



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

## **Tesis de Doctorado**

# **Regulación del metabolismo lipídico *en Streptomyces coelicolor***

Presentada por:

**Lic. Santiago Comba**

Director: Dr. Hugo Gramajo

Co-directora: Dra. Ana Arabolaza

- 2015 -

# Regulación del metabolismo lipídico en *Streptomyces coelicolor*

Santiago Comba, Licenciado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas y CONICET, durante el período comprendido entre el 01/04/2010 y el 1/02/2015, bajo la dirección de Dr. Hugo Gramajo y la co-dirección de la Dra. Ana Arabolaza.



*a mi familia,*

## **Agradecimientos**

Llega, todo termina llegando. El camino es tortuoso, regado de incertidumbres y abismos, de satisfacciones y recompensas. Tal vez el final no es el que imaginamos. Quizá sea algo mejor que eso.

Infinitas gracias a mi familia. A mis viejos, que nunca permitieron que me falte nada; que allá por el 2003 me dieron la posibilidad de elegir mi futuro, de venirme a Rosario y estudiar Biotecnología; que alentaron y confiaron en la decisión de un pibe de 18 años; porque hicieron un esfuerzo enorme para que pueda dedicarme de lleno a estudiar. Por los muchos consejos y porque, no sin temor, siguieron confiando en mis locuras. A mi hermana, por todos estos años compartidos. Porque a pesar de nuestras diferencias, siempre supe que podía contar con ella. Muchas gracias por la comprensión y por todos los buenos momentos.

Muchas gracias a Hugo y Ana, director y co-directora de este trabajo de tesis, que me acompañan y confían en mí desde el inicio del trabajo de Tesina de grado allá por el año 2008. Gracias por haber sido directores y compañeros, por respetar y alentar el intercambio de opiniones y la discusión en el día a día. Por fomentar el espíritu científico sin dejar de lado las relaciones humanas en el grupo de trabajo.

A todas esas personas con las que trabajamos día a día, tanto en IBR como en docencia, gracias por los consejos, la colaboración, la enseñanza. Por todos los mates cebados y los días compartidos. A investigadores, becarios, personal de apoyo y tesinistas. En especial a mis compañeros de grupo: este trabajo de tesis es el resultado de estos cinco años de trabajo en equipo, no habría sido posible sin ustedes.

Muchas gracias a todos mis amigos y amigas, esas personas de valor incalculable que entran, permanecen y a veces salen de nuestras vidas. A los que vienen desde el pueblo, a los que se sumaron en Venado, a los que conocí estando en Rosario. A los compañeros de viaje. A los que son familia y amigos en forma simultánea. Sepan que, cada uno a su manera, ha contribuído con mi persona. Que mucho de lo que soy, es gracias a ustedes. Que espero que haya sido recíproco. Muchas gracias por esas largas charlas y sobre todo por esas estridentes risas. Porque compartidas las penas se dividieron y las alegrías se multiplicaron.

Los desafíos fueron muchos. El sudor y las horas invertidas también. Pero hoy, al final de una etapa, puedo mirar retrospectivamente y ver que a pesar de los errores -y también gracias a ellos- el recorrido no ha sido en vano.

Los resultados de esta etapa no se limitan a este reporte escrito, sino que afortunadamente me llevo conmigo una incalculable cosecha de amistades, compañeros, buenos momentos, consejos; en definitiva, personas con las que da gusto compartir este viaje. Algo para nada menor.

Gracias, por lo vivido y por lo que está por venir.

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de Tesis han sido presentados en las siguientes publicaciones y reuniones científicas:

Publicaciones con referato internacional:

Arabolaza A, D'angelo M, Comba S, Gramajo H: **FasR, a novel class of transcriptional regulator, governs the activation of fatty acid biosynthesis genes in *Streptomyces coelicolor***. *Mol Microbiol*. 2010 Oct; 78(1):47-63.

Comba S, Arabolaza A, Gramajo H: **Emerging engineering principles for yield improvement in microbial cell design**. *Comput Struct Biotechnol J*. 2012 Oct; 3, e201210016

Comba S, Menendez-Bravo S, Arabolaza A, Gramajo H: **Identification and physiological characterization of phosphatidic acid phosphatase enzymes involved in triacylglycerol biosynthesis in *Streptomyces coelicolor***. *Microb Cell Fact*. 2013 Jan; 12:9.

Menendez-Bravo S, Comba S, Sabatini M, Arabolaza A, Gramajo H. **Expanding the chemical diversity of natural esters by engineering a polyketide-derived pathway into *Escherichia coli***. *Metab Eng*. 2014 Jul; 24:97-106

Hernández MA, Comba S, Arabolaza A, Gramajo H, Alvarez HM. **Overexpression of a phosphatidic acid phosphatase type 2 leads to an increase in triacylglycerol production in oleaginous *Rhodococcus* strains**. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014 Sep; 12.

Comba S, Sabatini M, Menendez-Bravo S, Arabolaza A, Gramajo H. **Engineering a *Streptomyces coelicolor* biosynthesis pathway into *Escherichia coli* for high yield triglyceride production**. *Biotechnol Biofuels*. 2014 Nov; 7:172

Reuniones científicas:

XLIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Noviembre 2008, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. "Transcriptional activation of the fatty acid biosynthetic genes in *Streptomyces coelicolor*". Santiago Comba, Matilde D'angelo, Ana Arabolaza, Hugo Gramajo.

XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Noviembre 2009, San Miguel de Tucumán, Tucumán,

Argentina. "FabPR governs transcriptional activation of fatty acid biosynthesis genes in *Streptomyces coelicolor*". Santiago Comba, Matilde D'angelo, Ana Arabolaza, Hugo Gramajo.

FEBS Workshop on Microbial Lipids "From Genomics to Lipidomics". Mayo 2010, Viena, Austria. "Regulation of fatty acid biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*". Ana Arabolaza, Santiago Comba, Matilde D'Angelo and Hugo Gramajo

XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Noviembre 2010, Puerto Madryn, Chubut, Argentina. "Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*". Santiago Comba, Ana Arabolaza, Hugo Gramajo.

ESF-EMBO Symposium: "Synthetic Biology of Antibiotic Production". Octubre 2011, Sant Feliú de Guixols, España. Presentación oral: "Interplay between lipid metabolism and polyketide production in *Streptomyces coelicolor*". Santiago Comba, Ana Arabolaza, Hugo Gramajo.

16th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. Diciembre 2011, Puerto Vallarta, Mexico. Presentación oral "Transcriptional Regulation of Fatty Acid Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*". Ana Arabolaza, Santiago Comba, Hugo Gramajo.

XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Octubre 2011, Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. "Engineering *Streptomyces coelicolor* for the production of free fatty acids". Ana Arabolaza, Santiago Comba, Simón Menendez Bravo, Hugo Gramajo.

XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Noviembre 2012, Ciudad de Mendoza, Mendoza, Argentina. Presentación oral: "Identification and characterization of phosphatidic acid phosphatase enzymes in *Streptomyces coelicolor*". Santiago Comba, Simón Menendez Bravo, Ana Arabolaza, Hugo Gramajo.

IX Congreso Argentino de Microbiología General (SAMIGE). Agosto 2013, Rosario, Santa Fe, Argentina. "Development of a LC-MS/MS based assay for Phosphatidic acid phosphatase activity". Santiago Comba, Simón Menendez Bravo, Ana Arabolaza, Hugo Gramajo.

L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Noviembre 2014, Rosario, Santa Fe, Argentina. "High yield TAG production by engineering a *Streptomyces coelicolor* pathway into *Escherichia coli*". Martín Sabatini, Santiago Comba, Simón Menendez Bravo, Ana Arabolaza, Hugo Gramajo

**Índice**

<b>1. ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>2. RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
3.1. EL GÉNERO <i>STREPTOMYCES</i> .....	7
3.2. <i>STREPTOMYCES COELICOLOR</i> COMO ORGANISMO MODELO.....	9
3.3. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN BACTERIAS: FAS II DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	9
3.4. ÁCIDOS GRASOS EN <i>BACILLUS SUBTILIS</i> : RAMIFICACIONES <i>ISO-</i> Y <i>ANTEISO-</i> .....	12
3.5. SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS EN BACTERIAS .....	12
3.6. SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN <i>S. COELICOLOR</i> .....	14
3.7. SÍNTESIS DE TRIGLICÉRIDOS EN <i>S. COELICOLOR</i> . .....	15
3.8. RELACIÓN ENTRE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS Y POLICÉTIDOS EN <i>S. COELICOLOR</i> .....	17
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
4.1. CEPAS Y PLÁSMIDOS.....	20
4.2. MEDIOS DE CULTIVO .....	24
4.2.1. LURIA-BERTANI (LB) .....	24
4.2.2. MEDIO MÍNIMO M9 .....	25
4.2.3. SOC.....	25
4.2.4. MEDIO MÍNIMO MINERAL .....	26
4.2.5. SOJA – MANITOL (SM).....	26
4.2.6. MEDIO MÍNIMO SUPLEMENTADO LÍQUIDO (SMM) .....	26
4.2.7. R5 .....	27
4.2.8. YEME .....	28
4.2.9. MEDIO MÍNIMO SUPLEMENTADO SÓLIDO (SMMS).....	28
4.2.10. 2XYT.....	29
4.2.11. TSB (CALDO TRIPTONA SOJA).....	29
4.2.12. YPD .....	29
4.2.13. MEDIO SINTÉTICO COMPLETO PARA LEVADURAS (SC) .....	29
4.2.14. ADICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS AL MEDIO DE CULTIVO .....	30
<b>4.3. CONDICIONES DE CRECIMIENTO</b> .....	<b>30</b>
4.3.1. PREPARACIÓN DE ESPORAS DE <i>STREPTOMYCES</i> .....	30
4.3.2. CULTIVOS DE <i>STREPTOMYCES</i> EN MEDIO LÍQUIDO .....	30

4.3.3.	DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) EN <i>S. COELICOLOR</i> .....	31
4.3.4.	CULTIVOS DE <i>E. COLI</i> EN MEDIO LÍQUIDO.....	31
4.3.5.	CULTIVOS DE <i>S. CEREVISIAE</i> EN MEDIO LÍQUIDO.....	32
<b>4.4.</b>	<b>TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE <i>E. COLI</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>4.5.</b>	<b>ELECTROPORACIÓN DE <i>E. COLI</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>4.6.</b>	<b>TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA CON FAGO P1 EN <i>E. COLI</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>4.7.</b>	<b>CONJUGACIÓN INTERGENÉRICA <i>E. COLI</i> - <i>S. COELICOLOR</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>4.8.</b>	<b>TRANSFORMACIÓN DE <i>S. CEREVISIAE</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>4.9.</b>	<b>DETERMINACIÓN DE ACTINORRODINA EN <i>S. COELICOLOR</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>4.10.</b>	<b>EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN <i>E. COLI</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>4.11.</b>	<b>PURIFICACIÓN DE HIS-FASR POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....</b>	<b>35</b>
<b>4.12.</b>	<b>PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN DE MEMBRANAS DE <i>E. COLI</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>4.13.</b>	<b>DOSAJE DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>37</b>
<b>4.14.</b>	<b>ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....</b>	<b>37</b>
<b>4.15.</b>	<b>TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT).....</b>	<b>38</b>
<b>4.16.</b>	<b>ENSAYO DE ACTIVIDAD CATECOL 2,3-DIOXIGENASA (CDO) .....</b>	<b>38</b>
<b>4.17.</b>	<b>MANIPULACIÓN DE ADN .....</b>	<b>39</b>
4.17.1.	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>S. COELICOLOR</i> .....	39
4.17.2.	EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE <i>E. COLI</i> .....	40
4.17.3.	TRATAMIENTO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN, ADN LIGASA Y FOSFATASA ALCALINA .....	40
4.17.4.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	40
4.17.5.	SECUENCIACIÓN DE NUCLEÓTIDOS .....	43
4.17.6.	ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA.....	43
4.17.7.	PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA .....	44
4.17.8.	DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE ADN EN SOLUCIÓN ACUOSA .....	44
<b>4.18.</b>	<b>MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA DEL PROMOTOR P<sub>FABD</sub> .....</b>	<b>44</b>
<b>4.19.</b>	<b>CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS .....</b>	<b>44</b>
<b>4.20.</b>	<b>ENSAYO DE RETARDO EN GEL (EMSA) .....</b>	<b>46</b>
<b>4.21.</b>	<b>ENSAYOS DE PROTECCIÓN FRENTE A DNASA I .....</b>	<b>47</b>
<b>4.22.</b>	<b>CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES INSERCIONALES EN <i>S. COELICOLOR</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>4.23.</b>	<b>GENERACIÓN DE MUTANTES POR DELECIÓN EN <i>E. COLI</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>4.24.</b>	<b>MANIPULACIÓN DE ARN.....</b>	<b>51</b>
4.24.1.	EXTRACCIÓN DE ARN .....	51
4.24.2.	SÍNTESIS DE CADN.....	52

4.25. AMPLIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL (RT-PCR) .....	52
4.26. ANÁLISIS DE LÍPIDOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (TLC).....	53
4.27. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PAP.....	53
4.28. CUANTIFICACIÓN DE TAG A TRAVÉS DE ESPECTROMETRÍA DE MASA .....	54
4.29. CULTIVOS DE <i>E. COLI</i> EN <i>BATCH</i> ALIMENTADO .....	55
4.30. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS.....	56
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>58</b>
<b>6. CAPÍTULO I.....</b>	<b>59</b>
6.1. INTRODUCCIÓN: REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN BACTERIAS .....	59
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES .....	65
6.3. RESULTADOS .....	66
6.3.1. LA SUPLEMENTACIÓN CON ÁCIDOS GRASOS REVIERTE LA DEFICIENCIA EN LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LA CEPA MUTANTE EN <i>FASR</i> .....	66
6.3.2. <i>FASR</i> ES UN ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES <i>FABD-FABH-ACPP-FABF</i> .....	67
6.3.3. LA MUTACIÓN EN <i>FASR</i> DISMINUYE LA PRODUCCIÓN DE ACTINORRODINA .....	68
6.3.4. <i>FASR</i> SE UNE ESPECÍFICAMENTE A LA REGIÓN PROMOTORA DEL OPERÓN <i>FAB</i> .....	70
6.3.5. UNA REPETICIÓN INVERTIDA PRESENTE EN $P_{FABD}$ ESTÁ INVOLUCRADA EN LA INTERACCIÓN DE <i>FASR</i> CON EL ADN. 74	
6.3.6. <i>FASR</i> ESTÁ INVOLUCRADO EN LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN <i>FAB</i> COMO RESPUESTA A LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS .....	77
6.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	79
<b>7. CAPÍTULO II.....</b>	<b>84</b>
7.1. INTRODUCCIÓN: FOSFATIDATO FOSFATASAS EN LA NATURALEZA .....	84
7.2. OBJETIVOS PARTICULARES .....	88
7.3. RESULTADOS .....	88
7.3.1. IDENTIFICACIÓN DE TRES PROBABLES PAPS EN <i>S. COELICOLOR</i> .....	88
7.3.2. LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LPPA Y LPPB CAUSA UN AUMENTO DE DAG EN <i>E. COLI</i> .....	91
7.3.3. LPPA Y LPPB SON CAPACES DE DEFOSFORILAR FOSFATIDATO <i>IN VITRO</i> .....	93
7.3.4. LA EXPRESIÓN DE SCOLPPS COMPLEMENTA EL FENOTIPO TEMPERATURA SENSIBLE DE <i>S. CEREVISIAE</i> $\Delta DPP1\Delta LPP1\Delta PAH1$ . .....	97
7.3.5. LPPA Y LPPB ESTARÍAN INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO LIPÍDICO DE <i>S. COELICOLOR</i> .....	99

7.3.6. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE LPPA Y LPPB CAUSA UN AUMENTO EN EL CONTENIDO DE TAG DE <i>S. COELICOLOR</i> .....	100
7.3.7. LA CO-EXPRESIÓN DE SCOLPP Y DGAT ES SUFICIENTE PARA LA SÍNTESIS DE TAG EN <i>E. COLI</i> .....	101
<b>7.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>103</b>
<b><u>8. CAPÍTULO III.....</u></b>	<b><u>106</u></b>
<b>8.1. INTRODUCCIÓN: PRODUCCIÓN MICROBIANA DE BIOCOMBUSTIBLES .....</b>	<b>106</b>
<b>8.2. OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>108</b>
<b>8.3. RESULTADOS .....</b>	<b>109</b>
8.3.1. LPPB TIENE UN IMPACTO POSITIVO EN LA SÍNTESIS DE TAG EN <i>E. COLI</i> .....	109
8.3.2. CUANTIFICACIÓN DE TAG POR MEDIO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS .....	110
8.3.3. LA OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN DE Sco0958 Y LPPB CONLLEVA A UN AUMENTO EN EL CONTENIDO DE TAG.....	113
8.3.4. COMPARACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO DE LAS DGAT Sco0958 Y ATFA .....	116
8.3.5. OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA DE PRODUCCIÓN DE TAG A TRAVÉS DE INGENIERÍA METABÓLICA .....	117
8.3.6. AUMENTO DE LA PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA POR MEDIO DE CULTIVOS DE ALTA DENSIDAD EN BATCH ALIMENTADO .....	120
<b>8.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>122</b>
<b><u>9. CONCLUSIONES GENERALES .....</u></b>	<b><u>127</u></b>
<b><u>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</u></b>	<b><u>129</u></b>

**1. Abreviaturas**

Abs	Absorbancia
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACP	Proteína transportadora de acilos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácido graso
AGI	Ácido graso insaturado
AGS	Ácido graso saturado
Am	Apramicina
Ap	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
mARN	ARN mensajero
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina sérica bovina
cADN	ADN complementario
CDO	Catecol dioxigenasa
CIM	Concentración inhibitoria mínima
Cm	Cloramfenicol
CoA	Coenzima A
cpm	Cuentas por minuto
csp	Cantidad suficiente para
C-terminal	Carboxilo terminal
CTP	Trifosfato de citosina
C55-PP	Undecaprenil-pirofosfato
DAG	Diacilglicerol
DGPP	Diacilglicerol-pirofosfato
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DO	Densidad óptica
DGAT	DAG aciltransferasa

DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAS	Ácido graso sintasa
FL	Fosfolípidos
G+C	Guanina y Citosina
Hyg	Higromicina
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
IR	Repetición invertida
Km	Kanamicina
LC	Cromatografía líquida
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPP	Lípido fosfato fosfatasa
MDO	Oligosacárido derivado de membrana
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
N-terminal	Amino terminal
PA	Ácido fosfatídico
PAP	Fosfatidato fosfatasa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PKS	Policétido sintasa
p/v	Peso en volumen
RT-PCR	PCR en tiempo real
RT	Reacción de retrotranscripción
<sup>R</sup>	Resistente
<sup>S</sup>	Sensible
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

TAE	Tris-Acetato-EDTA
TAG	Triacilglicerol
TBE	Tris-Borato-EDTA
TLC	Cromatografía en capa delgada
Tris	N-tris-(hidroximetil) aminometano
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen en volumen

## 2. Resumen

*Streptomyces* es un género bacteriano caracterizado por poseer un complejo ciclo de vida que involucra varios pasos de diferenciación fisiológica y morfológica. Durante su desarrollo, las bacterias de este género suelen producir una amplia gama de metabolitos con actividad biológica, que han sido tradicionalmente utilizados como antibióticos, antiparasitarios, antifúngicos, anticancerígenos, entre otros. Sin embargo, los *Streptomyces* son capaces también de sintetizar y acumular triglicéridos (TAG) como reserva de energía y carbono. Esta característica, si bien es inusual en bacterias, es compartida con otros géneros del orden de los Actinomicetales como *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Mycobacterium*.

A pesar de su diversificado metabolismo lipídico, los estudios en el género *Streptomyces* se han concentrado generalmente en el área de la producción de metabolitos secundarios, y muy poco se conoce acerca de cómo este organismo sintetiza sus ácidos grasos y regula su flujo hacia fosfolípidos o TAG. Además, en *S. coelicolor* la síntesis de ácidos grasos y del metabolito secundario actinorrodina comparten un precursor clave, el malonil-CoA, lo que plantea un complejo escenario regulatorio para la síntesis de estos compuestos carbonados en este microorganismo.

Así, como objetivo general de este trabajo de tesis nos propusimos identificar y caracterizar los mecanismos genéticos y bioquímicos que regulan la síntesis de ácidos grasos y lípidos de reserva en *Streptomyces coelicolor*. Para ello, en una primera etapa nos centramos en la caracterización de un regulador transcripcional de la síntesis de ácidos grasos en esta bacteria, FasR, con el fin de develar su rol fisiológico y entender de qué manera lleva a cabo su función regulatoria. Demostramos, mediante experimentos genéticos y bioquímicos, que FasR es un activador transcripcional del operón *fab* (*fabD-fabH-acpP-fabF*), el cual codifica para las proteínas esenciales del sistema de sintasa de ácidos grasos de tipo II de este organismo. FasR lleva a cabo su función uniéndose directamente a la región corriente arriba del operón *fab*, y su actividad estaría modulada por algún metabolito relacionado con el metabolismo de lípidos.

A continuación nos planteamos identificar el paso enzimático que genera el diacilglicerol (DAG), un sustrato clave para la síntesis de TAG. A pesar del rol que juegan estas moléculas en las diferentes especies como reserva de energía y carbono, la ruta de abastecimiento de DAG para su síntesis es completamente desconocida en bacterias. En este apartado trabajamos bajo la hipótesis de que enzimas fosfatidato fosfatasas de tipo 2 (PAP2) serían las responsables de defosforilar al intermediario ácido fosfatídico y generar así el DAG necesario para la síntesis de TAG. A través de análisis informáticos fuimos capaces de identificar tres probables proteínas con actividad PAP. El posterior estudio de las mismas reveló que sólo dos de ellas, Lpp $\alpha$  y Lpp $\beta$ , eran capaces de defosforilar fosfatidato *in vitro* y tenían además un rol en el metabolismo lipídico de *S. coelicolor*. Una cepa mutante en ambos genes presentó niveles reducidos de TAG a tiempos cortos de crecimiento, equiparándose con los niveles de la cepa salvaje a tiempos mayores. Estas evidencias indican que si bien tanto Lpp $\alpha$  como Lpp $\beta$  estarían proveyendo DAG para la síntesis de TAG en *S. coelicolor*, existen en este organismo rutas alternativas de generación de DAG que prevalecen a tiempos largos de cultivo.

Por último, con la información obtenida a partir de estos estudios básicos se reconstituyó la vía de síntesis de TAG en la bacteria no oleaginosa *E. coli* como prueba de concepto acerca de la funcionalidad de los genes caracterizados en la vía de síntesis de TAG en *S. coelicolor*. Para ello se utilizó como hospedador una cepa de *E. coli*  $\Delta dgkA$ , que posee una deleción en el gen que codifica para una DAG quinasa capaz de reciclar el DAG hacia la síntesis de fosfolípidos. En este contexto se expresaron en forma heteróloga las enzimas fosfatidato fosfatasa Lpp $\beta$  y DAG aciltransferasa Sco0958, que catalizan los dos últimos pasos de la síntesis de TAG. Si bien la sola expresión de Sco0958 demostró ser suficiente para la síntesis de TAG en este contexto genético, la expresión adicional de la fosfatasa Lpp $\beta$  tuvo un efecto positivo en el contenido de TAG, confirmando su capacidad de generar el sustrato DAG limitante para la síntesis de TAG. Luego de una optimización de la cepa de *E. coli* productora de TAG, y de su cultivo en sistemas de alta densidad, fuimos capaces de obtener una producción de 722,1 mg TAG/L, lo que constituye el mayor título de TAG reportado para *E. coli* recombinantes en la literatura. En conjunto, estos resultados muestran

cómo las evidencias que surgen a partir de estudios básicos pueden volcarse en el campo aplicado para resolver una necesidad particular. Sin embargo, a pesar de lograr el mayor título de TAG reportado hasta el momento para *E. coli*, es necesario aún incrementar la productividad volumétrica de TAG en este sistema para lograr el establecimiento de este huésped heterólogo como futura plataforma de biosíntesis de lípidos neutros aptos para la producción de, por ejemplo, biocombustibles.

### **3. Introducción**

#### **3.1. El género *Streptomyces***

Las bacterias del género *Streptomyces* pertenecen al orden de los Actinomicetales, bacterias Gram positivas de alto contenido de G+C en su genoma (frecuentemente superior al 70%), y que comprende a otros géneros como *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* [1, 2].

