 0,8%. (Hopwood y col.,1985a)

**DNA:** DNB, glucosa 0,5%, agar 1.5%. Esterilizar y añadir  $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$  hasta 0,8mM y  $\text{SO}_4\text{Mg}$  hasta 1mM (en el caso de fagos derivados de  $\phi\text{C31}$ ). (Hopwood y col.,1985a)

**SNA:** DNB con agar al 0,6%. (Hopwood y col.,1985a)

**YEME:** Extracto de levadura 0,3%, extracto de malta 0,3%, bactopectona 0,5%, glucosa 1% y Sacarosa 10,3%. Esterilizar y completar con  $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  hasta 5mM. Para la preparación de protoplastos añadir, además, glicina hasta 0,5%. (Hopwood y col.,1985a)

**SY:** Almidón soluble 1,5%, extracto de levadura 0,1%,  $\text{ClNa}$  0,3%,  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  0,1%,  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1% y TES 20mM. pH 7,4. Si se desea hacer con soporte sólido se le añadió agar al 1,5% final (Oki y col.,1981).

## 7.- SOLUCIONES Y TAMPONES

Entre las de uso más cotidiano caben destacar:

**TE:** (Tris 10mM pH 8, EDTA 1mM). Utilizado para disolver el DNA.

**Tampón de lisis alcalina:** Tris.ClH 25mM pH8, EDTA 25mM, Sacarosa 10,3%. Para resuspender células a lisar en extracciones de DNA por lisis alcalina.

**Solución de lisis alcalina:** NaOH 0,3M, SDS 2%. Para lisis celular en extracciones de DNA por lisis alcalina.

**TBE:** (Tris 89mM pH 8,3, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM). Utilizado como tampón en la electroforesis.

**SSC:** ( $\text{ClNa}$  150mM, citrato sódico 15mM, pH 7,6) y **Denhart** (BSA 0,02%, ficoll 0,02%, PVP 0,02%) utilizado a distintas concentraciones para transferencia e hibridación de ácidos nucleicos.

**Elementos traza:** ( $\text{Cl}_2\text{Zn}$  0,004%,  $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,02%,  $\text{Cl}_2\text{Cu}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,001%,  $\text{Cl}_2\text{Mn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,001%,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 1\text{H}_2\text{O}$  0,001%,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,001%). Para medios y tampones de *Streptomyces* (Hopwood y col., 1985a).

**P:** Sacarosa 10,3%,  $\text{SO}_4\text{K}_2$  0,25%,  $\text{Cl}_2\text{Mg}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2.02%, elementos traza 2%. Esterilizar y añadir  $\text{POH}_2\text{K}$  hasta 0,005%,  $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  hasta 25mM y tampón TES hasta 25mM. Para manejo de protoplastos (Hopwood y col., 1985a).

## 8.- OBTENCION DE DNA

### 8.1.- Preparación de DNA cromosómico de *Streptomyces*

El procedimiento seguido es básicamente el descrito por Hopwood y colaboradores (1985a). Se parte de un cultivo de 25ml de YEME crecido a 30°C durante 48 horas. Tras recoger el micelio por filtración se lava con sacarosa al 10%. Posteriormente se resuspende con el tampón de lisis alcalina con lisozima (2-4 mg/ml), incubando a 37°C durante 40 minutos. Estas células se lisan en presencia de SDS con una concentración final del 1%. Se extraen con fenol:cloroformo neutro (50:50 con OH-quinoleína al 0,1% y neutralizado con Tris-HCl 50mM pH8). Las extracciones se suceden hasta que no se observa interfase. Posteriormente se precipita con 2,2 volúmenes de etanol 100% y 1/10 volumen de ACoNa 3M. Después de dos lavados con etanol 75%, se disuelve en TE con una concentración de RNAsa de 50µg/ml, incubándose a 37°C durante 60 minutos para digerir el RNA. La fase acuosa se vuelve a extraer con fenol:cloroformo neutro y se precipita con etanol 100% disolviendo finalmente en TE. La concentración de las soluciones de DNA se determina por la medida de la densidad óptica a 260 nm en cubetas de cuarzo de 1mm y considerando que 1 unidad de D.O. se corresponde con una concentración de DNA de 50µg/ml. La pureza de la preparación se estima midiendo en las mismas condiciones pero a 280 nm y determinando la relación DO 260/280, siendo valores aceptables entre 1,65 y 1,85.

## 8.2.- Minipreparaciones de plásmidos tanto de *Streptomyces* como de *E.coli*

Tanto en las extracciones de DNA de *E.coli* como de *Streptomyces* se sigue el mismo protocolo, con la diferencia en el tratamiento con lisozima previo a la lisis, que no se realiza en el caso de *E.coli* y sí en el caso de *Streptomyces*. Las cantidades son proporcionales en ambas extracciones pero no iguales, ya que se parten de volúmenes de cultivo diferentes. El procedimiento realizado es básicamente el método descrito por Birnboim (1983) (de lisis alcalina) con algunas modificaciones. En el caso de *E.coli*, se parte de las células obtenidas de 2ml de cultivo en medio LB con selección, crecido durante toda la noche a 37°C, mientras que en *Streptomyces* se parte generalmente del micelio obtenido de 50ml de medio YEME con la selección adecuada, después de haber crecido durante 48 horas a 30°C. El micelio se recoge, bien por filtración o bien por centrifugación y se lava con sacarosa al 10%. Las células de *E.coli* se recogen por centrifugación. Tanto en *E.coli* como en *Streptomyces* las células se resuspenden en un 10% del volumen inicial de cultivo.

En el caso de *Streptomyces* las células se resuspenden en 5ml del tampón de lisis; este tampón contiene, además, lisozima (2-4 mg/ml). Se incuban a 37°C durante unos 30 minutos, para digerir la pared celular. Posteriormente se lisan las células añadiendo 3ml de solución de lisis alcalina previamente calentada a 60°C, e incubando 10 minutos a 70°C en el caso de plásmidos pequeños de *Streptomyces* ó plásmidos de *E.coli*. Si los plásmidos de *Streptomyces* son de gran tamaño, es necesario un tratamiento más suave, que consiste en una incubación a 50°C hasta que se observa una lisis total, generalmente unos 30 minutos.

A los lisados se añaden 4ml de una solución de AcOK 3M pH6 para precipitar los restos de proteínas, DNA cromosómico desnaturalizado, etc. Posteriormente se extrae con un volumen de fenol:cloroformo neutro y la fase acuosa se precipita con 1 volumen de isopropanol sin añadir sales, ya que la concentración salina es alta por el proceso anterior. Después de dos lavados con etanol 75% se disuelve en TE con

RNasa a una concentración de 50µg/ml. Se incuba a 37°C durante 30 minutos y se vuelven a repetir los ciclos de extracción con fenol:cloroformo y precipitación, disolviéndose al final en 70µl de TE.

### 8.3.- Preparación de DNA plasmídico en gradientes de densidad de ClCs

Para *E.coli* el volumen de cultivo del que se parte es de 250-500ml y en *Streptomyces* es de 1 a 2 litros, en función del número de copias del plásmido a extraer. En ambos casos es necesario añadir el antibiótico requerido para mantener la selección de las células portadoras del plásmido.

El protocolo seguido es el mismo que para las minipreparaciones (apartado 8.2), pero tras la precipitación con etanol se disuelve en 8ml de TE; una vez disuelto se añade ClCs hasta 1,05g/ml y BrEt hasta 625µg/ml. Mediante una centrifugación de 6 horas a 50000 rpm y después de 5 horas a 38000 rpm a 16°C, se separa el plásmido del resto de ácidos nucleicos presentes. Los pasos posteriores de purificación se realizan según Maniatis y col., (1982) eliminando el BrEt mediante sucesivas extracciones con isopropanol saturado con 5M ClNa. Una vez eliminado el BrEt se diluye con 2 volúmenes de TE y posteriormente se precipita con 2,2 volúmenes de etanol 100%. Una vez centrifugado se diluye en 1ml de TE.

### 8.4.- Preparación de DNA de fagos de *Streptomyces*

Para la preparación de DNA de fagos de *Streptomyces* se siguió exactamente el protocolo descrito por Hopwood y colaboradores (1985a).

Partiendo de una suspensión de fagos con una concentración al menos de  $10^6$  ufp/ml, se infectan esporas de la cepa correspondiente de *Streptomyces*, generalmente *S.lividans*. A partir de tres placas de DNA en las que la lisis es confluyente (ver apartado 13.1), se retira el agar de cobertera donde están contenidos los fagos y se resuspende en 4ml de medio DNB por placa. Se mezcla y se mantiene en agitación suave aproximadamente dos horas a temperatura ambiente. Después de

centrifugar a 8000 rpm en un rotor SS-34, para quitar los restos de agar, se centrifuga la suspensión de los fagos a 30000 rpm en un rotor 60Ti, durante 90 minutos a 4°C. El precipitado conteniendo los fagos se resuspende en 400µl de tampón SM (Tris-HCl 20mM pH 7,5, SO<sub>4</sub>Mg 1mM, NaCl 100mM, gelatina 1%, RNAsa 50µg/ml). Tras una incubación de 1 hora a 37°C con agitación suave, se añade 1/5 del volumen de mezcla de SDS (2 volúmenes de EDTA 0,5M pH8, 1 volumen de Tris 2M pH 9,6 y 1 volumen de SDS al 10%) y se incuba a 60°C durante 25 minutos con el fin de romper la cápsida de los fagos y liberar el DNA. Las proteínas se precipitan añadiendo AcOK 8M y posteriormente se realizan sucesivas extracciones con fenol:cloroformo neutro. Por último el DNA se precipita con 1 volumen de isopropanol y se lava con etanol al 75%, disolviendo al final en 100µl de TE. Puede purificarse algo más la preparación, precipitando con 5mM de espermina durante 5 minutos en hielo y posterior precipitación con 2,2 volúmenes de etanol 100% y 1/10 del volumen de AcONa 3M durante una hora a -20°C. El precipitado final se disuelve en 100µl de TE.

En el caso de preparación a gran escala (gradiente de ClCs) es necesario partir de lo equivalente a 20 placas de lisis confluyente. El procedimiento es similar hasta el tratamiento del fago con RNAsa, en el que los fagos se resuspenden en 8ml de tampón SM al que se le añade ClCs a una concentración de 0,9g/ml. Mediante una centrifugación de 18 horas a 30000 rpm, en un rotor 50Ti a 4°C, se extrae la banda refringente que contiene los fagos. Una vez extraída se procede de igual manera que en el caso de las minipreparaciones: utilización de la mezcla SDS, extracciones con fenol:cloroformo neutro y precipitaciones con isopropanol, disolviendo al final en 500µl de TE.

#### 8.5.- Extracción de DNA de colifagos

##### 8.5.1.- Derivados del fago lambda

Se parte de 25ml de medio NZ al que se inocula 200µl de un cultivo estacionario de células sensibles al fago, MN621, previamente tratadas (ver apartado 11.2.2), que se infectan con una suspensión de fagos con una concentración de  $2 \cdot 10^8$  ufp/ml. Después de una incubación de no más de 10 horas a 37°C en agitación, se trata durante 15 minutos

con unas gotas de cloroformo con el fin de lisar totalmente las células. Posteriormente se centrifuga a 5000 rpm en un rotor SS-34, durante 10 minutos, para quitar los lisados celulares y el sobrenadante se centrifuga a 30000 rpm en un rotor 60Ti, durante 90 minutos a 4°C. A continuación se resuspende el precipitado en tampón SM (ver apartado 8.4) conteniendo RNAsa 40µg/ml y DNAsa 20µg/ml; para eliminar los restos de RNA y DNA celulares la suspensión se incuba a 37°C durante 40 minutos. Se añade una mezcla 20mM de EDTA y 1% SDS y se incuba a 70°C durante 15 minutos. Se enfría rápidamente y se realizan 2 ó 3 extracciones con fenol cloroformo neutro. Se precipita con 1/10 (v/v) AcONa 3M y 0,65 volúmenes de isopropanol. Se lava 2 veces con etanol 75% y se disuelve en 100µl de TE.

#### 8.5.2.- Derivados de M13. Cadena doble y cadena sencilla

Tanto para las preparaciones de cadena doble (a pequeña y gran escala) como para la purificación de cadena sencilla, se siguió el método descrito por Messing (1983) y Sambrook y col., (1989). Las cepas que se utilizaron para obtener estos fagos son básicamente JM101 y XLlblue.

Se siembra medio líquido LB con una dilución 1/100 de un cultivo de las células adecuadas. Este cultivo se infecta con el fago procedente de una placa de lisis aislada y se incuba con agitación durante 6 horas a 37°C. Después de una centrifugación a 4000 rpm, durante 10 minutos, se obtiene un precipitado de células que contienen el fago en forma de doble cadena, y un sobrenadante en el que se encuentran las partículas del fago con la cadena sencilla de DNA.

La extracción de la doble cadena del fago se realiza mediante el mismo procedimiento que para plásmidos de *E.coli* (ver apartado 8.2). La extracción de la cadena sencilla consiste primeramente en una precipitación del fago en presencia de PEG 6000 25% y ClNa 2,5M, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se extrae con fenol neutro sin cloroformo, con el fin de extraer lipoproteínas. Una vez extraído con fenol se precipita añadiendo 1/10 (v/v) de AcONa 3M y 2,2 volúmenes de etanol 100% durante 1 hora a -20°C. Tras la precipitación se lava con etanol al 75% y se disuelve en 25µl de TE.

## 9.- MANIPULACION DE ACIDOS NUCLEICOS

### 9.1.- Digestión enzimática del DNA

Las digestiones con endonucleasas de restricción se realiza siguiendo los métodos descritos por Maniatis y col., (1982). Se utilizan aproximadamente entre 2-5 unidades de enzima generalmente en un volumen de digestión de 20µl. Los tampones utilizados son los que recomiendan las casas comerciales en su caso.

### 9.2.- Defosforilación de extremos 5' de DNA

La eliminación del fosfato del extremo 5' del DNA se realiza añadiendo 1 unidad de fosfatasa alcalina de timo de ternera, (Boehringer) directamente sobre la digestión que genera dicho extremo e incubándolo entre 20 y 45 minutos a 37°C. La alta actividad de esta enzima permite su buen funcionamiento a pesar de no utilizar en ocasiones las condiciones salinas óptimas.

### 9.3.- Relleno de extremos cohesivos de DNA

Para rellenar los extremos cohesivos de DNA generados por digestión con endonucleasas de restricción se siguen los protocolos descritos por Maniatis y col., (1982). Se utiliza la enzima DNA polimerasa, fragmento Klenow, en el caso de extremos 5' protuberantes, y T4 DNA polimerasa en el caso de extremos 5' recesivos. Se añade al DNA digerido una mezcla de deoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP a una concentración final de 2mM. Posteriormente se añade el tampón TA (40mM Tris-HCl pH 7,9, 100mM AcOK, 10mM Acetato magnésico, 0,2mM ditio-treitol, 120µg/ml BSA) y la enzima correspondiente. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C se extrae con fenol:cloroformo y se precipita con isopropanol.

### 9.4.- Ligación de fragmentos de DNA con extremos romos y cohesivos

Para la ligación de fragmentos de DNA se sigue el método recomendado por Maniatis y col., (1982). En general se utilizan vectores defosforilados y un exceso molar de fragmento a clonar de 2-3 veces. En



los casos en los que se requiere forzar las condiciones, como en el caso de ligación de extremos romos, se añade gelatina a 100µg/ml (Burns y Beacham, 1983) o PEG 6000 15% final (Buckel,1985).

Los fragmentos a ligar se coprecipitan con isopropanol y se disuelven en TE con tampón T4 DNA ligasa (50mM Tris-HCl, 10mM Cl<sub>2</sub>Mg, 10mM ditrioeritritol con pH 7,5), añadiendo 1 unidad de ligasa, si la ligación es de extremos cohesivos, y 200 unidades de ligasa si los extremos son romos. Posteriormente se incuban a 14°C durante 2 horas.

#### 9.5.- Digestión de DNA con Exonucleasa III

Se sigue el protocolo descrito por Henikoff (1984) partiendo de aproximadamente 2µg de DNA y utilizando Exonucleasa III, a una concentración de 25U/µgr de DNA. Se incuba durante 75 segundos a 37°C. Posteriormente se trata con nucleasa S1 con el fin de eliminar las cadenas sencillas generadas por la Exonucleasa III. Se rellenan los extremos utilizando T4 DNA polimerasa en presencia de dATP, dGTP, dCTP, dTTP en una concentración de 2mM. Una vez obtenidos los extremos romos, se ligan y se transforman las células elegidas, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 12.2. Nunca se obtuvo una población de fragmentos sincronizada, sino que en cada digestión se generaban moléculas digeridas entre 0 y 2000 pares de bases.

#### 9.6.- Electroforesis en geles de agarosa

Las moléculas de DNA se separan electroforéticamente en geles de agarosa a distintas concentraciones en función del tamaño de las moléculas a separar, utilizando TBE (Tris-Borato-EDTA) como tampón y bromuro de etidio 0,5µg/ml final como colorante.

#### 9.7.- Electroforesis en geles de acrilamida

Se realizan según describe el manual de manejo de "Macrophor sequencing system" (Pharmacia LKB). Son geles en gradiente de espesor de 0,2 mm a 0,8 mm. La mezcla de acrilamida contiene: Urea 42g, 14,5ml de mezcla acrialmida-bisacrilamida al 40%, TBE 1x y agua destilada hasta 100ml. Una vez hecha la solución se filtra por un filtro

Millipore de 0,45 $\mu$ m, y posteriormente se le añade 0,08% de TEMED y persulfato amónico a una concentración de 0,5mg/ml. Una vez polimerizado, se aplican las muestras en el gel y se somete a un campo eléctrico de 2000V durante aproximadamente 4 horas, a una temperatura de 55°C.

Las concentraciones de acrilamida estándar utilizadas son del 6% para los geles de secuenciación, del 12% para la visualización de oligonucleótidos y del 4% al 8% para separar bandas de 60-160 pares de bases.

#### 9.8.- Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Se realizaron aislando el fragmento de DNA que interesa, mediante un corte en el gel de agarosa de la zona que corresponde a ese fragmento. Posteriormente se introduce en una membrana de diálisis previamente hervida en una solución de 1mM EDTA y 2% bicarbonato sódico (Maniatis y col.,1982). Se añade una cantidad arbitraria de tampón TBE y la bolsa de diálisis se somete a una corriente de 120V, con el fin de extraer el DNA de la agarosa. A continuación se extrae varias veces con fenol:cloroformo neutro y se añaden 10 $\mu$ g de tRNA con el fin de favorecer la precipitación del fragmento de DNA (realizada en las condiciones ya descritas).

#### 9.9.- Preparación de sondas radiactivas de DNA

Para el marcaje homogéneo de fragmentos de DNA a utilizar como sonda radiactiva, se siguió el procedimiento de hibridación al azar con oligonucleótidos y extensión con DNA polimerasa fragmento Klenow. Siempre se utilizaron 25  $\mu$ Ci del isótopo radiactivo  $^{32}$ P-dCTP (Maniatis y col.,1982).

Se parten de 200ng de DNA al que se añaden 60ng de oligonucleótidos. Después de desnaturalizar el DNA se añaden dATP, dGTP y dTTP en concentración 2mM en presencia de DNA polimerasa fragmento Klenow y del isótopo radiactivo  $^{32}$ P-dCTP. Tras incubar durante 1 hora a 37°C se extrae con fenol:cloroformo neutro, y para separar los nucleótidos incorporados de los no incorporados, se realiza una

cromatografía de filtración a través de una columna de Sephadex G-50 equilibrada con TE. El rendimiento de la reacción se determina contando la radiación Cerenkov de una alícuota del eluido.

#### 9.10.- Transferencia de DNA a filtros de nitrocelulosa e hibridación de ácidos nucleicos

En un gel de agarosa se separan los fragmentos a analizar en las condiciones ya descritas (apartado 9.6). El DNA es desnaturalizado "in situ" cuando se sumerge el gel en una solución de NaOH 0,5M ClNa 1,5M y después de mantenerlo 30 minutos a temperatura ambiente, se neutraliza con una solución Tris-HCl 1M pH 7,5 y ClNa 1,5M, durante el mismo tiempo. Posteriormente se transfiere a un filtro de nitrocelulosa ó nylon (Hybond C ó Hybond N, respectivamente) según el procedimiento descrito por Maniatis y col. (1982), utilizando 20xSSC como tampón de transferencia y transfiriendo entre 3 y 8 horas. En el caso de utilizar la nitrocelulosa es necesario fijar el DNA mediante calor, con un tratamiento de 80°C en vacío durante 2 horas. En el caso del filtro de nylon el DNA se fija con una exposición a luz ultravioleta durante 1 ó 2 minutos. Después, el filtro (en ambos casos) se sumerge en tampón 5xDenhardt/4xSSC/200µg/ml DNA tимо de ternera o de esperma de salmón desnaturalizado, manteniéndolo a 65°C durante dos horas. Posteriormente se añade el DNA sonda desnaturalizado por calor, utilizando aproximadamente  $10^6$  cpm/ml; la mezcla se incuba a la misma temperatura anterior durante al menos 4 horas. Con el fin de eliminar la radiactividad no unida específicamente, las membranas se lavan dos veces con una solución de 2xSSC+SDSO,1% seguido de otros dos lavados con una solución 0,2xSSC+SDSO,1%, incubando en cada caso a 65°C durante 10 minutos. Se dejan secar a temperatura ambiente y la señal radiactiva fijada a las bandas de DNA impresiona una película de rayosX tras una exposición a -70°C durante un tiempo variable en función de la señal. Generalmente el tiempo de exposición es de 12 horas.

La transferencia "in situ" de las placas de lisis a nitrocelulosa se realiza también siguiendo el procedimiento descrito por Maniatis y col., (1982). Se posa la nitrocelulosa sobre la placa que contiene las

placas de lisis aisladas marcando la placa y los filtros, con el fin de poder localizar posteriormente la señal radiactiva; el DNA fijado a los filtros se desnaturaliza "in situ" con una solución de NaOH 0,5M, ClNa 1,5M durante dos minutos. Posteriormente se neutraliza con una solución Tris-HCl 1M pH 7,5 y ClNa 1,5M, durante el mismo tiempo. A continuación se fija el DNA a los filtros mediante un tratamiento a 80°C en vacío durante 2 horas. Tras ésto, el procedimiento continúa de la forma descrita anteriormente.

#### 9.11.- Secuenciación del DNA

Para secuenciar el DNA se utiliza el método de terminación de la cadena (Sanger y col.,1977). El hecho de que el DNA de *Streptomyces* posea un contenido en G-C tan elevado, dá lugar a que se generen compresiones en los geles de secuencia motivado por estructuras secundarias muy estables de DNA, impidiendo su correcta lectura. Para minimizar este efecto, se utilizó sistemáticamente el nucleótido 7-Deaza-2'-Deoxiguanosina 5'-trifosfato como sustituto del dGTP. El nucleótido incorporado a la cadena de DNA no se complementa con la citosina y, por tanto, se reducen espectacularmente las compresiones.

Se utilizó el "kit sequenase" (de la casa comercial USB) en el que se suministra todo lo necesario. En primer lugar se realiza una reacción de anillamiento entre el DNA de cadena sencilla y el iniciador utilizado. En segundo lugar se añade la mezcla de deoxinucleótidos, manteniendo como isótopo radiactivo el  $^{32}\text{P}$ -dCTP, en presencia de la secuenasa. Por último se añade la mezcla de dideoxinucleótidos en unas proporciones determinadas por la casa comercial, con el fin de producir paradas discretas dando lugar a fragmentos de diferentes tamaños, que son separados en geles de acrilamida en gradiente de grosor, preparado según el apartado 9.7. El gel se somete a 2000 voltios en una cubeta LKB de Pharmacia durante aproximadamente 4 horas. El tampón utilizado es TBE en gradiente de concentración (desde 0,5 hasta 2,5). Posteriormente se fija el DNA sumergiendo el gel en una solución al 10% de ácido acético glacial y tras su secado, se expone a temperatura ambiente generalmente durante 12 horas.

### 9.12.- Fraccionamiento en gradiente de sacarosa

Se utilizó para separar los fragmentos de DNA cromosómicos de diferentes tamaños obtenidos mediante digestión parcial con enzimas de restricción. El gradiente de sacarosa se forma una vez mezcladas a partes iguales dos soluciones de sacarosa del 40% y del 10%. Las soluciones de sacarosa se preparan en un tampón cuya composición es: 1M ClNa, 20mM Tris-HCl pH 8 y 5mM EDTA. Una vez añadidas las dos soluciones de sacarosa, se inclina el tubo muy lentamente y se mantiene horizontal durante 4 horas con el fin de crear el gradiente por difusión de las dos soluciones. Una vez formado se aplica la muestra conteniendo los fragmentos de DNA a separar y se centrifuga a 36000 rpm durante 17 horas y a 17°C, en el rotor SW41.

Posteriormente se separan distintas fracciones mediante un colector de fracciones y después de añadir 0,7 volúmenes de TE, con el fin de diluir la sacarosa, se precipitan en presencia de tRNA 10µg/ml e isopropanol (sin sales ya que las fracciones tienen una concentración de sal de 1mM) en las proporciones ya mencionadas. Por último, se disuelve en TE.

### 9.13.- Empaquetamiento "in vitro"

Fué realizado con el "kit" de empaquetamiento "in vitro" de la casa comercial Amersham Internacional. Se partió de 1µg de DNA (ligación entre los fragmentos obtenidos del gradiente de sacarosa seleccionados y el fago EMBL4). Posteriormente se añadieron los lisados celulares en las proporciones descritas por la casa comercial. Después de una incubación a 20°C durante 2 horas, se resuspende en 500µl de tampón SM más cloroformo. Se centrifuga durante 2 minutos y se guarda el sobrenadante a 4°C. De esta manera se alcanza un título de  $10^9$  ufp/µg de DNA de fago.

## 10.- CONSERVACION Y SELECCION DE CEPAS

Para la conservación de las cepas de *E.coli* se parte de un cultivo que proviene de una colonia aislada y crecido durante toda la noche

a 37°C. Las células se recogen por centrifugación y se resuspenden en glicerol al 50%. Finalmente, se guardan a -20°C (Maniatis y col.,1982).

La conservación de las cepas de *Streptomyces* se realiza en forma de suspensión de esporas (o de micelio en el caso de mutantes que no esporulan) en glicerol al 20% y se guardan a -20°C. (Hopwood y col.,1985a)

La selección de cepas bacterianas se realiza añadiendo a los medios de cultivo diferentes antibióticos en las condiciones que señala la siguiente tabla: (unidades en µg/ml)

	<u>Streptomyces</u>			<u>E.coli</u>
	M.líquido	M.sólido completo	M.mínimo sólido	
Ampicilina	-	-	-	200
Cloramfenicol	-	-	-	25
Higromicina	50	200	50	50
Streptomycin	20	50	50	20
Tetraciclina	-	-	-	5-10
Tioestreptón	5	50	50	-

## 11.- PREPARACION DE ORGANISMOS Y FAGOS

### 11.1.- Streptomyces

#### 11.1.1.- Suspensión de esporas

Se crecen las células en placas de medio rico, generalmente medio R5, hasta que el micelio esporule. Una vez que las esporas ya tienen la pigmentación característica, se añade agua estéril y se recogen de la placa. Posteriormente se filtran a través de algodón hidrófilo con el fin de eliminar los restos de micelio arrastrados con las esporas y

se centrifuga. El precipitado de las esporas se resuspende en glicerol 20% y de esta manera se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Hopwood y col.,1985a).

#### 11.1.2.- Preparación de micelio

En cepas que no esporulan bien se guarda en forma de micelio recogido de una placa en una solución al 20% de glicerol y a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En estas condiciones el micelio es más perecedero que las esporas. El micelio recogido por centrifugación es lavado con sacarosa 10% puede guardarse por pocas semanas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriores manipulaciones (Hopwood y col.,1985a).

#### 11.1.3.- Preparación de protoplastos

La preparación de protoplastos se basó en el trabajo de Okanishi y col.,(1974) adaptado y optimizado por Bibb y col.,(1978) y Thompson y col.,(1982). Un compendio de estos métodos es descrito por Hopwood y col.,(1985a).

Se parte de un cultivo de 50ml de YEME suplementado con glicina 0,5%, crecido durante 36-48 horas dependiendo de la cepa de *Streptomyces*. Se recogen por centrifugación y se lavan con sacarosa 10%. El micelio se resuspende en un 10% del volumen de cultivo con una solución de lisozima (tampón P con lisozima a la concentración de 1mg/ml) y tras una incubación de 30-60 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$ , se obtienen los protoplastos que son lavados varias veces con tampón P y concentrados en el mismo tampón. Se almacenan a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Cabe destacar que la congelación conviene que sea lenta mientras que la descongelación tiene que ser lo más rápida posible, con el fin de no lisar los protoplastos y obtener buenos rendimientos de transformación.

#### 11.1.4.- Conservación de actinofagos

La suspensión de fagos se realiza a partir de una placa de lisis y se resuspende en 1ml de DNB (Hopwood y col.,1985a). Para obtener una suspensión de alto título se infectan esporas de *S.lividans* TK21, con una dilución de la suspensión de placa aislada suficiente para obtener una lisis confluyente en placas de medio DNA sólido (ver apartado

13.1). Después de mantenerlo en la estufa toda la noche a 30°C, se añade a la placa 4-5ml de medio DNB y se mantiene en agitación suave durante 2 horas, tras lo cual los fagos han difundido al medio líquido. Se recogen y se filtra a través de un filtro de nitrocelulosa de 0,45µm con el fin de eliminar las bacterias de la suspensión de fagos. De esta forma se obtiene una suspensión de aproximadamente 10<sup>9</sup> ufp/ml y se guarda a 4°C manteniéndose durante varios meses.

## 11.2.- E.coli

### 11.2.1.- Preparación de células competentes

Se llevó a cabo siguiendo bien el método descrito por Brown y col.(1979) basado en el tratamiento con Cl<sub>2</sub>Ca. Se parte de un cultivo estacionario de células y se inoculan 50ml de medio LB con una dilución 1/50 de este cultivo. Se incuba a 37°C con agitación hasta llegar a una densidad óptica a 600nm de 0,4-0,6. Posteriormente se trata con Cl<sub>2</sub>Ca 50mM en frío durante 20 minutos. A continuación se concentran en una solución al 20% de glicerol en Cl<sub>2</sub>Ca 50mM y de esta forma se guardan congeladas a -70°C.

### 11.2.2.- Preparación de células sensibles

Se inoculan 25ml de medio LB-0,2% maltosa con la cepa sensible, en nuestro caso *E.coli* NM621. Tras un crecimiento a 37°C toda la noche se recogen las células y se resuspenden en SO<sub>4</sub>Mg 10mM. De esta forma se almacenan manteniéndose intactas alrededor de 10 días. (Maniatis y col.,1982).

### 11.2.3.- Conservación de colifagos

El procedimiento seguido con los fagos derivados del fago lambda es el descrito por Maniatis y col., 1982. A partir de una placa de lisis aislada se realiza una suspensión en 1ml de tampón SM, obteniéndose un título de 2.10<sup>8</sup> ufp/ml. En el caso de los colifagos derivados de M13 se siguió el procedimiento descrito por Messing (1983). El sobrenadante de los cultivos de M13 que contiene las partículas de fago pueden mantenerse a 4°C durante semanas.



## 12.- TRANSFORMACION GENICA

### 12.1.- Streptomyces

La transformación génica en diferentes especies de *Streptomyces* se basa en la obtención de protoplastos (Hopwood y col., 1985<sub>a</sub>; Bibb y col., 1978). El DNA se mezcla con 200µl de una suspensión de protoplastos preparados como se ha descrito en el apartado 11.1.3., e inmediatamente se añade 500µl de una solución al 25% de PEG 4000 en tampón P y se mantiene a temperatura ambiente durante 1-3 minutos. A continuación se extienden en placas de medio R5 y tras 17 horas de incubación a 30°C se añade una capa de SNA con el antibiótico requerido para la selección (ver tabla en el apartado 10), y se mantiene a 30°C. La frecuencia de transformación obtenida era, aproximadamente, de 10<sup>8-9</sup> transformantes/µg de DNA.

### 12.2.- E.coli

Se utiliza el método descrito por Brown y col. (1979). Se añade el DNA a las células competentes preparadas de la forma ya descrita (apartado 11.2.1). Se mantienen en frío durante 30 minutos y posteriormente se someten a un choque térmico durante 5 minutos a 37°C. Se añade 1ml de LB y se incuban durante 1 hora a 37°C con el fin de que se exprese la resistencia al antibiótico correspondiente. En el caso del cloramfenicol es necesario un tiempo de expresión de 90 minutos. A continuación se extienden en placas de LB con la selección adecuada y se incuban a 37°C. En el caso de utilizar plásmido que contengan el gen de la galactosidasa se añaden a las placas X-gal e IPTG. La frecuencia de transformación obtenida era, generalmente, de 10<sup>8</sup> transformantes por µg de DNA.