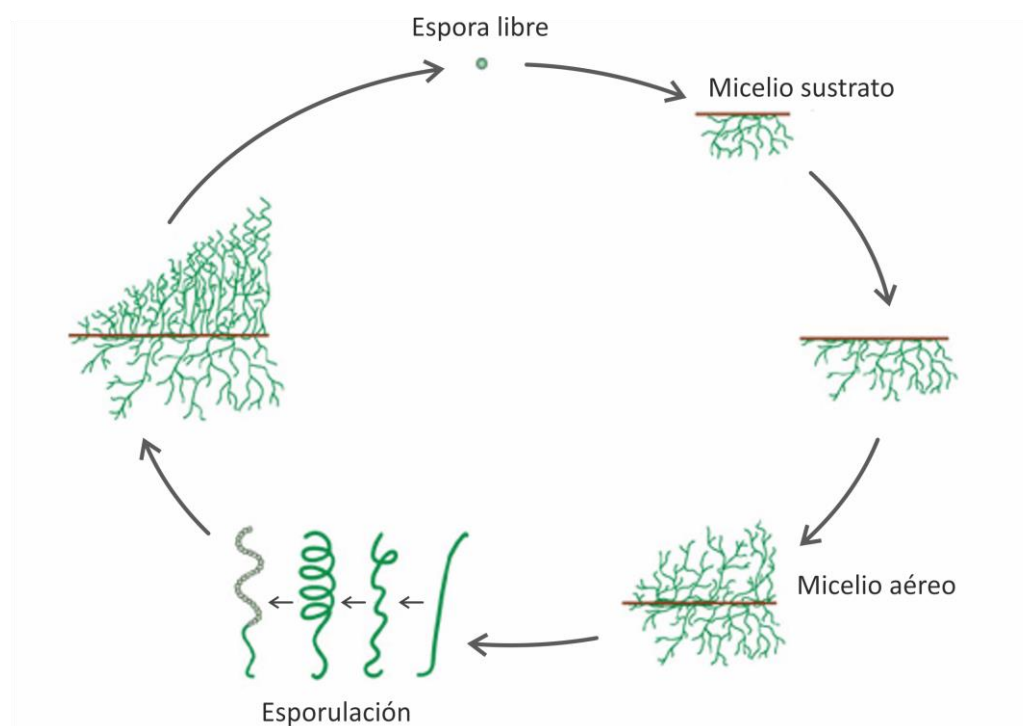
Los *Streptomyces* son bacterias de morfología filamentosa y crecimiento aerobio estricto que habitan gran parte del suelo terrestre y sedimentos marinos como saprófitos de vida libre. *Streptomyces* secreta al medio una gran variedad de proteínas extracelulares como quitinasas, lipasas, amilasas, proteasas y celulasas que le permiten degradar la diversidad de restos orgánicos que se encuentran en sus nichos ecológicos, cumpliendo así un rol central en el ciclo del carbono [3, 4]. Además, al existir en estos ambientes una alta competencia por nutrientes con otros organismos como hongos, nemátodos, insectos y otras bacterias, los *Streptomyces* han desarrollado la capacidad de producir metabolitos secundarios con actividad biológica. Estas moléculas son en su mayoría antibióticos, aunque también se han caracterizado compuestos con actividad antifúngica, antiparasitaria, anticancerígena, e incluso moléculas involucradas en funciones de señalización y comunicación celular [5].

El desarrollo de *Streptomyces* se produce en forma de células tubulares interconectadas y multigenómicas, denominadas micelio [6, 7]. En medio de cultivo sólido, se suceden complejos procesos de diferenciación celular que dan lugar, primero, a un “micelio sustrato” resultado del crecimiento radial y ramificación de las hifas inmersas en el medio de cultivo. Esta forma de crecimiento ayuda a la adhesión y penetración de los restos orgánicos insolubles presentes en el ambiente [4]. A continuación, probablemente ante la falta de nutrientes, las hifas son capaces de crecer hacia la superficie, formando un “micelio aéreo”. Parte del micelio sustrato se sacrifica mediante un proceso de muerte celular programada para liberar nutrientes que van a ser utilizados luego por las células sobrevivientes [8]. La producción de metabolitos especializados generalmente coincide con estos pasos de diferenciación morfológica. El micelio aéreo luego septa y se diferencia en exoesporas unigenómicas.

Las mismas son células metabólicamente quiescentes capaces de sobrevivir en condiciones de escasez de nutrientes y agua por largos períodos [7]. De esta forma las exoesporas le permiten a *Streptomyces* persistir, dispersarse y colonizar nuevo nichos ecológicos. En condiciones ambientales favorables, las esporas son capaces de germinar y dar lugar a un tubo germinal, que se elongará para formar una hifa y reiniciar el ciclo de vida (Figura 1) [6, 7, 9].

Este grupo bacteriano ha despertado gran interés industrial y académico debido a la gran diversidad de metabolitos secundarios que produce y el complejo ciclo de vida por el que atraviesa. Alrededor de dos tercios de los antibióticos utilizados en medicina y veterinaria son sintetizados por bacterias del género *Streptomyces* [10]. Otra característica muy importante de este género bacteriano es la producción y acumulación de triacilglicéridos (TAG) como depósito de energía y carbono durante el crecimiento vegetativo, lo que constituye una característica muy poco frecuente en procariontes [11, 12].

**Figura 1. Ciclo de vida de *S. coelicolor* en medio de cultivo sólido.** Los distintos estadios por los que atraviesa *S. coelicolor* se encuentran detallados en el texto.



### **3.2. *Streptomyces coelicolor* como organismo modelo**

*S. coelicolor* es la especie más caracterizada dentro del género *Streptomyces*, y para la que se encuentran disponibles una gran cantidad de herramientas genéticas y bioquímicas que facilitan su estudio. Su genoma se encuentra completamente secuenciado, tiene un contenido de G+C del 72% y un tamaño de 8,6 Mb [2, 13].

Hasta el inicio de este trabajo de tesis, se conocían cuatro compuestos con actividad antimicrobiana producidos por *S. coelicolor*: el antibiótico policétido actinorrodina, de color azul a pH alcalino [14]; undecilprodigiosina, una molécula híbrida policétido-péptido no ribosomal, de color rojo a pH neutro [15]; el antibiótico calcio dependiente (CDA) [16]; y la ciclopentanona metilenomicina codificada en el plásmido SCP1 [6]. La producción de estos compuestos secundarios en medio líquido comienza cuando los cultivos alcanzan la fase estacionaria de crecimiento. En medio sólido, esto se produce simultáneamente con el desarrollo del micelio aéreo [7]. Recientemente se ha reportado un nuevo alcaloide de tipo policétido producido por esta especie bacteriana, conocido con el nombre coelimicina P1, producto del clúster de genes *cpk* [17-19]. El mismo fue descubierto gracias a la mutación de un regulador transcripcional negativo de la ruta biosintética, lo que produjo su desregulación y la expresión de los genes de biosíntesis de manera no fisiológica [18].

La importancia histórica de este organismo radica en la particularidad de producir compuestos coloreados -actinorrodina y undecilprodigiosina-, que son por lo tanto observables a simple vista. Esto sin dudas constituyó una ventaja importante a la hora del análisis masivo de mutantes en busca de fenotipos híper- o sub-productores de estos metabolitos secundarios y llevó a la instauración de esta especie como modelo de estudio dentro del género *Streptomyces* [6].

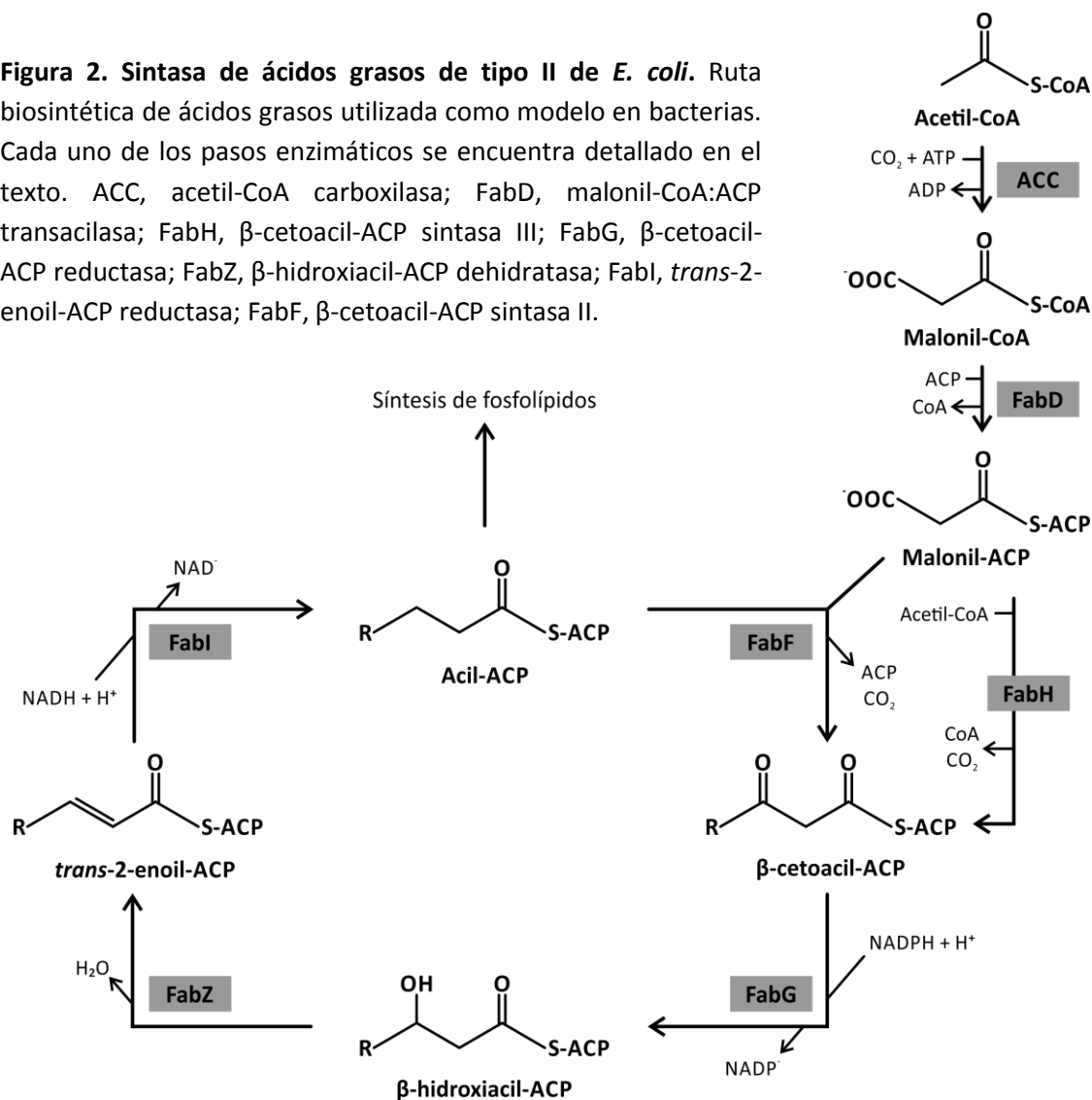
### **3.3. Biosíntesis de ácidos grasos en bacterias: FAS II de *Escherichia coli***

La síntesis de ácidos grasos (AG) constituye el primer paso en la formación de los lípidos de membrana y de triglicéridos. Aunque existe una variación estructural considerable entre las distintas ácido graso sintasas (FAS, por fatty acid synthase), las reacciones enzimáticas que llevan a la formación de ácidos grasos son esencialmente las mismas en todos los sistemas biológicos [20].

La biosíntesis de ácidos grasos en bacterias es llevada a cabo por la sintasa de ácidos grasos tipo II (FAS II). Este sistema se caracteriza por tener las distintas actividades enzimáticas en polipéptidos individuales [20]. La proteína transportadora de acilos (ACP) cumple un rol clave en este sistema ya que mantiene unidos en forma covalente, mediante un enlace tioéster a su grupo prostético 4-fosfopantoteína, a todos los intermediarios de la síntesis acercándolos a los sitios activos de las distintas enzimas de la vía [20].

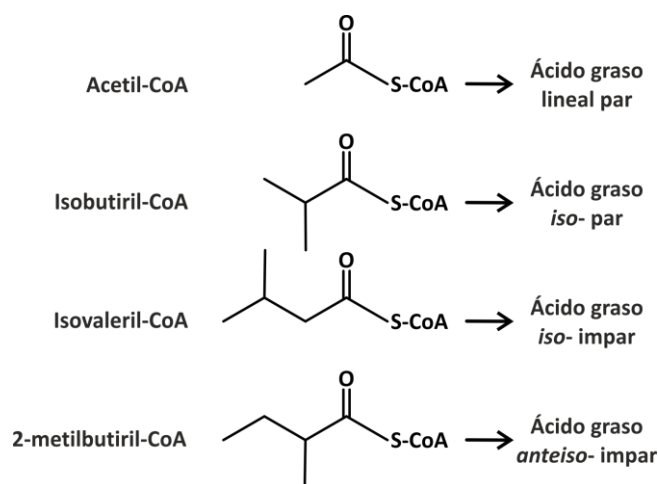
La síntesis de ácidos grasos en *E. coli* ha sido ampliamente caracterizada y es modelo de estudio para el mecanismo de FAS II en otras bacterias (Figura 2) [20, 21]. Esta serie de reacciones comienza con la activación del carbono 2 del acetil-CoA: la carboxilación dependiente de ATP llevada a cabo por la enzima acetil-CoA carboxilasa

**Figura 2. Sintasa de ácidos grasos de tipo II de *E. coli*.** Ruta biosintética de ácidos grasos utilizada como modelo en bacterias. Cada uno de los pasos enzimáticos se encuentra detallado en el texto. ACC, acetil-CoA carboxilasa; FabD, malonil-CoA:ACP transacilasa; FabH,  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa III; FabG,  $\beta$ -cetoacil-ACP reductasa; FabZ,  $\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa; FabI, *trans*-2-enoil-ACP reductasa; FabF,  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa II.



(ACC), en una reacción que genera malonil-CoA. El grupo malonilo del malonil-CoA es transferido luego al ACP por medio de una malonil-CoA:ACP transacilasa (FabD), y el malonil-ACP generado luego será sustrato de las enzimas condensantes que irán elongando las cadenas carbonadas de los ácidos grasos de a dos unidades de carbono. La enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa III (FabH) es la responsable del inicio de la cadena carbonada, condensando el grupo acetilo de una molécula de acetil-CoA con el carbono 2 del malonil-ACP, con la concomitante liberación de  $\text{CO}_2$  y generación del  $\beta$ -cetobutiril-ACP. Este intermediario de cuatro carbonos es reducido por medio de la  $\beta$ -cetoacil-ACP reductasa (FabG) dependiente de NADPH, y posteriormente deshidratado por medio de la  $\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa (FabZ) generando el *trans*-2-enoil-ACP. A continuación, una reducción NADH dependiente a cargo de la *trans*-2-enoil-ACP reductasa (FabI) genera un acil-ACP saturado de cuatro átomos de carbono. Éste es el sustrato de la enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa II (FabF), que condensa al intermediario acil-ACP con otra molécula de malonil-ACP, elongando en dos carbonos al intermediario acilado e iniciando nuevamente un ciclo de reducción, deshidratación y reducción de la cadena carbonada [20] (Figura 2).

Mediante la serie de reacciones anteriores se producen ácidos grasos saturados (AGS), cuya longitud promedio está determinada por una competencia entre FabF, que elonga una vez más la cadena, y las enzimas acil-transferasas, que esterifican al ácido graso con glicerol-3-fosfato o con acilglicerol-3-fosfato y generan los intermediarios en la vía de síntesis de fosfolípidos de membrana [22, 23]. De esta manera, los ácidos grasos finalizan su elongación cuando son removidos de FAS II por las enzimas acil-



**Figura 3. Diversidad de ácidos grasos en *B. subtilis*.** Se muestran los acil-CoA cortos utilizados por FabH como iniciadores para la síntesis de los distintos tipos de ácidos grasos encontrados en este organismo. En cambio, FabH de *E. coli* sólo utiliza acetil-CoA como iniciador, sintetizando sólo ácidos grasos lineales de cadena par.

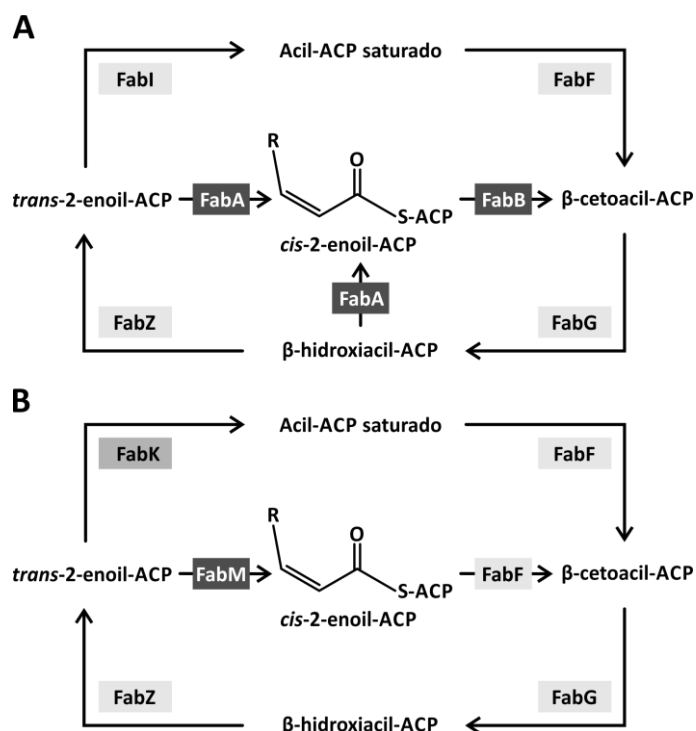
transferasas.

### **3.4. Ácidos grasos en *Bacillus subtilis*: ramificaciones iso- y anteiso-**

*E. coli* es capaz de sintetizar ácidos grasos de cadena lineal y número par de átomos de carbono. Esto se debe a que la enzima FabH presente en este organismo tiene preferencia por acetil-CoA como sustrato para iniciar la síntesis de estos compuestos [24]. En cambio, el bacilo gram positivo *B. subtilis* posee mayoritariamente ácidos grasos ramificados en sus fosfolípidos de membrana (Figura 3). Estas ramificaciones en el extremo distal desfavorecen el empaquetamiento de los fosfolípidos y mantienen la fluidez de membrana acorde a las necesidades celulares. Los AG *iso-* y *anteiso-* derivan de la utilización de isobutiril-CoA, isovaleril-CoA y 2-metilbutiril-CoA como sustratos de la iniciación de cadenas carbonadas [25]. Para lograr esto *B. subtilis* posee dos enzimas iniciadoras (FabHA y FabHB) capaces de condensar el malonil-ACP a estos sustratos con mayor eficiencia que con acetil-CoA, generando por lo tanto una mezcla ácidos grasos ramificados y no ramificados, siendo los primeros mayoritarios. Las condensaciones posteriores con malonil-ACP se producen exclusivamente por FabF [24].

### **3.5. Síntesis de ácidos grasos insaturados en bacterias**

En *E. coli*, los ácidos grasos insaturados (AGI) constituyen una porción significativa del total de ácidos grasos presentes en los fosfolípidos de membrana. Los mismos poseen una insaturación en configuración *cis* que provoca un quiebre en la cadena carbonada y disminuye el empaquetamiento de los ácidos grasos [26, 27]. Los AGI son producidos en *E. coli* por la acción de la  $\beta$ -hidroxidecanoil-ACP deshidratasa/isomerasa (FabA), cuyo sustrato son los acil-ACP de diez átomos de carbono (Figura 4.A) [27, 28]. Esta enzima genera un acil-ACP de diez átomos de carbono con un doble enlace *trans* en posición 2, y luego lo isomeriza a *cis* en posición 3. Este *cis*-3-decanoil-ACP puede ser elongado por FabB y continuar el ciclo de síntesis al igual que un AGS, generando ácidos grasos con insaturaciones en posición  $\omega$ -7 (Figura 4.A) [28].



**Figura 4. Síntesis *de novo* de ácidos grasos insaturados en bacterias. A.** Ruta presente en *E. coli*. **B.** Ruta presente en *S. pneumoniae*. La descripción de cada vía se encuentra detallada en el texto. FabF, β-cetoacil-ACP sintasa II; FabG, β-cetoacil-ACP reductasa; FabZ, β-hidroxiacil-ACP deshidratasa; FabI y FabK, *trans*-2-enoil-ACP reductasa; FabA, β-hidroxiacil-ACP deshidratasa/isomerasa; FabB, β-cetoacil-ACP sintasa I; FabM, β-hidroxiacil-ACP isomerasa

*Streptococcus pneumoniae* es un organismo gram-positivo patógeno, capaz de causar diversas infecciones en humanos. A diferencia de lo que sucede en *E. coli*, *S. pneumoniae* no posee homólogos a FabA y FabB en su genoma, sino una única enzima responsable de la síntesis de AGIs: FabM, una *trans*-2-enoil-ACP isomerasa esencial para la biosíntesis de los mismos (Figura 4.B) [29]. Otra diferencia sustancial respecto a *E. coli* es la presencia de FabK, una flavoproteína que actúa como enoil-ACP reductasa, en lugar de la enzima NADH dependiente FabI [30]. La composición de ácidos grasos sintetizados *de novo* está determinada principalmente por la actividad de FabK. Esta enzima reduce el doble enlace *trans* en posición 2, lo que conlleva a la formación de AGS. En cambio, FabM es capaz de isomerizar este doble enlace a una insaturación *cis* en posición 3. Este acil-ACP a continuación es elongado por la enzima FabF, llevando entonces a la síntesis de AGI (Figura 4.B) [31].

Las insaturaciones en los ácidos grasos de *B. subtilis* se producen *a posteriori* de su síntesis y como respuesta a una disminución abrupta de la temperatura [32]. La enzima Δ5-ácido graso desaturasa (Δ5-Des) es capaz de oxidar el enlace carbono-carbono en posición 5 y generar un doble enlace *cis* en los ácidos grasos que se encuentran esterificados en los fosfolípidos de membrana [32]. La transcripción del gen que la codifica se encuentra regulada por un sistema de dos componentes: el

regulador de respuesta DesR es activado por la histidin-quinasa DesK ante la disminución de la fluidez de membrana [33]. De esta manera se activa la expresión de la enzima  $\Delta 5$ -Des, aumentando la proporción de ácidos grasos insaturados y restaurando la fluidez de la membrana ante la disminución de temperatura [34, 35].

### **3.6. Síntesis de ácidos grasos en *S. coelicolor***

*S. coelicolor* utiliza una sintasa de tipo II (FASII) para producir sus ácidos grasos [36]. Los mismos presentan, en su mayoría, ramificaciones *iso*- y *anteiso*- y sólo una pequeña proporción está constituida por ácidos grasos lineales [37]. Los primeros se sintetizan a partir de los precursores isobutiril-CoA, 2-metilbutiril-CoA e isovaleril-CoA, los cuales son ésteres de CoA provenientes del catabolismo de aminoácidos ramificados, de forma análoga a lo que sucede en *B. subtilis* (Figura 3, página 11), mientras que los segundos lo hacen a partir de acetil-CoA y butiril-CoA [37, 38]. La enzima FabH de organismos productores de estos ácidos grasos *iso*- y *anteiso*- presenta una especificidad de sustrato relajada que le permite aceptar una amplia gama de sustratos como iniciadores de la cadena carbonada [24, 36].

La síntesis lipídica en *Streptomyces* ha recibido poca atención en comparación con otros organismos modelo, y la mayoría de la información proviene del análisis *in silico* de secuencias genómicas [39]. El genoma de *S. coelicolor* codifica para al menos cuatro homólogos a FabH. Dos de ellos forman parte de clústeres productores de metabolitos secundarios, mientras que uno se encuentra formando un operón relacionado con la síntesis de ácidos grasos, el operón *fab*: *fabD-fabH-acpP-fabF* [36]. Este operón es el responsable de la síntesis de ácidos grasos en *S. coelicolor* y ha sido parcialmente caracterizado en forma bioquímica y genética [36, 40]. La enzima codificada por el primer gen del operón, FabD, se identificó como una malonil-CoA:ACP aciltransferasa involucrada en el metabolismo primario de ácidos grasos [40]. El sitio de inicio de la traducción de *fabD* presenta dos singularidades encontradas frecuentemente en *Streptomyces*: el primer codón es un GTG, en lugar del ATG comúnmente encontrado en otros organismos; y además éste coincide con el sitio de inicio de la transcripción, dando lugar a un mRNA sin la secuencia 5' convencional de unión a ribosoma [40]. *S. coelicolor* posee una sola copia de *fabD* en su genoma,

sugiriendo que esta transacilasa estaría involucrada tanto en la vía de síntesis de ácidos grasos como en la de compuestos policétidos [40]. FabH es una enzima con actividad  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa III esencial para el crecimiento de *S. coelicolor* [36]. Esta enzima es la responsable de iniciar la síntesis de ácidos grasos a través de la condensación de malonil-ACP con los acil-CoAs de cadena corta y, al tener preferencia por acil-CoA ramificados respecto a lineales, genera acil-ACPs con ramificaciones *iso*- y *anteiso*- [36, 37]. Tal es así que la cepa mutante condicional en este gen, que expresa el gen *fabH* de *E. coli* -altamente selectivo para acetil-CoA- produce ácidos grasos lineales en forma predominante [37]. El gen *acpP* codifica para una proteína transportadora de acilos (ACP, por acyl carrier protein) específica de la biosíntesis de ácidos grasos. En *S. coelicolor* existen otras dos proteínas homólogas a ACP, pero éstas se encontrarían comprometidas en el transporte de grupos acilos para la síntesis de pigmentos policétidos en policétido sintasas de tipo II [41]. Por último, *fabF* codificaría para la enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa II, responsable de la elongación de los acil-ACP a través de su condensación con moléculas de malonil-ACP [36].

El resto de los genes que codifican para enzimas de FASII se encuentran distribuidos en distintas partes del cromosoma: Los genes *fabG-fabI* ( $\beta$ -cetoacil-ACP reductasa y enoil-ACP reductasa) se encontrarían formando un posible operón en otro locus cromosomal mientras que el gen que codifica para FabZ ( $\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa) se encontraría duplicado y formaría una unidad transcripcional bicistrónica localizada en otra región del genoma [39].