## 13.- TRANSFECCION GENICA

### 13.1.- Streptomyces

Para la transfección en *Streptomyces*, se utilizan siempre protoplastos de *S.lividans* preparados en el momento; en ciertas ocasiones en las que la necesidad de obtener una alta frecuencia era crucial, se

utilizaron liposomas de carga positiva preparados exactamente como describen Rodicio y Chater (1982). Se mezcla el DNA del fago con 200µl de una suspensión de protoplastos. Cuando no se utilizan liposomas se añaden 500µl de una solución de PEG en tampón P al 25%, y se mantiene a temperatura ambiente durante 1-3 minutos. En el caso de utilizar liposomas, se mezclan suavemente el DNA, 100µl de liposomas y 200µl de protoplastos. Inmediatamente se añaden 500µl de una solución de PEG al 60% en tampón P, y se mantiene la mezcla durante 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente, en ambos casos, se extiende en placas de medio R5 y se añade R5 blando (medio R5 con una concentración de agar de 0,7%) con 30µl de una suspensión de esporas concentradas ( $10^9$ ) de *S.lividans*. Se incubó a 30°C toda la noche. La infección del fago liberado por las células transfectadas se produce justamente cuando la espora del agar de cobertera comienza a formar el tubo germinal apareciendo en cada caso una placa de lisis.

La frecuencia de transfección fué, generalmente de  $10^7$  ufp/µg DNA y era mejorada en un orden de magnitud utilizando liposomas.

Para infectar otras especies de *Streptomyces* es necesario transfectar primero *S.lividans*, cepa TK21, y posteriormente infectar la especie elegida. Así después de la transfección descrita anteriormente, y tras una incubación a 30°C durante aproximadamente 13 horas, se exponen las placas a vapores de cloroformo durante 30 minutos con el fin de lisar el resto de las células de *S.lividans* que hayan sobrevivido a la infección. Posteriormente se replican estas placas con los fagos sobre otras placas de R5 que contienen un césped de esporas de la especie que queremos infectar. Se incuban a 30°C.

#### 13.1.1.- Obtención de lisógenos

El procedimiento para obtener lisógenos en *Streptomyces* (cepa con un DNA de fago insertado en el cromosoma) se realizó de acuerdo con Hopwood y col., (1985a).

Una vez que ha tenido lugar la infección de cualquier cepa de *S.coelicolor* por ejemplo, hay un porcentaje de fagos que recombinan

con el cromosoma y se insertan en él. A estas células en las que el fago se ha insertado en el cromosoma se las denomina lisógenos.

El aislamiento de los lisógenos se realiza por la réplica de las placas que contienen los presuntos lisógenos, a un medio que contenga la selección necesaria. Ello tiene como fin, obtener únicamente aquellas células que contengan el fago insertado en su cromosoma (Hopwood y col., 1985a).

### 13.1.2.- Preparación de liposomas

Utilizado para aumentar la eficiencia de transfección. Se prepararon siguiendo estrictamente las indicaciones de Hopwood y col. (1985a), basado en el protocolo original de Rodicio y Chater, (1982).

Se parte de 2,5mg de L-fosfatidilcolina y 1,2mg de estearilamina. Se disuelve cada lípido en 1ml de cloroformo y se añade 0,1ml de la solución de estearilamina a la solución de fosfatidilcolina. Se transfiere la mezcla a un matraz de fondo redondo y se añade 8ml de cloroformo. Se secan los lípidos a vacío a 55°C, hasta que quede una fina película adherida a las paredes del matraz. Una vez seco se añade 0,5ml de buffer G (NaCl 15mM; citrato sódico 1,5mM; Cl<sub>2</sub>Ca 1mM; sacarosa 280mM; L-treonina 100mM; L-histidina 100mM ajustado a pH 7 y esterilizado por filtración), y se recogen todos los lípidos adheridos a la pared del matraz. Posteriormente se añaden 3ml de medio de sedimentación de liposomas, LSM, (5,2g de KCl en 90ml de agua y que tras su esterilización se añaden 10ml de etanol). Se centrifuga a 6000 rpm durante 15 minutos, en un rotor SS-34. Se recoge el sobrenadante y se guarda a 4°C. La preparación se conserva al menos por 1 mes en estas condiciones.

### 13.2.- E.coli

Para la transfección de DNA de colifagos derivados de M13 en *E.coli*, se siguió el método descrito por Messing (1983). Primeramente se transfectan las células competentes de la forma ya descrita (apartado 12.2); posteriormente se añaden las células correspondientes, en un agar de cobertera de 2xTy y que contiene X-gal

e IPTG. Todo ello se extiende en placas de 2xTy y se incuba a 37°C durante 15 horas.

En el caso de los fagos derivados del fago lambda, el protocolo que se utiliza es el descrito por Maniatis y col., (1982). En primer lugar se introduce el DNA en las células de la forma ya descrita en transformación de *E.coli*. Se hacen las diluciones pertinentes en tampón SM y se añaden las células apropiadas. Posteriormente se mantienen a 37°C durante 20 minutos y se añaden 3 ml de medio P-75. Se incuban a 37°C toda la noche.

La frecuencia de transfección era similar a la de transformación, 10<sup>8</sup> ufp por µg de DNA.

#### 14.- CONJUGACION ENTRE CEPAS DE *Streptomyces*

Ciertos plásmidos de *Streptomyces* son capaces de movilizar material genético de unas especies a otras (plásmidos conjugativos). Para realizar análisis basados en estos procesos es necesario partir de cepas con marcadores genéticos diferentes con el fin de seleccionar de una placa, en la que crecen dos cepas diferentes, la cepa elegida. En nuestro caso se han utilizado cepas que contienen derivados del plásmido SCP2 sobre cepas que carecen de este plásmido, seleccionado con los marcadores de ésta última y además con el antibiótico requerido en cada caso (según los marcadores fenotípicos del plásmido).

#### 15.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los ensayos de actividad biológica del antibiótico actinorrodina se realizaron bien sobre *Bacillus subtilis*, o bien sobre *Micrococcus aureus*.

En los ensayos en los que se utiliza *M.aureus*, se vierten sobre la placa con la cepa a ensayar 8ml de SNA a 45°C con 200µl de un cultivo de este microorganismo crecido durante la noche en medio LB.

En los ensayos en los que se utiliza como microorganismo testigo *B.subtilis* se procede como en el caso anterior con la diferencia de que el SNA contiene 20µl de una suspensión de esporas de *B.subtilis* (por placa a ensayar) preincubadas 5 minutos a 70°C para eliminar la fase vegetativa. Los resultados eran visibles tras crecer las placas una noche a 37°C.

#### 16.- EXTRACCION DE SUSTANCIAS DERIVADAS DE ISOCROMANO-QUINONAS

Es un procedimiento basado en el trabajo de Cole y col., (1987). Se parte de un medio sólido ó líquido como SY. Tras un tiempo de incubación entre 5 y 10 días a 30°C, se alcaliniza el medio, bien con vapores de  $\text{NH}_4^+$  en el caso de las placas, ó añadiendo Tris-HCl hasta llegar a un pH entre 9 y 10. Se deja difundir aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. En el caso de medio sólido se congela y descongela rápidamente con el fin de fragmentar el agar. Posteriormente se filtra y se acidifica el medio con ClH hasta alcanzar un pH de 1-2 (concentración final aproximada de 500mM) adquiriendo una coloración roja. En estas condiciones se hace una extracción con un volumen de acetato de etilo, pasando todo el pigmento a la fase orgánica. Posteriormente se deseca en un rotavapor concentrando así el pigmento. Por último se resuspende en metanol y en algunos casos en TES 125mM pH 7.

#### 17.- CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Realizada sobre placas de silicagel 60, sin indicador fluorescente (Merck), y generalmente utilizando como solvente una mezcla de cloroformo:metanol (8:2). Cuando se realiza una cromatografía preparativa una vez terminada la cromatografía, se recorta la banda que interesa de la placa y se disuelve en metanol. Por centrifugación se quitan los restos de silicagel y se concentra en un rotavapor a temperatura ambiente.

## 18.- SOPORTE INFORMATICO

**Brujene** : Para el análisis de secuencias de *Streptomyces* (búsqueda de ORF's, uso de codones, etc.) (Jesús Vara, comunicación personal) Similar al "Codonpreference" de los programas para biología molecular de la Universidad de Wisconsin (GCG) (Deveraux y col.1984), pero con la Tabla de uso de codones característica de *Streptomyces*.

**Strider** : Para el trabajo rutinario con secuencias de DNA (búsqueda de dianas de enzimas de restricción, deducción de los productos génicos) (Marck, 1988)

**McDrawII** : Para la realización de dibujos y figuras.

**McWord 3.01V** : Para los textos.

**GCG Wisconsin** : Para análisis de secuencias de DNA y proteínas, comparaciones, etc. (Programas de The University of Wisconsin Genetics computer group, U.W. Biotechnology center, Madison, USA).

Las comparaciones entre las distintas proteínas se realizaron mediante el programa COMPARE del mismo paquete GCG descrito anteriormente. Se utilizaron las siguientes condiciones: ventana 30 y una astringencia de 20. Estas condiciones suponen que los puntos que aparecen en el gráfico presentan una homología del 66% (Deveraux y col.,1984).

## RESULTADOS

## 1.- LOCALIZACION DE GENES HOMOLOGOS A LA ACTINORRODINA SINTETASA EN *S. antibioticus*

### 1.1.- Construcción de una genoteca de DNA total de *S. antibioticus*

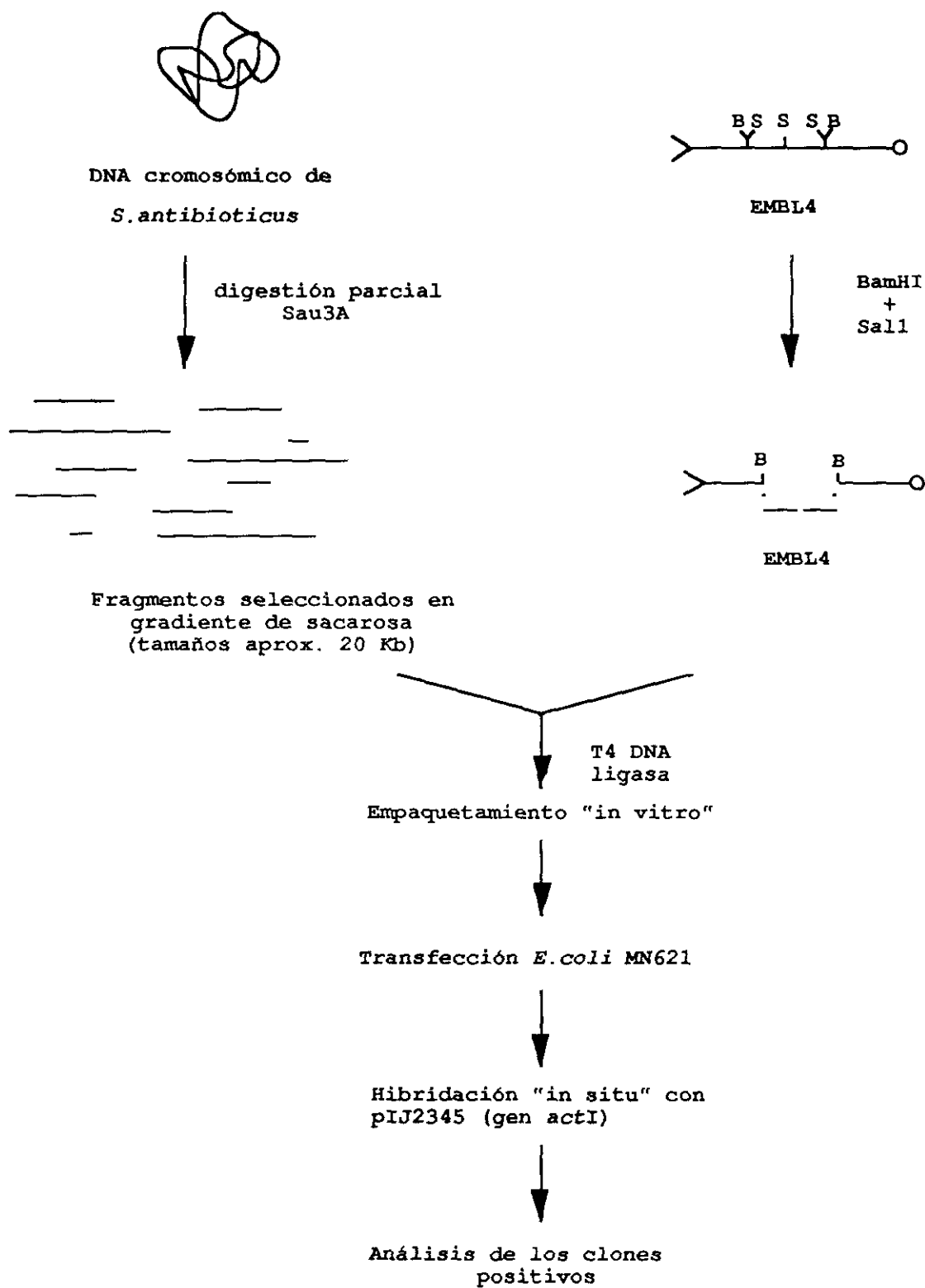
*Streptomyces antibioticus* es una especie productora de oleandomicina (un antibiótico macrólido de interés industrial), actinomicina D y probablemente otros poliquétidos con ó sin actividad antibiótica.

Basados en los datos de homología a nivel de las distintas poliquétido sintetetasas de diferentes sistemas ya descritos, se procedió a aislar y analizar los fragmentos cromosómicos de *S. antibioticus* que presentaran homología con el gen *actI*. Para ello, se construyó una genoteca de DNA total de *S. antibioticus* en el colifago EMBL4. El DNA cromosómico de *S. antibioticus* fué digerido con la enzima de restricción *Sau3A* en condiciones controladas para obtener una digestión parcial del genoma. Posteriormente y mediante un gradiente de sacarosa se procedió a separar fragmentos de aproximadamente 20kb que fueron ligados al vector EMBL4 digerido con *BamHI* y *Sall*, (ésta última digestión fué realizada con el fin de aumentar la eficiencia de fagos recombinantes) (Figura 5). Una vez ligado y mediante empaquetamiento "in vitro" (ver Materiales y Métodos, apartado 9.13) se obtuvieron los fagos recombinantes portadores de fragmentos cromosómicos de *S. antibioticus* con los que se infectó la cepa de *E. coli* MN621. Se obtuvieron aproximadamente  $7 \times 10^6$  ufp/ $\mu$ g de DNA, de las que aproximadamente el 70% contenían insertos.

El aislamiento de los fagos portadores de un fragmento de DNA cromosómico homólogo al gen *actI*, se realizó por hibridación "in situ" (ver Materiales y Métodos apartado 9.10) , extendiendo alícuotas de  $10^4$  ufp de la genoteca sobre 10 placas y utilizando como sonda el plásmido pIJ2345 (gen *actI* clonado en pBR329). De este ensayo se



Figura 5.- Esquema de la construcción de la genoteca de *S. antibioticus*.



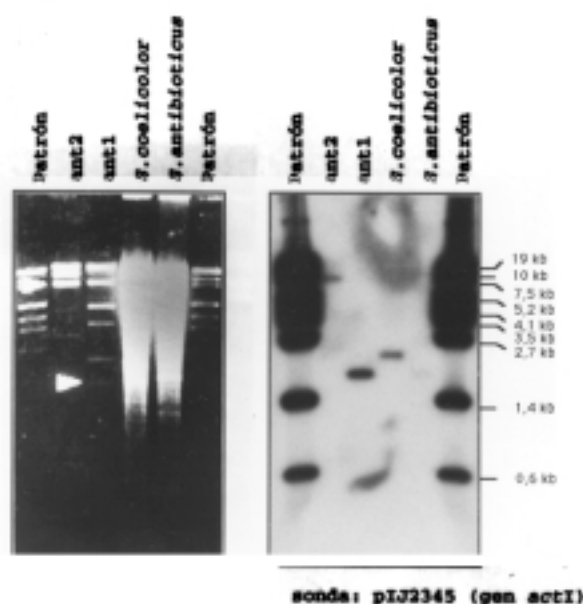
Nota: B: BamHI; S: Sall

obtuvieron dos placas de lisis que, mediante un posterior análisis de restricción, se determinó que contenían fragmentos de aproximadamente 13 y 15 kb (Ana Carnero, comunicación personal); se denominaron ant1 y ant2 respectivamente.

### 1.2.- Análisis de los clones obtenidos.

Los clones ant1 y ant2 digeridos con BamHI y separados los fragmentos en geles de agarosa, se hibridaron frente al plásmido pIJ2345 (portador del gen actI) marcado con  $^{32}P_i$ -dCTP; se determinaron así dos bandas BamHI de 1,8kb y de 8kb respectivamente, y que coincidían con las bandas de 1,8kb y de 8kb que aparecían en el digerido BamHI del DNA total de *S. antibioticus*. De los análisis de restricción y por hibridación cruzada se obtuvo la información de que ambos clones procedían de lugares distintos en el cromosoma. La hibridación con el gen actI fué más intensa con el clon ant1 que con el clon ant2, como se observa en la Figura 6.

Figura 6.- Análisis de restricción y "Southern blot" de los clones ant1 y ant2 obtenidos en el fago EMBL4 frente a pIJ2345.



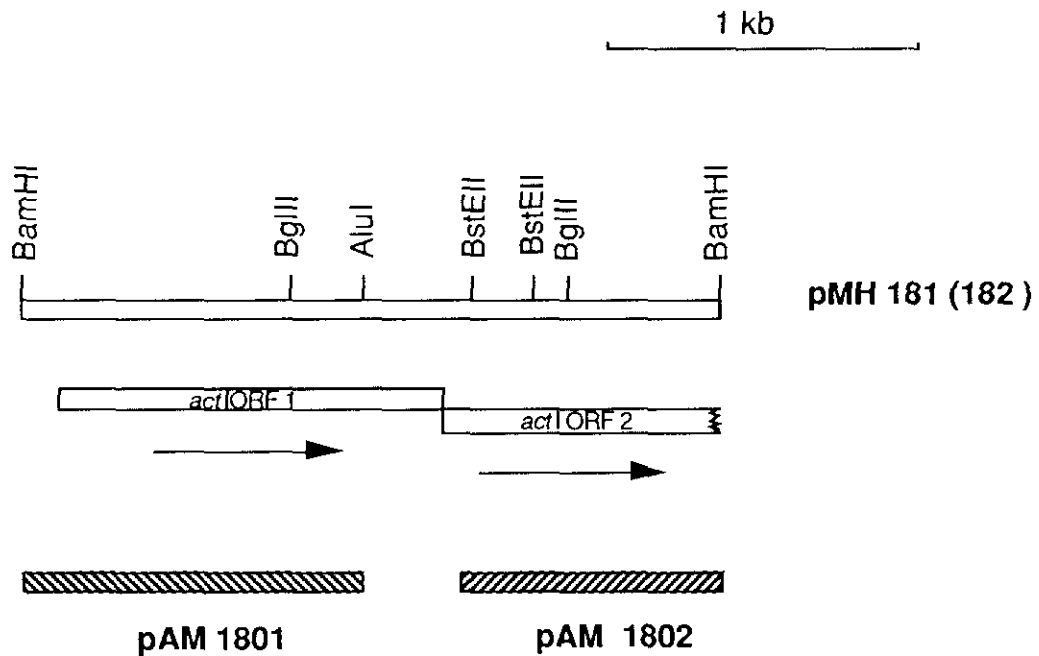
Nota: El patrón de tamaños moleculares consiste en una mezcla de fragmentos de DNA de *S.coelicolor* y *E.coli* de tamaño conocido. Tanto los clones ant1 y ant2, como los DNAs cromosómicos de *S.coelicolor* y *S.antibioticus* están digeridos con *Bam*HI.

Paralelamente, en el laboratorio se estaban secuenciando los genes correspondientes a las fases tempranas de la biosíntesis de actinorrodina. De esta forma se supo que en el fragmento *Bam*HI de 2,2kb de *S.coelicolor*, utilizado como sonda para el rastreo de la genoteca de *S.antibioticus* (pIJ2345), se encontraban toda la primera fase de lectura abierta, *actIORF1*, y parte de la segunda, *actIORF2*, correspondiente a la poliquétido sintetasa de actinorrodina. Los análisis comparativos con otras poliquétido sintetetas TipoII, sugerían que la homología entre las ORF's equivalentes a *actIORF1* podría estar más conservada que la homología entre las ORF's equivalentes a *actIORF2*; y que la existencia del par homólogo a *actIORF1/actIORF2* podría ser característica de las poliquétido sintetetas (Hopwood y Sherman,1990), ya que no se ha encontrado una organización semejante en agrupamientos análogos (ácido graso sintetetas). Para saber en cual de los fragmentos de *S.antibioticus* aislados existía una organización equivalente a la descrita para las distintas poliquétido sintetetas, se procedió a analizar qué fracción de la homología observada podría ser debida a la homología frente a *actIORF1* y cuál era debida a la homología frente a *actIORF2*. Para ello fué necesario separar *actIORF1* y *actIORF2* en la banda *Bam*HI de 2,2kb de *S.coelicolor* que contiene el gen *actI*. Con este fin se digirió la banda *Bam*HI de 2,2kb de *S.coelicolor*, clonada en pUC18 en ambas orientaciones (pMH181 y pMH182), con *ExoIII*, obteniéndose dos subclones: pAM1801 portador de la *actIORF1* casi completa, y pAM1802 con parte de la *actIORF2* (Figura 7).

Los clones ant1 y ant2 así como también los DNAs totales de *S.coelicolor* y *S.antibioticus*, se hibridaron frente a los plásmidos pAM1801 y pAM1802 (portadores de los genes *actIORF1* y *actIORF2* respectivamente), utilizando condiciones de alta astringencia (Materiales y Métodos apartado 9.10). De esta manera se determinó que el clon ant1 presentaba homología intensa con *actIORF1* y *actIORF2*, mientras que el clon ant2 sólo presentaba una señal fuerte frente a

*actIORF1*, no detectándose señal cuando la sonda radiactiva era el plásmido pAM1802 (*actIORF2*). De la misma manera, cuando se hibridó el DNA cromosómico de *S. antibioticus* digerido con *Bam*HI frente a *actIORF1* aparecían tres bandas *Bam*HI y, sin embargo, cuando se utilizó la sonda *actIORF2*, únicamente se observó la banda *Bam*HI de 1,8 Kb.

Figura 7.- Obtención de *actIORF1* y *actIORF2* separadas, mediante una digestión ExoIII.



El clon *ant1* parecía, por tanto, ser un buen candidato para contener los genes correspondientes a una poliquétido sintetasa, mientras que *ant2* parecía contener genes implicados en alguna otra ruta biosintética relativamente análoga a la biosíntesis de poliquétidos, ya que:

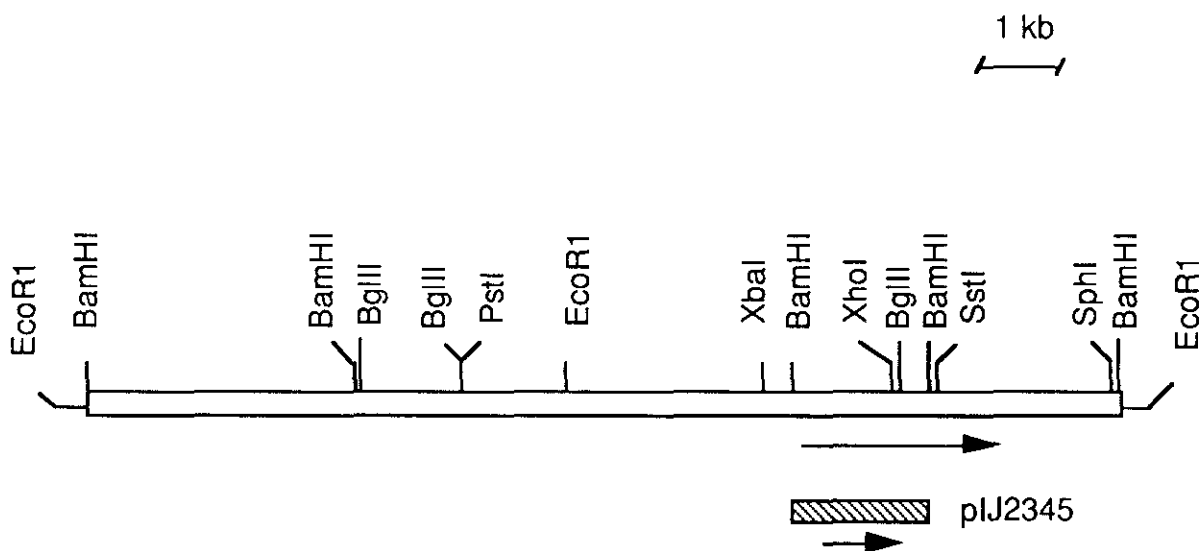
1) *ant1* presentaba una homología mucho mayor que *ant2* frente al gen *actI* (pIJ2345) y

2) *ant1* mantenía la homología con *actIORF1* y *actIORF2*, mientras que, el clon *ant2* únicamente presentaba una homología intensa con *actIORF1*.

### 1.3.- Nuevo rastreo de la genoteca de *S. antibioticus*

Los datos de secuencia de los genes de biosíntesis de actinorrodina (M. Fernández-Moreno, tesis doctoral) junto con los datos de análisis de transcritos (Malpartida, comunicación personal), demostraron que la transcripción del gen *actI* es en la dirección *actIORF1* a *actIORF2*. Dada la homología encontrada entre *ant1* y los genes tempranos de la biosíntesis de actinorrodina, parecía razonable pensar que en el clon *ant1* la transcripción de los genes equivalentes de una poliquétido sintetasa se realizaría de izquierda a derecha (Figura 8).

Figura 8.- Mapa de restricción del clon *ant1*



Según esto, el clon *ant1* únicamente contenía aproximadamente 3kb donde acomodar los genes correspondientes a la presunta poliquétido sintetasa. El espacio parecía insuficiente para codificar la presunta actividad que en el sistema de biosíntesis de actinorrodina es de más de 4kb. Por ello, se pensó que era necesario hacer un nuevo rastreo en la genoteca de *S. antibioticus*, de forma que permitiera conseguir un clon que se extendiera más a la derecha de los fragmentos clonados y disponer así del conjunto de los genes de la presunta poliquétido sintetasa.

Para ello, utilizando como sonda el extremo derecho del clon *ant1* (una banda *BamHI* de 2,5kb) frente a la genoteca de *S. antibioticus*, se

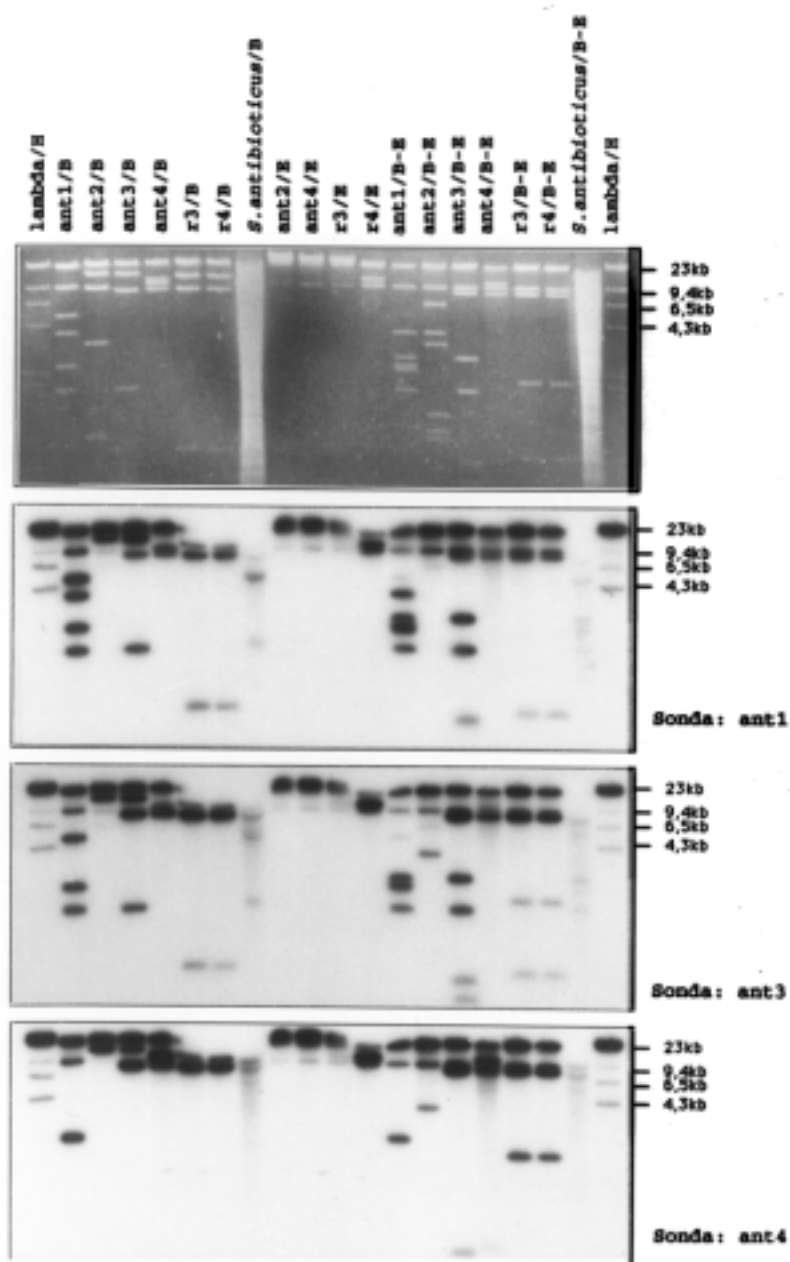
aislaron nuevos fagos recombinantes; de todos ellos los más interesantes parecían ser ant3 y ant4. Se hicieron hibridaciones cruzadas entre los clones ant1, ant3, ant4 y el genoma de *S.antibioticus* previamente digeridos con enzimas de restricción (ver condiciones en el apartado 9.10), usando el mismo filtro de Hybond N (Amersham) para todas las hibridaciones. El tiempo de exposición de los filtros con las distintas sondas, fué entre 2 y 5 días a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Después de cada hibridación se lavaba el filtro con NaOH 400 mM a  $45^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, con el fin de eliminar del filtro todos los restos de radiactividad del experimento anterior. La eliminación de radiactividad se comprobaba tras una exposición a  $-70^{\circ}\text{C}$  de toda la noche. Estos experimentos (Figura 9), permitieron determinar que ant1, ant3 y ant4 eran portadores de fragmentos solapantes y que éstos se encontraban contiguos en el cromosoma, abarcando una zona del cromosoma de aproximadamente 30kb (Figura 10).

Del mismo modo, se analizaron las hibridaciones de los distintos clones frente al DNA cromosómico de *S.antibioticus* digerido con *Bam*HI y *Eco*RI observando que:

- Cuando se utilizó la sonda ant1 frente a un digerido *Bam*HI del DNA cromosómico, se detectaron todos los fragmentos *Bam*HI contenidos en el clon ant1, a excepción de los fragmentos *Bam*HI de 3 y 2,5kb situados en los extremos del clon ant1 (Figura 9). En su lugar se observaron unos fragmentos cromosómicos *Bam*HI de 6 y 8Kb respectivamente. Este hecho puede explicarse, admitiendo que en los extremos del clon ant1 se han generado "in vitro" unos sitios *Bam*HI durante el clonaje que no están presentes en el genoma de *S.antibioticus*. De esta manera, las bandas *Bam*HI de 3 y 2,5kb presentes en los extremos del clon ant1, son parte de unos fragmentos cromosómicos *Bam*HI de 6 y 8kb respectivamente, que se digirieron con *Sau*3A en el experimento de clonaje.

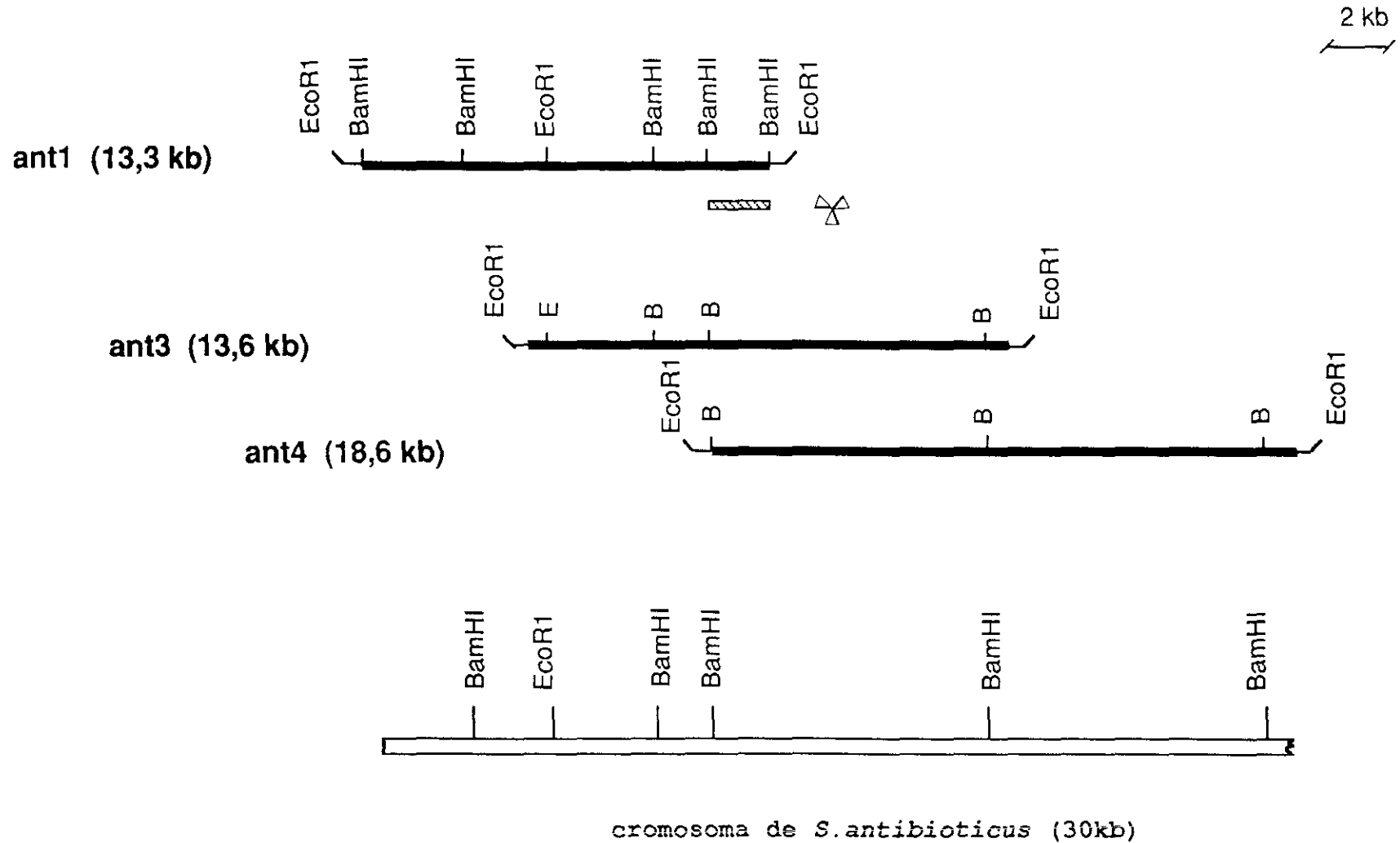
- Al utilizar la sonda ant3 se detectó un patrón de bandas en el digerido del genoma de *S.antibioticus*, que no se corresponde con el observado en el clon ant3, apareciendo en el cromosoma una banda *Bam*HI de 5,5 kb no presente en el clon ant3. Lo mismo ocurre cuando se utilizó el clon ant4 como sonda, ya que aparte de detectar las bandas

Figura 9.- "Southern blot" cruzado entre los distintos clones aislados



Nota: Los distintos clones y DNAs cromosómicos están digeridos con  
 H: *Hind*III; B: *Bam*HI; E: *Eco*RI

Figura 10.- Estructura física de la región cromosómica de *S. antibioticus* clonada





BamHI de 8,5 y 10kb definidas en el clon ant4, aparece una banda BamHI de 5,5kb, no localizada en el clon ant4, y que podría ser la misma detectada en el caso del clon ant3. Los clones ant3 y ant4 contendrían genes que presentan homología con otros localizados en algún otro punto del cromosoma, diferente a la zona analizada en este trabajo.

- Por último, se vuelven a ratificar los datos de que ant2 presenta una pequeña homología con ant1 al igual que con ant3. Sin embargo, queda excluido que este clon, ant2, proceda de la misma zona del cromosoma que los anteriores.

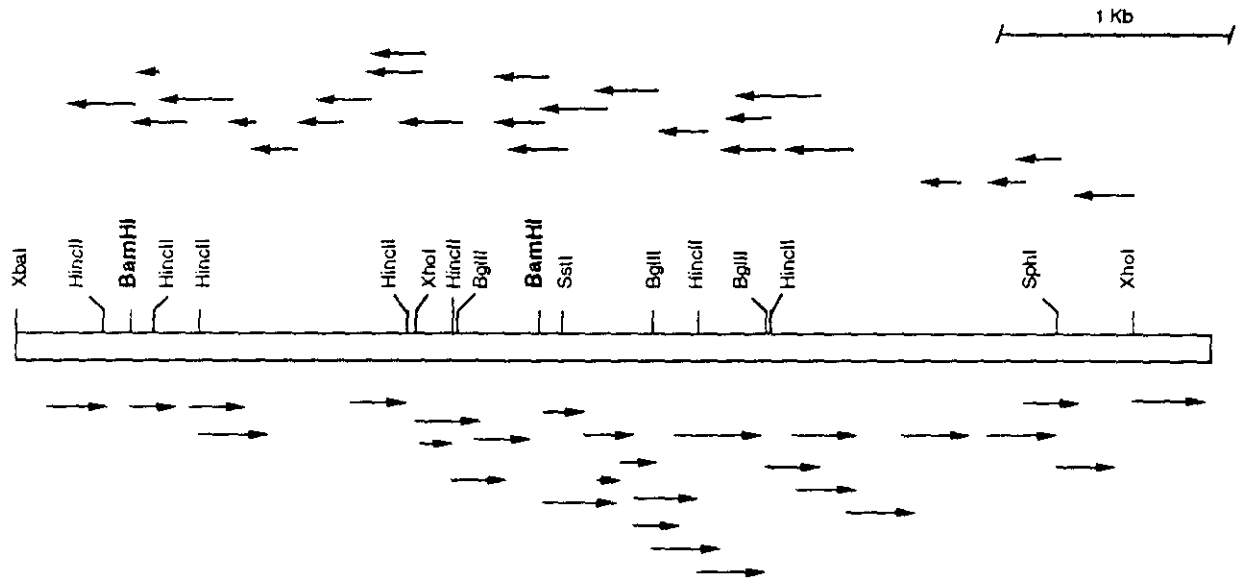
## 2.- ANALISIS MOLECULAR

### 2.1.- Secuenciación de los genes homólogos a la actinorrodina sintetasa en *S.antibioticus*

Una vez localizadas y establecido un mapa preliminar de restricción en los fragmentos homólogos al gen *actI*, se procedió a secuenciar esta zona con el fin de caracterizar lo que parecía ser un agrupamiento de genes implicados en la biosíntesis de un poliquétido. La estrategia de secuenciación se refleja en la Figura 11; el porcentaje de doble cadena secuenciado fué del 80%.

La secuencia obtenida (Figura 12) se analizó por ordenador; la distribución no al azar del porcentaje de G y C en tercera posición, junto con el uso de codones más frecuente en *Streptomyces*, sugirió la existencia en el fragmento secuenciado de cinco fases de lectura abierta (ORF's), cuatro de ellas (ORF1,2,3 y 4) parecen transcribirse en la misma dirección y la quinta (ORF5) se transcribiría en dirección opuesta (Figura 13). A consecuencia de ello, en principio se podría sugerir el hecho de que existiera al menos un mRNA policistrónico que se transcribiría desde la ORF1 hasta la ORF4, mientras que existiría otro mRNA que se transcribiría en dirección contraria que al menos abarcaría la ORF5.

Figura 11.- Estrategia de secuenciación del fragmento de *S. antibioticus* homólogo al gen *actI*.



Nota: Las flechas indican la dirección y la extensión de la secuencia del DNA en cada uno de los clones.

Un análisis de la secuencia (Figura 12) aportó los siguientes resultados: la ORF1 comprende una zona de 1266 bp (de la posición 95 a 1361) y la proteína deducida de su secuencia tiene 423 aminoácidos y una  $M_r$  de 44,7. El presunto codón de iniciación es un ATG que codifica para metionina y se localiza en la posición 95. Es un codón de iniciación bastante utilizado en *Streptomyces*. No se ha encontrado una secuencia de unión al ribosoma similar a las secuencias consenso descritas para *Streptomyces* en la región que precede a este codón de iniciación. Esta fase de lectura finaliza con un codón de terminación TGA en la posición 1361. Este codón de terminación solapa con el de iniciación de la ORF2, sugiriendo un acoplamiento a nivel de traducción entre ambas (ATGA) tal como ocurre en otros sistemas. La ORF2 comienza con un ATG correspondiente a una metionina en la posición 1360 y comprende una región de 1216 bp que se corresponde con una proteína de 405 aminoácidos y una  $M_r$  de 42,3. El inicio de traducción está precedido por una secuencia de unión al ribosoma (GGAGG) que en distancia y secuencia coincide con las descritas como

Figura 12.- Secuencia de nucleótidos de la zona homóloga al gen *actI* en *S. antibioticus*.

XbaI . . . . .

1 TCTAGACCGTCGCCACAGCCTTTCACCACGTAACCTGCCGCTGTTTCAGAGGGCGAAAGGAC 60

61 TTACAGCGATGTTGTCTACGAACGCGGGCCGGACATGACCCGGCGCGTCGTGATCACCGG 120  
M T R R V V I T G

ORF1 →

121 TGTCGGTGTACGCGCTCCCGGGCGCAACGGAACGAAGGCGTTCTGGGACCTGTTGTCGGC 180  
V G V R A P G G N G T K A F W D L L S A

181 GGGCCGCACCGCCACCCGGAGCATCTCCTTCTTCGACGCGTCGCCGTTCCGTTCCGCGGAT 240  
G R T A T R S I S F F D A S P F R S R I

241 CGCCGGCGAGGTCGACTTCGACGCGGCGCGGAGGGCTTCGGCCCCGCGGAGATCCGCCG 300  
A G E V D F D A A A E G F G P R E I R R

301 CATGGACCGGGCCACGCAGTTCGCGGTGGCCTGCACCCGCGAGGCGGTTCGCGGACAGCGG 360  
M D R A T Q F A V A C T R E A V A D S G

BamHI . . . . .

361 GCTGGACCTGTCCGCGCTGGATCCGCACCGCATCGGGGTCAGCCTGGGCAGCGCGGTCCG 420  
L D L S A L D P H R I G V S L G S A V A

421 CTCGGCGACCAGCCTGGAGAACGAGTACCTCGTGATGTGCGGACGCGGGCAAGGAGTGGGA 480  
S A T S L E N E Y L V M S D A G K E W E

481 GGTCGACCCGGCCTACCTGTCCCCGCACATGTTGACTATCTGTCCCCCGGCGTGATGCC 540  
V D P A Y L S P H M F D Y L S P G V M P

541 GGCCGAGGTGGCCTGGGAAGTGGGCGCGGAAGGCCCGGTGACCATGGTGTCCGACGGCTG 600  
A E V A W E V G A E G P V T M V S D G C

601 CACCTCGGGGCTCGACTCGGTGCGCTACGCCGTCCAGCTGATCCGCGAGGGCACGGTCCA 660  
T S G L D S V R Y A V Q L I R E G T V D

661 CACCGTCGTCCCGGGCGCGGACACCCGATCTCCCCGATCGTGGTCCGCTGCTTCGA 720  
T V V A G A A D T P I S P I V V A C F D

721 CGCCATCAAGGCGACGACGACCCGCAACGACGACCCGGCGCACGCCTCGCGCCCCTTCGA 780  
 A I K A T T T R N D D P A H A S R P F D

781 CGGCACCCGCAACGGATTTCGTGCTCGCCGAGGGCGCCGCCATGTTTCGTGCTGGAGGAGTA 840  
 G T R N G F V L A E G A A M F V L E E Y

841 CGAGGCGGGCCAAGAACC GCGGGCGGCACATCTACGCGGAGGTTCGGCGGGTACGCCACCCG 900  
 E A A K N R G A H I Y A E V G G Y A T R

901 CTGCAACGCCACCACATGACGGGCCTGCGCAAGGACGGCCGCGAGATGGCCGAGGCCAT 960  
 C N A H H M T G L R K D G R E M A E A I

961 CCGTGTCTCGCTGGACGAGGCACGCCTGGACGGCACCAAGATCGACTACATCAACGCGCA 1020  
 R V S L D E A R L D G T K I D Y I N A H

1021 CGGCTCGGGCACCAAGCAGAACGACCGCCACGAGACCGCCGCTCTTAAGCGCTCCCTGGG 1080  
 G S G T K Q N D R H E T A A L K R S L G

1081 CCAGCACGCCCTACGACGTGCCGGTCTCCTCCATCAAGTCGATGGTCGGCCACTCCCTGGG 1140  
 Q H A Y D V P V S S I K S M V G H S L G

1141 GGCCATCGGCTCCGTCGAGATCGCCGCGTCACTGCTGGCGATCGAGCACAACTCGTGCC 1200  
 A I G S V E I A A S L L A I E H N V V P

1201 GCCGACGGCCAACCTGCACACCCCGACCCCGAGTGGCACCCTCGACTACGTACCCCTGAC 1260  
 P T A N L H T P D P E C D L D Y V P L T

1261 CGCCCGCGAACAGCGCGTGGACACGGTGCACGGTCGGCTCCGGCTTCGGAGGCTTCCA 1320  
 A R E Q R V D T V L T V G S G F G G F Q

1321 GAGCGGATGATCCTGCACCGTCCGAGGTGGCCGCGGCATGACCACCGTCATCACGGGT 1380  
 S A M I L H R P E V A A A \*

rbs? .  
 ORF2 → M T T V I T G

1381 ATCGGGGCGGCCACGCCAACGGCCTGGGCACCGAGGCGTCTGGAAGGCGACGCTGACG 1440  
 I G A A T P N G L G T E A F W K A T L T

1441 GGCACCAACGGGTCCGGGAAC TGACCGGCTTCGACACCTCCGCGTACCCCTCGCGCCTG 1500  
 G T N G V R E L T G F D T S A Y P S R L

1501 GCCGGGCAGATCGTCTGACTACGACGCCAAGACCCATCTGCCAGCAGGCTGCTGCCGCAG 1560  
 A G Q I V D Y D A K T H L P S R L L P Q  
 . . . . . XhoI . . . . .  
 1561 ACCGACGTGTCGACCCGCTACGCGCTCACCGCCGCCGCTGGGCCCTCGAGGACGCGGGC 1620  
 T D V S T R Y A L T A A A W A L E D A G  
 . . . . .  
 1621 GTCGACGAGAACACCCTGCCCGACTACGACATGGGCACGGTCACCTCCAACGCCCTCGGC 1680  
 V D E N T L P D Y D M G T V T S N A L G  
 . . . . .  
 1681 GGTTTCGCGTTCACCCACCAGGAGTTCAACAAACTCTGGTCCAAGGGCTCGGAGTTCGTC 1740  
 G F A F T H Q E F N K L W S K G S E F V  
 . . . . .  
 1741 TCCGTCTACGAGTCGTTTCGCTGGTTCTACGCGGTCAACACCGGCCAGATCTCCATCCGG 1800  
 S V Y E S F A W F Y A V N T G Q I S I R  
 . . . . .  
 1801 CACAAGCTGCGCGGGCCAGCGCCGCCCTGGTTCGGCGAGCAGGCGGGCTGGACGCGTC 1860  
 H K L R G P S A A L V G E Q A A A G R V  
 . . . . .  
 1861 GGGCACGCCCGGCGCACCGTTCGAGCGCGGGACCAAGCTCGTGGTGTCCGGCGCGTGGAC 1920  
 G H A R R T V E R G T K L V V S G G V D  
 . . . . .  
 1921 TCCGCGTTCGACCCCTGGGGCTGGGCTCCAGCTGGCGGGCGGCCGGGTCACCACCGCC 1980  
 S A F D P W G W A S Q L A G G R V T T A  
 . . . . .  
 1981 ACCGACCCGGAGGCGGCCTACCTCCCGTTCGACGAGCGGGCGGCCGGCTATGTGCCCGGC 2040  
 T D P E A A Y L P F D E R A A G Y V P G  
 . . . . .  
 2041 GAGGGCGGCGGATCCTCATCGCCGAGGACGCCGCGAGGCCCCGGGAGCGCGGCGCGCCC 2100  
 E G G A I L I A E D A A S A R E R G A P  
 . . . . .  
 2101 CGGATCTACGGCGAGATCGCCGGCTATGCCTCGACGTTTCGACCCCAAACCGGGATCCCGG 2160  
 R I Y G E I A G Y A S T F D P K P G S R  
 . . . . .  
 2161 GCGCGAGCCCGGCTGCGCCGGGCGGCCGA<sup>ACT</sup>TGGCCCTGGCCGACGCCGGGCTGGCACCC 2220  
 A R A R L R R A A E L A L A D A G L A P  
 . . . . .  
 2221 GCCGACATCGACGTGGTGTTCGCGGACGCGGCCGGCCCTGCCGAGCTCGACCGGATCGAG 2280  
 A D I D V V F A D A A G L P E L D R I E

2281 GCGGACGCGCTGCGCGCCGTCTTCGGCCCCGCGGGGCGTGCCGGTGACCGCGCCCAAGGCG 2340  
 A D A L R A V F G P R G V P V T A P K A

2341 CTGACCGGCCGGATGTACGCGGGCGGCGGCCCGCGGACCTGGCGAGCGCGCTGCTGTCC 2400  
 L T G R M Y A G G G P A D L A S A L L S

2401 ATCCGGGACGGCGTCATCCCGGCCAGTGGCTTCACCGCCCAGGTCCCCGACGCCTACGGC 2460  
 I R D G V I P A S G F T A Q V P D A Y G

2461 ATCGACCTGGTGACCGGCGAACCCCGTACCCGGCCGGTGTCCGCGGCACTCGTCTCTCGCA 2520  
 I D L V T G E P R T R P V S A A L V L A

2521 CGCGGACGCTGGGGCTTCAACTCGGCCGTCTGTCGTACGCGCCACACCGACCACTGAGCT 2580  
 R G R W G F N S A V V V T R H T D H \*

2581 GCCCGACGCGCGCAGTTCACCTGACAGGAGAAGACCCCTCATGGCTCAGCTCGCCATC 2640  
 M A Q L A I  
 . rbs?

**ORF3** →

BglII  
 2641 GAAGATCTGCGACGCATCCTCATCGCCTGCGCCGGCGAGGACGACAGCCTCGACCTGACC 2700  
 E D L R R I L I A C A G E D D S L D L T

2701 GCGGACATCCTCGACAGCACCTTCGAGGACCTCGGTTACGACTCGCTCGCCCTGATGGAG 2760  
 G D I L D S T F E D L G Y D S L A L M E

2761 TCCGCCGCGCGCATCAAGCAGGAGTACGGCATCGACCTGTCCGACGACGACATCGCGGAG 2820  
 S A A R I K Q E Y G I D L S D D D I A E

2821 GTGGAGACACCCCGCGCGCTCCTCGCCCTGGTCAACGCCGACACGGCAACGGCCGCGCTC 2880  
 V E T P R A L L A L V N A D T A T A A V

2881 TGACGTCCGGCCCGACCGTACGCCTCCGGGGCCCGTATCCGCCGTCACCGGGATACGGG 2940  
 \*

2941 CCCC GGCCCCTTCCGCGCCACCGTCCCAGCCGAGGAGAAGCCGCCATGGAACGAACCGT 3000  
 M E R T V  
 . rbs?

**ORF4** →

3001 GATCCACCGCACCGAGCACACCCGCATCGTGTCCGCTCCCGCCCAGGTGCTGTACGACCT 3060  
 I H R T E H T R I V S A P A Q V V Y D L

3061 GGTGGCCGATGTCACCCTGTGGCCCGGGTGTTCGGGCCAGCGTGTACGTGCGCCACCT 3120  
 V A D V T L W P A V F G P S V Y V R H L

BglII

3121 GGAGCGCGACGAGCGCAGCGAGGTCTTCGAGATCTGGGCGCAGGTCAACGGCAAGGTAC 3180  
 E R D E R S E V F E I W A Q V N G K V T

3181 CAGCTGGACGTCGCGGGCGGTCTCGACCCCGCGCGCCGTACGTGAGCTTCCGGCAGCA 3240  
 S W T S R R V L D P A R R Y V S F R Q Q

3241 GCGCAGCTTCGCACCGGTACCTCCATGGCCGGCAGCTGGCTGCTGCGGAACTGCCCCA 3300  
 R S F A P V T S M A G S W L L R E L P D

3301 CGGCAGCACCGAGGTGGTGTGCGCCACCGCTTCAGCGTCGAGGACGACGCCCCCGCCG 3360  
 G S T E V V L R H R F S V E D D A P A A

3361 CGTCGAGGCGCTGATCACCGCGCTGGACCGCAACAGCGGGCAGGAACTGGCGGCACTGGC 3420  
 V E A L I T A L D R N S G E E L A A L A

3421 CCGGGTCGCGGAGCTGGGCCACCGGTGGCCGACGTGGTGTCTCTCCTTCACCGACGTCGT 3480  
 R V A E L G H P V A D V V F S F T D V V

3481 CCCGATCACCGGCGGTGCCGCGGGCCCTACGACTTCGTCAACCGGGCCGACCTGTGGGC 3540  
 P I T G G A A A A Y D F V N R A D L W A

3541 CGAGCGGCTGCCGCACGTACGCCGGGTACGGCTGACCGAGGACGAGCCGGGCGTGCAGGA 3600  
 E R L P H V S R V R L T E D E P G V Q D

3601 CCTGGAGATGGACACCGTACCGCGGACGGCTCGGCACACACCACCGCTCGGTGCGCAT 3660  
 L E M D T V T A D G S A H T T R S V R I

3661 CTGCCACGAGCCGTCGTGGATCGCCTACAAGCAGCACGTA CTGCCGAAGCTGCTGACCGG 3720  
 C H E P S W I A Y K Q H V L P K L L T G

3721 ACACAGCGGCCTGTGGACGTTACGGACGGCCCCGACGGGCCCGTGGCCACCGCCCGGCA 3780  
 H S G L W T F T D G P D G P V A T A R H

3781 CACCGTCGCGCTGAACCCGGCGACGGTCCGCGAAGTGCTCGGCGGACAGGCCACCCTCGC 3840  
 T V A L N P A T V R E V L G G Q A T L A

3841 CGACGCCCGTGCCTTCGTACGCGAGGCACTGGGCCGCAACAGCCTGACCACGATGACCCA 3900  
D A R A F V R E A L G R N S L T T M T H

3901 CGCCGCCGCGCACACGGGCGAGGGGAGCCAGGTCTCCGCCTGAACTCGGGCGCGGGCACA 3960  
A A A H T G E G S Q V S A \*

3961 CACGGCCGCCCTCTCCGGGACCGGGGAGGGGCGGCCGTGTCATGGCCGTGGCGGCGCGG 4020

4021 ATCAGTAGTTGCCAGACCGCCGACACGTTGAGGGCCTGCGCGGTACCGCGGCCGCGT 4080  
TAGTCATCAACGGGTCTGGCGGCGTGTGCAACTCCCGGACGCGCCAGTGGCGCCGGCGCA  
\* Y N G L G G C V N L A Q A T V A A A

4081 CGTCGCTCACCAGGTACTCGACCATGGCGGCCACCTCACGGGTCTCCACGTAACGGCCCA 4140  
GCAGCGAGTGGTCCATGAGCTGGTACCGCCGGTGGAGTGGCCAGAGGTGCATTGCCGGGT  
D D S V L Y E V M A A V E R T E V Y R G

4141 GCGGCACCCGCGTGGTGTGATGCGGTGCGGTCTCCTGCTCGCTCACGCCCCAGATGCCGG 4200  
CGCCGTGGGCGCACCACTACGCCAGCACCCAGAGGACGAGCGAGTGGGGGTCTACGGCC  
L P V R T T I R D H T E Q E S V G W I G

4201 CGTAGTGCTCGCGCACCCGCTCCGCCATCGGGCTCTCGACGAAGCCGGGGCACACCGCGT 4260  
GCATCACGAGCGCGTGGGCGAGGCGGTAGCCGCGAGAGCTGCTTCGGCCCCGTGTGGCGCA  
A Y H E R V R E A M P T E V F G P C V A

4261 TGACCGTGATGCCGGTACGGGCCAGTCCAGACCCGAGGGCCTTGGAGAAGCCGACCACGC 4320  
ACTGGCACTACGGCCATGCCCGGTGAGGTCTGGCTCCCGGAACCTCTTCGGCTGGTGCG  
N V T I G T R A L E L G L A K S F G V V

4321 CGTGCTTGGACGCCGAGTAGGGCGGGCGTGCACGACGCCCTGCTTGGCGCCGGTGGAGG 4380  
GCACGAACCTGCGGCTCATCCCGCGCCGACGTGCTGCGGGACGAACGGCGGCCACCTCC  
G H K S A S Y P A A H V V G Q K G G T S

4381 CGATCGAGATGATGCGGCCGGA<sup>SphI</sup>CTTTCGCCAGCATGCCACCGGTGTTGAGGACTTCCT 4440  
GCTAGCTCTACTACGCCGCTGAAGAAGCGGTGCTGACGGTGGCCACAACCTCCTGAAGGA  
A I S I I R G S K K A L M G G T N L V E

4441 TGGTCATCAGGAAGACACTGTTGAGGTTGCTGTTGATGACGTCGAACCAACAGGTGCTCCG 4500  
ACCAGTAGTCCTTCTGTGACAACCTCCAAGCACAACCTACTGCAGCTTGGTGTCCAGCAGGC  
K T M L F V S N L N T N I V D F W L D D

4501 GGATCTCGTTGGTGGCTCCGCCCGGCTGCGCCCCGGCGTTGTTACAGAGGATGTCGACCG 4560  
CCTAGAGCAACCACCGAGGCGGGCGGGACGCGGGCCGCAACAAGTCTCCTACAGCTGGC  
P I E N T A G G G S R G A N N V L I D V

4561 GCCCCAAGCGGTGACGGCCGCGGGACGAAGGCCCTGATCTGCTCGGGGTGCGACACGT 4620  
CGGGCTTCGCCAGCTGCCGGCGCGCTGCTTCGGGACTAGACGAGCCCCAGCCTGTGCA  
P G F R D V A A R V F A R I Q E P D S V



4621 CACACGTGGTGGCGTCCACCTCGTACCCCGCGTCCGTCAACTCCTTGATGGTGTGGGCCA 4680  
 GTGTGCACCACGGCAGGTGGAGCATGGGGCCGAGGCAGTTGAGGAACTACCACAGCCGGT  
 D C T T G D V E Y G A D T L E K I T D A

4681 GTTGGTCCTCATGGCGCGCACAACAGGTAGACCCGGGCCCCGAGCCCGGCAGGCGCCGGG 4740  
 CAACCAGGAGTACCGCGCGTGTGTCCATCTGGGCCCCGGGGCTCGGGCCGCTCCGCGGCCC  
 L Q D E H R A C L Y V R A G L G A L R R

XhoI

4741 CGATCTCGAGACCGATCCCGCTGGTGGCTCCCGTGACCAGGGCGACCGGCTTGACTGCCT 4800  
 GCTAGAGCTCTGGCTAGGGCGACCACCGAGGGCACTGGTCCCGCTGGCCGAACCTGACGGA  
 A I E L G I G S T A G T V L A V P K V A

rbs?

4801 GTGACATGTGTTCTCCGAATCGCTGTGACGGCAGGTGCCACCGAGCGTGTGGGCGCG 4860  
 CACTGTACACAAGAGGGCTTAGCGACACTGCCGTCCACGGGTGGCTCGCACGACCCGCGC  
 Q S M

← ORF5

4861 CCTCGTGCCCTGCTGGAAGGCGCCTTGAAGCACACCGGCCGCGTCATGCGCCGCCCGGÀ 4920

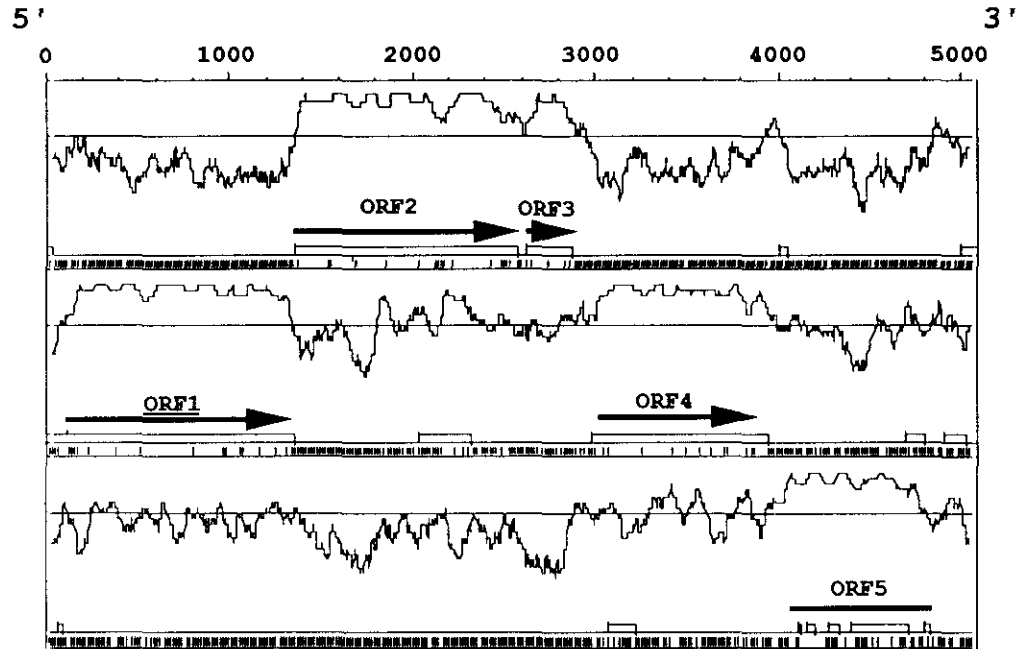
4921 CCGTGCTCCAGAGCGATTTCGAGCGCCGGTGGCGATCCTGGCCCGGCCACCACCCGCCCGÀ 4980

4981 CGACCCAGGTGAGGAACCCTCATGCCCACGCCGTCAGCAGTGATCTCTACACCAGGTCAG 5040

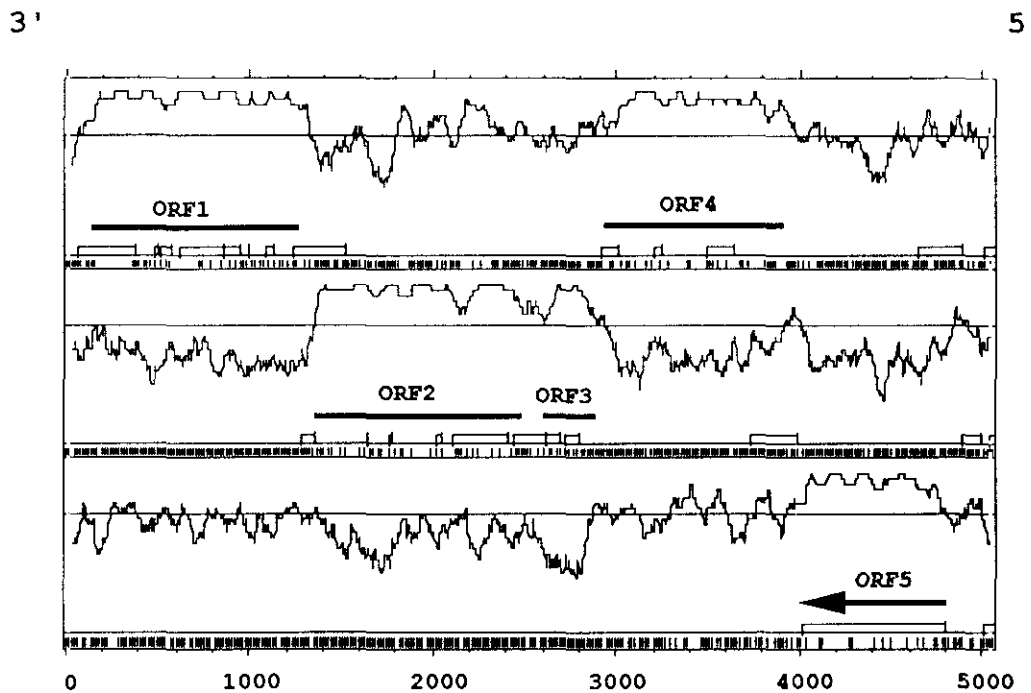
5041 CACTTCTACGCCGAGATCCAGGCCCTCGACGAGGCGCTGGAGGAT 5085

Figura 13.- Análisis de fases de lectura de los genes homólogos a los genes act en *S. antibioticus*

Análisis directo



Análisis reverso



consenso en *Streptomyces* (Hopwood y col.,1986). El final de la ORF2 tiene lugar en un codón TGA en la posición 2575.