### **3.7. Síntesis de triglicéridos en *S. coelicolor*.**

Los triglicéridos (TAG) son triésteres de glicerol con ácidos grasos, ampliamente utilizados como compuestos de reserva de energía y carbono en organismos eucariotas [42]. Éstos presentan la ventaja de poseer una alta densidad energética, ya que constituyen una de las formas más reducidas de compuestos carbonados, y además su carácter altamente hidrofóbico le permite a la célula acumular grandes cantidades de este lípido neutro sin alterar la osmolaridad intracelular [12, 42]. En la célula los TAG se encuentran como gránulos lipídicos, formando gotas de aceite recubiertas por una capa de fosfolípidos y gran cantidad de proteínas asociadas [43].

Si bien el uso de TAG como compuesto de reserva de carbono se creía una característica exclusiva de eucariotas, se ha reportado síntesis y acumulación de TAG en forma significativa en diferentes especies bacterianas, la mayoría de ellas representantes del orden Actinomycetales. Entre ellas se pueden destacar las pertenecientes a los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Streptomyces* [11, 44-46]; también se ha descrito la capacidad de sintetizar ceras y TAG en organismos gram negativos como *Acinetobacter baylyi* ADP1 y *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* [47, 48].

Miembros del género *Streptomyces* son capaces de acumular hasta un 60% del total de los lípidos celulares en forma de TAG [11]. Su síntesis se da en medios de cultivo que presentan un exceso de fuente de carbono, y en los cuales el crecimiento se encuentra limitado por nitrógeno o fósforo [12]. La acumulación de TAG comienza hacia fines de la fase exponencial de crecimiento, y se correlaciona con la actividad acil-CoA:DAG aciltransferasa (DGAT) presente en los extractos crudos [11]. Las enzimas DGAT son capaces de acilar el grupo -OH de una molécula de diacilglicerol (DAG) utilizando un acil-CoA como sustrato, lo que constituye el último paso en la formación de TAG [46]. En este organismo se han identificado al menos tres proteínas con actividad DGAT: Sco0958, Sco0123 y Sco1280. Las mismas pertenecen a la familia de DGAT procarióticas denominada WS/DGAT (por wax synthase/diacylglycerol acyltransferase), evolutivamente distantes de las DGAT que se encuentran en eucariotas [46, 47]. Entre ellas, Sco0958 sería la responsable de la mayor parte de actividad DGAT encontrada *in vivo* y la enzima clave en la síntesis de TAG en esta bacteria [46]. Tal es así que la cepa mutante en SCO0958 presenta una reducción en la síntesis de TAG del 60%, mientras que la mutación adicional de las otras dos DGAT no provoca una mayor disminución en el contenido de TAG [46].

Si bien la actividad de las WS/DGAT identificadas serían las responsables de la mayor parte de la síntesis de TAG, cabe destacar que se han reportado evidencias acerca de la existencia de vías alternativas de síntesis de triglicéridos en este organismo [46]. Se ha postulado que podrían existir enzimas aún no identificadas que serían DGAT no pertenecientes a la familia de WS/DGAT, e incluso enzimas con actividad fosfolípido:DGAT aciltransferasa (PDAT) cuya actividad se ha detectado en

extractos crudos celulares, y que han sido previamente caracterizadas en plantas [46, 49].

### **3.8. Relación entre la síntesis de ácidos grasos y policétidos en *S. coelicolor***

Los policétidos son moléculas que poseen una gran diversidad estructural, muchos de las cuales presentan actividad biológica como antibióticos (eritromicina A, monensina A, rifamicina S), inmunosupresores (rapamicina), antifúngicos (amfotericina B), antiparasitarios (avermectina) y anticancerígenos (doxorubicina) [5, 50].

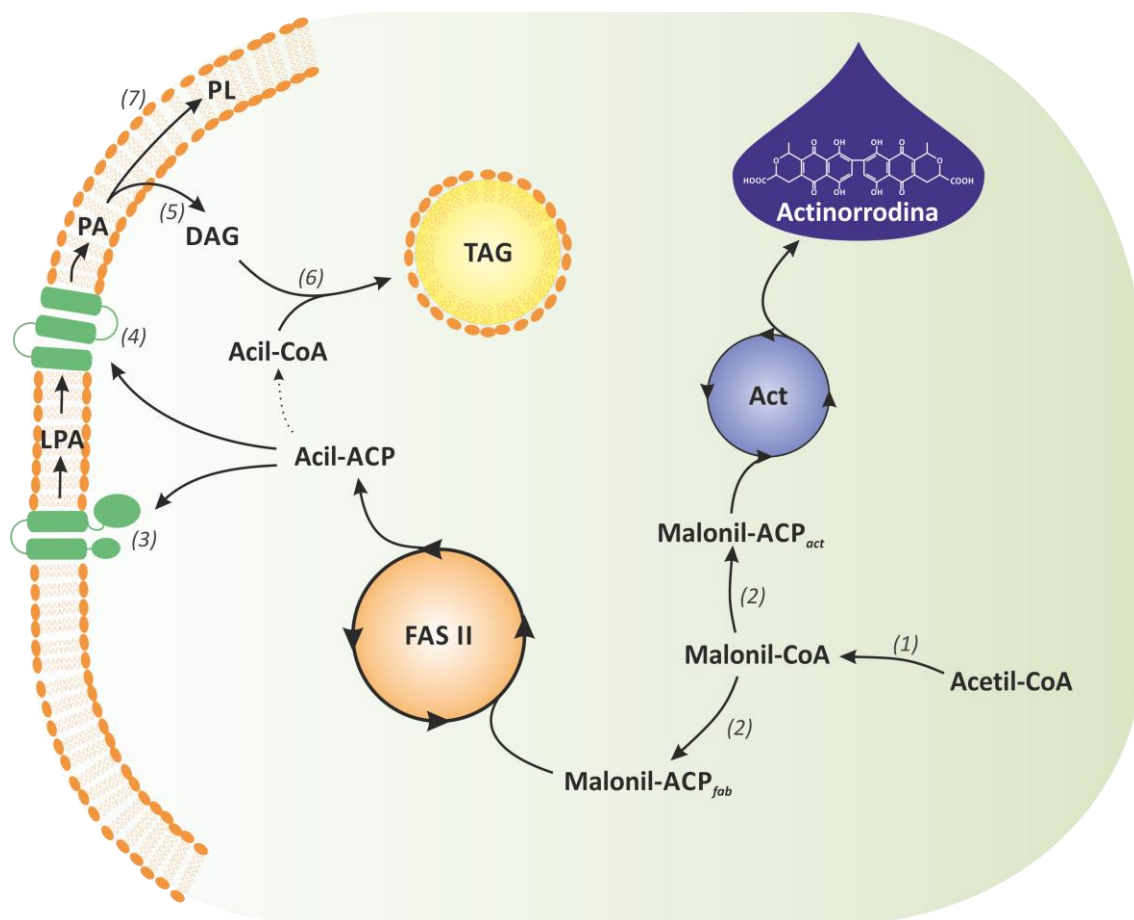
Si bien son estructuralmente muy diversos, los policétidos comparten el mismo patrón de biosíntesis: La enzima que cataliza el proceso se denomina policétido sintasa (PKS, por polyketide synthase) y es capaz de generar los policétidos a través de condensaciones sucesivas de ácidos carboxílicos cortos activados como ésteres de CoA/ACP (como acetil-, malonil- o metilmalonil-CoA, entre otros) de forma similar a lo que ocurre en la síntesis de ácidos grasos [51, 52]. Una característica fundamental de las PKS radica en el hecho de que luego de la condensación, los grupos ceto pueden ser reducidos totalmente, de manera similar a lo que ocurre en FAS, o bien reducidos parcialmente, generando entonces grupos hidroxilos o dobles enlaces; o también permanecer como cetonas. La presencia de estos grupos ceto en la cadena carbonada es la característica que le da el nombre “policétidos” a esta familia de compuestos [52].

La actinorrodina es un antibiótico policétido de color azul producido por *S. coelicolor*. El clúster *act* codifica para una PKS de tipo II responsable de la síntesis de este compuesto [14]. La actinorrodina es un compuesto dimérico, donde para cada monómero son necesarias siete unidades de malonil-CoA y una de acetil-CoA. En este organismo la síntesis de ácidos grasos y la de policétidos están estrechamente relacionadas ya que comparten un precursor clave: el malonil-CoA (Figura 5) [14]. Este precursor es producido por la enzima esencial acetil-CoA carboxilasa, que consta de tres subunidades: AccA2, AccB y AccE. El malonil-CoA entonces puede ser dirigido hacia FAS por medio de la transferencia del grupo malonilo a la proteína ACP<sub>fab</sub> propia del sistema FASII, y codificada por el gen *acpP*; o bien direccionarse hacia la síntesis de actinorrodina, cuando este grupo es transferido a ACP<sub>act</sub>, codificada dentro del clúster

*act* (Figura 5). Si bien ambas proteínas presentan un alto grado de similitud, las mismas son funcionalmente diferentes y cada una interacciona preferencialmente con un grupo de proteínas distinto, logrando a través de ello la separación de los precursores acil-ACP de ambas vías biosintéticas. Sin embargo, a pesar de su rol diferencial, ambos ACP son cargados con un grupo malonilo por una única malonil-CoA:ACP transacilasa FabD, codificada dentro del operón *fab*.

Es decir que dependiendo del estadio de crecimiento y las necesidades celulares, *S. coelicolor* debería ser capaz de regular la producción de malonil-CoA por la enzima

**Figura 5. Esquema de las vías de síntesis de fosfolípidos, TAG y el policétido actinorrodina en *S. coelicolor*.** La ruta biosintética de ácidos grasos y la del policétido actinorrodina comparten al precursor malonil-CoA y a la enzima FabD. (1) Acetil-CoA carboxilasa; (2) FabD, malonil-CoA:ACP transacilasa; (3) Glicerol-3P aciltransferasa; (4) Lisofosfatidato aciltransferasa; (5) Fosfatidato fosfatasa; (6) DAG aciltransferasa; (7) Fosfatidato citidiltransferasa. LPA, ácido lisofosfatídico; PA, ácido fosfatídico; DAG, diacilglicerol; TAG, triacilglicerol; PL, fosfolípido



ACC, y de dirigir este precursor hacia FAS o PKS a través de su transferencia a  $ACP_{fab}$  o  $ACP_{act}$  catalizada por la única enzima FabD que se encuentra en este organismo (Figura 5). Además, en condiciones de exceso de carbono, y ante la limitación del crecimiento por déficit de nitrógeno o fósforo, *S. coelicolor* es capaz de sintetizar TAG en forma simultánea a la síntesis de actinorrodina. En estos momentos, al estar el crecimiento en estado estacionario, también se espera una reducción en la demanda de fosfolípidos para la biogénesis de membrana. Es decir que *S. coelicolor* debe ser capaz de dirigir el flujo de malonil-CoA hacia tres destinos posibles en función de las necesidades celulares: la síntesis de ácidos grasos destinada a fosfolípidos de membrana; la de ácidos grasos destinados a TAG; o bien, a la síntesis de actinorrodina. En este sentido se ha propuesto que los TAG podrían actuar como compuestos de reserva de carbono para la producción ulterior de actinorrodina [11]. Sin embargo, también se ha demostrado que al ocurrir simultáneamente, ambas vías podrían estar compitiendo por las unidades de carbono disponibles [46, 53].

En este contexto, entender cuáles son los mecanismos bioquímicos y genéticos que *S. coelicolor* utiliza para coordinar la síntesis de ácidos grasos con la síntesis de fosfolípidos de membrana, de TAG y de compuestos policétidos permitiría, entre otras cosas, extrapolar estos conocimientos hacia otras especies relacionadas con la finalidad de optimizar la producción de estos compuestos -tanto lípidos como policétidos- utilizando estrategias racionales de ingeniería metabólica y/o biología sintética.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Cepas y plásmidos

Las cepas de *Escherichia coli*, *Streptomyces coelicolor* y *Saccharomyces cerevisiae*, y los plásmidos utilizados en este trabajo de tesis se listan en las Tablas I y II.

**Tabla I.** Cepas utilizadas en este trabajo de tesis

Cepas	Descripción	Referencia o Fuente
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>E. coli</i> K-12 F <sup>-</sup> lacU169 ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) endA1 recA1 hsdR17 deoR supE44 thi-1-l2 gyrA96 relA1	[54]
BL21	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) $\lambda$ (DE3)	Novagen
Rosetta (DE3)	<i>E. coli</i> BL21 pRARE2 ; Cm <sup>R</sup>	Novagen
C41	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) $\lambda$ (DE3)	Lucigen
ET 12567	supE44 hsdS20 ara-14 proA2 lacY galk2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 dam dcm hdsM ; Cm <sup>R</sup>	[6]
BW25113	F <sup>-</sup> $\Delta$ (araD-araB)567, $\Delta$ lacZ4787(::rrnB-3), $\lambda$ <sup>-</sup> , rph-1, $\Delta$ (rhaD-rhaB)568, hsdR514,	[55]
JW4002	<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta$ dgkA737::Km; Km <sup>R</sup>	[55]
JW5020	<i>E. coli</i> BW25113 $\Delta$ fadE739::Km; Km <sup>R</sup>	[55]
MPS10	BL21 (DE3) $\Delta$ dgkA::Km; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
MPS11	BL21 (DE3) $\Delta$ dgkA	Esta tesis
MPS12	BL21 (DE3) $\Delta$ dgkA $\Delta$ fadE::Km; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
MPS13	BL21 (DE3) $\Delta$ dgkA $\Delta$ fadE	Esta tesis
MPS14	BL21 (DE3) $\Delta$ dgkA $\Delta$ fadE $\Delta$ araBAD::Km; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
MPS15	BL21 (DE3) $\Delta$ dgkA $\Delta$ fadE $\Delta$ araBAD	Esta tesis
<i>Streptomyces coelicolor</i>		
M145	Cepa parental SCP1 <sup>-</sup> SCP2 <sup>-</sup>	[6]
AM6	M145 SCO2386::Tn5062; Am <sup>R</sup>	[56]
AM6C	AM6 attB <sub><math>\phi</math>C31</sub> ::pAA105; Am <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup>	[56]

MD18	M145 <i>attB</i> <sub>φBT1</sub> ::pMD13; Km <sup>R</sup>	[56]
MD26	AM6 <i>attB</i> <sub>φBT1</sub> ::pMD13; Am <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	[56]
SC13	M145 <i>attB</i> <sub>φBT1</sub> ::pSC3; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
SC_1102	M145 SCO1102::Tn5062; Am <sup>R</sup>	Esta tesis
SC_1753	M145 SCO1753::Tn5062; Am <sup>R</sup>	Esta tesis
SC_6355	M145 SCO6355::Tn5062; Am <sup>R</sup>	Esta tesis
SC_1153	M145 SCO1102::Tn5062 SCO1753::Tn5066; Am <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup>	Esta tesis
SC_6353	M145 SCO1753::Tn5062 SCO6355::Tn5066; Am <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup>	Esta tesis
SC_1155	M145 SCO1102::Tn5062 SCO6355::Tn5066; Am <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup>	Esta tesis
SC_1153_Ca	SC_1153 <i>attB</i> <sub>φBT1</sub> :: pRT802-Lppα; Am <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Esta tesis
SC_1153_Cb	SC_1153 <i>attB</i> <sub>φBT1</sub> :: pRT802-Lppβ; Am <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Esta tesis
SC_285	M145 <i>attB</i> <sub>φBT1</sub> ::pTR285; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
SC_Lppα	M145 <i>attB</i> <sub>φBT1</sub> ::p285-LPPα; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
SC_Lppβ	M145 <i>attB</i> <sub>φBT1</sub> ::p285-LPPβ; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
W303-1A	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	[57]
GHY58	<i>W303-1A dpp1Δ::TRP1/Kan<sup>R</sup> lpp1 Δ::HIS3/Kan<sup>R</sup> pah1 Δ::URA3</i>	[58]

**Tabla II.** Plásmidos y cósmidos utilizados en este trabajo de tesis

Plásmido	Descripción	Referencia o Fuente
pET28a	Vector de expresión de proteínas recombinantes bajo el promotor del fago T7; Km <sup>R</sup>	Novagen
pBAD33	Vector de expresión de proteínas recombinantes bajo el promotor P <sub>BAD</sub> inducible por L-Arabinosa; Cm <sup>R</sup>	[59]
p425GPD	Plásmido de expresión multicopia para levaduras. Posee el promotor GPD y el marcador LEU2; Ap <sup>R</sup>	[60]
pCR®-BluntII-	Plásmido para el clonado de fragmentos de ADN romos;	Invitrogen

TOPO®	Km <sup>R</sup>	
pKD13	Plásmido para la amplificación del marcador de selección de kanamicina flanqueado por secuencias FRT; Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	[61]
pKD46	Plásmido de expresión del sistema de recombinación Red. Termosensible; Ap <sup>R</sup>	[61]
pCP20	Plásmido de expresión de la recombinasa FLP. Termosensible; Cm <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup>	[62]
pUZ8002	Plásmido helper utilizado en conjugación <i>E. coli</i> - <i>S. coelicolor</i> ; Km <sup>R</sup>	[6]
pKOS111-47	Plásmido helper utilizado en conjugación <i>E. coli</i> - <i>S. coelicolor</i> ; Ap <sup>R</sup>	B. Julien (com. personal)
pRT802	Vector conjugativo e integrativo en <i>Streptomyces</i> basado en el sistema de recombinación del fago $\phi$ BT1; Km <sup>R</sup>	[63]
pTR285	Plásmido de expresión derivado de pRT802, que posee el promotor fuerte P <sub>ermE*</sub> ; Km <sup>R</sup>	[46]
pBR130	pTZ19R, contiene los genes <i>xylTE</i> ; Ap <sup>R</sup>	[64]
pQM5066	Plásmido que contiene una copia del transposón <i>Tn5066</i> ; Hyg <sup>R</sup>	P. Dyson (com. personal)
pMD10	pET28a(+) conteniendo el gen <i>fasR</i> clonado en los sitios <i>NdeI/EcoRI</i> ; Km <sup>R</sup>	[65]
pAA105	pSET152, contiene el gen <i>fasR</i> bajo su propio promotor; Am <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup>	[56]
pMD13	pRT802, contiene la construcción P <sub>fabD</sub> - <i>XylTE</i> ; Km <sup>R</sup>	[65]
pSC3	pRT802, contiene la construcción P <sub>fabDmut</sub> - <i>XylTE</i> ; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pET28-Lpp $\alpha$	pET28, porta el gen SCO1102 bajo el promotor T7; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pET28-Lpp $\beta$	pET28, porta el gen SCO1753 bajo el promotor T7; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pET28-Lpp $\gamma$	pET28, porta el gen SCO6355 bajo el promotor T7; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pBAD-Lpp $\alpha$	pBAD33, porta el gen SCO1102 bajo el promotor P <sub>BAD</sub> ; Cm <sup>R</sup>	Esta tesis
pBAD-Lpp $\beta$	pBAD33, porta el gen SCO1753 bajo el promotor P <sub>BAD</sub> ; Cm <sup>R</sup>	Esta tesis

pBAD-Lppy	pBAD33, porta el gen SCO6355 bajo el promotor $P_{BAD}$ ; $Cm^R$	Esta tesis
pBAD0958	pBAD33, posee el gen SCO0958 bajo el promotor $P_{BAD}$ ; $Cm^R$	[46]
p425-Lpp $\alpha$	p425-GPD, porta el gen SCO1102 bajo el promotor GPD; $Ap^R$ , LEU2	Esta tesis
p425-Lpp $\beta$	p425-GPD, porta el gen SCO1753 bajo el promotor GPD; $Ap^R$ , LEU2	Esta tesis
p425-Lppy	p425-GPD, porta el gen SCO6355 bajo el promotor GPD; $Ap^R$ , LEU2	Esta tesis
p285-Lpp $\alpha$	pTR285, porta el gen SCO1102 bajo el control del promotor $P_{ermE^*}$ ; $Km^R$	Esta tesis
p285-Lpp $\beta$	pTR285, porta el gen SCO1753 bajo el control del promotor $P_{ermE^*}$ ; $Km^R$	Esta tesis
pRT802-Lpp $\alpha$	pRT802, porta el gen SCO1102 bajo el control de su propio promotor; $Km^R$	Esta tesis
pRT802-Lpp $\beta$	pRT802, porta el gen SCO1753 bajo el control de su propio promotor; $Km^R$	Esta tesis
pTR257	pET28, porta el gen SCO0958 bajo el promotor T7; $Km^R$	[46]
pET28-0958-Lpp $\beta$	pET28, porta el operón SCO0958-SCO1753 bajo el promotor T7; $Km^R$	Esta tesis
pBAD-0958-Lpp $\beta$	pBAD33, porta el operón SCO0958-SCO1753 bajo el promotor $P_{BAD}$ ; $Cm^R$	Esta tesis
pET28-AtfA	pET28, porta el gen <i>atfA</i> bajo el promotor T7; $Km^R$	Esta tesis
pET28-FadD	pET28, porta el gen <i>fadD</i> bajo el promotor T7; $Km^R$	Esta tesis
pET28-0958-FadD	pET28, porta el operón SCO0958- <i>fadD</i> bajo el promotor T7; $Km^R$	Esta tesis
pCC01	pET28, porta el gen <i>accA2</i> bajo el promotor T7; $Km^R$	[66]
pET28-AccA2-AccE	pET28, porta el operón <i>accA2-accE</i> bajo el promotor T7; $Km^R$	Esta tesis
pET28-AccA2-AccE-AccB	pET28, porta el operón <i>accA2-accE-accB</i> bajo el promotor T7; $Km^R$	Esta tesis

pET28-0958-ACC	pET28, porta el operón SCO0958- <i>accA2-accE-accB</i> bajo el promotor T7; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pET28-GpsA	pET28, porta el gen <i>gpsA</i> bajo el promotor T7; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pET28-0958-GpsA	pET28, porta el operón SCO0958- <i>gpsA</i> bajo el promotor T7; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pET28-FadR	pET28, porta el gen <i>fadR</i> bajo el promotor T7; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pET28-0958-FadR	pET28, porta el operón SCO0958- <i>fadR</i> bajo el promotor T7; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
pET28-0958-0958	pET28, porta el operón SCO0958-SCO0958 bajo el promotor T7; Km <sup>R</sup>	Esta tesis
6A05.2.b04	Cósmido ( <i>rep</i> <sup>pUC</sup> , Km <sup>R</sup> ) con una inserción del Tn5062 ( <i>oriT</i> , Am <sup>R</sup> ) en el gen SCO1102; Am <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	[67]
2SCI34.1.D02	Cósmido ( <i>rep</i> <sup>pUC</sup> , Km <sup>R</sup> ) con una inserción del Tn5062 ( <i>oriT</i> , Am <sup>R</sup> ) en el gen SCO1753; Am <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	[67]
SC3A7.1.D12	Cósmido ( <i>rep</i> <sup>pUC</sup> , Km <sup>R</sup> ) con una inserción del Tn5062 ( <i>oriT</i> , Am <sup>R</sup> ) en el gen SCO6355; Am <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	[67]
6A05.2.b04-Hyg	Cósmido ( <i>rep</i> <sup>pUC</sup> , Km <sup>R</sup> ) con una inserción del Tn5066 ( <i>oriT</i> , Hyg <sup>R</sup> ) en el gen SCO1102; Hyg <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Esta tesis
2SCI34.1.D02-Hyg	Cósmido ( <i>rep</i> <sup>pUC</sup> , Km <sup>R</sup> ) con una inserción del Tn5066 ( <i>oriT</i> , Hyg <sup>R</sup> ) en el gen SCO1753; Hyg <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Esta tesis
SC3A7.1.D12-Hyg	Cósmido ( <i>rep</i> <sup>pUC</sup> , Km <sup>R</sup> ) con una inserción del Tn5066 ( <i>oriT</i> , Hyg <sup>R</sup> ) en el gen SCO6355; Hyg <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Esta tesis

## 4.2. Medios de cultivo

### 4.2.1. Luria-Bertani (LB)

Este medio, tanto líquido como sólido, se utilizó para mantener y crecer cepas de *E. coli*, y para el crecimiento y titulación de esporas de *S. coelicolor*.

Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

H<sub>2</sub>O csp. 1 L

Ajustar a pH 7 con NaOH

Para la obtención de medio sólido se suplementó el mismo con agar a una concentración final de 1,5% p/v.

#### 4.2.2. Medio mínimo M9

Este medio se utilizó para la evaluación de auxotrofías en *E. coli*.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	12,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
NaCl	0.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
H <sub>2</sub> O	csp. 1 L

Se autoclava el medio de cultivo, y para cada 100 mL se adicionan:

MgSO <sub>4</sub> (1 M)	0,2 mL
CaCl <sub>2</sub> (100 mM)	0,1 mL
Glucosa (20% p/v)	1 mL

La glucosa puede ser reemplazada por L-Arabinosa u oleato a una concentración de 0,2% p/v.

#### 4.2.3. SOC

Este medio fue utilizado para la recuperación de células de *E. coli* luego de la electroporación

Peptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,6 g
KCl	0,2 g
H <sub>2</sub> O	csp. 1 L

Luego de autoclavar el medio se suplementa con MgCl<sub>2</sub> 10 mM y glucosa 20 mM.