Esta disposición acoplada de las primeras fases de lectura es común a otros sistemas, incluyendo los genes tempranos de la biosíntesis de poliquétidos, como actinorrodina (M. Fernández-Moreno, tesis doctoral), granaticina (Sherman y col.,1989) y tetracenomicina (Bibb y col.,1989).

La ORF3 se extiende sobre una secuencia de 257 bp y su producto génico es un polipéptido de 86 aminoácidos y una  $M_r$  de 9,1. El codón de iniciación es un ATG que codifica para metionina (posición 2623). Este inicio de traducción viene precedido por una secuencia rica en purinas (..GGAGAA..) y que probablemente pueda actuar como un sitio de unión al ribosoma ya que mantiene cierta complementariedad con el extremo 3' del RNA ribosómico (Hopwood y col.,1986). Esta ORF3 termina en un codón TGA en la posición 2881, bastante utilizado como codón de terminación en *Streptomyces*. La ORF3 está separada de la ORF2 por 48 nucleótidos aparentemente no codificantes.

La ORF4 comienza, al igual que las anteriores, en un codón ATG que codifica para metionina localizada en la posición 2987. Esta fase de lectura abierta tiene un tamaño de 957 bp. El producto génico deducido de su secuencia está compuesto por 318 aminoácidos y una  $M_r$  de 34,7. El codón de iniciación va precedido por una secuencia rica en purinas (..GGAGAA..) y que pudiera ser el sitio donde se une el ribosoma a la cadena de RNA para comenzar la traducción. El codón de terminación es un TGA (posición 3941), que es bastante utilizado como tal en *Streptomyces*. La ORF4 se encuentra separada de la ORF3 por una secuencia de 106 nucleótidos aparentemente no codificante.

La ORF5, comienza en un codón de iniciación ATG que codifica para metionina en la posición 4807 (cadena complementaria). Este inicio de traducción viene precedido por una secuencia como las descritas para las ORFs anteriores, ..GGAGAA., y que pudiera ser la secuencia de reconocimiento del ribosoma. La ORF5 tiene una extensión de 783 bp y se corresponde con un producto génico de 261 aminoácidos y una  $M_r$  de 27,5. El codón de terminación es un TGA al igual que en los genes

descritos anteriormente, localizado en la posición 4024. Entre la ORF4 y la ORF5 existe una secuencia de 83 nucleótidos aparentemente no codificante.

## 2.2.- Deducción de las funciones de las presuntas proteínas obtenidas a partir de la secuencia

### 2.2.1.- ORF1 y ORF2

Datos previos a este trabajo demostraron que a nivel de los genes tempranos existía una alta homología entre las proteínas deducidas de las secuencias de diferentes poliquétido sintetetasas, por ejemplo, la actinorrodina (M. Fernández-Moreno, tesis doctoral) y granaticina sintetasa (Sherman y col., 1989), y algunas proteínas deducidas de la secuencia de ácido graso sintetetasas tanto de bacterias como de mamíferos. La búsqueda en el banco de datos de secuencias homólogas a las obtenidas de *S. antibioticus* reveló los datos reflejados en la Tabla 4.

**Tabla 4.- Homología del péptido correspondiente a la ORF1 con diferentes ceto-acil-sintetasas**

	<u>% homología</u>	<u>% identidad</u>
AGS <i>E. coli</i> <sup>a</sup>	56	32
AGS rata <sup>b</sup> (4-412)	48,5	26,2
GraORF1 <sup>c</sup>	92	87,2
ActIORF1 <sup>d</sup>	85	76,3
TcmORF1 <sup>e</sup>	80	69
EryA <sup>f</sup> (38-458)	52,5	27,8
6-MSAS <i>P. patulum</i> <sup>g</sup>	47	25

a) Kauppinen y col., 1988

b) Amy y col., 1989

c) Sherman y col., 1989

d) M. Fdez-Moreno, tesis doctoral

e) Bibb y col., 1989

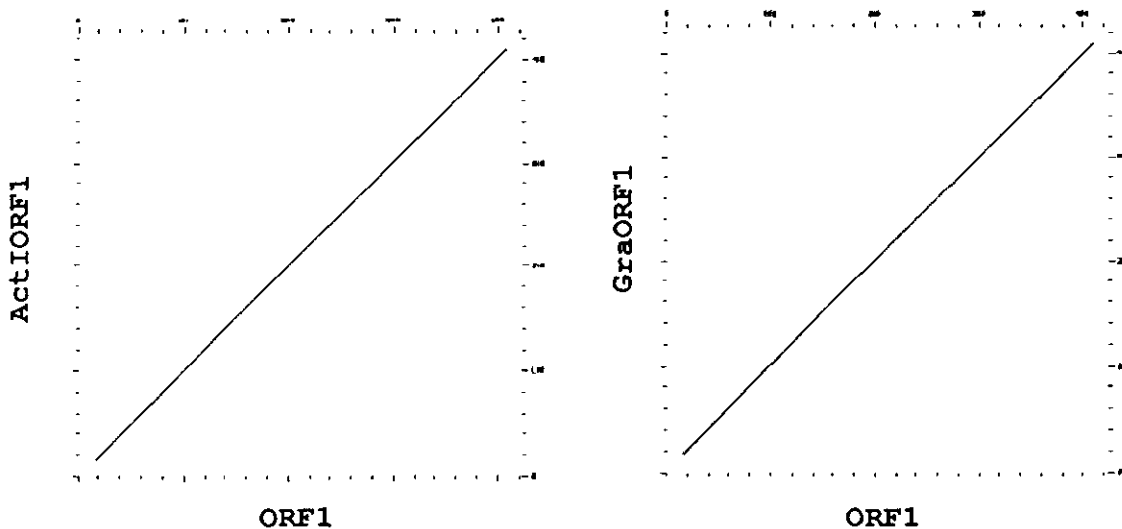
f) Cortés y col., 1990

g) Beck y col., 1990

NOTA.- los números entre paréntesis son las posiciones relativas de los dominios homólogos dentro de la secuencia de la sintetasa en cada caso.

Cabe destacar la alta identidad que existe con las proteínas deducidas de las secuencias equivalentes en las sintetasas de antibióticos poliquétidos como granaticina y actinorrodina (un 87% y 76% respectivamente). Igualmente, aunque en menor grado, existe homología con dominios discretos de ceto-acil-sintetasas de AGSs y poliquétido sintetasas de TipoI, como es el caso de la ácido graso sintetasa de rata (48%), en el dominio ceto-acil-sintetasa (aminoácidos 4 y 412), y la sintetasa de eritromicina (52,5%) en uno de los dominios ceto-acil-sintetasa (aminoácidos 38 al 458).

Figura 14.- Comparación a nivel de proteínas entre el péptido deducido de la ORF1 de *S. antibioticus* y ActIORF1 y GraORF1.



Cuando se hizo un análisis gráfico de alineamientos entre estas proteínas mediante el programa COMPARE, y utilizando las condiciones descritas en Materiales y Métodos apartado 18, se obtuvieron los alineamientos que se muestran en la Figura 14. La ORF1, por tanto, presenta un alineamiento casi perfecto tanto con GraORF1 y ActIORF1 a lo largo de toda la molécula.

En la ORF1 se encuentra un residuo de cisteína en la posición 169 (Figura 12), que parece ser el punto donde se anclan los radicales acilo para que sean condensados, es decir, el centro activo de la proteína. Cuando se hizo un estudio comparativo a nivel de las homologías existentes en los centros activos de diferentes ceto-acil-sintetasas, se vió que existía una alta homología en una zona de 17 aminoácidos del dominio ceto-acil-sintetasa, llegando incluso a una total identidad en esta zona con la secuencia de granaticina (Figura 15).

**Figura 15.- Homologías a nivel de los centros activos de diferentes ceto-acil-sintetasas.**

TcmORF1	G P V T V V S T G C T S G L D A V
ActIORF1	G P V T M V S T G C T S G L D A V
GraORF1	G P V T M V S D G C T S G L D S V
ORF1	G P V T M V S D G C T S G L D S V
AGS <i>E.coli</i>	G V N Y S I S S A C A T S A H C I
AGS <i>S.cerevisiae</i> <sup>a</sup>	G P I K T P V G A C A T S V E S V
AGS rata	G P S I A L D T A C S S L L A L Q
EryA (1)	G P A M T V D T A C S S G L T A L
6-MSAS <i>P.patulum</i>	G P S T A V D A A C A S S L V A I

Las referencias son las mismas que las de la Tabla 4 y además:

a) Mohamed y col.,1988

1) La máxima homología se presenta a nivel del primer dominio ceto-acil-sintetasa descrito, comprendida entre los aminoácidos 38-458.

Mediante un estudio semejante al realizado en el dominio ceto-acil-sintetasa, se ha encontrado en la parte final de la proteína deducida de la ORF1, un presunto dominio acetiltransferasa como se observa en la Figura 16.

**Figura 16.- Homologías a nivel de los centros activos de diferentes aciltransferasas.**

TcmORF1	S S I K S M I G H S L G A I G S L
GraORF1	S S I K S M G G H S L G A I G S I
ActIORF1	S S I K S M V G H S L G A I G S L
ORF1	S S I K S M V G H S L G A I G S V
AGS <i>E. coli</i>	P A D A T F A G H S L G E Y A A L
AGS Rata	L K P D G I I G H S L G E V A C G
EryA (1)	V E P A A V V G H S Q G E I A A A
6-MSAS <i>P.Patulum</i>	I T P Q A V I G H S V G E I A A S

(1) El dominio aciltransferasa de EryA corresponde al mismo descrito en la Figura anterior.

Las referencias son las mismas que las de la Tabla 4.

**Tabla 5.- Homología del producto génico correspondiente a la ORF2 con sus equivalentes en otros sistemas.**

	<u>% homología</u>	<u>% identidad</u>
GraORF2	77	68
ActIORF2	75	64
TcmORF2	70	54
EryA (1497-1926)	47	23
AGS rata (3-410)	46	22

Nota: las referencias son las mismas que las de la Tabla 4.

El presunto producto génico de la ORF2 presenta una homología del 50% con la proteína deducida de la ORF1. Carece del residuo de cisteína típico del centro activo de las distintas ceto-acil-sintetasas; el acoplamiento traduccional entre los productos de ORF1 y ORF2 sugieren formar parte de un complejo multienzimático con actividad acil-sintetasa. Cuando se comparó el producto génico deducido de la ORF2 con las proteínas equivalentes en los complejos de

biosíntesis de otros poliquétidos (que carecen igualmente del residuo de cisteína), se vió que existía una alta homología, como se refleja en la Tabla 5.

Cabe destacar que la homología que existe entre la proteína correspondiente a la ORF2 y la sintetasa de eritromicina (AGS TipoI), se encuentra a nivel del segundo dominio ceto-acil-sintetasa descrito, mientras que con la ácido graso sintetasa de rata el dominio homólogo es el mismo que en el caso del péptido deducido de la ORF1, aunque el porcentaje de identidad es algo menor. Parece, por tanto, que la presencia de los equivalentes a la ORF1 y ORF2 es una organización conservada en distintas poliquétido sintetasas, sin equivalente en las ácido graso sintetasas.

#### 2.2.2.- ORF3

Comparando la secuencia de aminoácidos obtenida mediante la traducción por ordenador de la secuencia ORF3, frente a las proteínas equivalentes de poliquétido sintetasas y ácido graso sintetasas, se obtuvo un alto grado de homología con las proteínas transportadoras de residuos acilos (ACP) de todos los sistemas analizados (Tabla 6).

**Tabla 6.- Homología entre el producto génico deducido de la ORF3 y sus equivalentes en otros sistemas.**

	<u>% homología</u>	<u>% identidad</u>
GraORF3	77	65
ActIORF3	70	55
TcmORF3	68,6	44,5
EryA (2803-2906)	49	29
AGS rata (2111-2198)	49	31
AGS conejo <sup>a</sup>	54	34,4

NOTA.- los números entre paréntesis son las posiciones relativas dentro de la secuencia de la sintetasa en cada caso. Las referencias

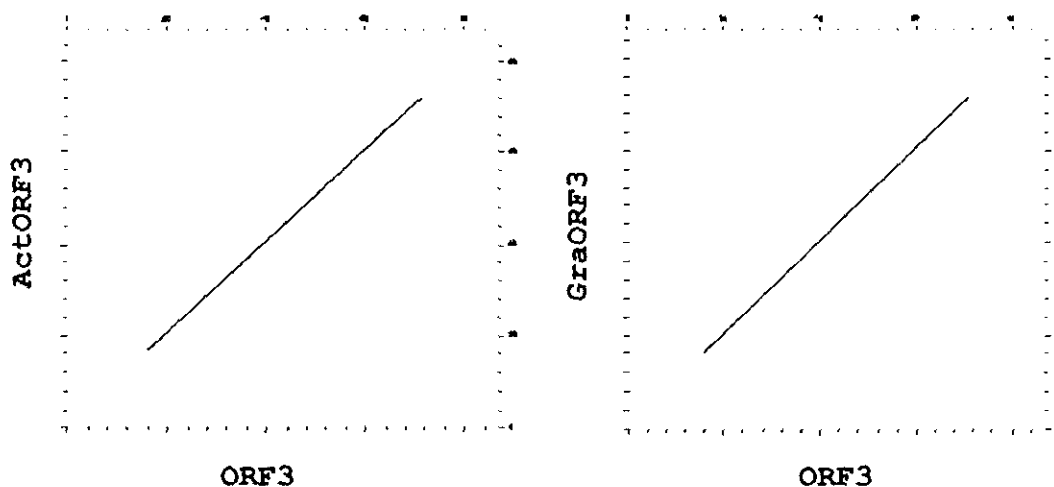


son las mismas que las de la Tabla 4 a excepción de: a) McCarthy y col.,1983.

Al igual que en comparaciones anteriores, el producto génico presenta una mayor homología con las correspondientes proteínas de las poliquétido sintetetasas que con sus homólogas en las diferentes ácido graso sintetetasas. Asimismo, cabe destacar que sigue existiendo un 10% más de identidad en la comparación de ORF3 con GraORF3 que en la comparación con ActIORF3.

El alineamiento gráfico de ORF3 con las proteínas ActIORF3 y GraORF3 es muy pronunciado, sobre todo en la parte central de la molécula como se observa en la Figura 17.

Figura 17.- Homología de la proteína deducida de la ORF3 con ActIORF3 y GraORF3.



Las condiciones utilizadas son las descritas en Materiales y Métodos, apartado 18.

La proteína transportadora de residuos acilos (ACP), interviene en los procesos de recepción y presentación de los residuos acilos a la enzima condensante y de soporte de la cadena carbonada en formación mientras se van condensando las distintas unidades (Hale y Leadly,1985; Hale y col.,1987).

El centro activo de la ACP se caracteriza por tener un residuo de serina al que se une el brazo de fosfopanteteína que a su vez ligará las unidades acilo que elongarán la cadena policetónica. Este brazo de fosfopanteteína irá desplazándose con el fin de facilitar la acción de la enzima condensante al presentarle las unidades a condensar (Figura 3).

Cuando se hizo una comparación en la zona del centro activo (Figura 18), se encontró que la proteína deducida de la ORF3 mantiene la serina típica del centro activo así como la mayoría de los aminoácidos en una zona de 12 aminoácidos alrededor del residuo de serina.

**Figura 18.- Homología entre los presuntos centro activos de ACP de distintos sistemas.**

TcmORF3	Q D L G Y D S I A L L E
ActIORF3	E D I G Y D S L A L M E
GraORF3	E E L G Y D S I A L M E
ORF3	E D L G Y D S L A L M E
AGS <i>E.coli</i>	E D L G A D S L D T V E
AGS <i>Spinacea oleracea</i> <sup>a</sup>	S K L G A D S L D T V E
AGS Conejo	A D L G L D S L M G V E
AGS <i>S.erythraea</i> <sup>b</sup>	E D L G M D S L D L V E
EryA (2803-2906)	T E L G F D S L T A V G

a) Kuo y col.,1984

b) Hale y col.,1987

El resto de las referencias son las mismas que en los casos anteriores.

La organización de los genes aislados de *S.antibioticus*, y las funciones derivadas del análisis de los productos génicos correspondientes, sugieren un modelo de poliquétido sintetasa que

interviene en un proceso de biosíntesis mediado por la ACP como soporte de la cadena a elongar, a diferencia de la chalcona sintetasa.

### 2.2.3.- ORF4

La presunta proteína deducida de la ORF4 es la que presenta menos homología con su presunta equivalente en los genes de biosíntesis de poliquétidos. Tiene una homología del 76% con GraORF4 y del 67% con ActORF4, como se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7.- Homología entre el producto génico correspondiente a la ORF4 y sus equivalentes en otros sistemas.**

	<u>% Homología</u>	<u>%Identidad</u>
GraORF4	76	61
ActORF4	67	53
TcmORF4	50	24
EryA (2269-2670)	47	27

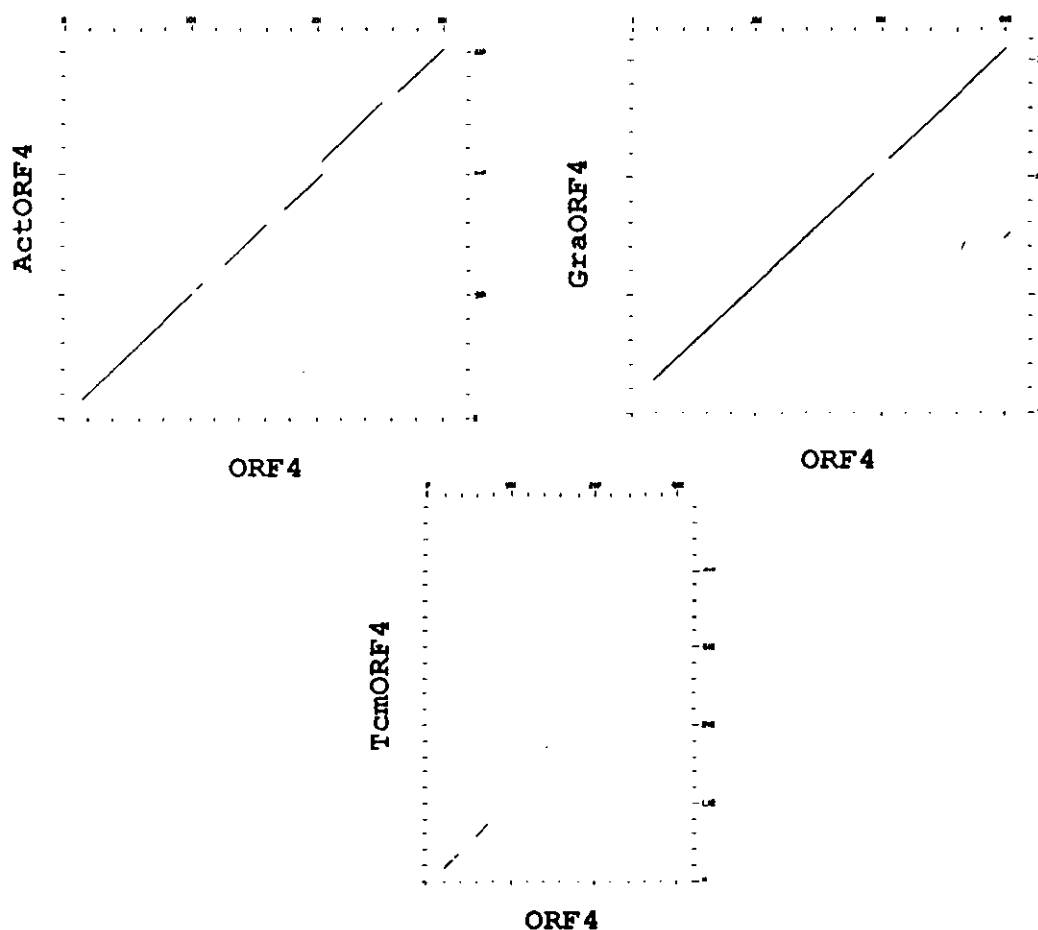
Nota: los números entre paréntesis son las posiciones relativas dentro de la secuencia de la sintetasa en cada caso. Las referencias son las mismas que en los casos anteriores.

A pesar de todo, existe un buen alineamiento extremo a extremo tanto con GraORF4 como con ActORF4, mientras que con TcmORF4 únicamente existe homología en el extremo N-terminal, como se muestra en la Figura 19.

Mediante un estudio realizado sobre intermediarios químicos en *S.violaceoruber* y *S.coelicolor*, se determinó que tanto GraORF4 como ActORF4 intervenían en un doble proceso de deshidratación y ciclación (Sherman y col.,1991). A diferencia de éstas dos anteriores, el producto génico deducido de tcmORF4 es una proteína bifuncional con actividad ciclasa/o-metiltransferasa (Hopwood y Sherman,1990). Se ha determinado que en la mitad del extremo C-terminal de la proteína deducida del gen tcmORF4, existe homología con la hidroxíndol-O-metiltransferasa de vaca (Ishida y col.,1987); la actividad ciclasa

parece localizarse en el extremo N-terminal. De estos datos se deduce que los péptidos ActORF4 y GraORF4 tienen en su extremo N-terminal la actividad ciclasa, que comparten con el péptido TcmORF4, mientras que en el extremo C-terminal de los péptidos GraORF4 y ActORF4, se localiza la actividad deshidratasa a diferencia del péptido TcmORF4 que tendría en este extremo una actividad o-metiltransferasa. En base a ello, el producto génico deducido para la ORF4 parece ser una proteína con actividad ciclasa/deshidratasa, sugiriendo la existencia de un intermediario en *S. antibioticus* similar al que se produce en la síntesis de actinorrodina y granaticina.

Figura 19.- Comparación a nivel de proteínas entre ORF4 de *S. antibioticus* y ActORF4, GraORF4 y TcmORF4.



Las condiciones en las que se realizaron estos alineamientos son las descritas en Materiales y Métodos, apartado 18, salvo en el caso de la comparación con TcmORF4 en las que las condiciones son ventana: 30 y astringencia:18.

2.2.4.- ORF5

En el análisis del producto génico de la ORF5 se ha encontrado homología con la proteína deducida del gen *actIII* (Hallam y col.,1988) y las proteínas correspondientes a los genes *graORF5* y *graORF6* (Sherman y col.,1989). Con menor homología se encontraron algunas deshidrogenasas así como el dominio cetorreductasa del polipéptido funcional que interviene en la biosíntesis de eritromicina, como se observa en la Tabla 8. Al igual que en los casos anteriores los péptidos más homólogos al deducido de la ORF5, son los implicados en la biosíntesis de granaticina y actinorrodina.

**Tabla 8.- Homología de la proteína correspondiente a ORF5 con sus equivalentes en otros sistemas.**

	<u>% homología</u>	<u>% identidad</u>
GraORF5 <sup>a</sup>	90	80
GraORF6 <sup>a</sup>	54	34
ActIII <sup>b</sup>	81	70
GDH ( <i>B. subtilis</i> ) <sup>c</sup>	54,5	34,3
RDH ( <i>Klebsiella aerogenes</i> ) <sup>d</sup>	54,5	31
ADH ( <i>Drosophila</i> ) <sup>e</sup>	48	34
EryA <sup>f</sup>	50	25

a) Sherman y col.,1989

b) Hallam y col.,1988

c) Jany y col.,1983

d) Moore y col.,1977

e) Thatcher, D.R.,1980

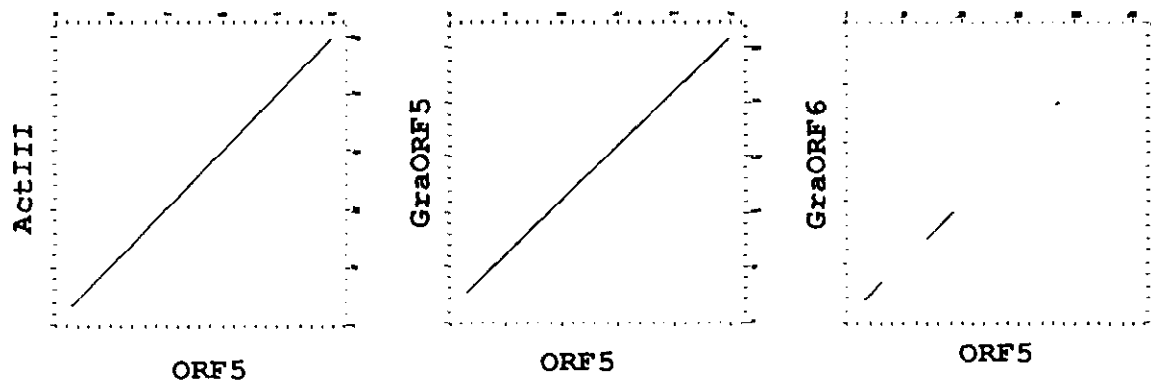
f) Cortés y col.,1990

NOTA: GDH: glucosa deshidrogenasa; RDH: ribitol deshidrogenasa; ADH: alcohol deshidrogenasa.

Existe un buen alineamiento entre las proteínas correspondientes a los genes *actIII* y *graORF5* con el producto génico de la ORF5,

mientras que la homología con la proteína deducida de *graORF6* es bastante menor (Figura 20).

Figura 20.- Comparación a nivel de aminoácidos entre el producto génico de la ORF5 con las proteínas correspondientes a los genes *actIII*, *graORF5* y la *graORF6*



Las condiciones en las que se realizaron estos alineamientos están descritas en Materiales y Métodos apartado 18.

En el caso de los genes implicados en la síntesis de granaticina se ha determinado que *graORF5* y *graORF6* son homólogos al gen *actIII*, aunque *graORF6* en menor grado. Además, la traducción de estos dos genes está acoplada (Sherman y col.,1989). La función que realiza la proteína deducida del gen *actIII*, se ha asociado a una actividad cetorreductasa (Hallam y col.,1988) que reduce el grupo ceto localizado en el carbono 9 de la estructura que dará lugar a la molécula de actinorrodina (Bartel y col.,1990). La homología entre la proteína deducida del gen *actIII* con los productos génicos deducidos de *graORF5* y *graORF6* hace pensar que éstos tienen igualmente una función cetorreductasa.

La máxima homología de la proteína correspondiente al gen ORF5 con GraORF5 (algo menor con el producto génico del gen *actIII*) hace pensar que el intermediario sea afín al de la ruta de granaticina. Sin embargo, los datos de la secuencia parecen descartar la existencia de otra ORF acoplada a la ORF5 (como ocurre en granaticina). El producto génico correspondiente a la ORF5, parece ser una cetorreductasa

similar a la de granaticina (Sherman y col.,1989) y actinorrodina (Hallam y col.,1988).

Las proteínas implicadas en reacciones redox utilizan como coenzima bien moléculas de NAD o bien de NADP. Las enzimas que unen piridín nucleótidos parecen conservar un dominio característico GXGXXG, en el caso de unión de NAD, ó GXGXXA en el caso de que el coenzima sea el NADP. Además, mantienen una estructura secundaria determinada basada en unos plegamientos de cadenas  $\beta\alpha\beta$  (Scrutton,1990). Igualmente es necesaria la existencia de aminoácidos cargados negativamente en el extremo C-terminal de la segunda cadena  $\beta$ , con el fin de formar un enlace de hidrógeno con el 2' hidroxilo del residuo de ribosa del ADP, molécula mediadora en la unión del coenzima (Wierenga y col.,1986). En el caso de las presuntas cetorreductasas de las sintetetasas de actinorrodina y granaticina se encuentran la secuencia consenso del tipo GXGXXA en la posición 95 (Hallam y col.,1988; Sherman y col.,1991), aunque le faltan algunos de los requerimientos estructurales que favorecen la unión enzima-cofactor, como es la presencia de un residuo de alanina a 4 aminoácidos de la secuencia consenso. En la proteína deducida de la ORF5 no se encuentra ninguna de estas secuencias consenso, sin embargo, existe cierta homología a nivel de secuencia con la ribitol deshidrogenasa de *Klebsiella aerogenes* y la alcohol deshidrogenasa de *Drosophila* (Jörnwall y col,1984), al igual que con la proteína correspondiente al gen actIII. En este tipo de deshidrogenasas, se ha descrito como posible dominio de unión del coenzima, una secuencia consenso en el extremo N-terminal que mantiene la estructura secundaria típica de alternancia de cadenas  $\beta$  y cadenas  $\alpha$  (Jörnwall y col.,1984).

Entre los dos primeros dominios de cadenas  $\beta$  ( $\beta A$  y  $\beta B$ ) se encuentran dos residuos de glicina altamente conservados. Estas glicinas permiten el giro de dichas cadenas, originando una estructura tridimensional flexible que permite la unión del coenzima. Asimismo, presentan residuos ácidos, como ácido aspártico ó ácido glutámico, muy cerca de la cadena  $\beta B$ , residuo descrito como posible punto de unión al extremo 2' hidroxilo del ADP que media la unión de la molécula de piridín nucleótidos (Wierenga y col.,1986).

La secuencia de aminoácidos deducida de la ORF5 presenta una disposición muy parecida a este grupo de deshidrogenasas, como se observa en la Figura 21.

Cabe destacar igualmente, que la homología del producto génico de la ORF5 con la ribitol deshidrogenasa y la glucosa deshidrogenasa, se centra fundamentalmente en el extremo N-terminal, siendo la homología en este extremo un 15% mayor con respecto a los valores encontrados frente a la proteína total (Tabla 9).

Podría existir en el extremo N-terminal un dominio típico de unión a piridín nucleótidos dada su alta homología con la ribitol deshidrogenasa, entre otras, manteniendo todos los requerimientos estructurales necesarios para la unión del coenzima a la proteína que cataliza las reacciones redox.

Figura 21.- Homologías en el dominio de unión al coenzima de distintas deshidrogenasas y cetorreductasas.

ORF5	8	V A L V T	G A T S G I G L E I A R R L A G L G A	R V Y L C	A R H E D	41
ActIII	8	V A L V T	G A T S G I G L E I A R R L G K E G L	R V F V C	A R G E E	41
GraORF5	19	V A L V T	G A T S G I G L A I A R R L A A L G A	R T F L C	A R D E E	52
RDH <i>K.aerogenes</i>	16	V A A I T	G A A S G I G L E C A R T L L G A G A	K V V L I	D R E G E	49
GDH <i>B.megaterium</i>	9	V V V I T	G G S T G L G R A M A V R F G Q E E A	K V V I N	Y Y N N E	42
ADH <i>D.metleri</i> <sup>a</sup>	8	I I F V A	G . L G G I G L D T S R E I V K S G P	K N L V I	L D R V E	40
ADH <i>D.pseudoscura</i> <sup>b</sup>	7	V I F V A	G . L G G I G L D T S R E L V K R N L	K N L V I	L D R I D	38
ADH <i>D.lebanonensis</i> <sup>c</sup>	8	V I F V A	A . L G G I G L D T S R E L V K R N L	K N F V I	L D R V D	40
		Cadena BA			Cadena BB	

Las referencias son las mismas de la Tabla 8 y además:

- a) Yum y col., sin publicar
- b) Schaeffer y col.,1987
- c) Juan y col.,1990; Alabat y col.,1990



Tabla 9.- Homología del producto génico deducido de la ORF5 con sus equivalentes de otros sistemas a nivel de toda la proteína así como en el extremo N-terminal.