#### 4.2.4. Medio mínimo mineral

Este medio de cultivo se utilizó para el crecimiento de *E. coli* en cultivos de *batch* alimentado

Extracto de levadura	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20,8 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g
H <sub>2</sub> O	csp. 1L

Luego de autoclavarse el medio es suplementado con 1,5 mL de solución de elementos traza conteniendo: 50 mM FeCl<sub>3</sub>, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM ZnSO<sub>4</sub>, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM CoCl<sub>2</sub>, 2 mM CuCl<sub>2</sub>, 2 mM NiCl<sub>2</sub>, 2 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> and 2 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>.

La solución de alimentación de fuente de carbono contiene 600 g/L glucosa y 15 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

#### 4.2.5. Soja – Manitol (SM)

Este medio de cultivo sólido se utilizó para la selección de exconjugantes en los experimentos de conjugación *E. coli* – *Streptomyces*, para el mantenimiento de cepas y la preparación de esporas de *S. coelicolor*.

Agar	20 g
Manitol	20 g
Harina de soja	20 g
H <sub>2</sub> O corriente	csp. 1 L

#### 4.2.6. Medio mínimo suplementado líquido (SMM)

Este medio fue utilizado para el crecimiento de *S. coelicolor*. La fuente de carbono consistió en glucosa 1% p/v y la fuente de nitrógeno en casaminoácidos 0,2% p/v.

PEG 6.000	5 g
H <sub>2</sub> O	csp. 82 mL

Luego de autoclavar se agrega por cada 100 mL de medio:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (50 mM cada uno)	1 mL
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (24 g/L)	2,5 mL
Buffer TES (0,25 M pH 7,2)	10 mL
Antiespumante (1% p/v)	1 mL
Glucosa (50% p/v)	2 mL
Casaminoácidos (20% p/v)	1 mL
Elementos traza*	0,1 mL

\*La solución de elementos traza contiene: 0,1 g/L de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y NaCl.

#### 4.2.7. R5

Medio de cultivo rico líquido fue utilizado para el crecimiento de *S. coelicolor*.

Sacarosa	103 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10,2 g
Glucosa	10 g
Casaminoácidos	0,1 g
Elementos traza*	2 mL
Extracto de levadura	5 g
Buffer TES	5,73 g
H <sub>2</sub> O	csp. 1 L

\*La solución de elementos traza contiene: 40 mg/L de ZnCl<sub>2</sub>, 200 mg/L FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10 mg/L CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 mg/L MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 10 mg/L Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O y 10 mg/L (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O.

Luego de autoclavar, para cada 100 mL de medio de cultivo agregar:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5% p/v)	1 mL
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (5 M)	0,4 mL
NaOH (1 N)	0,7 mL

El medio de cultivo R5 sólido se utilizó para evaluar la producción de antibióticos de *S. coelicolor*. Para ello, durante la preparación el R5 líquido fue suplementado con 2% p/v agar.

#### 4.2.8. YEME

Medio de cultivo rico líquido utilizado para el crecimiento de *S. coelicolor*.

Extracto de levadura	3 g
Peptona	5 g
Extracto de malta	3 g
Glucosa	10 g
Sacarosa	340 g
H <sub>2</sub> O	csp. 1 L

Luego de autoclavar, el medio de cultivo se suplementa con MgCl<sub>2</sub> 5 mM

#### 4.2.9. Medio mínimo suplementado sólido (SMMS)

Este medio de cultivo se empleó para el estudio de la producción de antibióticos de *S. coelicolor*. Se utilizó acetato 0,5% p/v como fuente de carbono y 0,2% p/v casaminoácidos como fuente de nitrógeno.

Difco Casa aminoácidos	2 g
Buffer TES	5,73 g
Agar	24 g
H <sub>2</sub> O	csp. 1 L

Ajustar a pH 7,2. Luego de autoclavar se agrega por cada 200 mL de medio:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (50 mM cada uno)	2 mL
MgSO <sub>4</sub> (1M)	1 mL
Elementos traza*	0,2 mL

\*La solución de elementos traza contiene: 0,1 g/L de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O y NaCl.

#### 4.2.10. 2xYT

Medio utilizado para la germinación de esporas de *Streptomyces* en los experimentos de conjugación.

Difco Bacto triptona	16 g
Difco Bacto extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	csp. 1 L

#### 4.2.11. TSB (Caldo Triptona Soja)

Este medio se utilizó en la preparación de micelios para la posterior extracción de ADN genómico.

Caldo de triptona de soja	30 g
H <sub>2</sub> O	csp. 1 L

#### 4.2.12. YPD

Medio de cultivo rico utilizado para el crecimiento de levaduras.

Extracto de levadura	10 g
Peptona	20 g
H <sub>2</sub> O	csp. 1 L

Luego de autoclavado, se adiciona glucosa a una concentración 2% p/v. Para solidificar, el medio se suplementó con agar 1,5% p/v.

#### 4.2.13. Medio sintético completo para levaduras (SC)

Este medio se utilizó para la selección de transformantes y evaluación de auxotrofías de las determinadas cepas de *S. cerevisiae*.

YNB (6,7% p/v)*	100 mL
Glucosa (20%)	100 mL
H <sub>2</sub> O	csp. 1 L

Dependiendo de los requerimientos nutricionales de la cepa, el medio de cultivo fue suplementado con hemisulfato de adenina (10 mg/L), L-histidina (50 mg/L), L-leucina (100 mg/L), triptofano (100 mg/L), y/o uracilo (20 mg/L).

\* YNB (por, yeast nitrogen base) contiene sulfato de amonio, vitaminas y cofactores necesarios para el crecimiento de *S. cerevisiae*. No contiene aminoácidos [68].

#### 4.2.14. Adición de ácidos grasos al medio de cultivo

De ser necesaria la suplementación de un determinado medio de cultivo con ácidos grasos, previamente se agregó el detergente Brij-58 a una concentración 4 veces mayor a la de los mismos para favorecer su solubilización. El palmitato y el oleato fueron neutralizados y preparados en solución al 5 o al 20% p/v en etanol, respectivamente.

### 4.3. Condiciones de crecimiento

#### 4.3.1. Preparación de esporas de *Streptomyces*

Una colonia aislada fue repicada y esparcida con hisopo sobre toda la superficie de placas de medio sólido soja-manitol (SM). Éstas luego se incubaron por 6 días a 30 °C, hasta obtener un pasto confluyente de esporas grises. Las esporas fueron colectadas en 20% v/v glicerol, tituladas en medio LB y guardadas a -80 °C.

#### 4.3.2. Cultivos de *Streptomyces* en medio líquido

Se utilizaron erlenmeyers con deflectores para favorecer la aireación, y siliconizados para evitar la adhesión del micelio a las paredes. El medio de cultivo se inoculó con esporas de *S. coelicolor* a una concentración final de  $10^7$  esporas/mL. Los cultivos crecieron a 30 °C, con una agitación de 200-250 rpm durante un período de tiempo dependiente del ensayo. El volumen de medio de cultivo nunca excedió la quinta parte del recipiente.

Las curvas de crecimiento se realizaron mediante extracciones proteicas totales de cada alícuota de cultivo (1 mL) tomada a diferentes tiempos y conservada luego en frío. Cada alícuota fue lavada con una solución de Tris-HCl 50 mM pH 7 y resuspendida

en una solución conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 7, NaCl 100 mM, EDTA 0,5 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM. La ruptura celular se realizó mediante sonicación a 25% de amplitud, 5 veces x 10 segundos cada vez (VibraCell Ultrasonic Processor-Sonics & Materials Inc.). Posteriormente, los extractos se clarificaron a 14.000 rpm y la concentración proteica en el sobrenadante se determinó por el método de Bradford que se describe en la sección 4.13 [69]. Cada determinación se realizó por triplicado.

Para la marcación radiactiva utilizando acetato marcado con  $^{14}\text{C}$  ( $^{14}\text{C}$ -acetato) se separaron 5 mL de cultivo en un tubo de ensayo, se adicionaron 5  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -acetato 58.9 mCi/mmol (PerkinElmer®) y se continuó cultivando a 30 °C con agitación durante 3 hs. A continuación las células fueron lavadas con 50 mM Tris-HCl pH 7 y guardadas a -20 °C para su procesamiento

#### 4.3.3. Determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) en *S. coelicolor*

Los ensayos de CIM se realizaron inoculando un determinado medio de cultivo con una concentración final de  $10^7$  esporas/mL y alicuotándolo en diferentes tubos. A continuación se realizaron diluciones seriadas al medio del antibiótico, que fueron adicionadas a cada uno de los tubos. Se realizó un control positivo sin agregado de antibiótico. Posteriormente los mismos fueron incubados a 30 °C con agitación durante 48 hs. Se definió a la CIM como la menor concentración del compuesto antimicrobiano capaz de inhibir completamente el crecimiento.

#### 4.3.4. Cultivos de *E. coli* en medio líquido

Las cepas bacterianas se inocularon desde medio sólido a una absorbancia inicial ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) de aprox. 0,01 y el volumen del medio de cultivo (LB) en ningún caso superó la quinta parte del recipiente. Los cultivos crecidos durante toda la noche (ON, por over night) fueron diluídos 1:100 en medio LB fresco o fueron recolectados por centrifugación. Cuando fue necesario, el medio fue suplementado con 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  ampicilina (Ap), 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  cloramfenicol (Cm), 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  kanamicina (Km), 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  apramicina (Am) o 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  higromicina (Hyg) para el mantenimiento de los

plásmidos. Para el crecimiento se utilizaron baños termostatzados a 37 °C con agitación a 200-250 rpm.

#### 4.3.5. Cultivos de *S. cerevisiae* en medio líquido

El cultivo de rutina de *S. cerevisiae* se realizó a 30 °C con agitación, generalmente en medio de cultivo YPD. En levaduras se utilizan marcadores de selección nutricionales que confieren prototrofia frente a algún compuesto para la cual la cepa aceptora es auxótrofa. Cuando fue necesario evaluar las prototrofias de una determinada cepa, se utilizó medio de cultivo sintético completo omitiendo los aminoácidos y/o bases nitrogenadas para la cual la cepa debería ser protótrofa.

#### 4.4. Transformación química de *E. coli*

La cepa *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  [54] fue utilizada para clonado de rutina. Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron transformadas por golpe térmico en presencia de CaCl<sub>2</sub> siguiendo los métodos convencionales [68]. Brevemente, a partir de cultivos de fase logarítmica (DO<sub>600nm</sub> de aproximadamente 0,5) crecidos a 37 °C, se colectaron por centrifugación (10 min, 4.000 x g, 4 °C) las células correspondientes a 1 mL de cultivo, se lavaron con 1 mL de Solución I de transformación estéril (10 mM Solución MOPS y 10 mM KCl, pH 7) y luego se resuspendieron en 1 mL de la misma solución. Las células se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de Solución II (100 mM MOPS, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, pH 6,5) y se incubaron durante 15 min en hielo. Luego las células se centrifugaron y resuspendieron en 0,1 ml de la Solución II, se agregaron 1-200 ng de ADN en un volumen menor a 10  $\mu$ l, y finalmente la mezcla se incubó 30 min en hielo. Luego se realizó una incubación a 42 °C durante 1 min, y posteriormente 2 min más en hielo. Se adicionó 1 ml de medio LB y las células se recuperaron durante 1 h a 37 °C. La selección de transformantes se en placas con medio LB agar suplementado con los antibióticos apropiados.

#### 4.5. Electroporación de *E. coli*

Para la introducción de DNA lineal en *E. coli*, y para determinados plásmidos, se utilizó el protocolo de electroporación. Para ello, se colectaron las células de 10 mL de

un cultivo en LB de *E. coli* a  $DO_{600nm}$  aprox. 0,5. De aquí en adelante todos los pasos fueron realizados en frío. Las células fueron lavadas con 10 mL de agua destilada, centrifugadas 5 min a 4.000 x g y resuspendidas luego en 1 mL de glicerol 10% v/v. Se realizó un lavado adicional con glicerol 10% p/v, luego del cual las células fueron resuspendidas en 50  $\mu$ L de glicerol 10% p/v. El ADN fue agregado a esta suspensión, y la mezcla fue transferida a una cubeta de electroporación de 0,2 cm previamente enfriada. La electroporación se realizó con un equipo MicroPulser (BioRad®), utilizando el programa Ec2 (pulso de 2,5 kV). Inmediatamente se agregó 1 mL de medio de cultivo SOC, se recuperaron las células durante 1 h a 30 o 37 °C y se sembraron en placas selectivas de medio de cultivo LB.

#### **4.6. Transducción generalizada con fago P1 en *E. coli***

Para la transferencia de marcadores cromosomales en *E. coli* se utilizó la técnica de transducción generalizada con fago P1 *vir* [68]. El lisado de la cepa dadora se generó en medio líquido, creciéndola en 5 mL de medio LB suplementado con  $CaCl_2$  5mM glucosa 0,2% p/v (LB-Ca-Glc) a 37 °C e inoculando con 500  $\mu$ L de fago P1 salvaje. Luego de 3 hs de incubación a 37 °C se puede observar la lisis casi total del cultivo por disminución de la turbidez. A continuación se separó el sobrenadante por centrifugación 10 min a 5.000 x g, se adicionaron 500  $\mu$ L de cloroformo y se mezcló vigorosamente para destruir cualquier célula de la cepa dadora remanente. El lisado fue centrifugado 5 min a 5.000 x g para separar las fases y guardado a 4 °C hasta su uso.

Para la transducción propiamente dicha, 1 mL de cultivo saturado de la cepa aceptora fue centrifugado 5 min a 5.000 x g, y resuspendido en solución MC estéril ( $MgSO_4$  100 mM,  $CaCl_2$  5 mM). Se incubaron 100  $\mu$ L de esta suspensión durante 20 min a 37 °C con distintas diluciones de lisado de la cepa dadora, luego de lo cual se adicionaron 200  $\mu$ L de Citrato de sodio 1 M pH 5,5 y 1 mL de LB. Luego de recuperar las células durante 1 h a 37 °C, éstas fueron sembradas en placas selectivas de medio de cultivo LB suplementado con citrato de sodio 20 mM.

#### **4.7. Conjugación intergenérica *E. coli* - *S. coelicolor***

Para la transferencia de plásmidos movilizables entre *E. coli* y *S. coelicolor* se siguió una técnica modificada del método original [6]. La conjugación intergenérica se realizó utilizando como dadora, una cepa de *E. coli* ET12567/pKOS111-47 (Cm<sup>R</sup> Ap<sup>R</sup>) que porta el plásmido a transferir, y como receptora una cepa de *S. coelicolor* M145 o derivada de la misma. El plásmido pKOS111-47 proporciona las funciones de transferencia a plásmidos que contienen un origen de transferencia *oriT*, pero no puede autotransferirse por poseer una mutación en su propio *oriT* [70].

Por cada conjugación, 10<sup>8</sup> esporas de *Streptomyces* se adicionaron a 500 µl de medio 2xYT y se germinaron por calentamiento a 50 °C durante 10 min. Las células posteriormente se sembraron en placas de medio soja–manitol (SM) suplementado con MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Luego sobre las esporas se sembraron con ansa por medio de estrías las células dadoras ET12567/pKOS111-47 conteniendo el vector a transferir. Las placas se incubaron a 30 °C durante la noche y luego se cubrió cada placa con 1 ml de H<sub>2</sub>O conteniendo 0,5 mg ácido nalidíxico y 2,5 mg Km, 0,5 mg Am o 0,5 mg Hyg según el marcador utilizado en el vector. Finalmente, las placas fueron incubadas en estufa a 30°C durante 3 a 4 días hasta la aparición de las transconjugantes.

#### **4.8. Transformación de *S. cerevisiae***

La introducción de plásmidos en *S. cerevisiae* se realizó por medio de electroporación. Se cultivó la cepa de levadura a 30 °C en 250 mL en medio YPD hasta una DO<sub>600nm</sub> de 1,3-1,5. A continuación se centrifugó el cultivo a 3.000 x g durante 5 min, y se lavó el pellet celular con un volumen de agua fría, dos veces. Luego se resuspendió el pellet en 20 mL de sorbitol 1 M frío y se centrifugó a 3.000 x g durante 5 min. Las células fueron a continuación resuspendidas en 0,5 mL de sorbitol 1 M y alicuotadas en tubos de 40 µL de suspensión celular a los que se les adicionaron 5-100 ng de ADN. Las células con el ADN fueron colocadas en una cubeta de electroporación de 0,2 cm previamente enfriada. La electroporación se realizó con un equipo MicroPulser (BioRad®), utilizando el programa Sc2 (pulso de 1,5 kV). Inmediatamente después se adicionó 1 mL de medio YPD y se incubó 1 h a 30 °C. Finalmente, las células fueron sembradas en placas selectivas conteniendo medio sintético completo,

excluyendo los suplementos para los cuales se quería seleccionar la auxotrofia (leucina, para el caso de la transformación con p425-GPD).

#### **4.9. Determinación de actinorrodina en *S. coelicolor***

Para cuantificar el metabolito secundario actinorrodina, se tomaron 0,5 ml de cultivo y se sonicaron durante 10 segundos, 25% amplitud (VibraCell Ultrasonic Processor-Sonics & Materials Inc.). A continuación se agregaron 250  $\mu$ l de KOH 3 N para dar una concentración final de 1 N (pH  $\approx$  14,0) y se mezcló vigorosamente durante 15 min. Luego se centrifugó a 4.000 x g durante 5 min, se recuperó el sobrenadante y se midió la absorbancia del mismo a 640 nm ( $Abs_{640nm}$ ). La concentración de actinorrodina pudo ser calculada usando su coeficiente de extinción molar en KOH 1 N,  $\epsilon_{640nm} = 25.320 M^{-1} cm^{-1}$  [6].

#### **4.10. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli***

Para la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* se utilizaron distintas cepas de expresión dependiendo del ensayo, todas ellas derivadas de la cepa BL21 (DE3). La cepa BL21 (DE3) es una cepa de *E. coli* B lisógena para el profago  $\lambda$ DE3, que expresa la T7 ARN polimerasa a partir del promotor *lacUV5*. Este promotor es menos sensible a la represión catabólica respecto a su versión salvaje, e inducible por lactosa o su análogo isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

Luego de crecer la cepa de *E. coli* hasta una  $DO_{600nm}$  de aproximadamente 0,6 a 37 °C, se adicionaron los inductores correspondientes y se disminuyó la temperatura a 23 °C. Los cultivos fueron incubados durante toda la noche con agitación moderada. La disminución en la temperatura se realizó para favorecer el correcto plegado de las proteínas y evitar la formación de agregados proteicos.

Para la marcación radiactiva utilizando [ $^{14}C$ ]-acetato se utilizó una concentración de 1  $\mu$ Ci/mL (58.9 mCi/mmol, PerkinElmer®) en el momento de la inducción.

#### **4.11. Purificación de His-FasR por cromatografía de afinidad**

Las células que expresan la proteína recombinante fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en solución A (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM,  $\beta$ -

mercaptoetanol 10 mM). A continuación éstas fueron tratadas por sonicación durante 5 series de 10 s a 25% amplitud usando un VibraCell Ultrasonic Processor (Sonics & Materials, Inc.), previa adición del inhibidor de proteasas PMSF a una concentración de 0,5 mM. Posteriormente, los restos celulares se clarificaron por centrifugación a 14.000 x g durante 30 min. La porción soluble fue tomada del sobrenadante y empleada como extracto proteico total libre de células para la purificación de la proteína recombinante. Tanto la fracción soluble como la insoluble fueron analizadas por SDS-PAGE. Todos los pasos se realizaron a 4 °C.

Para la purificación del regulador FasR expresado como proteína de fusión a una secuencia de polihistidinas (His) se utilizó el protocolo de purificación de proteínas solubles descrito por QIAGEN®. Los extractos proteicos totales libres de células fueron incubados junto a la resina de afinidad de Ni<sup>2+</sup>-NTA (Ácido Nitrilo-Tricloro-Acético)-Agarosa equilibrada previamente con la solución A (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM). Luego de 1 h de incubación a 4 °C con agitación suave, la resina fue empacada en forma de columna y seguidamente lavada con 20 volúmenes de la solución A. Posteriormente se realizó un lavado con 10 volúmenes de solución A suplementada con 20 mM imidazol y a continuación las proteínas unidas a la columna fueron eluidas usando un gradiente discontinuo creciente de imidazol (40, 80, 100, y 250 mM). Las fracciones eluidas fueron colectadas y la presencia de proteínas fue analizada mediante SDS-PAGE.

Las fracciones que contenían la proteína purificada fueron dializadas a 4°C frente a 100 volúmenes de soluciones de distinta composición. Para ello se utilizaron membranas de diálisis de corte 12 kDa pre-tratadas por ebullición durante una hora en agua destilada y EDTA 10 mM para remover las trazas de metales pesados.

Posteriormente, la preparación proteica fue alicuotada y utilizada sin congelar para ensayos de retardo en gel (EMSA).

#### **4.12. Purificación de la fracción de membranas de *E. coli***

Las cepas de *E. coli* y de *S. coelicolor* fueron cultivadas como se describió anteriormente. Las células fueron colectadas por centrifugación, lavadas con solución A (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 10 mM) y

resuspendidas en solución A suplementada con PMSF 0,5 mM. A continuación éstas fueron tratadas por sonicación durante 5 series de 10 s a 25% amplitud utilizando un VibraCell Ultrasonic Processor (Sonics & Materials, Inc.). El lisado fue primero clarificado por centrifugación a 15.000 x g durante 30 min, y luego ultracentrifugado a 120.000 x g durante 2 h para separar la fracción de membranas. El pellet de membranas fue lavado con Tris-HCl pH 7,5 20 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, PMSF 0,5 mM, y resuspendido en la misma solución.

#### **4.13. Dosaje de proteínas**

La concentración de proteínas fue determinada mediante el método descrito por Bradford utilizando como patrón una solución de albúmina sérica bovina (BSA) de concentración conocida [69].

#### **4.14. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida**

Los extractos proteicos y las proteínas purificadas se analizaron mediante electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando la celda Mini-gel PROTEAN III (BioRad®). La electroforesis se realizó únicamente con fines analíticos, en condiciones reductoras. Las muestras fueron incubadas en solución de siembra (glicerol 5%, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1%, azul de bromofenol 0,1 mg/ml) durante 3 min a 100 °C y posteriormente sembradas en el gel. Se utilizó un sistema discontinuo que consiste en un gel de concentración (poliacrilamida 4,5% en Tris-HCl 0,126 M, pH 6,8, SDS 0,26% p/v) seguido por un gel de separación (poliacrilamida 12% en Tris-HCl 0,36 M, pH 8,8, SDS 0,26% p/v [68]. Para la corrida electroforética, realizada a temperatura ambiente, se utilizó una solución amortiguadora de Tris 0,3% p/v, glicina 1,44% p/v y SDS 0,1% p/v y se aplicó una corriente constante de 30 mA por gel. En todos los casos, la relación acrilamida:bisacrilamida utilizada fue 30:1.

Luego de la electroforesis, para detectar proteínas totales los geles fueron fijados en ácido acético 10% v/v, teñidos con azul brillante de Coomassie R-250 durante 15 min y posteriormente desteñidos por ebullición en H<sub>2</sub>O destilada durante 10 min. Como marcadores de peso molecular se utilizaron: lisozima (14,4 kDa), inhibidor de

tripsina de soja (21,5 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), albúmina sérica bovina (66,2 kDa) y fosforilasa B (97,4 kDa).

#### **4.15. Transferencia e inmunodetección de proteínas (Western blot)**

Luego de la corrida por SDS-PAGE, se llevó a cabo la electrotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa. Para ello se utilizó una celda Mini-Trans-Blot transfer (BioRad®) y una solución de transferencia compuesta por 15,6 mM Tris-HCl, 120 mM glicina, 20% v/v metanol, pH 8,8 [68]. Se aplicó una corriente de 300 mA, a 4 °C durante al menos 1 h.

Para inmunodetectar proteínas fusionadas a His se empleó el protocolo sugerido por el fabricante de los anticuerpos anti-His (QIAGEN®). Después de la transferencia, las membranas se lavaron 2 veces durante 10 min en solución TBS (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl), y se incubaron durante 1 h con solución bloqueante (3% p/v BSA en TBS). Luego las membranas se lavaron durante 10 min, 2 veces más con TBS-Tween/Triton (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0,05% v/v Tween 20, 0,2% v/v Triton X-100), y 10 min más con TBS. Posteriormente se agregó el anticuerpo anti-His (dilución 1:3000 preparada en solución de bloqueo) y se incubó durante 1 h. A continuación, las membranas tratadas con anti-His fueron lavadas 2 veces durante 10 min con TBS-Tween/Triton y 10 min más con TBS. Luego fueron incubadas durante 1 h con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (BioRad, dilución 1:1500 preparada en solución de bloqueo) y a continuación lavadas 4 veces más con TBS-Tween/Triton, durante 10 min cada una. Finalmente se realizó un lavado con TBS y se reveló utilizando NBT y BCIP (Sigma Aldrich®), en solución 50 mM Tris-HCl pH 9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl hasta desarrollo de color.

#### **4.16. Ensayo de actividad catecol 2,3-dioxigenasa (CDO)**

Para medir fusiones reporteras transcripcionales se utilizaron los genes *xyITE*, que codifican para la enzima catecol 2,3-dioxigenasa (XylE), y para una proteína tipo ferredoxina que evita su inactivación por oxidación (XylT).