	<u>% homología</u>	
	<u>dominio unión al coenzima</u>	<u>proteína total</u>
ActIII	88	82
GraORF5	91	90
RDH <i>K.aerogenes</i>	70,5	54,5
GDH <i>B.megaterium</i>	65	52
ADH <i>D.metleri</i>	54,5	49
ADH <i>D.pseudobscura</i>	48,5	42
ADH <i>D.lebanonensis</i>	48,5	48

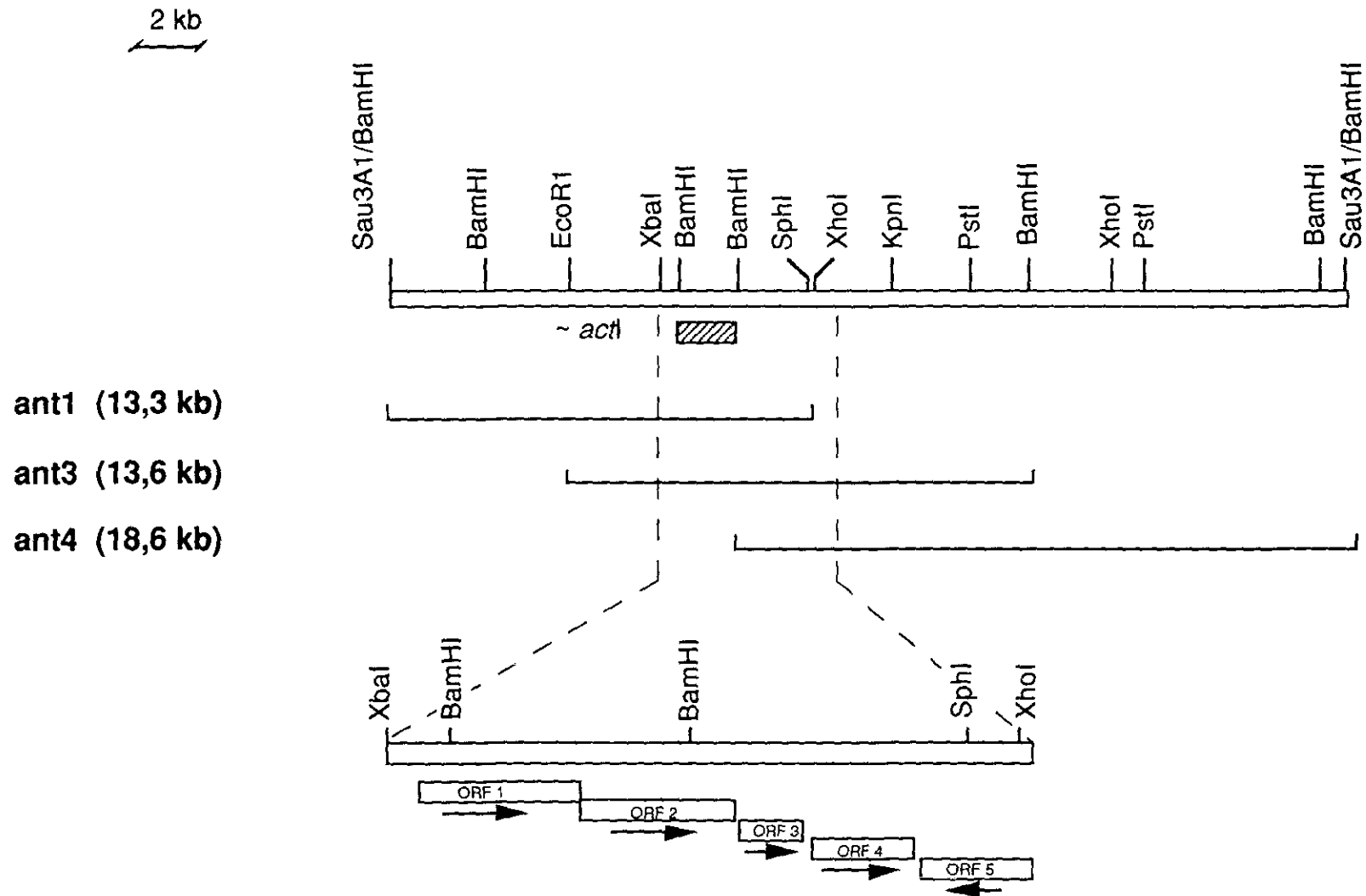
Las referencias son las mismas que en la Figura 21.

Como resultado del análisis molecular a nivel de DNA del fragmento aislado de *S.antibioticus*, homólogo a los genes *act*, se han obtenido cinco fases de lectura abierta (Figura 22), cuyos productos génicos presentan una homología considerable con los correspondientes de *S.violaceoruber*, organismo productor de granaticina y algo menor con los genes que intervienen en la biosíntesis de actinorrodina de *S.coelicolor*. Estos resultados podrían sugerir que los genes caracterizados, codifican para enzimas de una ruta de un poliquétido estructuralmente más semejante a granaticina que a actinorrodina.

### 3.- ANALISIS GENETICO

Una vez analizados los fragmentos del DNA de *S.antibioticus* clonado y, de la secuencia de DNA deducida la función de los genes, se procedió a hacer un estudio "in vivo" para poder determinar cuál es el papel que juegan estos genes en el interior de la célula. Para ello es necesario disponer primero de un sistema de transformación y/o transfección adecuado para *Streptomyces* y en segundo lugar obtener un

Figura 22.- Resumen del análisis molecular de los clones aislados



grupo de mutantes que tuvieran interrumpidos específicamente los genes objeto de estudio. Desgraciadamente para *S. antibioticus* no se tiene un sistema eficiente de transformación/transfección, ni se disponen de mutantes para los genes clonados. Sin embargo, se disponen de un amplio número de vectores y mutaciones de *S. coelicolor* como para permitir un análisis heterólogo de los genes clonados. Por ello se decidió utilizar esta estrategia para analizar los genes que habían sido clonados y caracterizados.

### 3.1.- Complementación heteróloga en *S. coelicolor*

Algunas especies del género *Streptomyces* poseen un sistema de restricción-modificación muy desarrollado. Cuando un DNA procedente de otra especie, se introduce en una célula de *Streptomyces*, sufre un reconocimiento por parte de los sistemas de restricción que se traduce en la degradación del DNA. Este es un problema muy generalizado en los experimentos de clonaje en *Streptomyces*, afectando en algunos casos de modo drástico, a las frecuencias de transformación y transfección. En concreto, *S. coelicolor* y *S. antibioticus* poseen un sistema de restricción bastante potente. Para reducir este problema existen algunas cepas, como *S. lividans*, que poseen un sistema de restricción bastante más débil que en las cepas antes mencionadas, manteniendo el sistema de modificación del DNA. De esta forma, DNAs extraídos primeramente de *S. lividans* habrán sufrido algunas de las modificaciones necesarias que eviten el reconocimiento de las endonucleasas de restricción, mejorando de modo importante las frecuencias de transformación y transfección (Hopwood y col., 1985a).

Con los datos obtenidos de la secuencia de los genes aislados de *S. antibioticus*, se pudo observar la gran homología con los genes tempranos de la biosíntesis de actinorrodina en *S. coelicolor* (aproximadamente un 75% como valor medio). En el laboratorio se disponía de un buen número de mutantes de *S. coelicolor* que tenían afectada la ruta de biosíntesis de actinorrodina en distintos puntos. Igualmente se sabía que era posible la complementación heteróloga de mutaciones específicas entre dos especies de *Streptomyces* productoras de poliquétidos semejantes, como es el caso de la complementación de

las mutaciones *actI* y *actIII* de *S.coelicolor* con DNA procedente de *S.violaceoruber*, productor de granaticina (Sherman y col.,1991). Siguiendo el mismo criterio, se intentó complementar las mutaciones de *S.coelicolor* que afectan a la biosíntesis de actinorrodina, con DNA procedente de *S.antibioticus*.

El primer paso fué, por tanto, el clonaje de los fragmentos de la genoteca en vectores capaces de replicarse en *Streptomyces*.

### 3.1.1.- Construcción de los clones en *Streptomyces*

Se disponía de una zona de aproximadamente 30kb del cromosoma de *S.antibioticus* que contenía, al menos cinco genes que presuntamente codifican una poliquétido sintetasa. Esta región estaba clonada en tres fragmentos en vectores de *E.coli*, dando lugar a los clones ant1, ant3, ant4 (Figura 22). Con el fin de conocer qué tipo de información contenían, se procedió a clonarlos en vectores de *Streptomyces*, tanto de bajo número de copias, (pIJ941), como de alto número de copias (pIJ486 y pIJ4083) (El conjunto de todos los plásmidos construidos se resume en la Tabla 10).

Para ello, se digirió el clon ant1 parcialmente con *EcoRI* y se ligó al vector de *E.coli*, pUC18 digerido con *EcoRI*, dando lugar al plásmido pMH19. Una vez comprobado por restricción que no había reorganización de los fragmentos clonados en pMH19, se digirió este plásmido con *HindIII* (ya que tenía un corte único) y después de romper su extremos se ligaron a pIJ941 digerido con *EcoRV*, obteniendo el plásmido pMH4. De esta manera se interrumpía el gen de la resistencia a tiosstreptón y se mantenía el gen de resistencia a higromicina (ver Figura 23).

El clonaje de los fragmentos de ant3 y ant4 fué más sencillo, ya que se digirieron los clones de *E.coli* con *EcoRI* y se clonaron directamente en pIJ941 digerido con *EcoRI*, de forma que se interrumpía el gen de la resistencia a higromicina y se mantenía la resistencia a tiosstreptón. Así, se obtuvo pMH9, que se corresponde con el fragmento del clon ant3, y pMH9410 que se corresponde con el fragmento del fago

Tabla 10.- Relación de clones obtenidos en este trabajo

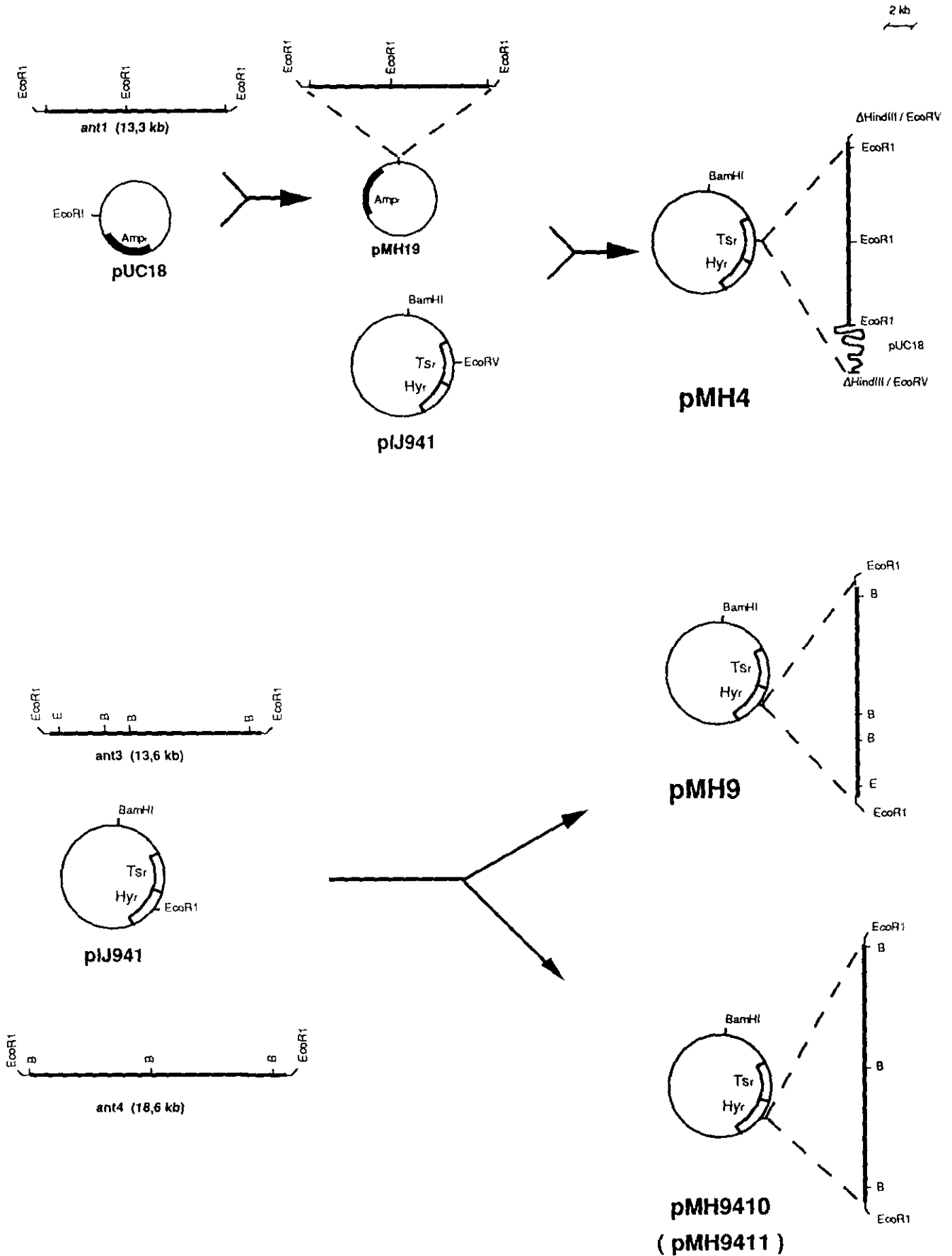
<u>Fagos E.coli</u>	<u>Vector parental</u>	<u>Características</u>
ant1	EMBL4	Banda <i>Sau3A</i> de 13,3kb del genoma de <i>S.antibioticus</i> (Figura 8).
ant2	"	Fragmento <i>Sau3A</i> de 18kb del genoma de <i>S.antibioticus</i> (sin Figura).
ant3	"	Fragmento <i>Sau3A</i> de 13,6kb del genoma de <i>S.antibioticus</i> , solapante con ant1 (Figura 9).
ant4	"	Fragmento <i>Sau3A</i> de 18,6kb del genoma de <i>S.antibioticus</i> que solapa con ant3 (Figura 9).
<u>Fagos de Streptomyces</u>		
φMH10	PM1	Fragmento <i>DdeI</i> (romo) de 4,3kb de <i>S.coelicolor</i> que contiene ORF1-3 <i>actI</i> (Figura 28).
<u>Plásmidos E.coli</u>		
pMH181	pUC18	Fragmento <i>BamHI</i> de 2,2kb procedente de <i>S.coelicolor</i> que contiene el gen <i>actI</i> (Figura 7).
pMH182	"	Es la otra orientación de pMH181 (Figura 7).
pAM1801	"	Fragmento de 1,1kb procedente de una digestión <i>ExoIII</i> del plásmido pMH182 (Figura 7).

pAM1802	"	Fragmento de 800bp procedente de una digestión <i>ExoIII</i> del plásmido pMH181 (Figura 7).
pMH19	"	Fragmento íntegro obtenido con una digestión <i>EcoRI</i> parcial del clon ant1 (Figura 23).

### Plásmidos *Streptomyces*

pMH4	pIJ941	Clon pMH19 íntegro (Figura 23).
pMH9	"	Fragmento <i>EcoRI</i> parcial procedente del clon ant3 (Figura 23).
pMH9410	"	Fragmento <i>EcoRI</i> procedente del clon an4 (Figura 23).
pMH9411	"	Es la otra orientación del plásmido pMH9410 (Figura 23).
pMH4863	pIJ486	Banda <i>BamHI</i> de 8,5kb procedente del plásmido pMH9410 (Figura 24).
pMH481	"	Fragmento <i>EcoRI</i> 8kb procedente del clon ant1 (Figura 24).
pMH4031	pIJ4083	Fragmento <i>XbaI-BamHI</i> de 370bp que contiene el inicio de traducción de la ORF1 (Figura 32).
pMH4032	"	Es la otra orientación de pMH4031 (Figura 32).
pMH4033	"	Fragmento <i>SmaI-BamHI</i> de 914bp que contiene el inicio de traducción de la ORF1 (Figura 32).

Figura 23.- Estrategia de clonaje en *Streptomyces* de los fragmentos cromosómicos aislados de *S. antibioticus*



ant4 clonado en pIJ941 en la orientación que se indica en la Figura 23, y pMH9411 en la orientación opuesta.

### 3.1.2.- Transformación de *S.lividans* TK21

Como se ha mencionado anteriormente es necesario la utilización de una cepa intermediaria como *S.lividans* antes de transformar *S.coelicolor* para evitar los sistemas de restricción presentes en este último. Por ello, se transformó primeramente la cepa de *S.lividans*, TK21, con los plásmidos obtenidos: pMH4, pMH9, pMH9410 y pMH9411. El fenotipo observado en los casos de pMH4 y pMH9 fué el típico de TK21, a diferencia del observado en las transformaciones con pMH9410 y pMH9411, en las que apareció la producción de un pigmento color fucsia, diferente a actinorrodina, y que no es producido por TK21 en condiciones normales (Figura 27).

### 3.1.3.- Complementación de las mutaciones *act* en *S.coelicolor*

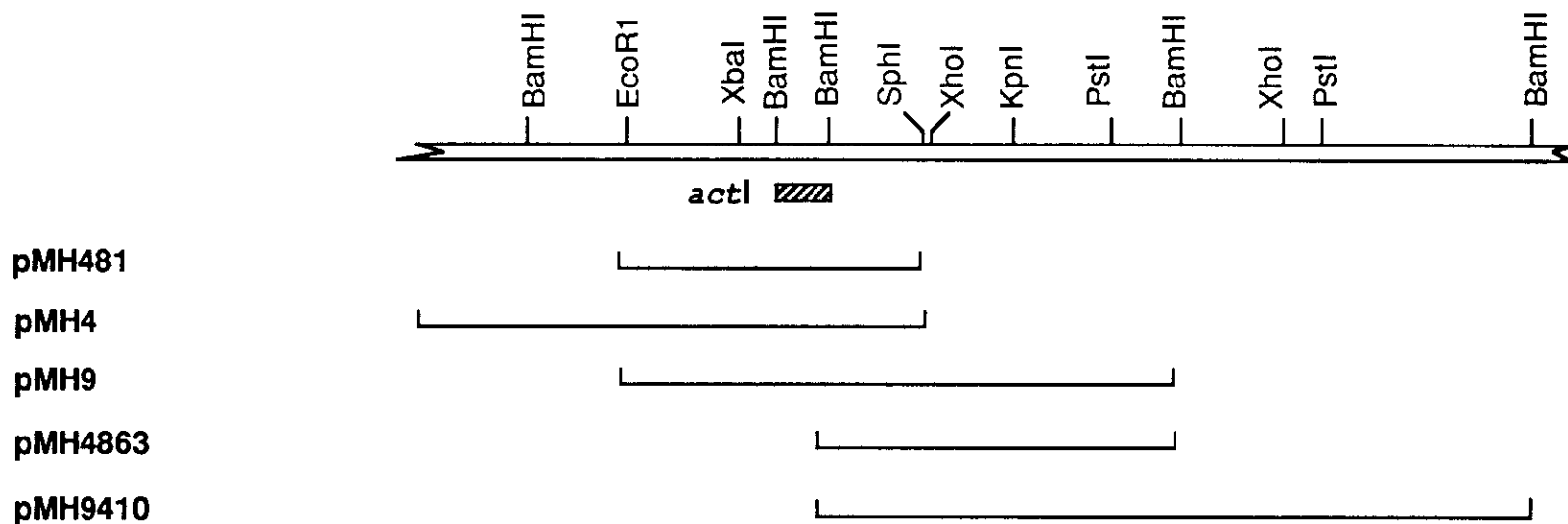
Una vez obtenidos los plásmidos pMH4, pMH9 y pMH9410 de *S.lividans*, se transformaron los mutantes de *S.coelicolor* afectados en los loci *actI*, *actIII*, *actIV*, *actV<sub>a</sub>*, *actVII* y *actII*. El resultado de todas estas transformaciones se resume en la Figura 24.

De los datos de la Figura 24, cabe destacar que son consistentes con los datos de homología obtenidos del análisis de secuencia. Así, la complementación de *S.coelicolor*, TK18 (*actIII*), resulta positiva cuando se transforma con la región de *S.antibioticus* donde se encuentra localizado el gen homólogo al gen *actIII*. Cuando se transformó la cepa JF3 de *S.coelicolor* (mutante *actVI*) con el plásmido pMH9410, no se obtuvo complementación. Igualmente, no se han conseguido complementar las mutaciones *actIV* y *actII* ni se han localizado secuencias que sean homólogas a estos genes. Esta ausencia de complementación bien pudiera deberse a que el poliquétido en cuya síntesis interviene esta poliquétido sintetasa de *S.antibioticus*, no requiera las modificaciones químicas que realizan las proteínas codificadas por estos genes, puesto que se trata de los genes de expresión media y tardía de una ruta biosintética diferente. Alternativamente, puede deberse a que su homología con los genes



Figura 24.- Complementación heteróloga de *S.coelicolor*

2Kb



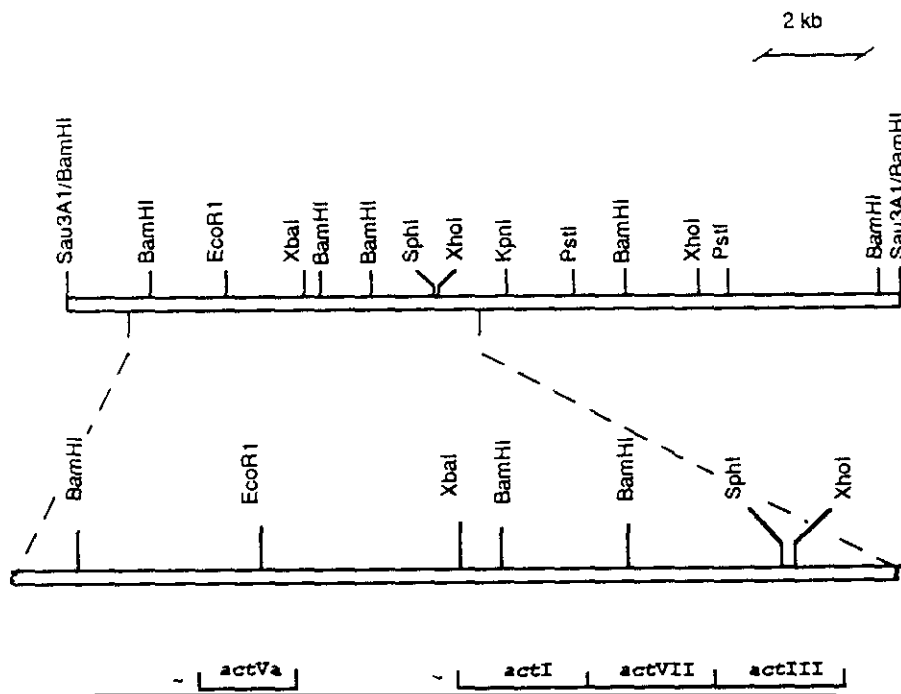
<u>PLASMIDOS RECOMBINANTES</u>	<u>pMH4</u>	<u>pMH481</u>	<u>pMH9</u>	<u>pMH9410</u>	<u>pMH4863</u>
TK17 ( <i>actI</i> )	+	-	+	-	-
TK18 ( <i>actII</i> )	-	-	+	+	+
B-140 ( <i>actVII</i> )	-	+	-	-	-
TK16 ( <i>actIV</i> )	-	-	-	-	-
JF4 ( <i>actVa</i> )	+	-	+	-	-
JF1 ( <i>actII</i> )	-	-	-	-	-

tempranos no sea suficiente como para permitir la complementación heteróloga de las mutaciones de los genes tardíos de la biosíntesis de actinorrodina.

Cabe destacar en el análisis de complementación de *S.coelicolor* TK17 (*actI*), que pMH4 y pMH9, que contienen todos los genes equivalentes al locus *actI*, complementan la mutación, mientras que por el contrario, pMH481 (la misma construcción pero clonada en un plásmido multicopia), no complementa la mutación de TK17.

De todos estos resultados, cabe concluir en primer lugar que la homología entre las presuntas poliquétido sintetetasas de *S.antibioticus* y la actinorrodina sintetasa de *S.coelicolor* a nivel de los genes tempranos, es suficiente como para poder complementar heterológamente las mutaciones que afectan a los genes tempranos de la biosíntesis de actinorrodina en *S.coelicolor*. En segundo lugar se ratifican las funciones de los productos génicos deducidos de los datos de secuencia (Figura 25).

Figura 25.- Organización genética de una poliquétido sintetasa en *S.antibioticus*.

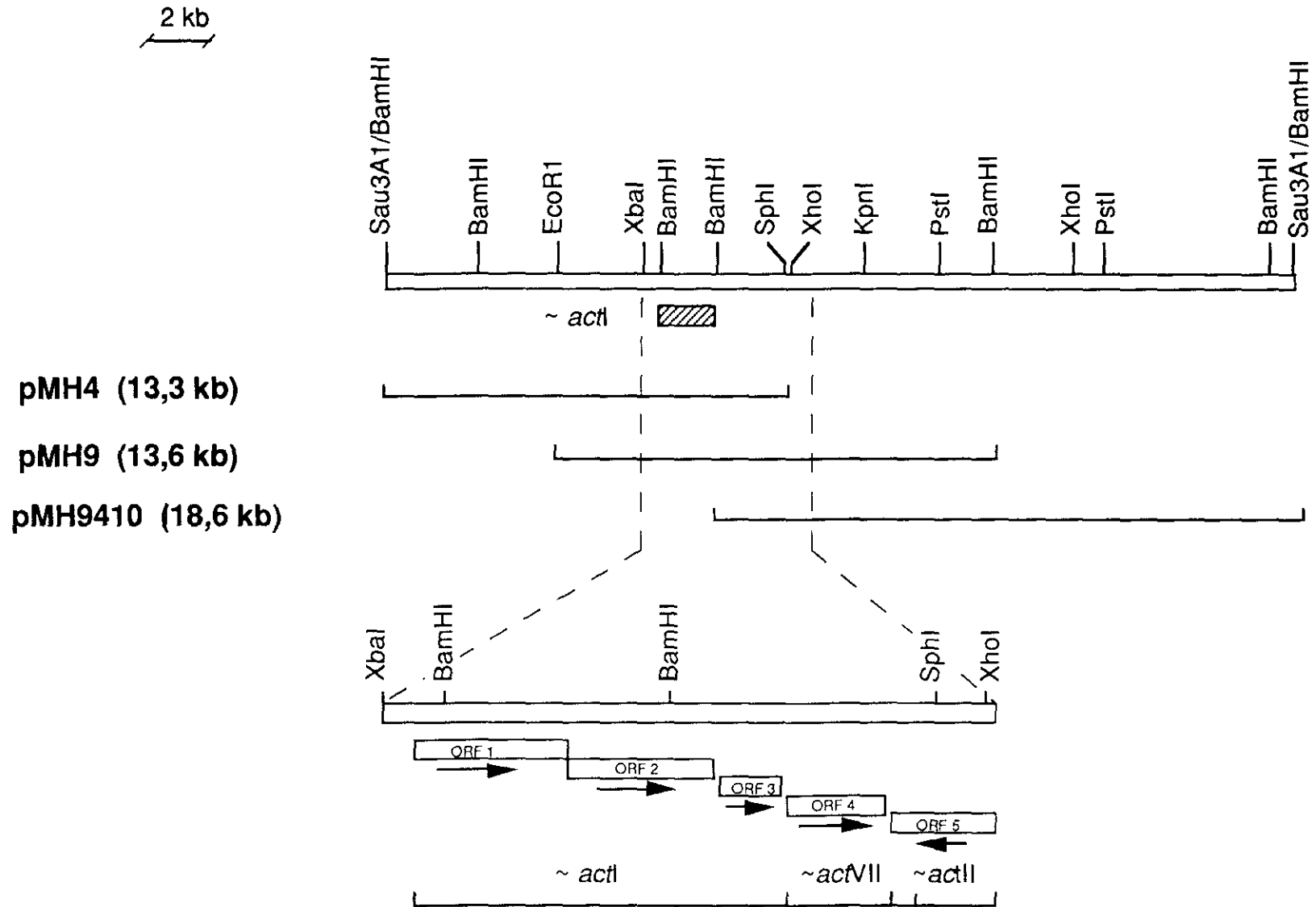


Mediante clonaje mutacional se intentó obtener mutantes de *S.antibioticus* que tuvieran interrumpidos específicamente los genes de

la poliquétido sintetasa aislada en este trabajo. Después de varios intentos, se consiguió una infección de *S. antibioticus* (utilizando como intermediario TK21) pero el fago sólo desarrollaba el ciclo lítico, sin entrar en lisogenia, por lo que no se pudo conseguir inserciones en el cromosoma. Igualmente se transformaron protoplastos de *S. antibioticus* con los plásmidos obtenidos de *S. coelicolor*, aislando algunos transformantes en las mismas condiciones de selección que en *S. coelicolor* (50µg/ml de tiostreptón y 200µg/ml de higromicina). Los clones obtenidos mostraron diversos grados de deleciones, no siendo posible aislar transformantes estables en los que no hubiera deleciones inespecíficas. Con el fin de ver si eran los fragmentos clonados los que originaban esta inestabilidad se transformaron vectores obtenidos de *S. coelicolor* M145, como son pIJ922 y pIJ702, no logrando ningún transformante estable. Así pues, se ha logrado introducir en *S. antibioticus* plásmidos que contienen genes de una poliquétido sintetasa y que son capaces de replicarse dentro de este microorganismo, pero las deleciones obtenidas dificultan su análisis de expresión homóloga.

Como conclusión del análisis de complementación realizado, se puede comentar que se han localizado 5 genes agrupados en el cromosoma correspondientes a una poliquétido sintetasa en *S. antibioticus* y que son muy homólogos a los genes correspondientes a la actinorrodina sintetasa. Se han complementado de forma heteróloga las mutaciones que afectan a varios genes tempranos que intervienen en la biosíntesis de actinorrodina, ratificando los datos obtenidos del análisis de la secuencia (Figura 26). Por el momento no se han encontrado por secuencia, genes homólogos a los genes tardíos de la ruta de actinorrodina; sin embargo, se ha podido complementar alguna de las mutaciones tardías como es el caso del gen *actVa*, cuya mutación ha sido complementada por pMH4 y pMH9. Este dato sugiere que junto al agrupamiento de genes tempranos que intervienen en la biosíntesis de poliquétidos, identificados por secuencia, podría existir otro agrupamiento de genes más tardíos.

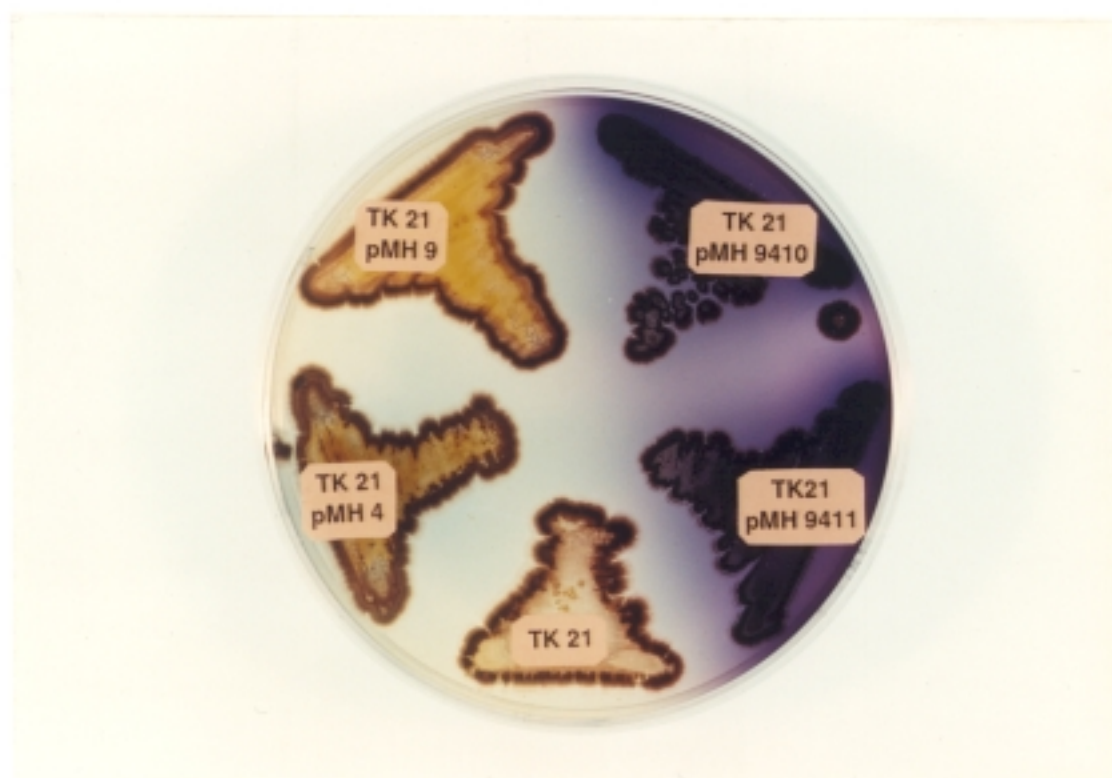
Figura 26.- Genes homólogos a la actinorrodina sintetasa en *S. antibioticus*.



### 3.2 Expresión en *S.lividans*

Cuando se transformó la cepa TK21 de *S.lividans* con los plásmidos pMH9410 y pMH9411, que contienen los genes estudiados y una zona a la derecha de unas 15Kb, se obtuvo un nuevo pigmento color fucsia aparentemente diferente a actinorrodina (Figura 27). La expresión de los genes necesarios para la producción del pigmento, es independiente de la orientación en la que el fragmento esté clonado, ya que se produce tanto cuando se transforma TK21 con pMH9410 como con pMH9411.

Figura 27.- Transformación heteróloga de TK21 con DNA de *S.antibioticus*



El nuevo pigmento aparentemente es diferente a actinorrodina, aunque algunas de sus características físico-químicas son muy parecidas, sugiriendo que sus estructuras podrían ser análogas. Ambos tienen una absorbancia máxima a 530nm, presentan un comportamiento como indicador ácido-base y tienen los mismos cambios de solubilidad en disolventes orgánicos, en función de pH. Este último punto es la base para el método de extracción de compuestos que tienen una estructura semejante a actinorrodina (Cole y col., 1987). Esta nueva sustancia es difusible a través de la membrana plasmática, empezándose

a sintetizar incluso antes de que la colonia comience a esporular. Ambos pigmentos presentan diferente movilidad en cromatografía en capa fina, cuando se utiliza la mezcla de cloroformo:metanol (8:2). El nuevo pigmento tiene un  $R_f$  de 0,25 mientras que el pigmento extraído de J1501 (cepa productora de actinorrodina) tiene un  $R_f$  de 0,4. Mediante un bioensayo frente a *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis* no apareció ningún halo de inhibición, a diferencia de actinorrodina que sí tiene actividad antibiótica frente a estos microorganismos. El pigmento no aparece en la especie parental por lo que podría ser consecuencia de expresión heteróloga de algunos genes de *S.antibioticus* clonados en *S.lividans*.

*S.lividans* contiene todos los genes necesarios para la biosíntesis de actinorrodina, aunque no se expresan en condiciones normales. Por ello, la primera hipótesis podría ser que este pigmento inducido en *S.lividans* por DNA de *S.antibioticus*, fuera una sustancia sintetizada por una ruta heteróloga formada por genes de la actinorrodina sintetasa (presentes en TK21) y genes contenidos en el plásmido pMH9410. Si esto es así, algunas de las enzimas de estas rutas tendrían que reconocer como sustratos aquéllos intermediarios que no son los obtenidos en su ruta homóloga. Dado que el plásmido pMH9410 contiene las ORF3, 4 y 5 completas, así como el final de la ORF2, de todos los genes identificados (ver Figura 26), cabe suponer que podrían necesitarse algunos intermediarios tempranos de la biosíntesis de actinorrodina para sintetizar el nuevo pigmento. Ya que se disponía de numerosos mutantes de *S.coelicolor* con la ruta de biosíntesis de actinorrodina interrumpida, se estudió qué mutantes de la ruta biosintética de actinorrodina eran capaces de sintetizar la nueva sustancia. Los resultados se muestran en el siguiente cuadro:

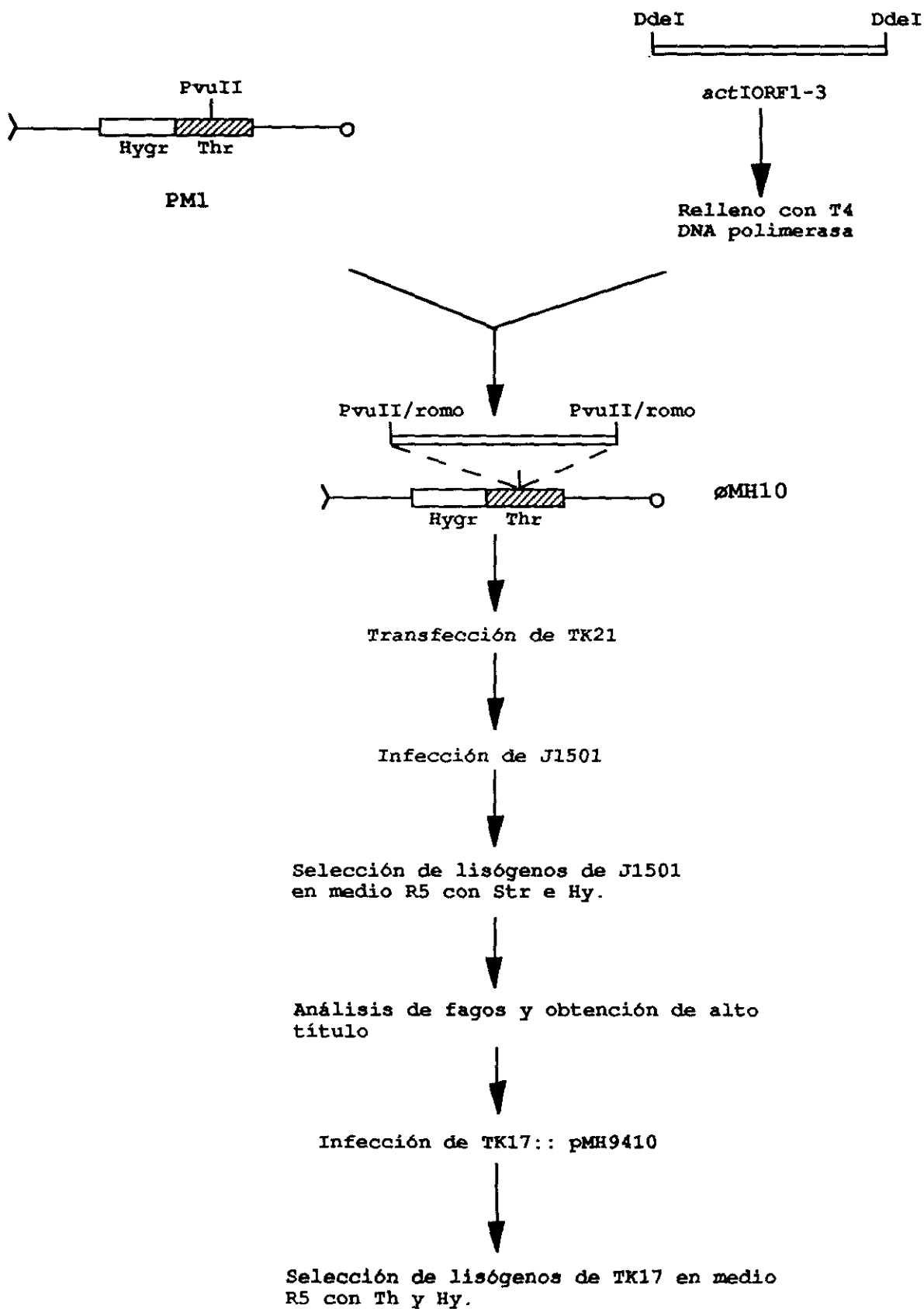
	<u>Complementación</u>	<u>Síntesis del pigmento</u>
JF1 ( <i>actII</i> )	-	+
TK17 ( <i>actI</i> )	-	-
TK16 ( <i>actIV</i> )	-	+
JF3 ( <i>actVI</i> )	-	+
TK18 ( <i>actIII</i> )	+	+
JF4 ( <i>actV<sub>a</sub></i> )	-	-
B140 ( <i>actVII</i> )	-	+

De estos datos se puede deducir que como norma general, aunque con excepciones, no son necesarios la expresión de genes de acción media y tardía de la biosíntesis de actinorrodina, *actIV*, *actVII*, *actVI* para que se biosintetice el nuevo pigmento. Sin embargo, un hecho a destacar es que al no complementar la mutación del gen *actI* no se produce pigmento. Este resultado podría sugerir que es necesario al menos el intermediario generado por la ceto-acil-sintetasa, codificada por el gen *actI*, para formarse el nuevo pigmento. Con el fin de confirmar esta hipótesis, se intentó la complementación homóloga de la mutación *actI* en el mutante de *S.coelicolor* TK17, que contenía el clon pMH9410 (Figura 28). Del resultado de todo este proceso se obtuvieron colonias productoras de actinorrodina de TK17, pero no se detectó producción del nuevo pigmento. Parecería, por tanto, que no es necesario el gen *actI* para la síntesis del nuevo pigmento; sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de una ruta heteróloga ya que podría estar ocurriendo una titulación de los intermediarios tempranos de la ruta de biosíntesis de actinorrodina.

El clon pMH9410, además de las ORF's 3, 4 y 5 de los genes secuenciados, contiene aproximadamente 15kb de DNA desconocido. En la mayoría de los experimentos de complementaciones de los mutantes *act* con el clon pMH9410, se observa un número importante de deleciones inespecíficas del extremo derecho del clon. Por ejemplo, en TK18::pMH9410 la deleción de un fragmento de 12kb del extremo derecho, complementa la mutación de TK18 (*actIII*) pero no produce pigmento. Este hecho hace pensar en una segunda hipótesis que consiste en la localización en este extremo de unos genes "silentes" que en las cepas parentales no se expresan.

Cuando se transformó JF1, que tiene mutado el gen regulador (gen *actII*), no se complementó la mutación y, sin embargo, sí se produjo el nuevo pigmento. Este hecho sugiere que podría existir en este extremo un gen equivalente al gen *actII* que activara la expresión de genes *act* "silentes" en *S.lividans*, ó bien que la síntesis del nuevo pigmento fuera independiente del gen *actII*.

Figura 28.- Estrategia de complementación de la mutación *actI* en TK17::pMH9410





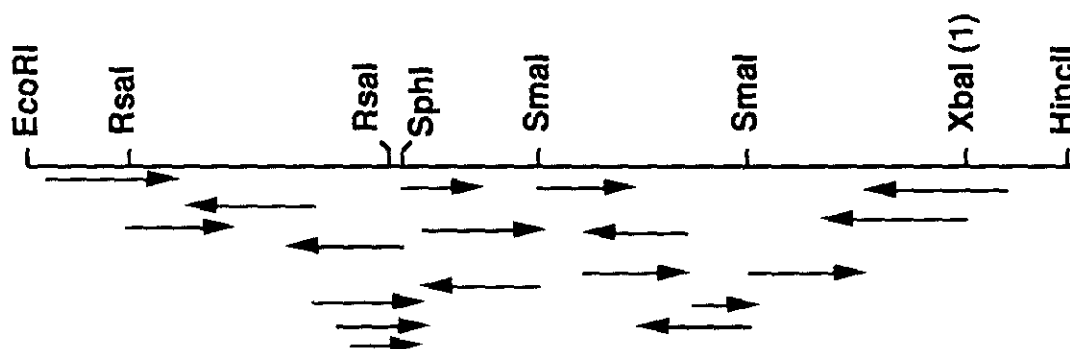
De todas estas observaciones no se puede establecer un criterio único, siendo necesarios más experimentos encaminados a determinar si en el extremo derecho del clon pMH9410 se localizan unos genes "silentes" responsables de la síntesis del nuevo pigmento ó si por el contrario se trata de un pigmento híbrido sintetizado por una ruta heteróloga entre intermendiarios de la ruta *act* y intermediarios correspondientes a la ruta de *S.antibioticus*.

#### **4.- LOCALIZACION DE SECUENCIAS ACTIVADORAS EN ZONAS ADYACENTES A LA PRESUNTA POLIQUETIDO SINTETASA EN *S.antibioticus***

Gracias al estudio de distintas sintetetasas de antibióticos en *Streptomyces*, se ha podido determinar la existencia de genes reguladores adyacentes a los genes estructurales que intervienen en la biosíntesis de antibióticos. Un análisis de estas secuencias reguladoras han demostrado que en la mayoría de los casos estudiados se trata de genes implicados en la activación de la transcripción de los genes biosintéticos. Tal es el caso de actinorrodina (M. Fernández-Moreno y col.,1991), bialaphos (Anzai y col.,1987), estreptomycinina (Distler y col.,1987; Ohnuki y col.,1985) y undecilprodigiosina (Malpartida y col.,1990; Narva y Feitelson,1990). Sin embargo, existen otros casos en los que los reguladores reprimen la expresión de los genes estructurales como ocurre con los genes de biosíntesis de metilenomicina (Chater y Bruton,1985).

En *S.antibioticus*, una vez localizados y analizados los genes estructurales de una poliquétido sintetasa, cabía esperar que en las zonas alrededor de estos genes existieran secuencias reguladoras que controlaran la expresión de los genes estructurales de la poliquétido sintetasa aislada. De esta forma se procedió a secuenciar la zona situada a la izquierda del inicio de traducción de la ORF1 siguiendo la estrategia mostrada en la Figura 29.

Figura 29.- Estrategia de secuenciación de la región izquierda de la poliquétido sintetasa en *S. antibioticus*.



(1) el sitio XbaI es el mismo que el sitio XbaI de la Figura 11.

Nota: Las flechas indican el sentido y la extensión de la secuencia en cada uno de los clones.

Del análisis de la secuencia obtenida (Figura 30) mediante un estudio realizado por ordenador al igual que en los casos anteriores, se obtienen dos posibles ORF's, ORF0 y ORFX. Ambos genes parece que tienen la misma dirección de transcripción que la ORF1 (Figura 31).

Un análisis más detallado de la secuencia (Figura 30), reveló que la ORF0 comienza probablemente en un codón de iniciación GTG, que codifica para valina, en la posición 216. Este inicio de traducción está precedido por una zona rica en purinas (GAGGA) que puede ser un sitio de unión al ribosoma (Hopwood y col., 1986). El final de la traducción tiene lugar en un codón TGA en la posición 1140. Seguidamente, la ORFX comienza con un codón de iniciación TTG en la posición 1230, codón de iniciación muy poco usual en *Streptomyces* que codifica para leucina. A una distancia de 20bp, se encuentra un presunto sitio de unión al ribosoma. La ORFX termina en un codón TGA en la posición 1737. Esta ORF se encuentra separada de la ORF0 por 90 pares de bases aparentemente no codificantes.

Entre el final de la ORFX y el principio de la ORF1 existe una zona de 1263 bp que en base al análisis de distribución de G y C en 3ª posición parece ser codificante (ORFZ). No se ha identificado por el momento

Figura 30.- Secuencia de nucleótidos de la zona que precede a los genes de la poliquétido sintetasa en *S. antibioticus*.

```

1   CCCGTCCGGGGCCGAGAGGGTGGCGAGGGCGAACGGTCCGGCGAAGAGCGCGGACGTGGA   60
   GGGCAGGCCCCGGCTCTCCACCGCTCCCGCTTGCCAGGCCGCTTCTCGCGCCTGCACCT

61  TCGGGGTTTCACGGACGTGTCTCCTGATTGCGGTGGGACTAATCTGGACCCGCCGCTCG   120
   ACGCCAAAGTGCCTGCACAGGAGGACTAACGCCACCCCTGATTAGACCTGGGCGGGCAGC

121 CGATCAGGGAAATAGATTCTGTGGATGGTCGGCATCCATCGCGTTTATTCCCGCCGCTCA   180
   GCTAGTCCCTTTATCTAAGACACCTACCAGCCGTAGGTAGCGCAAATAAGGGCGGGCAGT

181 CCGCCCTGCTCGTCGCCCCGTACGAGGAACCGATCCGTGAACCTGACCCGACTCGACCTCA   240
      RsaI
      rbs?       M N L T R L D L N
      ORF0 →

241 ACCTCGTCGTCGCCCTGCGCGCCCTGCTGGAGGAACGCAACGTCACCCGCGCCGGGCAGC   300
      L V V A L R A L L E E R N V T R A G Q R

301 GCGTCGGCCTCAGCCAGCCC GCCATGAGCGCCGCCCTCGCCCGGCTGCGCCGCCACTTCG   360
      V G L S Q P A M S A A L A R L R R H F D

361 ACGACGACCTGCTCGCCCGGTCGGCGGCCACTACGAACTGACCGCCCTCGGCCAGGTCC   420
      D D L L A R V G G H Y E L T A L G Q V L

421 TCCTCGACCGCACCGCCACCGCCTACGACGTGCTGGAACGCCTCTTCTCCAGCCAGGCCG   480
      L D R T A T A Y D V L E R L F S S Q A D

481 ACTTCGACCCGGCCGTCGGAGAGCCGCGAGTTCGGGCTGGTGGCGTCCGACTACGCGGTGG   540
      F D P A V E S R E F R L V A S D Y A V A

541 CCGTCTTCGGCACCGAACTCGCCCGCGTCTGTCACGAGGAGCCCCCGGCATCCGGCTCC   600
      V F G T E L A R V V H E E A P G I R L R

601 GCTTCGCCCAGGCCAGCCGGCCGTCGTCGACGACCCGCCACCCTGCTCAGCGCCACCG   660
      F A Q A Q P A V V D D T A T L L S A T D

```

661 ACGGCCTGCTCATGCCACACGGCGTGATCAGCGGCTTCCCGCCACCGACCTCTACGACG 720  
G L L M P H G V I S G F P A T D L Y D D

721 ACCGCTGGGTGTTTCCTCGTCGCCGAGGACCATCCGGACGTCCGGCGACCGGCTCACCCGCC 780  
R W V F L V A E D H P D V G D R L T R Q

781 AGGACCTGGCCCCGGCTGCCGTGGGTGACGTACCAGCGCACCTACGACGCGCCCGCCGTGC 840  
RsaI  
D L A R L P W V T Y Q R T Y D A P A V R

841 GCCACGTCCGGCATGCTCGGCATCGAACCGCGCGTGAAGTGTCCGTCCGACAGCTTCCAGC 900  
SphI  
H V G M L G I E P R V E V S V D S F Q L

901 TCCTGCCCTGCTGGTCACCGGCACCCGGCGCATCGCCCTGATCCAGGCACGGCTGGCGC 960  
L P L L V T G T R R I A L I Q A R L A R


961 GGCTGCTGACCCGATCGCCGCCGTCCGGGTGGTGGAGCCGCCCTACGAGGCGGTGCCGC 1020  
L L T P I A A V R V V E P P Y E A V P L

1021 TGCCTGAGGCGCTGTGGTGGCACCCGGTCCACACCCATGACCGGCCACATCTGGCTGC 1080  
R E A L W W H P V H T H D A A H I W L R

1081 GGGAGACGGCCATGCGGGTCCGGCAGCCACCTGACGGACCGCCGGGTTCAAGCGGTTCCCT 1140  
E T A M R V G S H L T D R P G S A R S \*

1141 GAGCGGCACGAGCGCGCCGCGCCGACCGTGACGGCCCGGGCGGTACGGTCGGGGAGTCG 1200  
SmaI

1201 GCCGGAGAGTCTTCCTCGTCCTCGGACTGTTGTACGGCTGACCGCGCTGTCGCTGACCG 1260  
rbS?  
M S R L T A L S L T V

**ORFX** 

1261 TCCACATGTGCCTGGCGATGGTCCTGGTCAACGCCGGCACCGGGTTCACGACCCCCGGC 1320  
H M C L A M V L V N A G T G F T T P R Q

1321 AGGGGGTCCGAGCGGGGCGGGGACCGAGCTTCCGCGATGAAGGTGGCGGCGCTCCTCG 1380  
G V A S G A G T E L P P M K V A A L L V

1381 TCGTACTGCCGGCCGGGCGGGCCCGCTCGCGCTCGACCGGTCCCTCGGGGTCAAGCGG 1440  
RsaI  
V L P A G P G P L A L D R V L G V E A A

1441 CGCGCCGGGCGTACCGGCCCGCTTGGCGCCGGCCCTCCCGGGTGCAGCGCTCGGTTCG 1500  
R R G V T G P L A A G P P A V R A S V V

1501 TCGGCGGCGCGATCGGGGGTGTGATCGGCGCGGTGATGAGCGCCCTCGTCAACTACTCGG 1560  
G G A I G G V I G A V M S A L V N Y S A

1561 CCGTGGGGGTGCCTTCCAGCGCCGGGGTGAACGCCGCCGACCACGCCGTGTCCGGACCGG 1620  
V G V P S S A G V N A A D H A V S G P V

1621 TCAGCGGCTTCCTCACCGGTTCTCGGACTGCTGGCGCACAGCGTCGCCACGGCCCCG 1680  
S G F L T G F L G I L A H Q R R H G P G SmaI

1681 GGGCACGGCCCGCGACCGGCGACACCCCGCCCGCACCCGCGCTCGACTCACGGCCGTGAC 1740  
A R P A T G D T P P A P A L D S R P \*

1741 GCGGCTGTGTTCTGCCCGGCCGTGGCCTGAAGGTGGTCCAGGAGTGCGCGGGCGCCCCG 1800

1801 ACGGCGAGGGCGACGGACGTCAGGGTGGGGTGCAGGCGGTGGCCGTCGGGATGACGTTGT 1860

1861 CGCCGGCGACCCACACCCACGGGTGTTCAGACGCGGCTGTGACTGTCGCGAACGCTGGT 1920

1921 GCCGTCGTGGGCGGGGCCATGCGCGTGGTGCCCTGGTGGTGGGTCGGGTGAGCCGCCCGCGG 1980

1981 CAGCAGGAAGGGGCTGTCGTCGAGGGGATGCCGACGGCGGCCCGGCTTCGGCGACGGC 2040

2041 CTTCTTGGCCTGCTCGATGGTCTCCGGATCGCGGTGCTGTAGCGGTAGCGGACGCGCGG 2100

2101 GGCGGCAGCCCGTGGTCTCGGCCGCGGTGTCGCTGAACCTCTCGCTGTCGTCGCGCT 2160

2161 CGCGCGCTCCCGGTGGCGCCACGCGTTCTCCCGAGGCGGGGTCGAGTGGTGTCTAGACC 2220  
Xba

2221 GTCGCCACAGCCTTTCACCACGTAACCTGCCGCTGTTTCAGAGGCGAAAGGACTTACAGCG 2280

2281 ATGTTGTCTACGAACGCGGGCCGGACATGACCCGGCGCGTCGTGATCACCGGTGTCGGTG 2340  
M T R R V V I T G V G V

ORF1 →

2341 TACGCGCTCCCGGCGGCAACGGAACGAAGGCGTTCTGGGACCTGTTGTCGGCGGGCCGCA 2400  
R A P G G N G T K A F W D L L S A G R T

2401 CCGCCACCCGGAGCATCTCCTTCTTCGACGCGTCGCCGTTCCGTTCCGGGATCGCCGGCG 2460  
A T R S I S F F D A S P F R S R I A G E

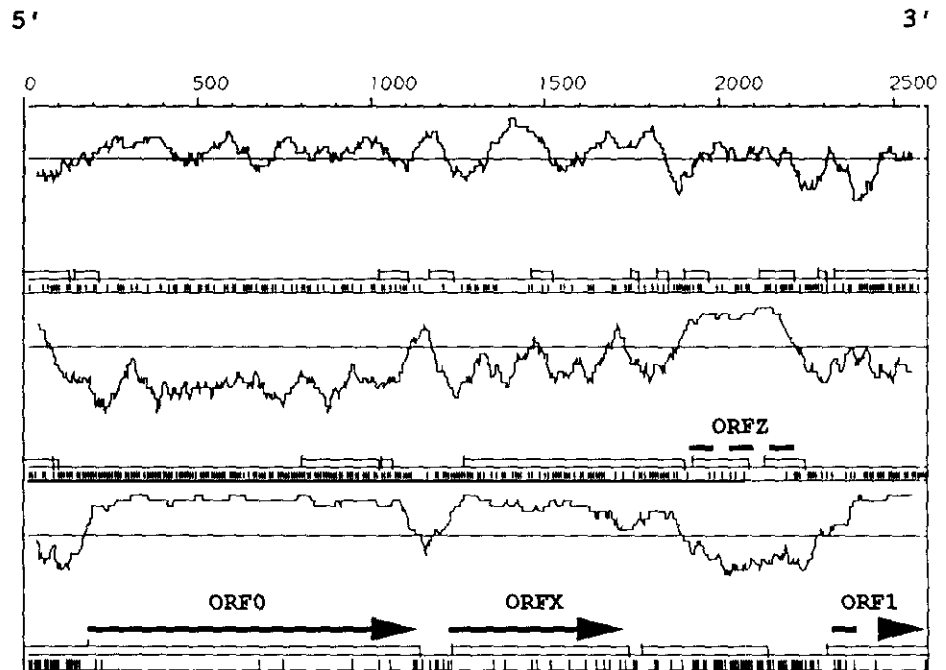
2461 AGGTCGACTTCGACGCGGCGGCGGAGGGCTTCGGCCCGCGGAGATCCGCCGCATGGACC 2520  
V D F D A A A E G F G P R E I R R M D R

2521 GGGCCACGCAGTTCGCGGTGGCCTGCACCCGCGAGGCGGTCGCGGACAGCGGGCTGGACC 2580  
A T Q F A V A C T R E A V A D S G L D L

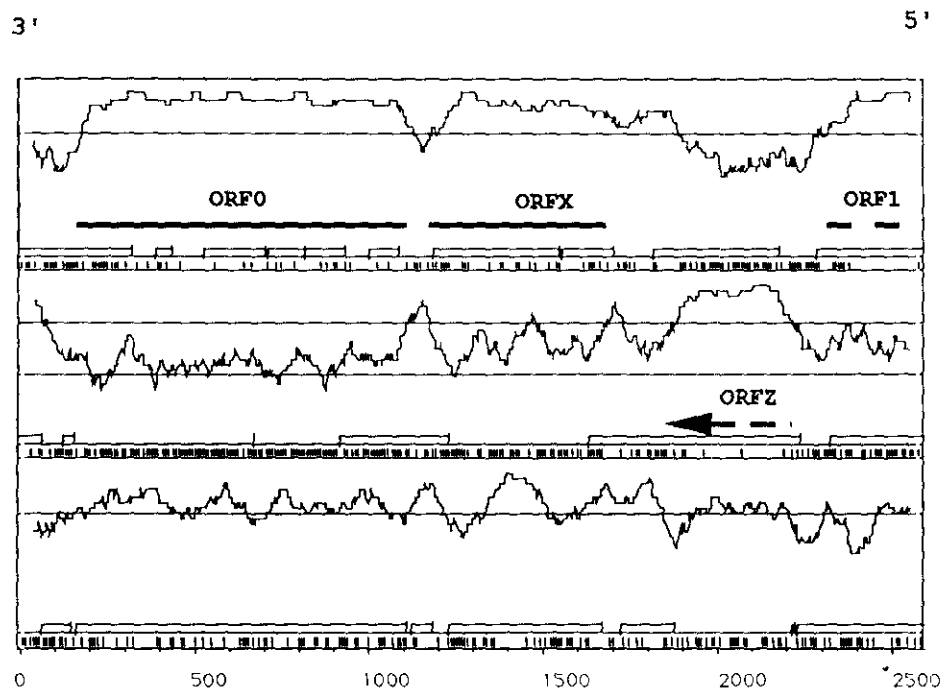
.BamHI  
2581 TGTCCGCGCTGGATCC 2596  
S A L D

Figura 31.- Análisis de la secuencia de la zona que precede a la ORF1 en *S. antibioticus*

Análisis directo



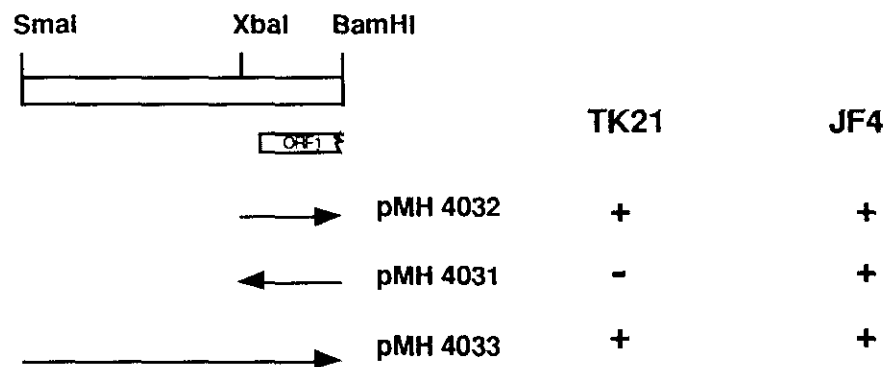
Análisis reverso



homologías de su producto génico con otros presentes en el banco de datos. Asimismo, parece que la dirección de transcripción sería divergente a la dirección de transcripción de la ORF1.

Un estudio preliminar a nivel de secuencias promotoras reveló la existencia de una actividad promotora divergente en la región inmediatamente anterior a la ORF1 (Figura 32). Se clonaron unos fragmentos solapantes de 370bp (*XbaI*-*BamHI*) y 900bp (*SmaI*-*BamHI*) que contenían el presunto inicio de la proteína correspondiente al gen ORF1, dentro del plásmido pIJ4083 (pMH4031, pMH4032 y pMH4033). La determinación de la actividad promotora se detectó por la aparición de un pigmento amarillo (semialdehído hidroximucónico) producto de la reacción de la catecoldeoxigenasa cuando se le añade a la placa donde han crecido los transformantes, una solución 0,5M de catecol.

**Figura 32.- Análisis de secuencias promotoras**



La existencia de una actividad promotora divergente en la región inmediatamente anterior a la ORF1, apoya la hipótesis de que en esta zona pudiera existir otro gen que se transcribiría en dirección contraria a la ORF1.

Para determinar la posible función de la proteína deducida de la ORF0 se hizo un rastreo en el banco de datos, mediante el programa FASTA (incluido en el paquete de programas GCG, ver Materiales y Métodos apartado 18). De esta manera, se encontró que la proteína deducida de la ORF0 tiene una alta homología (50%) con proteínas activadoras de la transcripción pertenecientes a la familia LysR. Esta familia agrupa una serie de proteínas que intervienen en procesos muy



diversos. Todas ellas activan la transcripción, uniéndose a determinadas secuencias del DNA con el fin de activar la expresión de otros genes relacionados. Dentro de este grupo de proteínas caben destacar las deducidas de los genes *nahR* que regula genes del catabolismo de compuestos fenólicos en *Pseudomonas pútida*; *LeuO*, que activa el operón de leucina en *E.coli*; *NodD*, que activa la expresión de los genes de nodulación en *Rhizobium*, etc.

La máxima homología que presenta la proteína deducida de la ORF0 con las proteínas incluidas en la familia *LysR*, es a nivel de las proteínas reguladoras de los procesos de nodulación de *Rhizobium*, como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11.- Homología del producto génico deducido de la ORF0 con proteínas correspondientes a la familia *LysR*

	<u>homología</u>	
	<u>toda la proteína    Extremo N-terminal</u>	
NodD <i>Bradyrhizobium</i> <sup>a</sup>	56	78
NodD <sub>2</sub> <i>R.melliloti</i> <sup>b</sup>	54	78
NodD <i>R.trifolii</i> <sup>c</sup>	54	76
NodD <sub>2</sub> <i>Br.japonicum</i> <sup>d</sup>	54	74
LeuO <i>E.coli</i> <sup>e</sup>	56	76
NahR <i>P.pútida</i> <sup>f</sup>	46	68
SymR <i>R.melliloti</i> <sup>g</sup>	51	74

a) Scott K.F.,1986

b) Honma y col.,1990

c) Schofield and Watson,1988

d) Applebaum y col.,1988

e) Haughn y col.,1986

f) You y col.,1988

g) Barnett y Long,1990

La homología entre las distintas proteínas activadoras clasificadas en este grupo, se localiza fundamentalmente en el extremo

amino terminal, siendo menor a lo largo del resto de la molécula. En el caso de la proteína correspondiente a la ORF0 se observa un fenómeno parecido, de forma que, la homología con las proteínas del grupo LysR es del orden de un 20% mayor en el extremo N-terminal, que cuando se compara toda la proteína, (Tabla 11). Se ha descrito que en este extremo existe un dominio característico de proteínas de unión a DNA (Henikoff y col.,1988). Este dominio se caracteriza por mantener una estructura secundaria que consiste en un plegamiento hélice-giro-hélice localizado generalmente a una distancia de aproximadamente 20 aminoácidos del inicio de la proteína. Un análisis detallado del extremo N-terminal, reveló una alta identidad en algunos aminoácidos, identificando una secuencia semejante a la descrita como consenso en distintas proteínas de unión a DNA (Figura 33).