Las cepas que portan integradas las fusiones reporteras a *xyITE* se cultivaron en distintos medios de cultivos y se tomaron muestras a diferentes tiempos,

representativos de las distintas fases de crecimiento. Las muestras fueron centrifugadas a 5.000 x g durante 5 min, lavadas con una solución de 50 mM Tris-HCl pH 8 fría y guardadas a -20°C para su procesamiento.

La actividad catecol 2,3-dioxigenasa se midió como se describe en Kieser *et al.* [6]. Brevemente, cada una de las muestras guardadas fue resuspendida en solución amortiguadora fosfato 100 mM pH 7,5, EDTA 20 mM, acetona 10% v/v. La ruptura celular se realizó por sonicación, 4 series de 10 s a 20% de amplitud con 30 s de intervalo. Seguidamente, se agregó Tritón X-100 en una concentración final de 0,1% v/v, y se incubaron los tubos en hielo durante 15 min. Luego de centrifugar por 10 min a 5.000 x g a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford. A continuación, volúmenes definidos se agregaron a 500 µL de solución de ensayo (solución amortiguadora fosfato 10 mM pH 7,5, catecol 0,2 mM). Se midió el cambio en la absorbancia 375 nm ( $Abs_{375nm}$ ). Cada muestra se midió al menos por duplicado, verificando que el cambio de absorbancia observado respondiera de manera proporcional al volumen de extracto agregado, comprobando que el sustrato no fuera limitante de la reacción. La actividad se calculó a partir de la pendiente de la región lineal de la gráfica  $Abs_{375nm}$  vs. tiempo (min) y se refirió a la cantidad de proteína agregada mediante la siguiente fórmula:

$$mU_{esp} = 30,03 \times \frac{\Delta Abs_{375nm}}{\text{tiempo (min)}} \times \frac{1}{\mu g_{prot}}$$

#### **4.17. Manipulación de ADN**

##### **4.17.1. Extracción de ADN genómico de *S. coelicolor***

La extracción de ADN se realizó según el protocolo descrito por Kieser *et al.* [6], a partir de cultivos de 40 hs en medio TSB inoculado con  $10^7$  esporas/mL. Brevemente, se tomaron aproximadamente 250-500 µL de cultivo y se centrifugaron 5 min a 5.000 x g. Luego de un lavado con H<sub>2</sub>O destilada, las células se resuspendieron en 300 µL de solución de lisis (Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM, 5 mg/mL lisozima, 0,1 mg/mL RNasa) y se incubaron durante 30 min a 30 °C. Posteriormente, se agregaron 50 µL de SDS 10% p/v y se mezcló vigorosamente. Luego se adicionaron 85 µL de NaCl 5 M y se vortexeó durante 15 s. A continuación se agregaron 400 µL de fenol, se agitó vigorosamente

durante 30 s y se centrifugó a 5.000 x g durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregaron 400 µL de cloroformo. Nuevamente, se mezcló por agitación, se centrifugó y se tomó la fase acuosa. Para precipitar el ADN se agregaron 500 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó 10 min a 5.000 x g y se descartó la solución, dejando el ADN en el fondo del tubo. Luego se realizó un lavado con 1 mL de etanol 70% v/v, se dejó secar el pellet de ADN a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 h. Finalmente el ADN fue resuspendido en 100 µL de H<sub>2</sub>O destilada.

#### 4.17.2. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Los plásmidos utilizados fueron preparados mediante el kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification (Promega®), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 4.17.3. Tratamiento con enzimas de restricción, ADN ligasa y fosfatasa alcalina

Las condiciones generales para los tratamientos de ADN con enzimas de restricción y fosfatasa alcalina, y las reacciones de ligación con T4 ADN ligasa, fueron realizadas mediante los métodos convencionales descritos por Sambrook *et al.* [68] y a partir de las recomendaciones de los proveedores de cada una de las enzimas.

#### 4.17.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las secuencias genómicas de *S. coelicolor* fueron obtenidas del sitio “StrepDB - The Streptomyces Annotation Server” ([strepdb.streptomyces.org.uk](http://strepdb.streptomyces.org.uk)). Otras secuencias fueron obtenidas de la base de datos “GenBank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). A partir de las mismas se realizó el diseño de los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo las distintas reacciones de PCR. Se diseñaron los oligonucleótidos de manera de que hibriden en los extremos de la región a amplificar e incluyan sitios de restricción para el subclonado posterior del fragmento amplificado. Sus secuencias se detallan en la Tabla III.

Las reacciones de PCR de rutina consistieron en un volumen final de 25  $\mu$ l, conteniendo *Buffer Taq* ADN polimerasa 1X,  $MgCl_2$  2 mM, 20 pmoles de cada oligonucleótido, 1  $\mu$ l de ADN genómico obtenido por el método anteriormente descrito o 20 ng de ADN molde, 0,2 U de *Taq* ADN polimerasa y 0,025 mM de cada uno de los dNTPs (dCTP, dATP, dGTP, dTTP). Se completó el volumen restante con agua destilada. Para los casos en donde se necesitó una alta fidelidad (por ejemplo, amplificación de genes para su posterior expresión), se utilizó la enzima *Pfu* ADN polimerasa y el *buffer* correspondiente. Para la amplificación de ADN de alto contenido de GC fue necesaria la adición de DMSO 1-10%.

Las reacciones de amplificación respetaron el siguiente protocolo básico de amplificación, el cual se ajustó en cada caso particular según el tamaño del fragmento a amplificar y las secuencias de los cebadores. Después de una primera etapa de desnaturalización del ADN genómico a 94 °C durante 1 min, se programaron 30 ciclos de amplificación con los siguientes parámetros: desnaturalización a 94 °C por 30 s, hibridación a 52-60 °C por 30 s, y elongación a 72°C por 30-200 s. Para la extensión final de los fragmentos amplificados, la reacción fue continuada durante 5 min a 72°C, y fue terminada a 15 °C. La temperatura de hibridación se definió en base al par de cebadores utilizado. Los tiempos de elongación de la segunda etapa se calcularon en base a la velocidad de síntesis promedio de las ADN Polimerasas utilizadas (*Taq* ADN Polimerasa, 1.000 nt min<sup>-1</sup>; *Pfu* ADN Polimerasa, 500 nt min<sup>-1</sup>). Se utilizó un equipo MyCycler Thermal Cycler (BioRad®).

**Tabla III.** Cebadores utilizados en este trabajo de tesis

Nombre	Secuencia	Referencia
RTfabH_up	CAAGTTTCCTGCGATCACG	Esta tesis
RTfabH_dn	GGGATGAAGACGTCCAGGT	Esta tesis
RTacp_up	GCCGCCACTCAGGAAGAG	Esta tesis
RTacp_dn	CCAGGTCGTCGGTGAAGG	Esta tesis
RT2fabD_up	CGTACGTCTCCAACAAGGAC	Esta tesis
RT2fabD_dn	CTCCTTGAACGTCTCCATGC	Esta tesis
RT2fabF_up	TACGACGTGCTGAAGGAGA	Esta tesis

RT2fabF_dn	GGATCATCTCGATGGCGTAG	Esta tesis
RThrdB_L	CAAGGGCTACAAGTTCTCCA	Esta tesis
RThrdB_R	GTTGATGACCTCGACCATGT	Esta tesis
PfabD_up2	CTAGCGGCCGCGACGTGTGACTGAC	[65]
PfabD_dn	CGAGTTCTAGAACTCTCACACTCTC	[65]
PfabDmut_up	CCTAGCCTCCCCTCCTGTTCTTCGTCC	Esta tesis
PfabDmut_dn	GAACAGGAGCGGGAGGCTAGGACCCTGC	Esta tesis
fabD_dn	CTGGGCCACGGACGTGTCTCGGATCTCG	Esta tesis
EZR1	ATGCGCTCCATCAAGAAGAG	[67]
EZL2	TCCAGCTCGACCAGGATG	[67]
SCO1102_F	CCATATGCAGACGCCGCGGTCGAC	Esta tesis
SCO1102_R	TGGCCGAATTCTAGGGGGCGAAGGA	Esta tesis
SCO1753_F	CGATCATATGCGTACCGAACGGAAG	Esta tesis
SCO1753_R	CCCCGAATTCACCCGAACGACACC	Esta tesis
SCO6355_F	GGGTCAATGAAGCGCGGCGATGTC	Esta tesis
SCO6355_R	GTGAATTCGGGGACGGTGTGCGAAG	Esta tesis
P1102_F	GCGGCCGCGGACGGTGCTTGTGG	Esta tesis
P1102_R	ACTAGTGGGGGCGAAGGATGCGACC	Esta tesis
P1753_F	GCGGCCGCGGGGTCGCGCTCCTGGT	Esta tesis
P1753_R	ACTAGTACCCGAACGACACCCCCTG	Esta tesis
dgkA_F	AGGATCTGCCGAATAGACTTGCTT	Esta tesis
dgkA_R	AGCGCCTCAGATGTTCTTCAGCC	Esta tesis
fadE_F	CAAAAGCGAGAAGTACGGGCAGGTG	Esta tesis
fadE_R	GCTTTCGATTGATGGTAAAACGGTG	Esta tesis
araBAD_F	CTCGATTTTGGCAGTGATTCTGTGCGAGCTTTG GCGGTGGCTGTCAAACATGAGAATTAA	Esta tesis
araBAD_R	CCGTAATATGCCTTCGCGCCATGCTTACGCAGA TAGTGTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Esta tesis
ara_check_F	TAAACGAGTATCCCGGCAGCAGGGG	Esta tesis

ara_check_R	CGGGAATAAACGCCACGGACTCTTG	Esta tesis
araA_wt_F	AAGTGTATTACGGGTTTCGTCGCTA	Esta tesis
atfA_F	<u>CATATGCGCC</u> CATTACATCCGATTG	Esta tesis
atfA_R	<u>ACTAGTCCTTTAGTTTTATCTGATA</u>	Esta tesis
fadD_F	<u>GCTAGCAAGAAGGTTTGGCTTAACC</u>	Esta tesis
fadD_R	<u>ACTAGTCTCAGGCTTTATTGTCCAC</u>	Esta tesis
gpsA_F	<u>CATATGAGCAAGCCGGTCAAGGCGG</u>	Esta tesis
gpsA_R	<u>ACTAGTGCGGGTTGCGCGGGGGGTC</u>	Esta tesis
fadR_F	<u>CATATGGTCATTAAGGCGCAAAGCC</u>	Esta tesis
fadR_R	<u>ACTAGTATGGGAAATCTGTAAAAC</u>	Esta tesis
accB_F	<u>CATATGACCGTTTTGGATGAGGCGC</u>	Esta tesis
accB_R	<u>ACTAGTTC</u> ACTGCGGCGGGTTGCCG	Esta tesis
accE_F	<u>CATATGTCCCCTGCCGACATCCGCG</u>	Esta tesis
accE_R	<u>ACTAGTTCAGCGCCAGCTGTGCGGG</u>	Esta tesis

Los sitios de restricción se muestran subrayados. En negrita se destacan las secuencias complementarias al plásmido pKD13.

#### 4.17.5. Secuenciación de nucleótidos

Todos los fragmentos amplificados fueron clonados y posteriormente verificados por secuenciación de ADN. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas por el servicio “DNA Sequencing Facility” de la Universidad de Maine, Estados Unidos, sobre una muestra de ADN plasmídico obtenida utilizando el kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification (Promega®).

#### 4.17.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para la electroforesis de ADN los geles de agarosa se realizaron de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook *et al.* [68]. La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,9 y 2% p/v, según el tamaño de los fragmentos a separar. Los geles se prepararon en solución TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM) conteniendo bromuro de etidio 0,3 µg ml<sup>-1</sup>. La corrida electroforética se realizó en solución TAE a un voltaje constante de 90 V. Los fragmentos de ADN fueron visualizados mediante un

transiluminador de luz UV. Como marcador de peso molecular se utilizó el bacteriófago  $\lambda$  digerido con *Bst*EI.

#### 4.17.7. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Se emplearon los kits comerciales QIAquick (QIAGEN®), y GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences®), siguiendo las instrucciones de los respectivos fabricantes.

#### 4.17.8. Determinación de concentración de ADN en solución acuosa

Sobre una dilución adecuada de la muestra de ADN, se midió el valor de absorbancia a 260 nm. La concentración de ADN en solución se determinó empleando la relación  $Abs_{260nm} = 1$  para  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de ADN doble hebra.

### 4.18. Mutagénesis sitio dirigida del promotor $P_{fabD}$

Para la generación de la versión mutada del promotor  $P_{fabD}$  se utilizó la técnica de “Overlap extension PCR” [71]. Para ello, se realizaron dos amplificaciones independientes del promotor  $P_{fabD}$  utilizando por un lado el par de cebadores PfabD\_up2/PfabDmut\_dn, y por otro PfabDmut\_up/fabD\_dn. Estas PCR generaron fragmentos de 160 pb y 250 pb respectivamente. Los oligonucleótidos PfabDmut\_up/dn hibridan sobre la misma región alrededor de la primera repetición invertida (IR) y portan las mutaciones que se fijarán en el producto final. Luego, los productos de PCR fueron purificados por electroforesis en geles de agarosa y posterior extracción de ADN correspondiente, diluídos 1:10 y utilizados ambos como molde en una siguiente reacción de PCR. Para ello se diseñó una reacción de amplificación de 10 ciclos de desnaturalización, anillado y extensión de manera de hibridar las secuencias solapantes de ambos fragmentos de PCR y extender los extremos 3'OH de cada uno, generando un fragmento de ADN de 390 pb. A continuación se adicionaron los cebadores PfabD\_up2/PfabD\_dn y se sucedieron 30 ciclos de amplificación para generar un promotor de 223 pb con una de las secuencias IR mutada. Este fragmento fue purificado, ligado en un vector pCR-TOPO-Blunt y verificado por secuenciación.

### 4.19. Construcción de plásmidos

El plásmido pSC3 que porta la fusión reportera transcripcional de  $P_{fabDmut}$  a los genes *xyITE* fue construido de la siguiente manera: el fragmento  $P_{fabDmut}$  fue digerido con las enzimas *NotI* y *XbaI*, y los genes *xyITE* fueron extraídos como fragmentos *XbaI/BamHI* del plásmido pBR130; ambos fragmentos fueron ligados en los sitios *NotI* y *BamHI* del plásmido pRT802.

Los genes SCO1102 (*lpp $\alpha$* ), SCO1753 (*lpp $\beta$* ) y SCO6355 (*lpp $\gamma$* ) fueron amplificados por PCR utilizando los cebadores SCO1102\_F/R, SCO1753\_F/R y SCO6355\_F/R, clonados en el vector pCR-TOPO-Blunt y verificados por secuenciación. Los mismos fueron extraídos como fragmentos *NdeI/EcoRI* y clonados en los mismos sitios del plásmidos pET28a, generando los vectores pET28-Lpp $\alpha$ , pET28-Lpp $\beta$  y pET28-Lpp $\gamma$ , respectivamente.

Los plásmidos pBAD-Lpp $\alpha$ , pBAD-Lpp $\beta$  y pBAD-Lpp $\gamma$  se generaron por digestión *XbaI/HindIII* de los vectores pET28-Lpp $\alpha$ , pET28-Lpp $\beta$  y pET28-Lpp $\gamma$ , y su posterior ligación en los sitios *XbaI/HindIII* del vector pBAD33, respectivamente.

Para la expresión de estos genes en levaduras, los plásmidos p425-Lpp $\alpha$ , p425-Lpp $\beta$  y p425-Lpp $\gamma$  se generaron por digestión *XbaI/HindIII* de los vectores pET28-Lpp $\alpha$ , pET28-Lpp $\beta$  y pET28-Lpp $\gamma$ , y su posterior ligación en los sitios *SpeI/HindIII* del vector p425-GPD, respectivamente.

Para la sobre-expresión de estos genes en *S. coelicolor*, los plásmidos p285-Lpp $\alpha$  y p285-Lpp $\beta$  se generaron por digestión *XbaI/HindIII* de los vectores pET28-Lpp $\alpha$  y pET28-Lpp $\beta$ , y su posterior ligación en los sitios *SpeI/HindIII* del vector pTR285, respectivamente.

Para complementar la cepa SC\_1153, se generaron los plásmidos pRT802-Lpp $\alpha$  y pRT802-Lpp $\beta$ . Para ello se amplificaron los genes SCO1102 y SCO1753 junto a sus regiones promotoras utilizando los cebadores P1102\_F/R y P1753\_F/R. Estos fragmentos fueron clonados en pCR-TOPO-Blunt, verificados por secuenciación y clonados como insertos *NotI/SpeI* en los mismos sitios del vector pRT802, generando los plásmidos pRT802-Lpp $\alpha$  y pRT802-Lpp $\beta$ , respectivamente.

El plásmido pET28-0958-Lpp $\beta$  fue generado por ligación del fragmento *XbaI/HindIII* de pET28-Lpp $\beta$  en los sitios *SpeI/HindIII* del vector pTR257. El plásmido

pBAD-0958-Lpp $\beta$  fue generado por ligación del fragmento *Xba*I/*Hind*III de pET28-0958-Lpp $\beta$  en los sitios *Xba*I/*Hind*III del vector pBAD33.

El gen *atfA* (GenBank: 2879218) fue amplificado por PCR de ADN genómico de *Acinetobacter sp.* ADP1 utilizando los cebadores *atfA*\_F/R. Los genes *fadD* (GenBank: 8182496) y *fadR* (GenBank: 8181871) fueron amplificados por PCR desde ADN genómico de *E. coli* BL21 utilizando los cebadores *fadD*\_F/R y *fadR*\_F/R, respectivamente. Los genes *gpsA* (SCO5559), *accB* (SCO5535) y *accE* (SCO5536) fueron amplificados por PCR desde ADN genómico de *S. coelicolor* utilizando los cebadores *gpsA*\_F/R, *accB*\_F/R and *accE*\_F/R, respectivamente. Los fragmentos resultantes de las PCR fueron clonados en el vector pCR<sup>®</sup>-BluntII-TOPO y verificados por secuenciación. Las secuencias codificantes de *AtfA*, *FadR*, *GpsA*, *AccB*, *AccE* fueron clonadas en el vector pET28a como fragmentos *Nde*I/*Eco*RI, generando los plásmidos pET28-*AtfA*, pET28-*FadR*, pET28-*GpsA*, pET28-*AccB* and pET28-*AccE*, respectivamente. *fadD* fue clonado como fragmento *Nhe*I/*Eco*RI en el vector pET28a, generando el plásmido pET28-*FadD*.

El vector de expresión de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) de *S. coelicolor* fue generado de la siguiente manera: primero, el gen *accE* fue clonado como fragmento *Xba*I/*Hind*III en los sitios *Spe*I/*Hind*III del plásmido pCC01, generando el vector pET28-*AccA2*-*AccE*; luego el gen *accB* fue clonado como fragmento *Xba*I/*Hind*III en los sitios *Spe*I/*Hind*III del plásmido pET28-*AccA2*-*AccE*, generando el vector pET28-*AccA2*-*AccE*-*AccB* que porta las secuencias codificantes de las 3 subunidades del complejo ACC de *S. coelicolor*.

Los vectores derivados del pET28a que contienen las secuencias codificantes de *FadD*, *AccA2*-*AccE*-*AccB*, *FadR*, *GpsA* and SCO0958 fueron digeridos con las enzimas *Xba*I/*Hind*III y los fragmentos resultantes fueron clonados en los sitios *Spe*I/*Hind*III del plásmido pTR257, generando los vectores pET28-0958-*FadD*, pET28-0958-ACC, pET28-0958-*FadR*, pET28-0958-*GpsA* and pET28-0958-0958, respectivamente.

#### **4.20. Ensayo de retardo en gel (EMSA)**

En el ensayo de retardo en gel (EMSA, por electrophoretic mobility shift assay) se evaluó la capacidad de *FasR* de unirse al promotor  $P_{fabD}$ . Para ello se generaron sondas

radiactivas de 223 pb mediante PCR utilizando los cebadores PfabD\_up2/dn. Como molde para estas amplificaciones se utilizaron tanto la secuencia P<sub>fabD</sub> nativa como la P<sub>fabD</sub> mutada en IR (P<sub>fabDmut</sub>) generada por mutagénesis dirigida de ADN. En estas reacciones se utilizaron las condiciones estándar para taq ADN polimerasa, adicionando 10 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/mL, Perkin Elmer®) en la mezcla de reacción. Esto generó fragmentos de ADN marcados con <sup>32</sup>P, que fueron purificados y cuantificados por medio de un contador de centelleo líquido Wallac 1209 Rackbeta.

Las mezclas de unión se realizaron en un volumen final 25 µl, conteniendo 50 mM Tris pH 7,4, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,1% v/v Nonidet-P40 y 10% p/v Glicerol, 3.000 cpm de sonda de ADN radiactiva y cantidades variables (0-200 ng) de His-FasR. La incubación en estas condiciones fue de 20 min a 25 °C.

Los geles fueron preparados con una solución filtrada de acrilamida-bisacrilamida en relación 30:1, a una concentración de 6% p/v de poliacrilamida y 5% v/v glicerol (condiciones no desnaturalizantes), en TBE 0,5X pH 8 (Tris base 44,5 mM, Ácido Bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM). Se realizó una pre-corrída durante 2 h a 180 V con el fin de homogeneizar la temperatura del sistema. Las muestras fueron luego sembradas y la electroforesis se realizó a 4°C en TBE 0,5X pH 8, aplicando una diferencia de potencial constante de 180 V. Luego de la corrida electroforética los geles se secaron al vacío en Gel Dryer MODEL 583 (BioRad®) durante 50 min a 80 °C, y fueron revelados por autorradiografía utilizando un equipo Storm 840 (Amersham Biosciences®).

#### **4.21. Ensayos de protección frente a DNasa I**

Para estos ensayos se utilizó como sonda la región del promotor P<sub>fabD</sub>, amplificada por PCR utilizando los oligonucleótidos PfabD\_up2/PfabD\_dn. El cebador PfabD\_up2 fue marcado radiactivamente en su extremo 5' mediante la incubación a 37 °C durante 1 h en presencia de 3 µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-dATP (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/mL, PerkinElmer), la enzima T4 polinucleótido quinasa y el *buffer* suministrado por el fabricante (Promega®) en un volumen final de 20 µl.

Se incubó la sonda P<sub>fabD</sub> marcada radiactivamente (5.000 cpm) con diferentes cantidades de proteína FasR purificada, durante 20 min a temperatura ambiente en un

volumen final de 200  $\mu$ L de la solución de unión utilizada en los ensayos de EMSA. Luego, los fragmentos de ADN se digirieron parcialmente con DNasa I (Promega®) durante 4 min a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con el agregado 510  $\mu$ L de una solución de 20 mM EDTA pH 8,0, 200 mM NaCl, 100  $\mu$ g/mL ARN de levaduras (Ambion®) y 750  $\mu$ L de fenol:cloroformo (1:1). La precipitación del ADN se llevó a cabo adicionando 1 mL de etanol 100%, el pellet se lavó con etanol 70% v/v y se resuspendió en 5  $\mu$ L de una mezcla formamida-colorante de siembra. Luego las muestras fueron calentadas hasta desnaturalización (2 min a 94 °C) e inmediatamente colocadas en hielo. Los productos de digestión se resolvieron por electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 6% p/v (poliacrilamida:bisacrilamida 38:2, 48% (P/V) urea, TBE 1X). Reacciones de secuenciación apropiadas se sembraron junto a las reacciones de digestión y se utilizaron como marcador para la identificación de las secuencias protegidas. Los resultados se visualizaron y digitalizaron utilizando un equipo Storm 840 (Amersham Biosciences®).