**Figura 33.- Alineamiento del extremo N-terminal de distintos componentes de la familia de proteínas activadoras LysR.**

```

ORF0                1 VNLTRLDLNLLVVALRALLEERNVTRAGORVGLSOPAMSAALARLRRHFDD 50
NodD Bradyrhizobium 1 MRFKGLDLNLLVALDALMTERNLTAAARKINLSOPAMSAALRLRSYFRD 50
NodD2 R.melliloti   1 MRFRGLDLNLLVALDALMTERKLTAAARRVKLSOPAMSAALRLRITYFGD 50
NodD R.trifolii    1 MRFKGLDLNLLVALDALMTERKLTAAARSINLSOPAMSAALGRLRAYFND 50
NodD2 Br.japonicum 1 MRFKGLDLNLLVALDALMTKRSVTAARSINLSOPAMSAALRLRITYFGD 50
LeuO E.coli        17 PQLRMVDLNLTVTDFAVMQEQNITRAAHVLGMSOPAVSNAVARLKVMFND 66
NahR Ps.pútida     1 MELRDLNLLVVFNQLLVDRRVSITAENLGLTOPAVSNALKRLRTSLQD 50
SymR R. melliloti  27 PNLASIDLNLLVDLEALLQYRHITOOAHOVGRSOPAMSRALSRLRGLKD 76

```

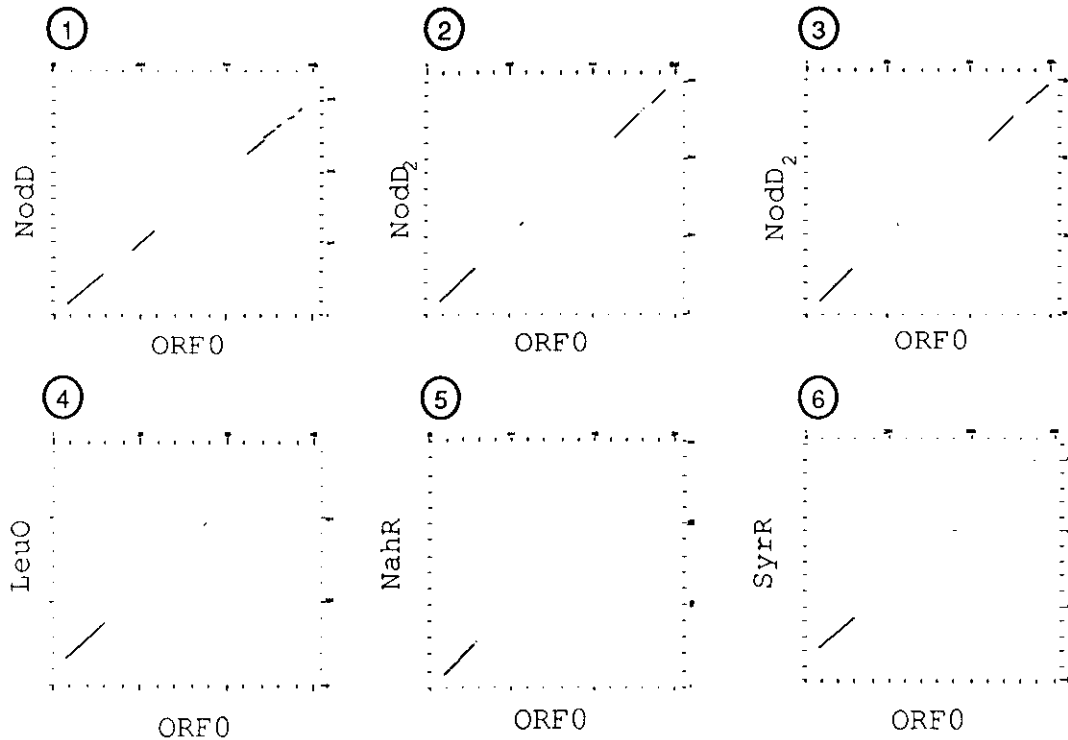
\*\*\*\*\*

hélice giro hélice

Las referencias son las mismas de la Tabla 11.

Cuando se realizaron los distintos alineamientos entre el péptido correspondiente a la ORF0 y algunas proteínas reguladoras de la familia LysR, se observó que la homología se localizaba fundamentalmente en el extremo N-terminal (Figura 34), encontrándose en el caso de la comparación con los productos génicos de *nodD* que también existe una alta homología en el extremo C-terminal.

Figura 34.- Alineamientos entre el producto génico deducido de la ORF0 y proteínas pertenecientes a la familia LysR.

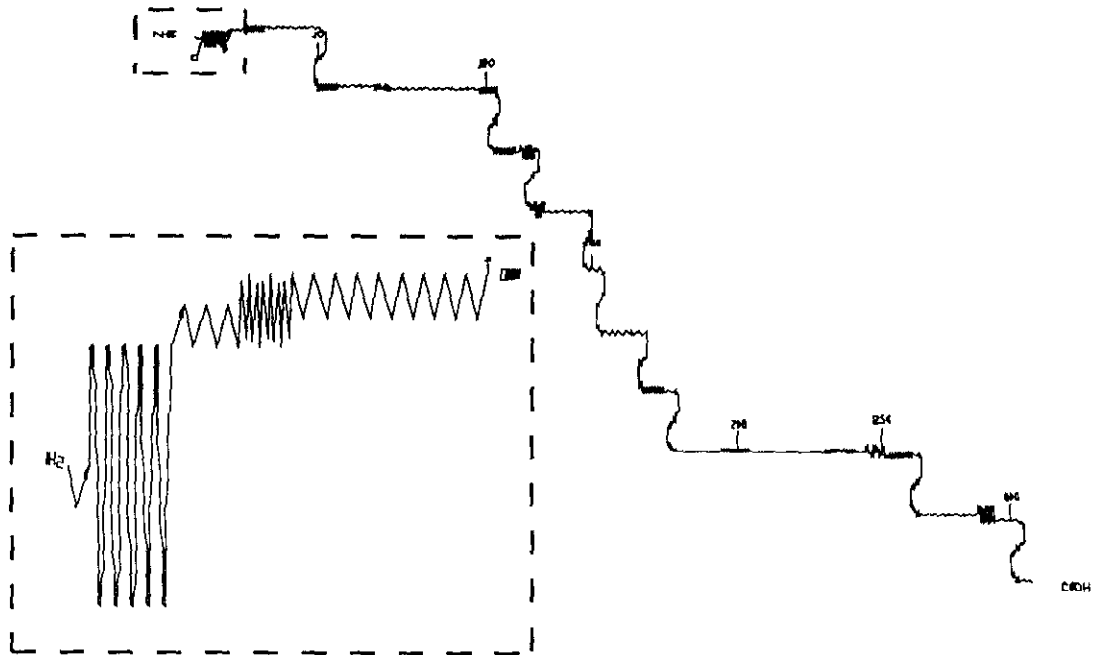


- |                               |                        |
|-------------------------------|------------------------|
| 1.- <i>Bradyrhizobium</i> sp. | 4.- <i>E.coli</i>      |
| 2.- <i>R.melliloti</i>        | 5.- <i>P.putida</i>    |
| 3.- <i>Br. japonicum</i>      | 6.- <i>R.melliloti</i> |

Las condiciones en las que se obtuvieron estos alineamientos son las descritas en Materiales y Métodos apartado 18.

Un análisis matemático del extremo N-terminal (Dodd y Egan, 1990), demostró la existencia de una estructura secundaria de hélice-giro-hélice. Posteriormente utilizando el programa PEPTIDESTRUCTURE, se ratificaron los datos de que en el extremo N-terminal existía un plegamiento característico de hélice-giro-hélice (Figura 35).

Figura 35.- Estructura secundaria de la proteína deducida para la ORF0



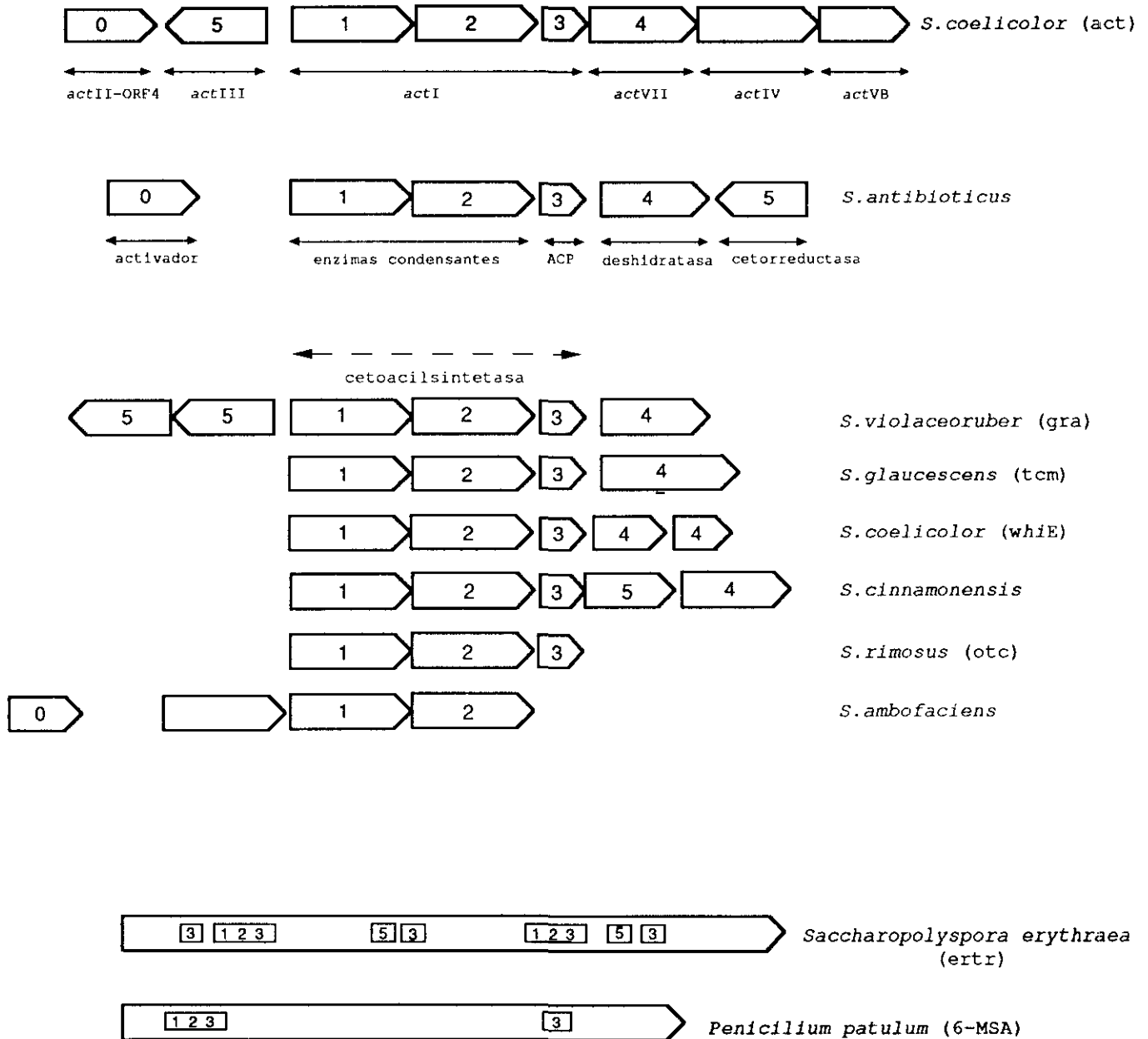
DISCUSSION

La disponibilidad "in vitro" de genes que codifican distintas poliquétido sintetetasas, ha permitido incrementar en los últimos años el conocimiento de sistemas implicados en rutas de biosíntesis de poliquétidos de diversos orígenes. El alto grado de homología de algunos de los genes implicados en la biosíntesis de poliquétidos en distintas especies de *Streptomyces* (Malpartida y col.,1987), ha sido una herramienta muy útil para clonar genes implicados en la biosíntesis de algunos antibióticos, especialmente cuando no se dispone de mutantes específicos ó de un sistema de transformación eficiente. Tal fué el caso de granaticina (Sherman y col.,1989), daunorrubicina y doxorubicina (Stutzman y col.,1989). En la actualidad se han aislado numerosos agrupamientos genéticos que codifican poliquétido sintetetasas en distintas especies de *Streptomyces*. Un análisis comparativo ha podido determinar que su organización génica está muy conservada, sobre todo en la disposición de las tres primeras fases de lectura abiertas (ORF's) (Figura 36) (Hopwood y Sherman, 1990).

En *S. antibioticus*, productor de oleandomicina (poliquétido del grupo de los macrólidos) y actinomicina D, existen al menos tres fragmentos cromosómicos *Bam*HI (cuyos tamaños son 1,8kb, 5kb y 8kb; Malpartida y col.,1987) homólogos al gen *actI* (detectados mediante un "Southern blot"). Mediante hibridación "in situ" de una genoteca construída en el colifago EMBL4, hemos aislado y caracterizado una de las regiones homólogas a la poliquétido sintetasa de *S. coelicolor* (*actI*).

De los cuatro clones aislados (*ant1*, *ant2*, *ant3* y *ant4*), mediante hibridaciones cruzadas (Figura 9), determinamos que *ant1*, *ant3* y *ant4* contenían fragmentos solapantes, procedentes de una misma región cromosómica de unas 30Kb. *ant2* contiene un fragmento *Bam*HI de 8kb (también homólogo al gen *actI*, aunque en menor grado) y se localiza en otra zona diferente del cromosoma. Hemos centrado nuestro interés en la región representada por *ant1*, *ant3* y *ant4*, por ser la de mayor homología con la poliquétido sintetasa de *S. coelicolor*; *ant2*, por los datos obtenidos de experimentos de Southern, podría contener genes más semejantes con otros equivalentes al gen *actI*, como el gen *whiE* (implicado en esporulación) (Davis y Chater,1990).

Figura 36.- Organización génica de distintas poliquétido sintetetasas



El locus *actI*, implicado en los primeros pasos de la ruta de biosíntesis de actinorrodina, está constituido por 3 ORF's (*actIORF1*, 2 y 3). En todas las poliquétido sintetetasas analizadas hasta el momento se ha encontrado una organización genética similar a nivel de estas 3 ORF's. Sin embargo, en otros sistemas homólogos como las ácido graso sintetetasas, únicamente se han detectado genes homólogos a *actIORF1* y *actIORF3*. Por tanto, la presencia de un gen homólogo al gen *actIORF2*, podría ser una característica más específica para las poliquétido sintetetasas, al menos las pertenecientes al TipoII.

Mediante una hibridación selectiva de los distintos clones aislados frente a las sondas pAM1801 (*actIORF1*) y pAM1802 (*actIORF2*), se observó que la zona de 30kb que contiene al clon *ant1* era homóloga a las dos sondas utilizadas, mientras que el clon *ant2* únicamente presentaba homología con el plásmido pAM1801 (*actIORF1*). Esto podría indicar que el clon *ant2* contiene genes implicados en la biosíntesis de un compuesto estructuralmente más alejado del antibiótico poliquétido actinorrodina. También podría ser que estos genes contenidos en el clon *ant2*, formaran parte de una poliquétido sintetetasa más compleja, de tipo modular, en la que algún módulo no presentara la organización génica descrita como consenso en las poliquétido sintetetasas, como de hecho ocurre en la sintetetasa de eritromicina (Donadio y col.,1991). Las expectativas son, por tanto, que los genes de la región seleccionada de *S.antibioticus* (contenidos en *ant1*, *ant3* y *ant4*), estarían relacionados con la síntesis de poliquétidos derivados del acetato más afín al sistema de actinorrodina, y susceptible, por tanto, de manipulación heteróloga.

Un análisis de la secuencia de la zona, aislada en *S.antibioticus*, homóloga a los genes tempranos de la actinorrodina sintetetasa (gen de *actI*), nos permitió deducir la existencia de cinco ORF's agrupadas. Mediante ordenador, determinamos que las cuatro primeras ORF's (ORF1-4) se transcriben en la misma dirección, mientras que la ORF5 se transcribe en dirección contraria (Figura 13). Estos datos permiten establecer la existencia de varios RNAs mensajeros uno de los cuales sería un mRNA policistrónico que se transcribiría desde la ORF1 hasta la ORF4, mientras que existiría otro cuya dirección de transcripción



sería contraria y que al menos comprendería la ORF5. Esta organización genética se asemeja a la que presentan otras poliquétido sintetetasas, confirmando la conservación estructural en la organización de las poliquétido sintetetasas.

Una vez conocida la disposición de los distintos genes aislados de *S. antibioticus*, determinamos los productos génicos más probables utilizando como criterios:

1) el contenido de G y C en tercera posición de los posibles codones obtenidos en cada posible fase de lectura;

2) la distribución de la frecuencia del uso de codones en relación a una tabla construida en base a 64 genes secuenciados de *Streptomyces* (Bibb y col., datos sin publicar) y

3) la presencia de una zona rica en purinas antes del codón de iniciación que puede actuar como un potencial sitio de unión del ribosoma para iniciar la traducción (Hopwood y col., 1986).

Mediante una comparación de los productos génicos obtenidos con sus equivalentes en otros sistemas homólogos, pudimos deducir sus presuntas funciones.

Tanto el péptido correspondiente a la ORF1 como a la ORF2, presentan una alta homología con distintas ceto-acil-sintetasas (Tablas 4 y 5). La homología del péptido ORF2 con el péptido ORF1 (50%), así como el acoplamiento traduccional que presentan, hace pensar en la existencia de un heterodímero con una función ceto-acil-sintetasa. Sobre la proteína correspondiente a la ORF1, se produciría el anclaje de las distintas unidades a condensar, ya que es la que mantiene el residuo de cisteína, a cuyo grupo SH se unen los residuos acilos. La ausencia del centro activo característico de las ceto-acil-sintetasas en la ORF2, hace pensar que la proteína correspondiente a la ORF2, podría intervenir de alguna otra forma, desconocida hasta el momento, en el proceso de condensación de los distintos residuos acilos.

El producto génico de la ORF3 es una proteína de pequeño tamaño y que consta de 86 aminoácidos. Presenta una homología muy fuerte con las proteínas transportadoras de residuos acilos, ACP (Tabla 6). Se pone de manifiesto que existe una ACP específica para la biosíntesis de poliquétidos, dado que la homología, y en algunos casos la identidad, a nivel de los centros activos es un 20% mayor con las proteínas homólogas de las poliquétido sintetetas (bien sean TipoII ó TipoI) que con las proteínas correspondientes de las AGS.

Parece, por tanto, que la poliquétido sintetasa codificada por los genes aislados en *S. antibioticus* interviene en un proceso mediado por una ACP, a diferencia de la chalcona sintetasa de *Petroselinum hortense* (Schüz y col.,1983).

Se ha visto que un cambio de ACP dentro de la AGS de *E. coli*, puede originar defectos en las deshidrataciones que ocurren entre las diferentes condensaciones (Overath y col.,1964; Simoni y col.,1967). Este hecho, junto con la existencia de una ACP específica para la biosíntesis de poliquétidos, hace pensar que la ACP además de servir de soporte para la cadena policetónica en formación, pueda "dirigir", en cierto modo, algunas reacciones posteriores (Hopwood y Sherman, 1990).

Estas tres primeras proteínas (las deducidas de los genes ORF1,2 y 3) formarían, por tanto, una posible unidad de condensación, dando lugar a un complejo multienzimático que catalizaría las reacciones de condensación.

La ORF4 codifica un péptido que se asemeja sobre todo a sus homólogos en los sistemas de biosíntesis de actinorrodina y granaticina y en menor grado a tetracenomicina (Figura 19 y Tabla 7). Por ello, parece que podría tener una función ciclasa/deshidratasa al igual que en el caso de las sintetetas de granaticina y actinorrodina (Sherman y col.,1989; Sherman y col.,1991), en lugar de ser una proteína con una actividad ciclasa/o-metiltransferasa, como ocurre en el caso de la proteína deducida del gen *tcmORF4*.

No se ha encontrado ningún gen homólogo a la ORF4 en las distintas ácido graso sintetetasas estudiadas. Este hecho, es consecuente con la especificidad del producto ORF4 para la ruta de poliquétidos, sin contrapartida en las ácido graso sintetetasas, a la vez que nos sugiere una estructura química para el producto final de la ruta muy afín a actinorrodina y granaticina (poliquétidos derivados del acetato).

La proteína deducida de la secuencia de la ORF5 se asemeja a la proteína correspondiente al gen *actIII* y a las proteínas deducidas de la secuencia de los genes *graORF5* y *graORF6* que intervienen en la biosíntesis de granaticina (Figura 20), pero no tiene equivalente en los genes implicados en la síntesis de tetracenomicina. Dado que el producto del gen *actIII* interviene en la reducción específica del grupo ceto del carbono 9 (Hallam y col.,1988; Bartel y col.,1990), hace pensar que el producto génico deducido de la ORF5 catalice un proceso de cetorreducción similar al que tiene lugar en la síntesis de actinorrodina y granaticina, pero no en la síntesis de tetracenomicina.

La estructura deducida del análisis de secuencia de los genes aislados, confirma una estructura de poliquétido sintetasa TipoII, formada por un complejo multienzimático, más que un polipéptido multifuncional (TipoI) como sería la poliquétido sintetasa de eritromicina. La naturaleza del producto final de la ruta catalizada por la poliquétido sintetasa objetivo de este trabajo, nos es por el momento desconocida.

La deducción de las presuntas funciones, basado en los grado de homología de los péptidos correspondientes a los genes aislados en *S.antibioticus* con sus equivalentes en otros sistemas, nos permite especular, con una base sólida, sobre la estructura del poliquétido: la poliquétido sintetasa de *S.antibioticus* analizada en este trabajo, podría sintetizar un poliquétido derivado del metabolismo del acetato, de estructura cíclica del tipo de isocromanoquinonas, como actinorrodina y granaticina.

Se conoce que la reducción específica en el carbono 9, catalizada por la proteína deducida del gen *actIII*, condiciona en cierta manera,

la reacción de ciclación posterior catalizada por el producto génico correspondiente al gen *actVII* (Bartel y col.,1990). Dado que en la poliquétido sintetasa de *S.antibioticus* existen genes homólogos tanto al gen *actIII* como al gen *actVII* (ORF5 y ORF4 respectivamente) (Tablas 8 y 7), parece lógico pensar que las proteínas deducidas de la ORF4 y ORF5 catalicen reacciones igualmente específicas. Ello dará lugar a un poliquétido con un grado de reducción similar a actinorrodina y granaticina.

La homología con la granaticina sintetasa es un 10% mayor que con la actinorrodina sintetasa (Tablas 4,6,7 y 8). Las proteínas deducidas de la ORF3 y ORF4, no están traduccionalmente acopladas al igual que en la granaticina sintetasa (Figura 12), mientras que en la actinorrodina sintetasa sí, sugiriendo una ruta biosintética más parecida a la biosíntesis de granaticina que a la de actinorrodina. La ausencia de un gen homólogo al gen *actV<sub>D</sub>* (gen implicado en la dimerización de la molécula de actinorrodina) en la región aislada de *S.antibioticus*, sugiere que la estructura del poliquétido fuera un monómero al igual que granaticina, en vez de un dímero, como ocurre en la molécula de actinorrodina. Todos estos datos sugieren que el poliquétido sintetizado por la poliquétido sintetasa de *S.antibioticus*, objetivo de este trabajo, bien pudiera tener una estructura química más próxima a granaticina que a actinorrodina.

Otros estudios moleculares han localizado fragmentos de DNA de *S.antibioticus* homólogos al gen *actI*, y en los que se localizan genes implicados en la resistencia a oleandomicina (Carmen Vilches, tesis doctoral). La existencia de genes de resistencia adyacentes a los genes biosintéticos es un hecho muy generalizado en *Streptomyces* (Cundliffe,1989). Estos fragmentos de DNA de *S.antibioticus* con resistencia a oleandomicina y homólogos al gen *actI*, no presentan homología con los fragmentos aislados en este trabajo (resultados no mostrados). Los datos obtenidos permiten concluir que el sistema enzimático analizado en *S.antibioticus*, se asemeja más a una sintetasa de un poliquétido derivado de acetatos como granaticina, que a un poliquétido macrólido del tipo de oleandomicina. Dado que la actinomicina D no es un poliquétido, parece lógico pensar que el compuesto sintetizado por los genes aislados en *S.antibioticus*, no sea

actinomicina D. Un análisis comparativo entre los genes de *S. antibioticus* aislados y el gen *whiE* demuestra que se trata de poliquétido sintetetasas diferentes (Figura 36). Todo ello lleva a sugerir que los fragmentos analizados pudieran estar implicados en la biosíntesis de un poliquétido no descrito en *S. antibioticus*.

Tras el análisis molecular de la nueva poliquétido sintetasa de *S. antibioticus* era necesario un análisis genético. No disponíamos de mutantes de *S. antibioticus*, así como tampoco teníamos un sistema de transformación/transfección eficaz en este microorganismo. La gran homología existente entre los genes aislados en *S. antibioticus* y los genes *act* de *S. coelicolor* y la disponibilidad en el laboratorio de mutantes *act* de *S. coelicolor*, permitieron un análisis genético mediante complementación heteróloga de *S. coelicolor* con DNA de *S. antibioticus*. De esta manera, se ratificaron los datos deducidos del análisis de secuencia, localizándose el gen homólogo al gen *actIII* y los homólogos a los genes *actI* y *actVII* (Figura 26).

Cuando se transformó la cepa de *S. coelicolor* TK17 (mutante *actI*) con un plásmido multicopia, *pmH481* (Figura 24), que contiene todas las ORF's correspondientes al locus *actI* no se obtuvo complementación, mientras que con otros plásmidos de bajo número de copias, como *pmH4* y *pmH9* (que contienen igualmente el gen *actI* completo), sí. Este fenómeno puede deberse a una titulación de una posible proteína activadora. Así, en plásmidos multicopias no se expresarían el resto de los genes *act* diferentes al operón presente en el plásmido, y por lo tanto bloquearía la producción de actinorrodina. Por otro lado, en plásmidos de bajo número de copias (*pmH4* y *pmH9*) existirían moléculas de activador suficientes para poder expresar el resto de los operones que forman el conjunto de los genes *act*. Aunque los datos son preliminares, sugieren la existencia de señales reguladoras en "trans" del genoma de *S. coelicolor* que podrían ser tituladas por alguna región del DNA de *S. antibioticus*. Si esto fuera así nos abre la posibilidad del análisis heterólogo de las secuencias capaces de reconocer reguladores específicos de la biosíntesis de antibióticos.

No hemos encontrado complementaciones a nivel de algunos genes de acción media y tardía como por ejemplo, *actIV* y *actVI*. Sin embargo, sí

hemos complementado el gen *actV<sub>a</sub>* aunque no se ha localizado por secuencia, ya que se encontraría en el extremo izquierdo de la zona secuenciada. Tampoco se ha logrado la complementación de mutaciones de genes reguladores del tipo *actII*. Queda incierto, por tanto, el que existan más genes homólogos a los genes tardíos de la actinorrodina sintetasa, ya que existe la posibilidad de que puedan estar presentes en la región clonada, pero no tener una homología suficiente como para complementar de forma heteróloga las mutaciones *act*.

En la mayoría de las poliquétido sintetetasas estudiadas, se ha detectado la existencia de genes reguladores adyacentes a los genes estructurales. La secuenciación de la región inmediatamente anterior a la ORF1 reveló la presencia de dos genes ORF0 y ORFX, cuya transcripción tiene lugar en la misma dirección que la ORF1 (Figura 31). El análisis comparativo del producto génico deducido de ORFX, con el fin de determinar su posible función, no permitió relacionarlo con ninguna función conocida. Sin embargo, se encontró que el producto génico correspondiente a la ORF0 está estructuralmente relacionado con proteínas activadoras de transcripción pertenecientes a la familia LysR. Este grupo está constituido por proteínas muy diversas que únicamente tienen en común su función como activadores de transcripción, manteniendo un típico dominio consenso de unión a DNA en el extremo amino terminal. La homología del presunto producto génico deducido de la ORF0, con otras proteínas de la familia LysR es de aproximadamente un 50%; esta homología no es uniforme a lo largo de toda la molécula siendo un 20% mayor en el extremo N-terminal que en el resto de la proteína (Tabla 11). La homología es altamente significativa con los distintos genes *nodD* y se distribuye en ambos extremos de la proteína (Figura 33). La proteína deducida de la ORF0, mantiene los aminoácidos conservados necesarios para originar un plegamiento de hélice-giro-hélice, estructura que presenta el dominio consenso de proteínas de unión a DNA (Figuras 34 y 35).

Sorprendentemente las homologías más fuertes se encontraron con los genes reguladores de procesos de nodulación, genes *nodD*, en diferentes especies de *Rhizobium*. Es conocido que los productos correspondientes a estos genes, interaccionan con los distintos agrupamientos de genes *nod* localizados en el genoma de *Rhizobium*

(Fisher y col.,1988). Uno de estos agrupamientos, *nodA*,B y C está implicado en el proceso de formación del nódulo, mientras que el agrupamiento de genes *nodE*,F y G interviene en la cantidad y frecuencia de los nódulos, así como en la especificidad por el organismo hospedador. Los productos de los genes *nodE*, *nodF* y *nodG* se han relacionado con una función ceto-acil-sintetasa, transporte de residuos acilos y cetereductasa respectivamente (Johnston, 1989). Ello conlleva a que exista homología entre algunos de los genes estructurales del proceso de nodulación y los aislados en este trabajo. Así la ORF1 y ORF2 se asemejan al gen *nodE* (60% y 47% respectivamente), la ORF3 es homóloga al gen *nodF* (47%) y la ORF5 es homóloga al gen *nodG* (60%).

Tanto la expresión del gen *nodD* como la de los demás genes reguladores de la familia LysR necesitan de la presencia de moléculas inductoras. Así los genes *nodD* son activados por flavonoides (Downie y Johnston,1986), el gen *ampR* por una  $\beta$ -lactamasa (Honore y col.,1986), el gen *nahR* por salicilato (Yen, K. M. y Gunsalus, 1985; You, I.-S. y Gunsalus, 1986), etc. La homología que presenta el gen ORF0 con los distintos genes de la familia LysR, hace pensar que su expresión necesite de la presencia de una molécula inductora (cuya naturaleza química podría ser un poliquétido) y que su función al igual que el gen *nodD* pudiera ser la de un activador transcripcional de un agrupamiento de genes.

La existencia de homología en los dos extremos de la proteína ORF0 con las proteínas deducidas de los genes *nodD*, a diferencia del resto de las proteínas que únicamente tienen homología en el extremo N-terminal, hace pensar que la naturaleza de la molécula inductora en ambos casos, pudiera ser muy parecida (Figura 33). Ello sugiere que el gen ORF0 necesitaría para su expresión una molécula de naturaleza poliquétida, ya que los flavonoides son poliquétidos.

Una característica de los activadores de la familia LysR es que generalmente se transcriben en sentido contrario a los genes estructurales que regulan (Henikoff,1988). El análisis de secuencia nos indica que existe una ORF adyacente al inicio de la ORF0 que podría tener una transcripción divergente (Figura 31). En esa región

hemos encontrado por complementación homólogos funcionales al gen *actVa*. Cabe, por tanto, la posibilidad de que el gen ORF0 pudiera regular la expresión de genes homólogos al gen *actVa* situados a su izquierda (Figura 31). En este contexto se plantean dos posibilidades:

a) el producto del gen ORF0 es un activador de transcripción para los genes de la poliquétido sintetasa aislada, cuya función sería equivalente a la del gen *actIIORF4* (M. Fernández-Moreno y col.,1991);

b) el producto del gen ORF0 es un activador de la transcripción de otros genes situados a la izquierda, en cuyo caso podría pensarse que un poliquétido generado por acción de otros productos génicos actuaría como inductor de ORF0, tal como ocurre con el *nodD* (Downie y Johnston,1986) ó *nahR* (Yen, K. M. y Gunsalus,1985; You, I-S. y Gunsalus,1986).

En cualquiera de los casos y si estos datos se confirman, existiría una vez más un presunto gen regulador (ORF0) dentro del agrupamiento de los genes de una poliquétido sintetasa distinto del gen *actIIORF4* (activador de la síntesis del poliquétido actinorrodina).

El análisis futuro del mecanismo de regulación de ORF0 abre una nueva perspectiva en la caracterización de la cascada de señales activadoras descritas en *Streptomyces* para determinar la síntesis de metabolitos secundarios. El gen ORF0 es diferente a los distintos genes activadores que hasta el momento se conocen en *Streptomyces* (*actIIORF4*, *afsR*, *dnrR*, *abaA*).

Serán necesarios estudios posteriores para poder determinar cuál es la diana ó dianas del producto del gen ORF0, así como determinar qué moléculas son necesarias para la activación de la transcripción del gen ORF0.

El interés por el conocimiento de la organización de distintas poliquétido sintetetas radica en la posibilidad de poder manipular los distintos genes con el fin de obtener nuevas sustancias. Hasta el momento, una de las maneras de obtener nuevas sustancias ha sido



mediante complementación heteróloga entre especies de *Streptomyces* productoras de sustancias muy semejantes (Hopwood y col., 1985b). En nuestro caso, la transformación heteróloga de *S.lividans* y de *S.coelicolor*, con DNA de *S.antibioticus*, originó en algún caso la producción de un nuevo pigmento no presente en las cepas parentales (Figura 27). Un análisis preliminar sobre su comportamiento químico reveló que era una sustancia diferente a actinorrodina pero con propiedades físico-químicas parecidas. El nuevo pigmento podría tener una estructura muy semejante a actinorrodina y podría ser el resultado de la formación de una posible ruta heteróloga en la que estarían implicados los genes *act* (presentes en *S.lividans* y *S.coelicolor*) y los genes implicados en la síntesis de otro poliquétido sintetizado en *S.antibioticus*. Sin embargo, los datos preliminares de complementación heteróloga realizados en este trabajo, apuntan hacia la posibilidad de que el nuevo pigmento sea el resultado de la expresión de unos genes "silentes" presentes en alguna de las cepa parentales, sin llegar a descartar totalmente la posibilidad de formación de una ruta heteróloga.

En todas las transformaciones heterólogas de *S.coelicolor* con el clon pMH9410 se ha observado que existe un elevado número de deleciones del extremo derecho de este clon. Existe igualmente una dificultad grande en el clonaje de este extremo derecho del clon pMH9410 tanto en *E.coli* como en *Streptomyces*. Estos hechos junto con el retraso del crecimiento de las células que contienen el plásmido entero, hacen pensar que los genes implicados en la síntesis del nuevo pigmento, se localizarían en la mitad derecha del clon pMH9410. Otro hecho que apoya esta hipótesis es que al transformar *S.lividans* con un clon conteniendo la banda *Bam*HI con parte de los genes identificados (extremo izquierdo del clon pMH9410), no se produce pigmento. Es necesario un estudio más exhaustivo de diferentes deleciones con el fin de determinar cuál es el fragmento de *S.antibioticus* responsable de la síntesis del nuevo pigmento.

El retraso en el crecimiento producido por el plásmido pMH9410 hace pensar en una posible actividad antibiótica. En este caso las células carecerían de un sistema óptimo de resistencia frente al nuevo antibiótico, lo que explicaría la dificultad de crecimiento y la

inestabilidad del plásmido completo, teniendo lugar una selección "in vivo" para deleccionar la zona donde presuntamente se localizan los genes implicados en la biosíntesis del nuevo compuesto. Sin embargo, no se ha detectado una actividad antibiótica frente a microorganismos sensibles como *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*, aunque esta falta de actividad antibiótica pudiera ser debida a que estos microorganismos sean relativamente resistentes a esta nueva sustancia y necesiten una cantidad mayor para que se inhiba su crecimiento.

Si la expresión de los genes implicados en la biosíntesis del nuevo pigmento está ó no regulada por un gen del tipo *actII*, es un aspecto importante a ser analizado en un futuro.

El estudio de una nueva poliquétido sintetasa de *S. antibioticus*, y dada su gran homología con el resto de sintetetasas de poliquétidos, sobre todo con las sintetetasas de granaticina y actinorrodina, abre la posibilidad de intercambio específico de algunos genes correspondientes a las fases tempranas en la biosíntesis de antibióticos con el objetivo de obtener nuevos fármacos mediante manipulación "in vitro". El sistema estudiado en este trabajo abre la posibilidad de detectar en *S. antibioticus* la formación de metabolitos secundarios no descritos hasta el momento, y analizar su posible regulación. La disponibilidad del sistema génico clonado, justifican los futuros esfuerzos para poner a punto un sistema de transformación en esta especie, con el fin de obtener mutantes de inserción y analizar la expresión de otras rutas de poliquétidos, como oleandomicina, en estos mutantes.

**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1.- Se ha localizado y aislado un agrupamiento de genes en *S. antibioticus*, que codifica una nueva poliquétido sintetasa semejante a las sintetasas de granaticina y actinorrodina.

2.- Esta nueva poliquétido sintetasa está constituida, al menos, por cinco productos génicos implicados en procesos de condensación y transporte de residuos acilos, ciclación, cetorreducción y deshidratación. Todos ellos forman un complejo multienzimático típico de las ácido graso sintetasas TipoII.

3.- Los genes aislados en *S. antibioticus* tienen una organización estructural muy semejante a la que presentan los genes que codifican algunas de las poliquétido sintetasas conocidas. Unicamente se diferencian en la disposición de la ORF5 (presunta actividad cetorreductasa).

4.- La estructura del presunto poliquétido sintetizado por los genes de *S. antibioticus* aislados en este trabajo, es diferente a oleandomicina (antibiótico mayoritario en *S. antibioticus*) y parece ser diferente al pigmento de las esporas, cuya síntesis está mediada por el gen *whiE*. El poliquétido especificado podría tener una estructura de quinona monomérica semejante a granaticina, dada la alta homología existente entre los genes tempranos de la granaticina sintetasa y los genes de *S. antibioticus* analizados (valor medio 80%).

5.- Dada la gran homología de los genes aislados en *S. antibioticus* con los genes tempranos correspondientes a la sintetasa de actinorrodina, es posible complementar de forma heteróloga, las mutaciones *act* de *S. coelicolor* con DNA procedente de *S. antibioticus*. Este hecho abre la posibilidad de la obtención de nuevos compuestos por la manipulación "in vitro" de los genes tempranos de las dos rutas biosintéticas homólogas.

6.- Se ha obtenido un nuevo pigmento como resultado de la transformación heteróloga de *S. lividans* y *S. coelicolor*, con un fragmento del genoma de *S. antibioticus* (pMH9410).

7.- Se ha identificado un gen (ORF0) cuyo producto presenta una gran homología con proteínas activadoras pertenecientes a la familia LysR. Es un activador diferente a los descritos hasta el momento (*actII*, *dnrR*, *redD*), asociados a genes de biosíntesis de antibióticos.

8.- La gran homología del activador, aislado en *S. antibioticus*, con los genes *nodD* implicados en la regulación de los procesos de nodulación, sugiere la existencia en *Streptomyces* de una molécula inductora, probablemente un poliquétido, con un mecanismo de acción similar a los genes *nod* de *Rhizobium*.

## BIBLIOGRAFIA

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

**Alabat,R. and R. González-Duarte** (1990) "Nucleotide sequence of ADH gene of *Drosophila lebanonensis*.".Nucleic Acids Res. 18:6706-6706.

**Amy, C. M., Witkowski, A., Naggert, J., Williams, B., Randhawa, Z. and S. Smith.** (1989). "Molecular cloning and sequencing of cDNAs encoding the entire rat fatty acid synthase". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 114-118.

**Anzai, H., Murakami, T., Imai, S., Satoh, A., Nagoaka, K. and C.J. Thompson** (1987). "Transcriptional regulation of bialaphos biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*." J. Bacteriol. 169 : 3482-3488.

**Applebaun, E.R., Thompson, D.V., Idler, K. y N. Chartrain** (1988). "*Rhizobium japonicum* VSDS 191 has two *nodD* genes that differ in primary structure and function" J. Bacteriol 170: 12-20.

**Baltz, R.H. and E.T. Seno** (1988). "Genetics of *Streptomyces fradie* and tylosin biosynthesis. Annu. Rev. Microbiol. 42: 547-574.

**Barnett, M.J. and S. R. Long** (1990). "DNA sequence and translational product of a new nodulation -regulatory locus: *symR* has sequence similarity to NodD proteins. J. Bacteriol. 172: 3695-3700.

**Bartel, P.L., Zung, C.H., Lampel, J.S., Dosch, D.C., Connors, N. C., Strohl W.R., Beale Jr. J.M. and H. Floss** (1990). "Biosynthesis of anthraquinones by interspecific cloning of actinorhodin biosynthesis genes in Streptomycetes: clarification of actinorhodin gene function" J. Bacteriol. 172: 4816-4826.

**Beck, J., Ripka, S., Siegner, A., Scültz, E. and E. Schweizer** (1990). "The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*: its gene structure relative to that of other polyketide synthases". Eur. J. Biochem. 192: 487-498.

**Beckmann, R.J., Cox, K. and E.T. Seno** (1989). "A cluster of tylosin biosynthetic genes is interrupted by a structurally unstable segment containing four repeated sequences. In: Genetics and Molecular Biology of Industrial Microorganisms. Washington DC: Am. Soc. Microbiol. pag 176-186.

**Bibb,M.J., Ward,J.M. and D.A. Hopwood** (1978)."Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* protoplast at high frequency". Nature 274: 398-400.

**Bibb,M.J., Biró,S., Motamedi,H., Collins,J.F. and C.R. Hutchinson** (1989). "Analysis of the nucleotide sequence of the *Streptomyces glaucescens tcmI* genes provide key information about the enzmology of poliketide antibiotic biosynthesis". The EMBO J. 8: 2727-2736.

**Birch, A. J** (1967). "Biosynthesis of polyketides and related compound. Science 156: 202-206.

**Birnboim,H.C.** (1983)."A rapid alkaline extraction method for tha isolation of plasmid DNA". Methods in Enzymol. 100: 243-255.

- Brown, M.G.M., Weston, A., Saunders, J.R. and G.O. Humphreys** (1979). "Transformation of *E. coli* C600 by plasmid DNA at different phases of growth". *FEMS Microbiol. lett.* 5 : 219-222.
- Buckel, P.** (1985). En informativos Boehringer Mannheim. España. Marzo. pag. 16.
- Bullock, W.O., Fernández, J.M. and J.M. Short** (1987). "XL1 blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection" *Biotechniques* 5 : 376.
- Burns, D.M. and I.R. Beacham** (1983). "A method for the ligation of DNA following isolation from low melting temperature agarose". *Anal. Biochem.* 135 : 48-51.
- Caballero, J.L., Malpartida, F. and D.A. Hopwood** (1991). "Transcriptional organization and regulation of an antibiotic export complex in the producing *Streptomyces* culture". *Mol. Gen. Genet.* 228: 372-380.
- Carere, A., Russi, S., Bignami, M. and G. Sermonti** (1973). "An operon for histidine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* " *Mol. Gen. Genet.* 123: 219-224.
- Cortés, J., Haydock, S.F., Robertes, G.A., Bevitt, D.J. and P.F. Leadlay** (1990). "An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Sacchalopolyspora erythraea*. *Nature* 348: 176-178.
- Cole, S.P., Rud, B.A., Hopwood, D.A., Chang, Ch-S and H.G. Floss** (1987). "Biosynthesis of the antibiotic actinorhodin. Analysis of blocked mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Antibiot.* 60:340-347.
- Cundliffe, E.** (1989) "How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:207-233.
- Champness, W., Riggle, P. and T. Adamidis** (1990). "Loci involved in regulation of antibiotics synthesis" *J. Cellular Biochemistry supplement* 14A, pag 88.
- Chater, K.F., Hopwood, D.A., Kieser, T. and C.J. Thompson** (1982). "Gene cloning in *Streptomyces*". *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 96: 69-95.
- Chater, K.F.**, (1984). "Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*" En *Microbial development*, eds. Losick, R. and Shapiro, L., pag 89-115. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Chater, K. F. and C.J. Bruton** (1985). "Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered". *The EMBO J.* 4: 1893-1895.
- Chater, K.F.** (1989<sub>a</sub>). "Sporulation in *Streptomyces*". In *Regulation of prokaryotic development*. Eds. Smith, I., Slepecky, R. and Setlow, P. Am. Soc. for Microbiology.
- Chater, K.F.** (1989<sub>b</sub>). "Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation" *Trends in genetics* 5: 372-377.
- Covarrubias, L. and F. Bolivar** (1982). "Construction and characterization of new cloning vehicles. VI. Plasmid pBR329, a new derivative of pBR328 lacking the 482-base-pair inverted duplication. *Gene* 17: 79-89.



- Davis, M.K. and K.F. Chater** (1990). "Spore colour in *S. coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to poliketide antibiotics. *Mol Microbiol.* 4: 1679-1691.
- Deveraux, J., Haeberli, P. and O. Smithies** (1984). "A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX". *Nucl. Acid. Res.* 12: 387-395.
- Distler, J., Ebert, A., Mansouri, K., Pissowotzki, K., Stockmann, M. and W. Piepersberg**, (1987). "Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity". *Nucleic Acids Res.* 15: 8041-8056.
- Dodd, B.I., and B. J. Egan** (1990). "Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences". *Nucl. Acid. Res.* 18: 5019-5026.
- Donadio, S., Stauer, M.J., McAlpine, J.B., Swanson, S.J. and L. Katz** (1991). "Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis". *Science* 252: 675-679.
- Downie, J.A. and A.W.B. Johnston** (1986). "Nodulation of legumes by *Rhizobium*: The recognized roots. *Cell* 47: 153-154.
- Epk, J.K., Huber, M.L.B., Turner, J.R. and B.E. Schoner** (1988). "Molecular cloning and expression of carbomycin biosynthetic and resistance genes from *Streptomyces thermotolerans*". En *Biology of actinomycetes* (ed. Y. Okami, T. Beppu y H. Ogawava), pag. 82-85. Tokyo : Japan Scientific Society Press.
- Feitelson, J.S., Hopwood, D.A.** (1983). "Cloning a *Streptomyces* gene for an O-methyltransferase involved in antibiotic biosynthesis". *Mol. Gen. Genet.* 190: 394-398.
- Feitelson, J.S., Malpartida, F. and D.A. Hopwood** (1985). "Genetic and biochemical characterization of the *red* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A(3)2". *J. Gen. Microbiol.* 131: 2431-2441.
- Fernández-Moreno, M. A.** (1990). "Síntesis y regulación de la expresión del antibiótico poliquético actinorrodina en *S. coelicolor* A3(2)". Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Biología Molecular.
- Fernández-Moreno, M. A., Caballero, J. L., Hopwood, D. A. and F. Malpartida** (1991). "The *act* gene cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* 66: 769-780.
- Fischer, R.F., Egelhoff, T.T., Mulligan J.T., and S.R. Long** (1988). "Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing *nodD* to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes". *Genes & development* 2: 282-293
- Freeze, E.** (1982). "Initiation of bacterial sporulation", pag 1-12 In: H. S. Levison, A.L., Sonenshein and DJ Tipper (eds), *Sporulation and germination*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Frischauf, A.M., Lehrach, H., Poustka, A.M. and N. Murray** (1983). "Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences". *J. Mol. Biol.* 170: 827-842.

**Gallo, M. and E. Katz** (1972). "Regulation of secondary metabolite biosynthesis catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose" *J. Bacteriol* 109: 659-667

**Gorman, M., Chamberlin, J. W. and R.L. Hamill** (1968). "Monensin, a new biologically active compound. V. Compounds related to monensin. Antimicrob. Agents Chemoter. 1967: 363-368.

**Hale, R.S. and P.F. Leadly** (1985). *Biochimie* 67: 835-839.

**Hale, R.S., Jordan, K.N, and P.F. Leadly** (1987). "A small, discrete acyl carrier protein is involved in the novo fatty acid biosynthesis in *Streptomyces erithraeus*" *FEBS lett* 224: 133-136.

**Hallam, S.E., Malpartida, F., and D.A. Hopwood**, (1988). "DNA sequence, transcription and deduced function of a gene involved in poliketide antibiotic synthesis in *Streptomyces coelicolor*". *Gene* 74: 305-320.

**Haughn, G.W., Wessler, S.R., Gemmill, R. M. and J.M. Calvo**, (1986). " High A+T content conserved in DNA sequences upstream of *leuABCD* in *E.coli* and *S.yphimurium*" *J. Bacteriol.* 166: 1113-1117.

**Henikoff, S.**, (1984). "Unidirectional digestion with ExoIII creates targeted breakpoints for DNA sequencing". *Gene* 28: 351-359.

**Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo J.M. and J.C. Wallace**, (1988). " A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6602-6606.

**Honma, M.A., Asomaning, M. and F. M. Ausubel**, (1990). " *Rhizobium melliloti nodD* genes mediate host-specific activation of *nodABC*". *J. Bacteriol.* 172: 901-911.

**Hopwood, D.A.** (1967). "Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*". *Bact.Rev.* 31: 373-403.

**Hopwood, D.A., Kieser, T., Wright, H.M. and M.J. Bibb**, (1983). "Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66". *J. Gen. Microbiol.* 129: 2257-2269.

**Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. and H. Schrempf**, (1985<sub>a</sub>). "Genetic Manipulation of *Streptomyces* . A Laboratory Manual. Norwich, John Innes Foundation.

**Hopwood, D.A., Malpartida, F., Kieser, H.M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B.A.M., Floss, H.G. and S. Omura**, (1985<sub>b</sub>). "Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering" *Nature* 314 : 642-644.

**Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Jansen, G.R., Malpartida, F. and C.P. Smith**, (1986). "Regulation of gene expression in antibiotic-producing *Streptomyces*". In *Regulation of Gene Expression*. Booth, I. and Higgins, C. (eds.), Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press.

**Hopwood, D.A.**, (1988). "Understanding the genetic control of antibiotic biosynthesis and sporulation in *Streptomyces*. En *Biology of actinomycetes* '88. Japan Scientific Societies Press.

- Hopwood, D.A.** (1989). "Antibiotics: opportunities for genetic manipulation" *Phil. Trans. R. Soc. London* 324: 549-562.
- Hopwood, D.A. and D.H. Sherman**, (1990). Molecular genetics of poliketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Ann. Rev. Genet.* 24: 37-66.
- Hopwood, D.A., and T. Kieser**, (1990). "The bacterial chromosome" Darl Drlica and M. Riley (Ed). American Society for Microbiology. Washintong, D.C.
- Ikeda, H., Kotaki, H and S. Omura**, (1987). "Genetic studies of avermectin biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *J. Bacteriol.* 169: 5615-5621.
- Ishida, I., Obirrata, M. and T. Deguchi**, (1987). "Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding hydroxyindole O-methyltransferase of bovine pineal glands. *J. Biol. Chem.* 262:2895-2899.
- Jany K.-D., Ulmer, W., Fröschle, M. and G. Pleiderer**. (1984). "Complete aminoacid sequence of glucose dehydrogenase from *B. megaterium*" *FEBS lett.* 165: 6-10.
- Johnston, A.W.B.** (1989). "The symbiosis between Rhizobium and legumes. In: Genetics of Bacterial Diversity, Ed. D. A. Hopwood, K. F. Chater, pag 393-414. London Academy Press.
- Jones, G.H. and D.A. Hopwood**, (1984). "Activation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces lividans* by cloned DNA sequences from *Streptomyces antibioticus*". *J. Biol. Chem.* 259: 14158-14164.
- Jörnwall, H., Bahr-Lindström, H., Jany, K.-D., Ulmer, W. and M. Fröschle**, (1984). "Extended superfamily of short alcohol-polyol-sugar dehydrogenases: structural similarities between glucose and ribitol dehydrogenases. *FEBS lett.* 165: 190-196.
- Juan, E., Papaceit, M. and A. Quintana** (1990). "Nucleotide sequence of the ADH gene of *Drosophila lebanonensis*" *Nucl. Acid Res.* 18: 6420-6420.
- Katz, E., Thompson, C.J. and D.A. Hopwood**, (1983). "Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2703-2714.
- Kauppinen, S. Siggaard-Anderson, M. and P. von Wettstein-Knowles**, (1988). *Carlsbeg Res. Commun.*, 53: 357-370.
- Kondo, S., Yasui, K., Natsume, M., Katayama, M. and S. Maurmo**, (1988). "Isolation, physico-chemical properties and biological activity of pamamyccen-607, an aerial mycelium inducing substance from *S. alboringer*" *J. Antibiot.* 41: 1196-1204.
- Kuo, T.M. and J.B. Ohlrogge**, (1984). "The primary structure of spinach acyl carrier protein" *Archiv. Biochem. Biophys.* 234: 290-296.
- Lacalle, R.A., Tercero, J.A. and A. Jiménez**, (1992). "Cloning of the complete biosynthetic gene cluster for an aminonucleoside antibiotic, puromycin, and its regulated expression in heterologous hosts". *The EMBO J.* 11: 785-792.
- Leskiw, B.V., Lawlor, E.J., Fernández-Abalos, J.M., and K.F. Chater**, (1991). "TTA codons in some genes prevent their expression in a class of

developmental antibiotic-negative, *Streptomyces* mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 2461-2465.

**Lydiate, D.J., Malpartida, F. and D.A. Hopwood, (1985).** "The *Streptomyces* plasmid SCP2\*: its functional analysis and development into useful cloning vectors". Gene **35**: 223-235.

**Malpartida, F. and D.A. Hopwood, (1984).** "Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host". Nature **309**: 462-464.

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

**Malpartida, F., Hallam, S., Kieser, H.M., Motamedi, H., Hutchinson, C.R., Butler, M.J., Sugden, D.A., Warren, M., McKillop, C., Baily, C.R., Humphreys, G.O. and D.A. Hopwood, (1987).** "Homology between *Streptomyces* genes coding for synthesis of different poliketides used to clone antibiotic biosynthetic genes". Nature **325**: 818-821.

**Malpartida, F., Niemi, J., Navarrete, R., and D.A. Hopwood. (1990).** "Cloning and expression in a heterologous host of the complete set of genes for biosynthesis of the *Streptomyces coelicolor* antibiotic undecylprodigiosin" Gene **93**: 91-99.

**Maniatis, T., Fritsch, E.F. and J. Sambrook, (1982).** In: Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

**Marck, C, (1988).** "DNA strider": a C program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the apple Macintosh family of computers" Nucl. Acid Res. **16**: 1829-1836.

**McAlpine, J.B., Tuan, J.S., Brown, D.P., Grebner, K.D., Whittern, D.N., and col. (1987)** "New antibiotics from genetically engineered actinomycetes. I: 2-Norerythromycins isolation and structural determinations" J. Antibiot. **40**: 115-1122.

**McCarthy, A. and G. Hardie, (1984).** "Fatty acid synthase -an example of protein evolution by gene fusion" Trends in Biochem. Sci. **9**: 60-63.

**McCarthy, A., Aitken, A. and G. Hardie, (1983)** " The multifunctional polypeptide chain fo rabbit mammary fatty acid synthase contains a domain homologous with the acyl carrier protein of *Escherichia coli*" Eur. J. Biochem **136**: 501-508.

**Messing, J., Crea, R. and P.H. Seeburg, (1983).** "A system for shotgun DNA sequencing". Nucl. Acid Res. **9**: 309-321.

**Miller, J., (1972).** In "Experiments in bacterial genetics". Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.

**Mohamed, A.H., Chirala, S.S., Mody, N.H. Huang, W.Y and S.J. Wakil, (1988).** "Primary structure of the multifunctional  $\alpha$  subunit protein of yeast fatty acid synthase derived from *fasS2* gene sequence". J. Biol. Chem. **263**: 12315-12325.

Moore, C.H., Taylor, S.S., Smith, M.J. and Hartley, B.S. (1974) and Hartley, B.S. (1977), cited in Atlas of Protein Sequence and Structure, 1978 (Dayhoff, M.D. ed.) vol. 5, suppl. 3, pag.68. National Biomedical Research Foundation, Washington,DC.

Motamedi, H. and C.R. Hutchinson, (1987). "Cloning and heterologous expression of a gene cluster for the biosynthesis of tetracenomycin C, the anthracycline antitumor antibiotic of *Streptomyces glaucescens*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4445-4449.

Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Satoh, A., Nagaoka, K. and C.J. Thompson, (1986). "The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus* : Molecular cloning and characterization of the gene cluster". Mol.Gen.Genet. 205: 42-46

Narva, K., J.S. Feitelson, (1990). "Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *redD* locus of *Streptomyces coelicolor* A3(2)". J. Bacteriol. 172: 326-333.

Ochi, K., (1987). "Changes in nucleotide pools during sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture ". J. Gen. Microbiol 132: 2787-2795.

Ohnuki, T., Imanaka, T and S. Aiba, (1985). "Self-cloning in *Streptomyces griseus* of an *str* gene cluster for the streptomycin biosynthesis and streptomycin resistance". J. Bacteriol. 164: 85-94.

Okanishi, M., Suzuki, K. and H. Umezawa, (1974). "Formation and reversion of streptomycete protoplasts: cultural conditions and morphological study". J.Gen.Microbiol. 80: 389-400.

Oki, T., Matsuzawa Y., Kiyoshima D., Yoshimoto A., Naganawa, Takeuchi T. and H. Umezawa, (1981). "New anthracyclines, feudomycins, produced by the mutant from *Streptomyces coeruleorubidus* ME130-A4" J. Antibiot. Tokyo. 34: 783-790.

Overath, P. and P.K. Stumpf, (1964). "Fat metabolism in higher plants, XXIII. Properties of a soluble fatty acid synthetase from avocado mesocarp. J. Biol. Chem. 239: 4103-4110 .

Packer, N.M., (1980). "Biosynthesis of acetate-derived phenols (polyketides)". En The biochemistry of plants. Academic Press, Inc. vol. 4 , pag. 535-570.

Pigac, J. and M. Alacevic, (1979). "Mapping of oxytetracycline genes in *Streptomyces rimosus*". Periodicum Biologorum 81: 575-577.

Raibaud, A., Zalacain, M., Holt, T.G., Tizard, R. and S.J. Thompson, (1991). "Nucleotide sequence analysis reveals linked N-acetyl hydrolase, thioesterase, transport and regulatory genes encoded by the bialaphos biosynthetic gene cluster of *S.higroscopicus* J. Bacteriol. 173: 4454-4463.

Rhodes, P.M., Winskill, N., Friend, E.J. and M. Warren, (1981). "Biochemical and genetic characterization of *Streptomyces rimosus* mutants impaired in oxytetracycline biosynthesis". J.Gen.Microbiol. 124: 329-331

Richardson, M.A., Kuhstoss, S., Huber, M.L.B., Ford, L., Godfrey, O., Turner, J.R. and R.N. Rao, (1990). "Cloning of spiramycin biosynthetic genes and their use in constructing *Streptomyces ambofaciens* mutants defective in spiramycin biosynthesis. J. Bacteriol. 172:3790-3798.

- Rodicio, M.R. and K.F. Chater**, (1982). "Small DNA-free liposomes stimulated transfection of *Streptomyces* protoplasts". *J. Bacteriol.* 151: 1078-1085.
- Rudd, B.A.M. and D.A. Hopwood**, (1979). "Genetics of actinorhodin biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3(2)". *J. Gen. Microbiol.* 114: 35-43.
- Sambrook, Fritsch and Maniatis**. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. and A.R. Coulson**, (1977). "DNA sequencing with chain terminating inhibitors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Schaeffer, S.W., Stephen, W. and C.F. Aquador**, (1987). "Nucleotide sequence of the Adh gene region of *Drosophila pseudobscura*: evolutionary change and evidence for an ancient gene duplication" *Genetics* 117: 61-63.
- Schofield, P.R. and J. M. Watson**, (1986). "DNA sequence of *Rhizobium trifolii* nodulation genes reveals a reiterated and potentially regulatory sequence preceding *nodABC* and *nodEF*" *Nucleic Acid Res.* 14: 2891-2903.
- Schrempf, H.**, (1985). "Genetic instability: amplification, deletion and rearrangement within *Streptomyces* DNA". In *Microbiology-1985*. American Society for Microbiology.
- Schüz, R. Heller, W. and K. Hahlbrock**, (1983). "Substrate specificity of chalcone synthase from *Petroselinum hortense*". *J. Biol. Chem.* 258: 6730-6734.
- Scott, K.F.**, (1986). "Conserved nodulation genes form the non-legume symbiont *Bradyrhizobium* sp. *parosponia*" *Nucl. Acid Res.* 14: 2905-2919.
- Scrutton, N.S., Berry, A. and R.N. Perham**, (1990). "Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering". *Nature* 343: 38-43.
- Seno, E.T., Bruton, C.J. and Chater, K.F.**, (1984). "The glycerol utilization operon of *Streptomyces coelicolor*: genetic mapping of *gyl* mutations and the analysis of cloned *gyl* DNA". *Mol. Gen. Genet.* 193: 119-128.
- Sherman, D.H., Malpartida, F., Bibb, M., Kieser, H., Bibb, M. and D.A. Hopwood**, (1989). "Structure and deduced function of the granaticin-producing polyketide synthase gene cluster of *Streptomyces violaceus ruber* Tü22". *The EMBO J.* 8: 2717-2725.
- Sherman, D.A., Bibb, M. J., Simpson, T.J., Johnson, D., Malpartida, F., Fernández-Moreno, M.A., Martínez, E., Hutchinson, C.R. and D.A. Hopwood**, (1991). "Molecular genetic analysis reveals a putative bifunctional polyketide cyclase/ dehydrase gene from *S. coelicolor* and *S. violaceoruber*, and a cyclase/O-methyltransferase from *S. glaucescens*. *Tetrahedron* 47: 6029-6043.
- Simoni, R.D., Criddle, R. S. and P.K. Stumpf**, (1967). "Fat metabolism in higher plants. XXXI Purification and properties of plant and bacterial acyl carrier proteins" *J. Biol. Chem.* 242: 573-581.
- Smith, C.L., Econome, J.G., Schutt, A., Klico, S. and C.R. Cantor**, (1987). "A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome". *Science, wash.* 236: 1448-1453.

- Southern, E.M.** (1979) "Gel electrophoresis of restriction fragments" *Methods in Enzymol.* **68**: 152-176.
- Stanzak, R., Matsushima, P., Balz, R.H. and R.N. Rao,** (1986). "Cloning and expression in *Streptomyces lividans* of clustered erythromycin biosynthesis genes from *Streptomyces erythraeus*". *Biotechnology* **4**: 229-232.
- Stein, D. and S. Cohen.** (1989). "A cloned regulatory gene of *S.lividans* can suppress the pigment deficiency phenotype of different developmental mutants". *J. Bacteriol.* **171**: 2258-2261.
- Stutzman-Engwall, K.J. and C.R. Hutchinson,** (1989). "Multigene families for anthracycline antibiotic production in *Streptomyces peucetius*". *Proc. Natl.Acad. Sci.* **86**: 3135-3139.
- Thatcher, D.R.,** (1980). "The complete amino acid sequence of three alcohol dehydrogenase alleloenzymes ( $Adh^{N-11}$   $Adh^S$   $Adh^{UF}$ ) from the fruitfly *Drosophila melanogaster*". *Biochem. J.* **187**: 875-883.
- Thompson, C.J., Ward, J.M. and D.A. Hopwood,** (1980). "DNA cloning in *Streptomyces* : resistance genes from antibiotic-producing species ". *Nature* **286**: 525-527.
- Thompson, C.J., Ward, J.M. and D.A. Hopwood,** (1982) "Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes". *J. Bacteriol.* **151**: 668-677.
- Vara, J.A., Pulido, D., Lacalle, R.A. and A. Jiménez,** (1988). "Two genes in *Streptomyces alboniger* puromycin biosynthesis pathway are closely linked". *Gene* **69**: 135-140.
- Vilches Cañizares, C.** (1990). "Clonación de genes de biosíntesis y resistencia a oleandomicina. Tesis Doctoral Universidad de Oviedo. Departamento de Biología Funcional.
- Ward, J.M., Janssen, G.R., Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J. and M.J. Bibb,** (1986). "Construction and characterisation of a series of multi-copy promoter-probe vectors for *Streptomyces* using the aminoglycoside phosphotransferase gene from Tn5 as indicator". *Mol. Gen. Genet.* **203**: 468-478.
- Watson, J.D. and F.H.C. Crick,** (1953). "Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid". *Nature* : **171**: 737-738.
- Weber, J.M. and R. Losick,** (1988). "The use of a chromosome integration vector to map erythromycin resistance and production genes in *Saccharopolyspora erythraea* (*S.erythraeus*). *Gene* **68**: 173-180.
- Wierenga, R.K., Terpstra, P. and W.G.J. Hol,** (1986). "Prediction of the occurrence of the ADP-binding  $\beta\alpha\beta$  -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint". *J. Mol. Biol.* **187**: 101-107.
- Whittaker, P.A., Campbell, A.J.B., Southern M.E. and N.E. Murray,** (1989). "Enhanced recovery acid restriction mapping of DNA fragments cloned in a new  $\lambda$  vector " *Nucl. Acids Res.* **16**: 6725-6736.

**Yanisch-Perron, C., Viera, J. and J. Messing,** (1985). "Improved M13 cloning vector and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors". *Gene* 33: 103-119.

**Yen, K.-M and I. C. Gunsalus,** (1985). "Regulation of naphtalene catabolic plasmid NAH7" *J. Bacteriol.* 170: 5409-5415.

**You, I.-S and I.C. Gunsalus,** (1986). "Regulation of the *nah* and *sal* operons of plasmid NAH7: evidence for a new function in *nahR*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141: 986-992.

**You, I.-S , Ghosal, D. and I.C. Gunsalus,** (1988). "Nucleotide sequence of plasmid NAH7 gene *nahR* and DNA binding of the *nahR* product". *J. Bacteriol.* 170: 5409-5415.

**Young,F.E. and Wilson,G.A.,** (1974). "*Bacillus subtilis*". In *Handbook of genetics*, vol. 1, ed. R.C.King, pag. 69-114. New York : Plenum Press.

**Yue, S., Duncan,J.S., Yamamoto, Y .and C.R. Hutchinson,** (1987). "Macrolide biosynthesis. Tylactone formation involves the processive addition of three carbon units" *J. Ann Chem. Soc.* 109: 1253-1255.

**Zalkin,H. and Ebbole,D.J.,** (1988). "Organization and regulation of genes encoding biosynthetic enzymes in *Bacillus subtilis*". *J. Biol. Chem.* 263 : 1595-1598.