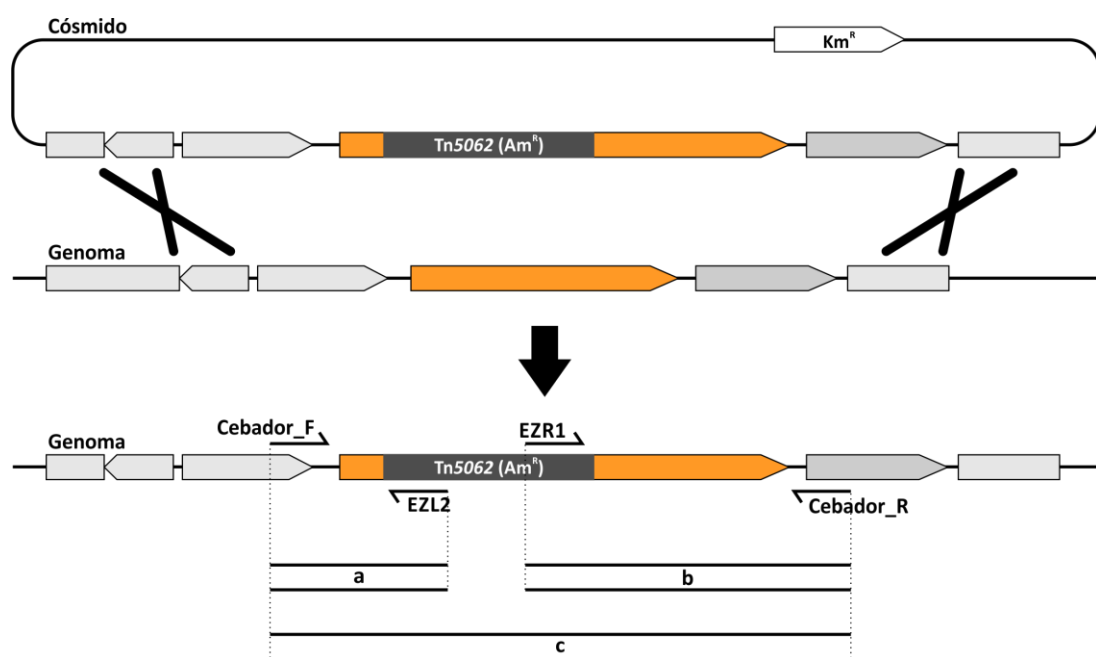
#### **4.22. Construcción de mutantes insercionales en *S. coelicolor***

Para la construcción de mutantes en *S. coelicolor* se utilizó una biblioteca de cósmidos mutantes por transposición construida por el grupo del Dr. Dyson en la Universidad de Swansea, Gales [67]. Esta biblioteca fue generada *in vitro* utilizando el transposón Tn5062 y los cósmidos construidos originalmente en el proyecto de secuenciación del genoma de *S. coelicolor* [67]. Cada uno de los cósmidos mutantes que constituyen esta biblioteca posee la inactivación por transposición de un único gen de *S. coelicolor* (Figura 6). Cada una de las inserciones del Tn5062 fue primero aislada en *E. coli* y luego mapeada mediante secuenciación del ADN. El Tn5062 posee un marcador de resistencia a apramicina (Am) y un origen de transferencia, *oriT* (RK2), que permite la movilización del cósmido dentro de *S. coelicolor* por medio de conjugación intergenérica con *E. coli*. De esta manera, utilizando los cósmidos 6A05.2.b04, 2SCI34.1.D02 y SC3A7.1.D12, por medio de experimentos de conjugación entre *E. coli*-*S. coelicolor*, se obtuvieron cepas mutantes en *lpp $\alpha$*  (SCO1102), *lpp $\beta$*  (SCO1753) y *lppy* (SCO6355). Brevemente, cada cósmido fue introducido en la cepa M145 por conjugación, seleccionando las exconjuntas resistentes a Am en placas de

SM. A continuación se evaluó la resistencia a kanamicina (Km) para cada de estas exconjugantes. El fenotipo Km<sup>S</sup> Am<sup>R</sup> indica el reemplazo de la copia salvaje del genoma por el alelo mutante presente en el cósmido a través de doble evento de recombinación (Figura 6). La confirmación del genotipo de las cepas mutantes se realizó mediante PCR a partir de ADN genómico de cada cepa mutante obtenida. Se utilizaron los pares de cebadores correspondientes a cada gen junto con oligonucleótidos EZR1 y EZL2, que hibridan dentro del transposón Tn5062 en direcciones opuestas y hacia afuera del mismo [67]. Se evaluó la ausencia de amplificación del gen de interés por medio de los oligonucleótidos específicos para cada uno, y la generación de amplicones entre los cebadores específicos y EZR1/EZL2, correspondientes a las inserciones del Tn5062 en dicho gen, como se detalla en el Figura 6.

Para la generación de mutantes dobles fue necesario obtener cósmidos mutantes con el marcador de resistencia a higromicina, de manera de que puedan ser

**Figura 6. Esquema del procedimiento de construcción de mutantes en *S. coelicolor*.** El alelo salvaje es reemplazado por una copia mutada presente en el cósmido suicida a través de un doble evento de recombinación. La confirmación del genotipo se realiza por medio de PCR, verificando la amplificación de los productos de tamaño esperado a y b. El fragmento c generalmente no puede observarse debido que el Tn5062 tiene un tamaño mayor a 4 Kb. Se corrobora además que el par de cebadores F/R no amplifique el fragmento correspondiente al alelo salvaje



utilizados en cepas que ya posean una inserción por Tn5062 y sean resistentes a Am. Para ello se transformó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ /pKD46, que expresa el sistema de recombinación del fago  $\lambda$  Red, con el cósmido Km<sup>R</sup> Am<sup>R</sup> [61]. Luego se digirió el plásmido pQM5066 con la enzima *PvuII*, liberando un fragmento que contiene el Tn5066 Hyg<sup>R</sup>, con el que se transformaron células electrocompetentes de la cepa conteniendo el cósmido Km<sup>R</sup> Am<sup>R</sup>, seleccionándose luego las transformantes Km<sup>R</sup> Hyg<sup>R</sup>. Al diferir sólo en el marcador de resistencia, la recombinasa Red es capaz de intercambiar el Tn5062 presente en el cósmido, por el Tn5066 a través de 2 eventos de recombinación homóloga. De esta manera se obtuvieron los cósmidos 6A05.2.b04-Hyg, 2SCI34.1.D02-Hyg y SC3A7.1.D12-Hyg.

#### **4.23. Generación de mutantes por delección en *E. coli***

La delección de los genes *dgkA* y *fadE* se llevó a cabo por transducción generalizada de cepas de la colección Keio que portan dichos genes reemplazados por un marcador de resistencia a Km, flanqueado por secuencias de reconocimiento para la recombinasa sitio-específica FLP (FRT, por *f*lippase *r*ecognition *t*arget) [55]. Brevemente, se realizaron lisados con fago P1 utilizando a las cepas dadoras como se describió previamente. La cepa BL21 fue transducida con un lisado de la cepa JW4002, que porta el alelo  $\Delta dgkA::Km$  y se seleccionaron las transductantes Km<sup>R</sup>. El reemplazo alélico fue verificado por PCR utilizando los cebadores *dgkA\_F/R*, generando la cepa MPS10. El marcador Km<sup>R</sup> fue luego removido por acción de la FLP recombinasa [61]. Para ello, la cepa MPS10 fue transformada con el plásmido pCP20 y, como su origen de replicación es termosensible, cultivada a 30 °C hasta aparición de colonias. El vector pCP20 posee la recombinasa FLP bajo el control de un promotor inducible por temperatura [62]. Entonces, una colonia fue estriada en placas de LB no selectivas, e incubadas por 16 hs a 42 °C, con el fin de inducir a la recombinasa y curar el plásmido termosensible. Luego, se verificó la delección por la pérdida de la resistencia a Km y por PCR utilizando los cebadores *dgkA\_F/R*, dando lugar a la cepa MPS11. Para la delección de *fadE*, la cepa MPS11 fue transducida con un lisado de JW5060, seleccionándose las transductantes resistentes a kanamicina. La delección se verificó por PCR utilizando los cebadores *fadE\_F/R* y por la pérdida de la capacidad de crecer en medio mínimo M9

con oleato como única fuente de carbono, dando lugar a la cepa MPS12. La remoción del marcador de Km se realizó como fue descrito previamente, verificando el genotipo por la pérdida de la resistencia a Km y de la capacidad de crecer con oleato como única fuente de carbono, y por PCR con los cebadores *fadE\_F/R*. Esto dio lugar a la cepa MPS13.

La delección de los genes *araBAD* en *E. coli* se generó por medio de la técnica “Inactivación de genes cromosomales en un paso” descrita por Datsenko y Wanner [61]. Para ello, se amplificó el marcador de resistencia a Km del plásmido pKD13 utilizando los cebadores *araBAD\_F/R*, cuyos extremos 5' presentan 40 pb de homología a las secuencias flanqueantes de la región a deleccionar (Tabla III). El fragmento correspondiente fue purificado y utilizado para electroporar a la cepa de *E. coli* MPS13 ( $\Delta dgkA \Delta fadE$ ) transformada con el plásmido pKD46, en la cual se encuentra inducida la recombinasa Red. Esta recombinasa cataliza el doble evento de recombinación entre las regiones de homología, reemplazando el operón salvaje por el marcador Km<sup>R</sup>. La delección fue verificada por PCR utilizando los pares de cebadores *ara\_check\_F/R* y *araA\_wt\_F/ara\_check\_R*; y por la pérdida de la capacidad de crecer en medio mínimo M9 con L-Arabinosa como única fuente de carbono.

#### **4.24. Manipulación de ARN**

##### **4.24.1. Extracción de ARN**

Un volumen de 3 ml de un cultivo en fase exponencial o estacionaria de crecimiento se centrifugó a 4.000 x g durante 10 min para bajar las células. Luego de descartar el sobrenadante, las mismas se resuspendieron en 100 µL de solución de lisis del kit SV total RNA isolation system (Promega®). A partir de este momento se trabajó en hielo. Todos los materiales utilizados fueron autoclavados 2 veces para disminuir la contaminación por RNasa.

Las células resuspendidas se lisaron mediante 5 pulsos de sonicación de 10 s a 25% de potencia con intervalos de enfriamiento de 30 s. El lisado se centrifugó a 12.000 x g durante 20 min y el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo.

A partir de este punto se continúa el protocolo de extracción proporcionado por el fabricante, que incluye una unión de ácidos nucleicos a una columna de afinidad, sucesivos lavados, digestión de ADN en columna, un lavado adicional y elución.

La cuantificación de las muestras de ARN se llevó a cabo a midiendo la  $Abs_{260nm}$ , teniendo en cuenta que un valor de 1 corresponde a una concentración de ARN de 40  $\mu\text{g/ml}$ . La pureza de las muestras fue analizada determinando la relación  $Abs_{260nm}/Abs_{280nm}$ .

La integridad y concentración del ARN fue examinada mediante electroforesis en geles de agarosa 2% p/v de la misma manera que para ADN. Las bandas correspondientes a los ARN ribosomales se visualizaron por fluorescencia en un transiluminador de luz ultravioleta.

#### 4.24.2. Síntesis de cADN

La síntesis del cADN se realizó incubando 2  $\mu\text{g}$  de ARN total con la enzima transcriptasa reversa Superscript III (Promega®) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se utilizaron 0,5  $\mu\text{g}$  de hexanucleótidos (dN6) al azar como cebadores de la reacción.

#### 4.25. Amplificación por PCR en tiempo real (RT-PCR)

La RT-PCR fue realizada en el equipo Mastercycler® ep realplex (Eppendorf®). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , el cual contenía *buffer* de reacción comercial (Life Technologies®) 1 X,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, mezcla equimolar de dNTPs 200  $\mu\text{M}$ , SYBR Green 0,5 X, ambos cebadores 0,5  $\mu\text{M}$ , 0,8 U de enzima Platinum® *Taq* DNA polimerasa (Life Technologies®) y 1  $\mu\text{l}$  de cADN molde. Las mezclas de reacción fueron sometidas, luego de una desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C, a 40 ciclos de desnaturalización (durante 15 s a 95 °C), anillado (15 s a 58 °C) y polimerización (20 s a 68 °C). Después del último ciclo se realizó una etapa de polimerización de 2 min a 72 °C. Los valores de corte (Ct) fueron determinados en función del umbral determinado por defecto por el equipo, éste se define como el punto al cual la fluorescencia sobrepasa considerablemente la fluorescencia de base. Para la cuantificación relativa se utilizó el método de Pfaffl, calculándose las eficiencias como

allí se indica [72]. Para ello se utilizó como molde ADN genómico de *S. coelicolor* M145 en el rango 0,5-30 ng/μl para todos los pares de cebadores.

La expresión de cada gen analizado se normalizó con la expresión del gen de referencia *hrdB*. Los pares de cebadores utilizados en este ensayo fueron RThrdB\_L/R, RT2fabD\_up/dn, RTfabH\_up/dn, RTacp\_up/dn, RT2fabF\_up/dn, para los genes *hrdB*, *fabD*, *fabH*, *acpP* y *fabF*, respectivamente.

#### **4.26. Análisis de lípidos por cromatografía en capa delgada (TLC)**

La extracción de lípidos totales de *S. coelicolor* se realizó a partir de células liofilizadas (2 mg) tratadas con cloroformo:metanol 2:1 [73]. Para *E. coli*, las células se colectaron por centrifugación y los lípidos se extrajeron utilizando el método de Bligh y Dyer [74]. Los extractos se secaron y se analizaron por cromatografía de capa delgada (TLC) en placas de sílica gel 60 F254 (0,2 mm Merck®). Para el análisis de DAG se utilizó un solvente de corrida compuesto por hexano:dietil éter:ácido acético 70:30:1, mientras que para el análisis de TAG se utilizó una proporción de 80:20:1. Las fracciones lipídicas fueron visualizadas por tinción con Cu-fosfórico o bien, en caso de estar marcadas radiactivamente, por autorradiografía en equipo Storm 840 (Amersham Biosciences®).

Para los análisis densitométricos, las imágenes fueron digitalizadas y analizadas a través del programa ImageJ v1.48.

#### **4.27. Determinación de actividad PAP**

Para determinar la actividad fosfatidato fosfatasa se utilizó dipalmitoil-fosfatidato (DPPA, Avanti Polar Lipids®) como sustrato, y el dipalmitoil-DAG generado fue medido por medio de espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS). Los ensayos de actividad PAP se desarrollaron en 100 μL de una solución conteniendo 25 mM Tris-HCl pH7,5, 2,5 mM Triton X-100 y 0,25 mM DPPA. La reacción se inició con el agregado de las fracciones de membrana, se desarrolló a 30 °C y se finalizó por la adición de 375 μL de metanol:cloroformo (2:1). La extracción lipídica se realizó por la subsecuente adición de 125 μL de cloroformo y 125 μL de agua destilada. La fase orgánica fue tomada, secada y resuspendida en 50 μL de cloroformo:metanol (1:4). 5

µL de estos extractos fueron inyectados y separados en una columna cromatográfica ZORBAX Eclipse XDB-C8 (3,0 x 50 mm, diámetro de partícula = 1,8 µm; Agilent®, USA) utilizando un sistema de solventes binario de metanol y agua, ambos suplementados con acetato de amonio 5 mM. El eluato de la cromatografía fue analizado por espectrometría de masa utilizando un equipo micrOTOF® (Bruker Daltonik®, Bremen, Germany) operando en modo positivo y adquiriendo datos en el rango de m/z de 300-1500. El producto de la reacción dipalmitoil-DAG fue detectado como la transición  $[M+NH_4]^+ \rightarrow [M-ROH]^+$  (m/z 586,5  $\rightarrow$  m/z 313,3). La curva de calibración fue realizada con dipalmitoil-DAG (Avanti Polar Lipids®), en las mismas condiciones que la reacción de actividad PAP.

Una unidad de actividad enzimática PAP fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de producto/min. La actividad específica fue definida como unidades/mg de proteína.

#### **4.28. Cuantificación de TAG a través de espectrometría de masa**

Para la cuantificación de TAG en *E. coli*, se extrajeron los lípidos totales de las células contenidas en 1 mL  $DO_{600nm} = 3$  (0,9 mg de peso seco), suplementadas con 10 µg de cetil palmitato utilizado como control interno. Los extractos lipídicos totales fueron solubilizados en 500 µL de cloroformo, 50 µL de los cuales fueron tomados y diluídos en un volumen igual de metanol. 5 µL de estos extractos diluídos en cloroformo:metanol (1:1) fueron inyectados y separados en una columna cromatográfica ZORBAX Eclipse XDB-C8 (3,0 x 50 mm, diámetro de partícula = 1,8 µm; Agilent®, USA) utilizando metanol suplementado con acetato de amonio 5 mM como fase móvil. El eluato de la cromatografía fue analizado por espectrometría de masa utilizando un equipo micrOTOF® (Bruker Daltonik®, Bremen, Germany) operando en modo positivo y adquiriendo datos en el rango de m/z de 300-1500. La curva de calibración fue realizada con tripalmitina (Avanti Polar Lipids®) suplementada con cetil palmitato como control interno. Los iones detectados fueron asociados a especies de TAG como se indica en la Tabla IV.

**Tabla IV.** Iones correspondientes a  $[M+NH_4]^+$  asociados a las diferentes especies de TAG detectados por espectrometría de masa.

Fórmula química	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> (m/z)	Peso molecular	Composición de ácidos grasos	Tiempo de retención (min)
C53H98O6	848,77	831,34	16:0/16:1/18:1	12,6
C55H102O6	876,80	859,39	16:0/18:1/18:1	16,4
C51H96O6	822,75	805,30	16:0/16:0/16:1	11,8
C53H100O6	850,79	833,36	16:0/16:0/18:1	15,3
C55H100O6	874,79	857,38	16:1/18:1/18:1	13,6
C51H94O6	820,74	803,29	16:0/16:1/16:1	9,9
C57H104O6	902,82	885,43	18:1/18:1/18:1	17,6
C49H92O6	794,72	777,25	16:0/16:1/14:0	9,2
C53H96O6	846,75	829,33	16:1/16:1/18:1	10,5
C57H106O6	904,83	887,45	18:1/18:1/18:0	12,7
C51H98O6	824,77	807,32	16:0/16:0/16:0	14,5
C55H104O6	878,82	861,41	16:0/18:1/18:0	15,2
C49H90O6	792,71	775,24	16:1/16:1/14:0	7,8
C49H94O6	796,74	779,27	16:0/16:0/14:0	11,0
C47H88O6	766,69	749,20	16:0/16:1/12:0	7,3
C51H92O6	818,72	801,27	16:1/16:1/16:1	8,4
C47H90O6	768,71	751,22	16:0/16:0/12:0	8,6
C47H86O6	764,68	747,18	16:1/16:1/12:0	6,2
C45H84O6	738,66	721,15	16:1/14:0/12:0	5,8
C45H86O6	740,68	723,16	14:0/14:0/14:0	6,8

#### **4.29. Cultivos de *E. coli* en batch alimentado**

Los cultivos de *E. coli* en *batch* alimentado fueron llevados a cabo en un biorreactor BioFLO 110 de 2 L de capacidad (New Brunswick Scientific®) conteniendo 0,9 L de medio mínimo mineral descrito anteriormente. Luego de su esterilización, se adicionaron los antibióticos Km y Cm, 20 g de glucosa, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 1,5 mL de solución de elementos traza. La temperatura, pH y oxígeno disuelto fue monitoreado constantemente usando sondas específicas (Mettler-Toledo®). La temperatura fue mantenida a 37 o 23 °C dependiendo de la fase del cultivo, utilizando una camisa

calefactora o agua de refrigeración a 10 °C. El pH fue mantenido a  $7,0 \pm 0,1$  mediante la adición de 15% v/v  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Cuando la concentración de amonio superó los 200 mM en cultivo, la solución de 15% v/v  $\text{NH}_4\text{OH}$  fue reemplazada por 5M NaOH. La agitación fue fijada a 700 rpm, y como fuente de oxígeno se alternó entre aire comprimido u oxígeno puro a fin de mantener el nivel de saturación de oxígeno por encima del 40%. La formación de espuma fue controlada por la adición periódica de Antifoam A (Sigma Aldrich®). La concentración de glucosa y amonio en sobrenadante fue medida a través de kits enzimáticos (Wiener Lab®, códigos 1400101 y 1810050, respectivamente). La inoculación fue llevada a cabo a 37 °C con 100 mL de cultivo de la cepa MPS13/pET28-0958-ACC/pBAD-Lpp $\beta$  a una  $\text{DO}_{600\text{nm}}=2$ . Cuando la glucosa del medio de cultivo fue depletada -a aproximadamente 12 h de cultivo,  $\text{DO}_{600\text{nm}}\approx 20$ - se comenzó con la alimentación continua de la fuente de carbono a un flujo de 0,2 mL/min. Cuando el cultivo alcanzó  $\text{DO}_{600\text{nm}}=60$ , la temperatura fue disminuída a 23 °C, el flujo de alimentación de fuente de carbono fue cambiado a 0,1 mL/min y la producción de proteínas heterólogas fue inducida por el agregado de IPTG 1 mM y L-Arabinosa 0,1% p/v. El cultivo fue mantenido en estas condiciones hasta las 68,5 h aprox., momento en el cual el consumo de glucosa disminuye marcadamente. Se colectaron y guardaron muestras periódicamente para ser luego analizadas en cuanto al contenido de TAG.

#### **4.30. Métodos bioinformáticos**

Los alineamientos de secuencias fueron realizados a través del programa ClustalW [75]. La búsqueda de homología de secuencias se realizó utilizando las herramientas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y “FASTA” (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fast/>) [76, 77]. La predicción de topología de membrana se realizó utilizando el algoritmo MEMSAT-SVM dentro del sitio Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) [78]. Los análisis de dominios conservados se realizaron a través de las herramientas “Conserved Domain Database” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) y “Pfam” (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

Para la construcción del árbol filogenético las secuencias proteicas de las diferentes PAPs fueron alineadas en el programa SeaView por medio del algoritmo

MUSCLE [79]. A continuación fueron curadas fijando los sitios activos como sitios no variables (sitios donde evolutivamente no se acumulan mutaciones), eliminando los gaps y dejando las posiciones variables que tienen injerencia como cronómetros evolutivos. El árbol filogenético fue construido a partir de las secuencias nucleotídicas que corresponden a las secuencias curadas anteriormente, calculando 100 replicados iterativos.

Para el diseño de cebadores de RT-PCR se utilizó la herramienta Primer3Plus [80].

## 5. Objetivos

Como objetivo general de este trabajo de tesis nos propusimos identificar y caracterizar los mecanismos genéticos y bioquímicos que regulan la síntesis de ácidos grasos y lípidos de reserva en *Streptomyces coelicolor*, e identificar las señales metabólicas que mantienen la homeostasis lipídica, coordinando la síntesis de ácidos grasos con la síntesis de fosfolípidos de membrana, de TAG y de compuestos policétidos. Con la información obtenida a partir de estos estudios básicos el segundo objetivo general fue reconstituir la vía de síntesis de TAG en la bacteria no oleaginosa *E. coli*, como prueba de concepto acerca de la funcionalidad de los genes caracterizados en la vía de síntesis de triglicéridos en *S. coelicolor*. Por último se analizó la viabilidad de *E. coli* como futura plataforma de biosíntesis de lípidos neutros aptos para la producción de biocombustibles.

## 6. CAPÍTULO I

### Caracterización de FasR, un activador transcripcional de la síntesis de ácidos grasos en *S. coelicolor*

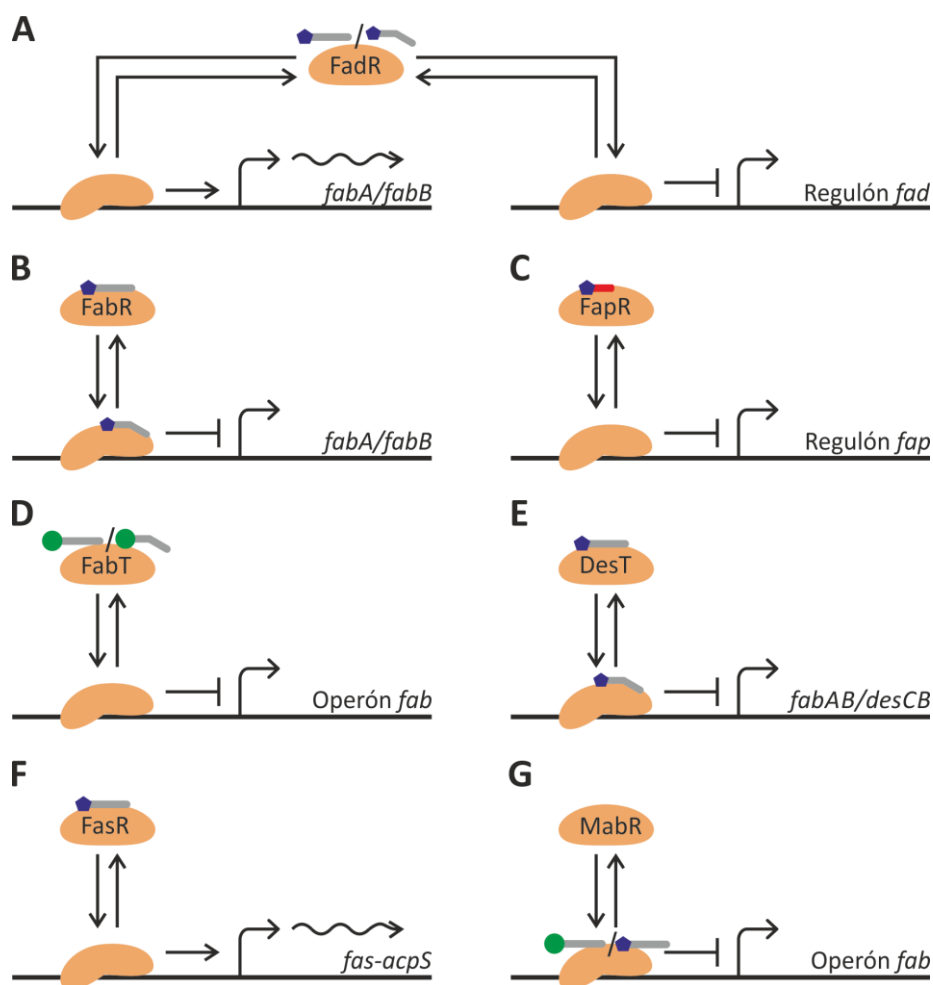
#### 6.1. Introducción: Regulación de la síntesis de ácidos grasos en bacterias

Los ácidos grasos presentes en los fosfolípidos determinan en gran parte las propiedades físicas de la membrana celular, como el espesor, la permeabilidad y la fluidez de la misma [81]. Estas características de la bicapa lipídica influyen directamente en las funciones asociadas a la misma, como ser la difusión pasiva de moléculas hidrofóbicas, el transporte activo de solutos en general y las interacciones de las proteínas embebidas en la membrana citoplasmática [81]. Es por esto que las bacterias para subsistir deben ser capaces de alterar la composición de los fosfolípidos ante cambios en las condiciones ambientales, con el fin de garantizar la fluidez óptima de la membrana [26, 28, 35]. Además de ser componentes esenciales de estas estructuras, los ácidos grasos son una importante fuente de energía metabólica y moléculas efectoras que regulan el metabolismo celular [82, 83]. La biosíntesis de estos compuestos es uno de los procesos más costosos para la célula desde el punto de vista energético, y por lo tanto su síntesis está regulada en forma estricta de manera de coordinarla con el crecimiento celular y con la disponibilidad de ácidos grasos exógenos [81, 83-85].

Debido al rol esencial que tienen los ácidos grasos, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos que le permiten controlar finamente el proceso de biosíntesis de los mismos, de manera de poder mantener una membrana estable y funcional [28, 81]. Esta regulación puede ejercerse a nivel bioquímico como se ha descrito en *E. coli*, donde la enzima acetil-CoA carboxilasa es inhibida por acil-ACPs de entre 6 y 20 unidades de carbono y, de forma similar, las enzimas FabH y FabI son inhibidas por acil-ACPs de cadena larga [85-88]. De esta manera, la célula ajusta de manera rápida la tasa de síntesis de ácidos grasos de acuerdo a la disponibilidad de intermediarios y productos de la vía a través de un mecanismo de retroalimentación negativa.

La regulación a nivel transcripcional complementa el esquema regulatorio de la síntesis de ácidos grasos utilizando reguladores transcripcionales capaces de sensar los niveles de sustratos, intermediarios o productos de la vía y ajustar de manera acorde la expresión de los genes de esta ruta metabólica (Figura 7). Los reguladores

**Figura 7. Regulación transcripcional de la síntesis de ácidos grasos en bacterias.** **A.** En ausencia de acil-CoAs de cadena larga, FadR de *E. coli* activa la expresión de los genes *fabA* y *fabB*, y reprime a los genes del regulón *fad*. **B.** FabR de *E. coli* es capaz de reprimir la transcripción de los genes *fadA* y *fadB* en presencia de acil-CoAs insaturados. Los acil-CoAs saturados son antagonistas de esta interacción. **C.** En *B. subtilis* FapR reprime a los genes del regulón *fap* ante un incremento en los niveles de malonil-CoA. **D.** FabT de *S. pneumoniae* reprime la expresión de los genes del operón *fab* en ausencia de acil-ACPs de cadena larga. **E.** DesT es capaz de sensar la composición de los acil-CoA en *P. aeruginosa*, reprimiendo la expresión de los genes *fadAB* y *desCB* ante un incremento en la abundancia de acil-CoA insaturados. **F.** FasR de *M. tuberculosis* es capaz de activar la expresión del operón *fas-ACP* en ausencia de acil-CoAs de cadena larga. **G.** MabR, en cambio, regula la expresión del operón *fab* en *M. tuberculosis*, siendo los acil-CoA/ACP de cadena larga los ligandos que aumentan su afinidad por el ADN.



caracterizados con mayor detalle son FadR y FabR de *E. coli*. FadR es un factor transcripcional que cumple un rol dual en el metabolismo de ácidos grasos. El mismo es capaz de reprimir la expresión de los genes involucrados en la degradación de ácidos grasos -transporte, activación y  $\beta$ -oxidación- y de activar la transcripción de los genes *fabA*, *fabB* y *fabHMG* [84, 89, 90]. En presencia de acil-CoAs de cadena larga (C12-C18), FadR disminuye su afinidad por sus secuencias de ADN operadoras, permitiendo la expresión de los genes involucrados en la degradación de ácidos grasos y disminuyendo la expresión de los genes biosintéticos *fabA*, *fabB* y *fabHMG* [84, 89, 90] (Figura 7.A). De esta manera, FadR permite optimizar el metabolismo en respuesta a la disponibilidad de ácidos grasos exógenos. Por otro lado, FabR es un regulador que controla la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados a través de la represión transcripcional de los genes *fabA* y *fabB* involucrados en la síntesis de ácidos grasos insaturados (Figura 7.B). Se ha demostrado *in vitro* que la afinidad de FabR por el ADN aumenta en presencia de acil-ACPs y acil-CoA insaturados, ajustando entonces la expresión de sus genes blanco de acuerdo a la concentración de estos metabolitos [83]. Sin embargo, experimentos realizados posteriormente indican que serían los acil-CoA insaturados, y no los tioésteres de ACP, los efectores *in vivo* de este regulador [91]. De esta manera, FabR estaría sensando la composición de acil-CoA intracelular y ajustaría, en forma concertada con FadR, la composición de los mismos.

En *Pseudomonas aeruginosa*, DesT es un factor transcripcional que regula la expresión de los operones *fadAB* y *desCB*, implicados en la biosíntesis de ácidos grasos insaturados [81, 92]. *desCB* codifica para una acil-CoA  $\Delta 9$ -desaturasa, que cataliza la formación de una insaturación *cis* en la posición 9 de un acil-CoA saturado de 16 o 18 átomos de carbono, mientras que los genes *fadA* y *fadB* estarían involucrados en su síntesis *de novo*, en forma análoga a lo que ocurre en *E. coli* [81]. La presencia de acil-CoAs insaturados estabilizan la unión de DesT con sus secuencias operadoras, reprimiendo la expresión de los genes blanco (Figura 7.E) [93]. Por el contrario, los acil-CoAs saturados, promueven la disociación del complejo DesT:ADN y permiten la expresión de los genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos insaturados (Figura 7.E) [93]. De esta manera, DesT ajusta los niveles de biosíntesis de ácidos grasos

insaturados de acuerdo a la composición de los ácidos grasos exógenos que son internalizados como sus respectivos tioésteres de CoA [92, 93].

En *Streptococcus pneumoniae* los genes que codifican para las enzimas del sistema FAS II se encuentran agrupados en el genoma, junto con las subunidades de la acetil-CoA carboxilasa y el regulador transcripcional FabT, formando el clúster de genes *fab* (Figura 7.D) [29, 31]. Esta proteína actúa como represor de todos estos genes excepto del gen que codifica para FabM, una *trans*-2-enoil-ACP isomerasa esencial para la biosíntesis de ácidos grasos insaturados [29]. Los acil-ACP de cadena larga, tanto saturados como insaturados, son capaces de aumentar la afinidad de FabT por el ADN y de esta manera regulan la expresión del clúster *fab* de acuerdo a la disponibilidad de los productos de la vía (Figura 7.D) [94]. Recientemente se ha identificado un regulador homólogo en *Lactococcus lactis*, denominado también FabT, que es capaz de reprimir la expresión del clúster *fab* y de los genes *fabZ1* y *fabI*. Sin embargo no se han caracterizado aún las moléculas efectoras del mismo [95].

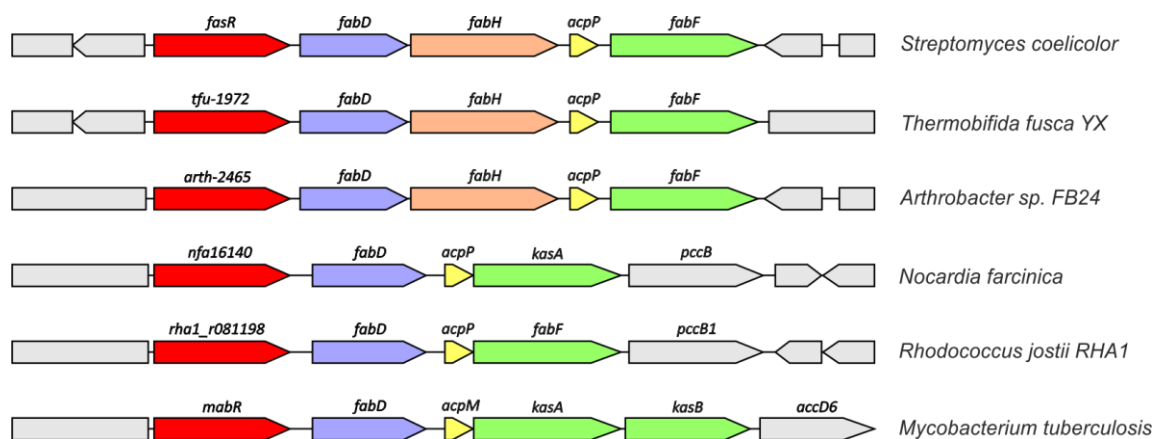
En *B. subtilis*, el paradigma de regulación es completamente diferente a los anteriores. En este organismo, FapR actúa como un represor global de la síntesis de ácidos grasos y fosfolípidos, y su unión al ADN está modulada por malonil-CoA, un sustrato clave en la síntesis de ácidos grasos (Figura 7.C) [82, 96, 97]. El malonil-CoA se une directa y específicamente al dímero FapR, provocando un cambio conformacional que disminuye la afinidad del mismo por sus secuencias operadoras (Figura 7.C) [82, 96]. En este sentido, se ha hipotetizado que podría existir una regulación bioquímica de la enzima ACC en forma análoga a lo que ocurre en *E. coli* [97]. Así, un exceso de acil-ACPs sería capaz de inhibir a la actividad ACC, disminuyendo los niveles de malonil-CoA y entonces permitiendo que FapR reprima la expresión de sus promotores blanco [97].

Al momento de iniciado este trabajo de tesis, no se había caracterizado ningún regulador de la síntesis de ácidos grasos en actinomicetes. En el año 2010 se publicó la identificación de FasR, un factor transcripcional de la síntesis de ácidos grasos en *Corynebacterium glutamicum* [98]. El mismo es capaz de reprimir la expresión de los genes *fasA* y *fasB*, que codifican para una sintasa de ácidos grasos tipo I, y de *accBC* y *accD1*, que codifican para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la acetil-CoA carboxilasa esencial en

este organismo [98]. Sin embargo, el ligando que modula su acción es desconocido, y no existe un modelo claro de regulación de síntesis de ácidos grasos en este organismo [39, 98]. En los últimos años, sin embargo, se ha logrado un importante avance en el entendimiento de la regulación de la síntesis de ácidos grasos en micobacterias. Este género bacteriano presenta la particularidad de poseer dos tipos de sintasas de ácidos grasos: de tipo I y de tipo II [39]. La primera se encarga mayormente de suplir ácidos grasos para la síntesis de fosfolípidos de membrana y triglicéridos; mientras que ambas actuarían en forma concertada en la síntesis de los ácidos micólicos [39]. En este organismo se ha caracterizado al regulador MabR, un represor de los genes de la sintasa de ácidos grasos de tipo II, en el cual los acil-CoA y acil-ACP de cadena larga (C $\geq$ 20) aumentan su afinidad por el ADN (Figura 7.G) [99]. Posteriormente en este organismo se caracterizó FasR, un activador transcripcional del operón *fas-acpS*, que codifica para la sintasa de ácidos grasos de tipo I y la enzima 4-fosfopantoteinil transferasa. En este caso los acil-CoA de cadena larga, productos de la enzima Fas, inhiben la formación del complejo FasR:P<sub>fas</sub> (Figura 7.F) [100].

En *S. coelicolor* los genes *fabD-fabH-acpP-fabF* se encuentran agrupados formando el operón *fab* [36]. Corriente arriba de este operón se encuentra codificado un marco abierto de lectura de 1206 pb, anotado como SCO2386 y denominado por nuestro grupo de trabajo como *fasR* (Figura 8). El análisis bioinformático de esta región

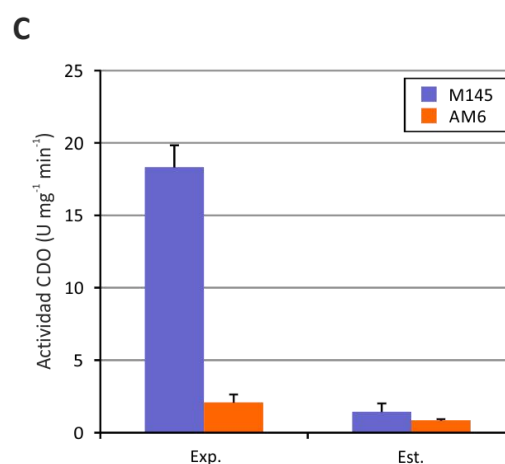
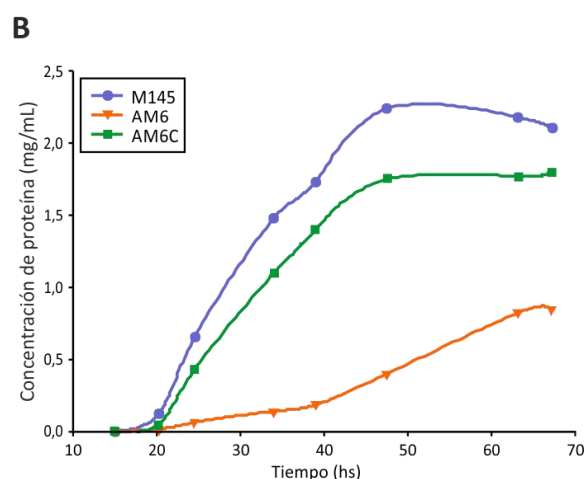
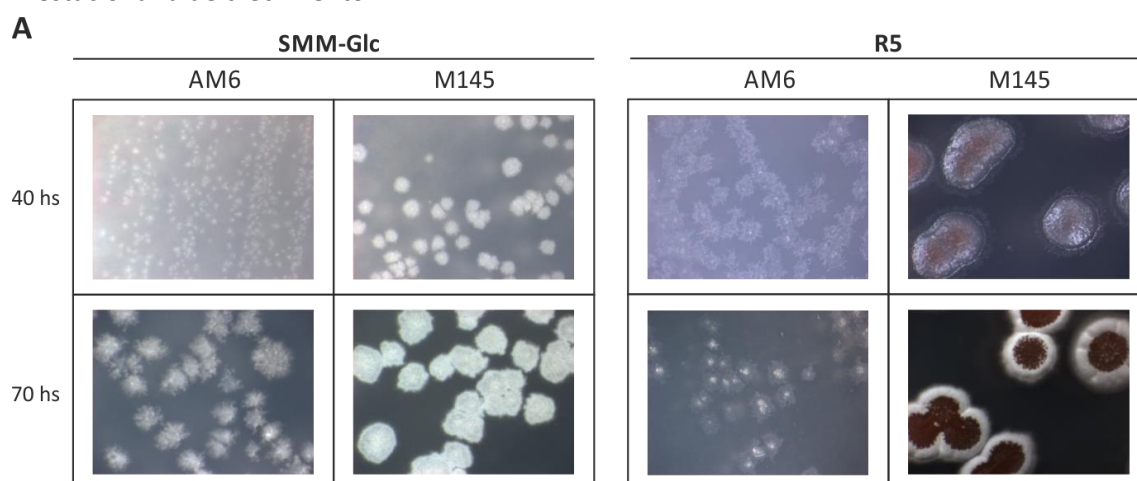
**Figura 8. Alineamiento de secuencia del operón *fab* en distintos actinomicetes.** Corriente arriba del operón *fab* de distintos actinomicetes se puede observar un marco abierto de lectura conservado correspondiente al regulador transcripcional FasR y sus ortólogos. Las secuencias que presentan alto grado de similitud se muestran del mismo color.



indica que tanto su secuencia como su localización genómica respecto al operón *fab* se encuentran conservados en distintas especies de actinomicetes (Figura 8). *fasR* codificaría para una proteína de 401 aminoácidos, de peso molecular 42,74 kDa que en su región C-terminal presenta homología significativa al dominio de unión al ADN de tipo hélice-giro-hélice [56].

Para evaluar el rol fisiológico de esta proteína en *S. coelicolor*, previo a este trabajo de tesis se construyó una cepa mutante en el gen *fasR* por inserción del transposón Tn5062. Esta inserción interrumpe la traducción de la proteína a partir del

**Figura 9. Características fenotípicas de la cepa AM6, mutante en el gen *fasR*.** **A.** El crecimiento y la diferenciación morfológica de la cepa AM6 en medio sólido se ven severamente afectados respecto a la cepa salvaje M145. **B.** El crecimiento en medio líquido también se ve afectado significativamente en la cepa AM6. La expresión en *trans* de FasR bajo su propio promotor es capaz de complementar este fenotipo (AM6C). **C.** La expresión del operón *fab* medida a través de fusiones reporteras transcripcionales disminuye notablemente en la cepa AM6, respecto a la cepa salvaje. Exp, fase exponencial; Est, fase estacionaria de crecimiento



aminoácido 34, generando un polipéptido quimérico de 49 aminoácidos. Esta cepa, denominada AM6, presentó un marcado defecto en el crecimiento, tanto en medio sólido como líquido, así como también un retraso en el inicio de la esporulación y de la producción de antibióticos en medio sólido (Figura 9). Además, en esta cepa se observó una disminución del 64% en la actividad FAS II presente en extractos proteicos libres de células. Estos fenotipos pudieron ser complementados con la inserción de una copia en *trans* de *fasR* bajo su propio promotor (Figura 9) [65, 101].

La transcripción del operón *fab* se produce a partir del promotor  $P_{fabD}$ , cuyo sitio de inicio de la transcripción coincide con el codón de inicio de la traducción del primer gen del operón, *fabD* [36]. Con el fin de evaluar el efecto que la mutación en *fasR* tiene sobre la expresión del operón *fab*, se construyó una fusión reportera transcripcional de la región comprendida entre las posiciones -210 y +13 respecto del inicio de la transcripción, a la enzima catecol 2,3-dioxigenasa (CDO). Esta enzima está codificada por los genes *xylTE* y cataliza la oxigenación del sustrato catecol generando un producto que puede detectarse espectrofotométricamente a una longitud de onda de 375 nm. La medición de la actividad CDO en la cepa salvaje reveló que la transcripción a partir de este promotor es máxima en la fase exponencial de crecimiento y disminuye en la fase estacionaria, mientras que en la cepa AM6 la expresión es 10 veces menor en ambas fases de crecimiento (Figura 9). Este comportamiento se reportó en cultivos tanto en medio mínimo (SMMS-Glc) como en medio rico (YEME). En conjunto, estos resultados preliminares sugerían fuertemente que FasR actúa como un activador transcripcional de los genes del operón *fab* (Figura 9) [65, 101].

## **6.2. Objetivos particulares**

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos continuar con la caracterización de FasR, un regulador que estaría involucrado en la regulación transcripcional del operón *fab* de *S. coelicolor*. Para ello, nos trazamos los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el rol fisiológico de FasR a través de la caracterización de la cepa AM6, mutante nula en *fasR*.

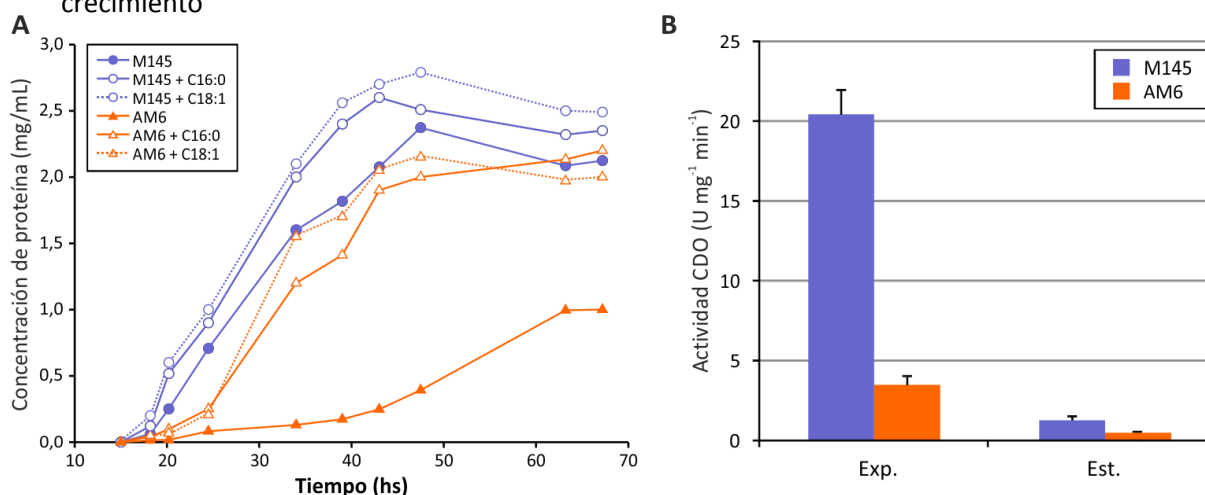
- Identificar y analizar a nivel molecular la interacción del regulador transcripcional FasR con su región operadora en el ADN.
- Elucidar la identidad del ligando que modularía la actividad de FasR.

### 6.3. Resultados

#### 6.3.1. La suplementación con ácidos grasos revierte la deficiencia en la velocidad de crecimiento de la cepa mutante en *fasR*

Como se mencionó en los resultados preliminares, una característica fenotípica de la cepa AM6 es la marcada disminución de la velocidad de crecimiento respecto a la cepa salvaje M145, independientemente del medio de cultivo utilizado. En estudios previos de nuestro laboratorio se demostró que una cepa mutante condicional en el complejo esencial acetil-CoA carboxilasa (ACC) puede crecer en condiciones no permisivas cuando el medio de cultivo es suplementado con ácido oleico [102]. Teniendo en cuenta que el complejo ACC provee el malonil-CoA necesario para la síntesis *de novo* de ácidos grasos (AG), este resultado demuestra que los AG presentes en el medio de cultivo pueden complementar la deficiencia en la biosíntesis de los mismos causada por la depleción de la enzima ACC en condiciones *a priori* no

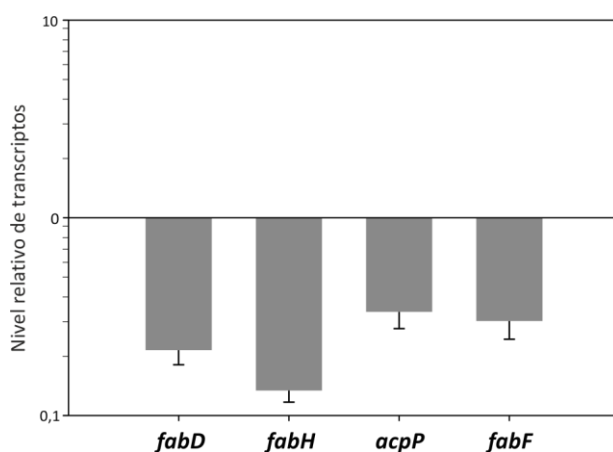
**Figura 10. Complementación del crecimiento de la cepa AM6 por medio del agregado de ácidos grasos.** **A.** La adición de ácido oleico o palmítico al medio de cultivo YEME es capaz de complementar el déficit de crecimiento observado en la cepa AM6. **B.** En estas condiciones la expresión del operón *fab* en la cepa AM6 es significativamente menor que en la cepa salvaje, indicando que la mejora en el crecimiento no se debe a un cambio en el perfil transcripcional de este operón. Exp, fase exponencial; Est, fase estacionaria de crecimiento



permisivas para el crecimiento. De esta manera, y considerando que el defecto de crecimiento de la cepa AM6 podría estar relacionado con una disminución en la síntesis de ácidos grasos, decidimos evaluar si el mismo podría ser revertido a través del agregado de AG al medio de cultivo. Como puede observarse en la Figura 10, el crecimiento de la cepa AM6 en medio de cultivo rico YEME es muy pobre. Sin embargo, la suplementación de este medio con 0,01% p/v de ácido palmítico (16:0) o ácido oleico (18:1) es capaz de restaurar la velocidad de crecimiento de la cepa AM6 hasta niveles comparables a los de la cepa salvaje M145 (Figura 10.A). Cabe destacar que la relación entre la expresión del operon *fab* en la cepa salvaje y la cepa mutante en *fasR* fue la misma en cultivos con y sin suplementación de ácidos grasos (Figura 10.B). Estos resultados demuestran que la complementación del crecimiento observada en la cepa AM6 no se debe a cambios a nivel transcripcional de la expresión del operón *fab*, sino que estaría relacionada con la capacidad de estos lípidos de ingresar al metabolismo para suplir la deficiencia en la síntesis *de novo* de ácidos grasos.

### 6.3.2. FasR es un activador transcripcional de los genes *fabD-fabH-acpP-fabF*

El uso de fusiones reporteras transcripcionales permite inferir el nivel de expresión de un determinado promotor a través de la cuantificación de una actividad enzimática. Para ello se utiliza un constructo quimérico de ADN compuesto por la secuencia promotora y el gen que codifica para una enzima con una actividad en principio no detectable en las células en las que se va a ensayar. En el presente

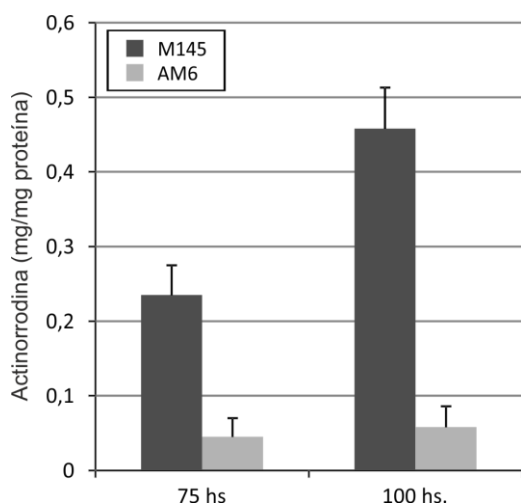


**Figura 11. Cuantificación relativa de ARNm de los genes *fabD-fabH-acpP-fabF*.** Los niveles de los transcritos de los cuatro genes del operón *fab* disminuyen notablemente en el contexto genético mutante en *fasR*, respecto al salvaje.

estudio, esta estrategia permitió evaluar la expresión del promotor que se encuentra corriente arriba del operón *fab*,  $P_{fabD}$ , pero no los cambios en cada uno de los genes que componen este arreglo policistrónico. Entonces, para determinar los niveles transcripcionales de todos los genes del operón *fab* (*fabD-fabH-ACP-fabF*), se procedió a cuantificar los niveles relativos de mRNA en la cepa AM6 respecto a la cepa salvaje, mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Para ello se realizaron cultivos de ambas cepas en medio líquido YEME suplementado con ácido palmítico 0,01% p/v, se extrajo el ARN total en fase exponencial de crecimiento, y luego se generó el ADN copia (cADN) por transcripción reversa. Utilizando pares de cebadores específicos para cada gen del operón *fab* se realizaron ensayos de PCR en tiempo real. Como gen de referencia se utilizó el gen *hrdB*, que codifica para el factor sigma vegetativo de *S. coelicolor*. En la Figura 11 se observa el cambio relativo en los transcritos para cada gen en la cepa mutante en *fasR*, respecto de la cepa salvaje. Como puede observarse, la cepa AM6 presenta una marcada disminución en el nivel de transcritos de todos los genes que componen el operón *fab*, confirmando entonces el rol de FasR como activador transcripcional de todos los genes del operón *fabD-fabH-ACP-fabF*.

### 6.3.3. La mutación en *fasR* disminuye la producción de actinorrodina

En *S. coelicolor* la síntesis de ácidos grasos y la de compuestos policétidos se encuentran estrechamente relacionadas ya que comparten un precursor común: el malonil-CoA. Si bien la sintasa de ácidos grasos y la policétido sintasa Act poseen proteínas ACP independientes y específicas de cada ruta (denominadas  $ACP_{fab}$  y  $ACP_{act}$ ,



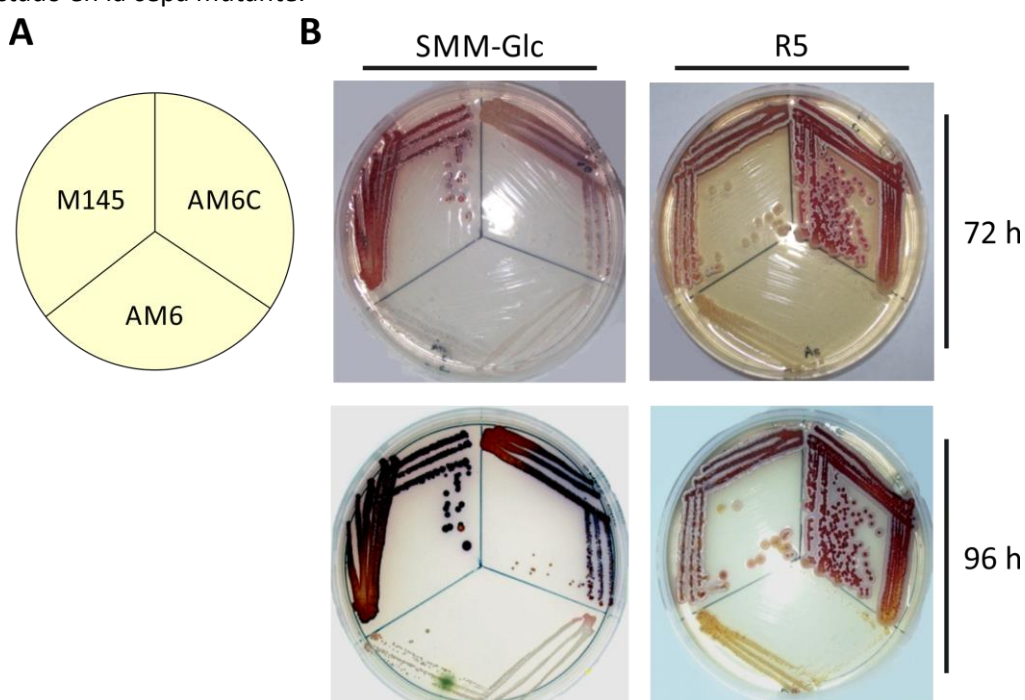
**Figura 12. Cuantificación del policétido actinorrodina en medio de cultivo YEME.** La producción de este metabolito secundario es significativamente menor en la cepa AM6 respecto a la cepa salvaje M145. La adición de ácidos grasos al medio de cultivo no es capaz de complementar este fenotipo.

respectivamente), sólo se ha identificado una única enzima en *S. coelicolor*, FabD, codificada en el operón *fab*, que sería la responsable de generar el malonil-ACP necesario para ambas vías biosintéticas [40, 103].

De esta manera, para evaluar el efecto de la mutación en *fasR* sobre la síntesis de estos compuestos, se realizó la cuantificación de actinorrodina en cultivos de las cepas M145 y AM6, a las 75 y 100 hs de crecimiento en medio de cultivo YEME. Los resultados indican que la síntesis de actinorrodina disminuye notablemente en la cepa AM6 respecto a la cepa salvaje M145 (Figura 12). Además, la adición de ácidos grasos al medio de cultivo no es capaz de reestablecer la producción de este compuesto en la cepa AM6. Al crecer estas cepas en medios de cultivo sólidos mínimo (SMMS) y rico (R5), también se pudo observar una baja producción de los metabolitos secundarios undecilprodigosina y actinorrodina, acompañados por el retraso en el crecimiento y diferenciación morfológica antes mencionado (Figura 13).

En este contexto, la disminución de la expresión de *fabD* en la cepa AM6 podría estar afectando la generación de malonil-ACP disponible tanto para la síntesis de ácidos grasos como de actinorrodina. Estudios de interacción entre FabD y sus

**Figura 13. Crecimiento de las cepas M145, AM6 y AM6C en medio de cultivo sólido. A.** Orden de siembra de las tres cepas. **B.** Tanto la producción de actinorrodina (azul) como de undecilprodigosina (rojo) es notablemente menor en la cepa AM6 respecto a la cepa salvaje. Como se mencionó anteriormente, el crecimiento también se ve severamente afectado en la cepa mutante.

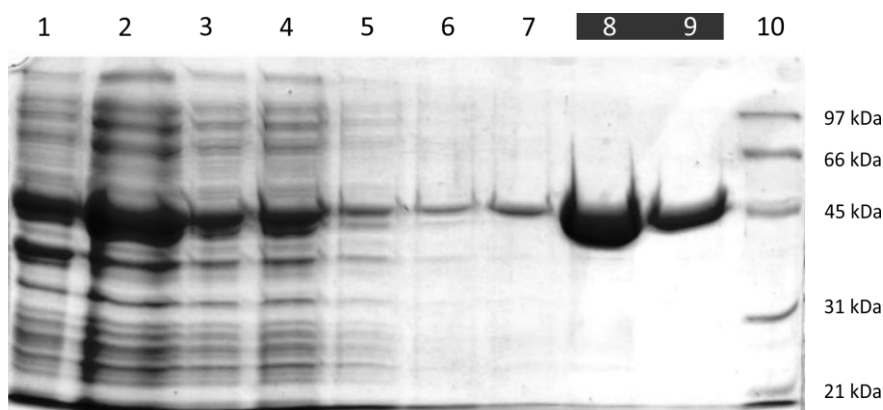


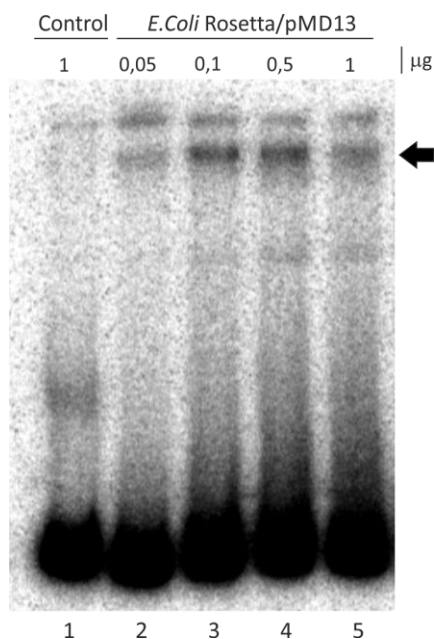
sustratos revelan que esta enzima presenta una mayor afinidad por la proteína  $ACP_{fab}$  respecto al  $ACP_{act}$  [103]. Es decir que, al tratarse de una interacción de menor afinidad, el flujo de malonil-CoA hacia la síntesis de actinorrodina podría estar más comprometido que hacia la síntesis de ácidos grasos. Se sabe que la síntesis de actinorrodina se encuentra restringida a la fase de transición y estacionaria del crecimiento, y que a su vez esta fuertemente regulada a nivel transcripcional [104]. Además, la regulación de la síntesis de metabolitos secundarios en *S. coelicolor* es una red compleja en que intervienen muchos factores además de la disponibilidad de sustratos, por lo que la disminución en la producción de antibióticos podría ser también una consecuencia de los efectos pleiotrópicos del retraso en el crecimiento.

#### 6.3.4. FasR se une específicamente a la región promotora del operón *fab*

Los resultados descritos anteriormente indican que FasR sería un activador transcripcional del operón *fab*. Sin embargo estos estudios no son concluyentes acerca de si esta acción es ejercida de modo directo o indirecto. Con el objetivo de evaluar la capacidad de FasR de unirse en forma específica al promotor del operón *fab* se realizaron ensayos de retardo en gel (EMSA) utilizando la proteína FasR recombinante

**Figura 14. Purificación de His-FasR mediante cromatografía de afinidad.** Análisis por SDS-PAGE del contenido proteico de las distintas fracciones colectadas durante el proceso de purificación. 1, Fracción insoluble; 2, Proteínas no unidas a la resina de afinidad; 3, Lavado con 10 volúmenes de solución A; 4, Lavado con 10 volúmenes de solución A + 20 mM imidazol; 5-9, Elución con 4 volúmenes de solución A conteniendo cantidades crecientes de imidazol: 40 mM (5), 60 mM (6), 80 mM (7), 100 mM (8) y 250 mM (9). 10, Marcador de peso molecular. Las fracciones 8 y 9 fueron seleccionadas para su posterior diálisis.





**Figura 15. Ensayo de retardo en gel utilizando extractos crudos de una cepa de *E. coli* que sobreexpresa el regulador FasR.** Los números superiores indican la cantidad de extracto proteico (en  $\mu\text{g}$  de proteína total) incubada con la sonda  $P_{fabD}$  en cada reacción de unión. La calle 1 corresponde a una cepa de *E. coli* Rosetta. En las calles 2-5 se utilizaron cantidades crecientes de extractos proteicos de la cepa *E. coli* Rosetta que sobreexpresa FasR. La flecha denota el complejo ADN:proteína formado.

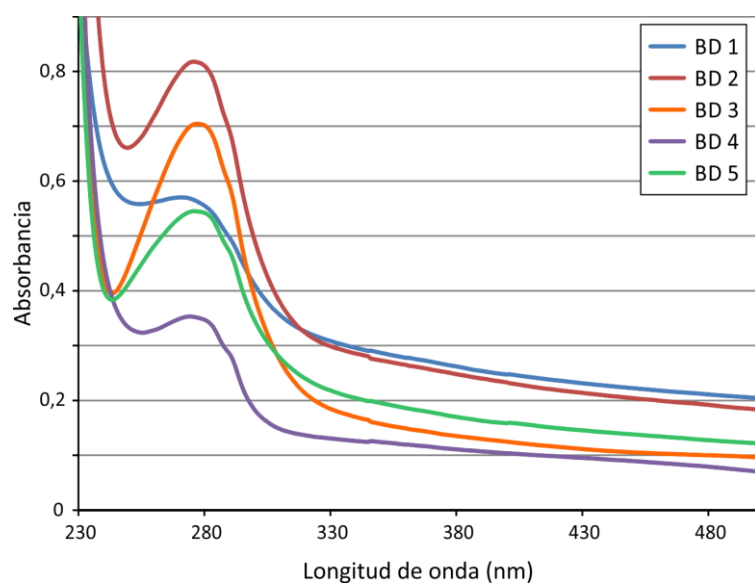
purificada y una sonda de ADN de 223 pb marcada con  $[^{32}\text{P}]$ -dATP conteniendo la secuencia del promotor  $P_{fabD}$ .

Para la expresión heteróloga de FasR se utilizó la cepa *E. coli* Rosetta (DE3) transformada con el plásmido pMD13, que contiene una copia del gen *fasR* bajo el control del promotor  $P_{T7}$ , y que genera una proteína de fusión a seis residuos de histidina en el extremo N-terminal de peso molecular estimado 44,9 kDa. Las condiciones de expresión y purificación de His-FasR recombinante se detallan en la sección Materiales y Métodos. Brevemente, los extractos crudos proteicos de la cepa *E. coli* Rosetta (DE3)/pMD13 fueron clarificados por centrifugación y sometidos a purificación en columna de afinidad de  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarosa. La elución de las proteínas unidas a la matriz de la columna se realizó a través de un gradiente discontinuo de imidazol entre 40 mM y 250 mM. Las distintas fracciones obtenidas durante el proceso fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Figura 14). Las fracciones eluidas con 100 mM y 250 mM de imidazol fueron dializadas frente a una solución Tris 100 mM pH 8, NaCl 100 mM, DTT 1 mM y glicerol 20%.

Ante la imposibilidad de detectar la formación de un complejo ADN-proteína en los ensayos de EMSA utilizando la proteína His-FasR purificada anteriormente, se consideró la posibilidad de que la proteína recombinante presentara alguna diferencia

a nivel conformacional respecto a la proteína salvaje que impidiera su unión al ADN (por ejemplo, la presencia de seis residuos cargados positivamente en su extremo N-terminal podría desestabilizar la estructura nativa de la proteína). Para evaluar esta posibilidad se realizaron ensayos de EMSA utilizando cantidades crecientes de extracto crudo libres de células de *E. coli* Rosetta (DE3)/pMD13 en la que la expresión de His-FasR había sido inducida previamente. Luego de optimizar la composición de la solución de unión, variando el pH, la concentración de sales, de detergentes y de glicerol, se pudo observar la aparición de una banda de retardo sólo en las calles donde His-FasR se encontraba inducida (Figura 15, calles 2-5). Este resultado demuestra que la proteína His-FasR posee la capacidad de unirse al ADN previa a la purificación. Si bien esta observación no descarta la posibilidad de que existan cambios estructurales respecto de la proteína salvaje, sí confirma el hecho de que la pérdida de la capacidad de unión del ADN se produciría durante el proceso de purificación.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se decidió evaluar el estado de agregación de His-FasR en solución por medio de espectroscopía de absorción ultravioleta (UV) [105]. En el espectro UV típico de una proteína pura se destaca el pico de absorción a longitud de onda de 280 nm, correspondiente a los residuos aromáticos. Además, la señal detectada en la región de longitud de onda de 340-350 nm se debe principalmente a la dispersión de la luz causada por partículas en suspensión, y por lo tanto brinda información acerca del grado de agregación de la preparación proteica realizada [105]. Así, se procedió a la purificación de His-FasR y las eluciones de 100 mM y 250 mM fueron combinadas, alicuotadas y dializadas frente a soluciones de distinta composición que se detallan en la Tabla V. A continuación se realizaron los correspondientes espectros de absorción para cada muestra (Figura 16). La muestra BD3 presentó la mejor relación concentración/agregación (la mayor relación  $Abs_{280nm}/Abs_{340nm}$ ), y por lo tanto se seleccionó para realizar los ensayos de EMSA ulteriores.



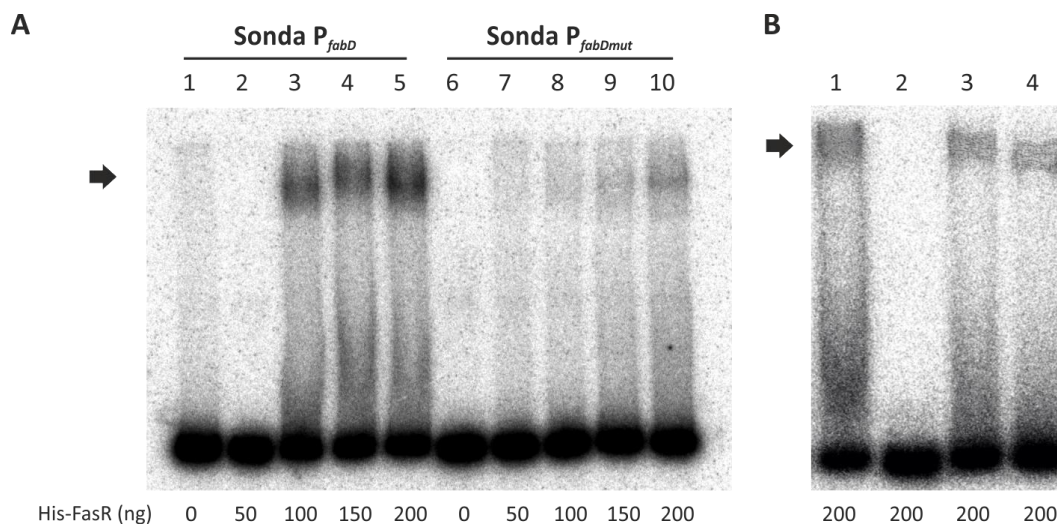
**Figura 16. Espectros de absorción UV de distintas preparaciones de FasR.** Luego de la purificación, FasR fue dializada frente a soluciones de distinta composición (BD1-5) que se detallan en la Tabla V

**Tabla V.** Soluciones utilizadas en la diálisis de FasR

Soluciones	BD 1	BD 2	BD 3	BD 4	BD 5
Tris pH 8	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM
NaCl	100 mM	300 mM	300 mM	300 mM	300 mM
DTT	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
EDTA	-	-	1 mM	-	-
Glicerol	20%	20%	20%	-	20%
PEG 3400	-	-	-	0,01%	-
Cóctel sales*	-	-	-	-	50 $\mu$ M (c/u)

\*CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>

Al ensayar la capacidad de unión de esta preparación proteica a la sonda de ADN que contiene al promotor  $P_{fabD}$ , se pudo detectar la formación de un complejo His-FasR: $P_{fabD}$  a partir de los 100 ng de proteína (89 nM) (Figura 17.A, calles 1-5). La especificidad de la interacción de His-FasR: $P_{fabD}$  se determinó por medio de ensayos de competencia utilizando un exceso de 100 veces de la misma sonda o de un fragmento de 200 pb no relacionado, ambos sin marcación radiactiva. Los resultados muestran que el complejo His-FasR: $P_{fabD}$  no se disocia luego del agregado de sonda inespecífica sin marca radiactiva (sonda fría) (Figura 17.B, calle 3). Sin embargo, la adición de la misma cantidad de la sonda  $P_{fabD}$  elimina la banda de retardo, lo que indica que el

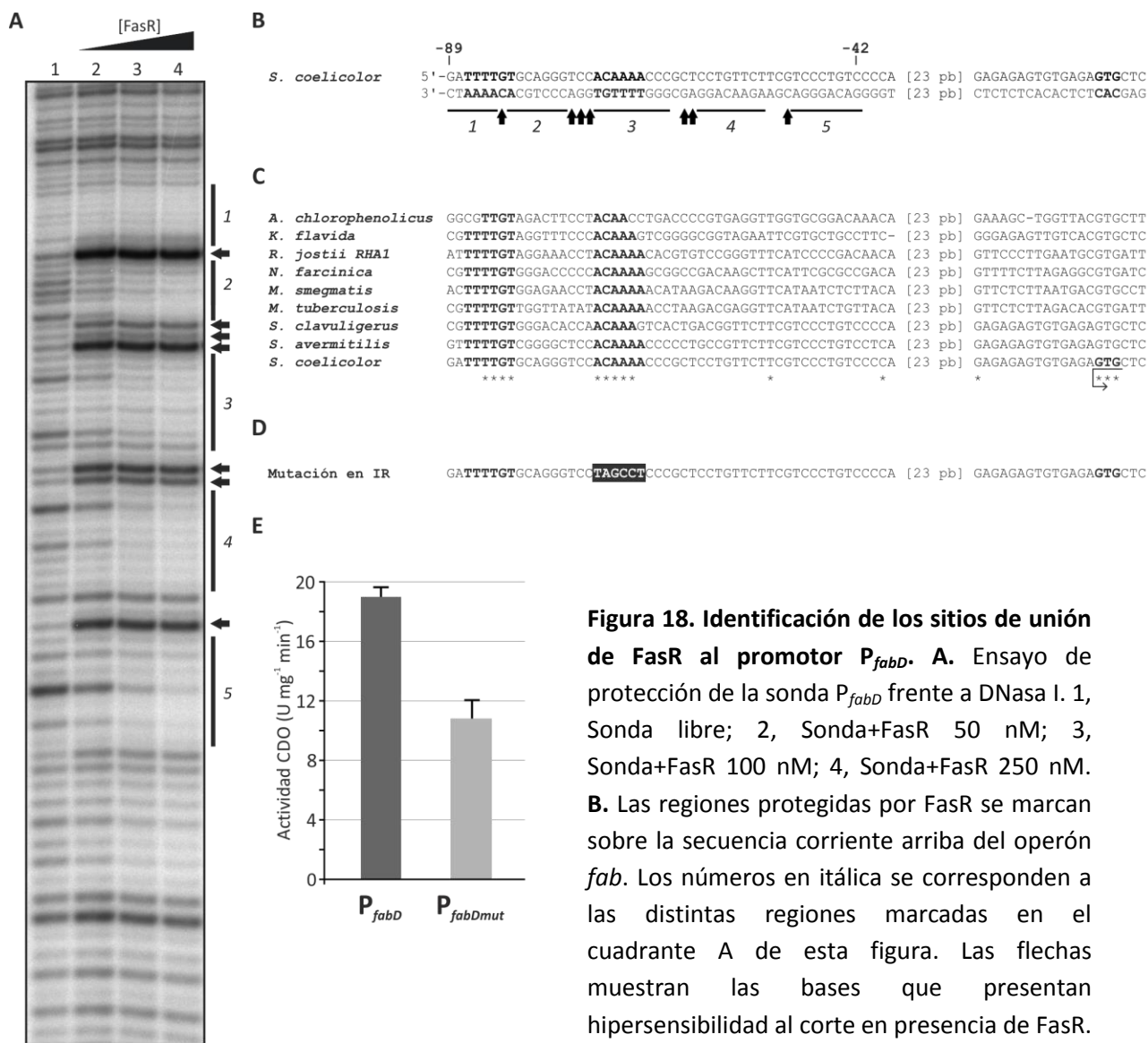


**Figura 17. Ensayo de retardo en gel utilizando His-FasR.** **A.** Distintas cantidades de His-FasR fueron incubados con la sonda P<sub>fabD</sub> o P<sub>fabDmut</sub>, y a continuación la formación del complejo ADN:proteína fue resuelto por electroforesis en geles de poliacrilamida. **B.** Ensayos de competencia de la unión His-FasR:P<sub>fabD</sub>. 1, His-FasR+P<sub>fabD</sub>; 2, His-FasR+P<sub>fabD</sub> + exceso de sonda P<sub>fabD</sub> fría; 3, His-FasR+P<sub>fabD</sub> + exceso de sonda no relacionada fría; 4, His-FasR+P<sub>fabD</sub> + exceso de sonda P<sub>fabDmut</sub> fría. Las flechas denotan la formación del complejo ADN:proteína

regulador se une específicamente a una secuencia ubicada en este fragmento de ADN (Figura 17.B, calle 2).

6.3.5. Una repetición invertida presente en P<sub>fabD</sub> está involucrada en la interacción de FasR con el ADN.

Con el fin de determinar las regiones del promotor P<sub>fabD</sub> implicadas específicamente en la interacción con FasR, se realizaron ensayos de protección frente a DNAasa I. Para ello, la sonda de P<sub>fabD</sub> de 223 pb fue marcada radiactivamente en el extremo 5' de la hebra codificante e incubada con cantidades crecientes del regulador FasR. La digestión parcial de la sonda en estas condiciones, y su posterior resolución en geles de poliacrilamida, permitió observar una zona de protección entre las posiciones -89 a -42 pb respecto al sitio de inicio de la transcripción debido a la interacción con FasR (Figura 18.A y B). Además, dentro de esta región protegida se pudieron observar bandas de hipersensibilidad, causadas probablemente por la torsión de la hélice de ADN y exposición de la hebra al corte con DNasa I.



**Figura 18. Identificación de los sitios de unión de FasR al promotor  $P_{fabD}$ .** **A.** Ensayo de protección de la sonda  $P_{fabD}$  frente a DNasa I. 1, Sonda libre; 2, Sonda+FasR 50 nM; 3, Sonda+FasR 100 nM; 4, Sonda+FasR 250 nM. **B.** Las regiones protegidas por FasR se marcan sobre la secuencia corriente arriba del operón *fab*. Los números en *itálica* se corresponden a las distintas regiones marcadas en el cuadrante A de esta figura. Las flechas muestran las bases que presentan hipersensibilidad al corte en presencia de FasR. **C.** Alineamiento de las secuencias 5' del

operón *fab* en distintos actinomicetes. Las repeticiones invertidas (IR) se marcan en **negrita**. **D.** Mutagénesis de una de las IR, reemplazando la secuencia ACAA por TAGCCT. A esta región promotora modificada se la denominó  $P_{fabDmut}$ . **E.** La expresión a partir de  $P_{fabDmut}$  es significativamente menor respecto a  $P_{fabD}$ , indicando que la IR mutada está involucrada en la activación *in vivo* mediada por FasR.

Como se mencionó anteriormente, FasR se encuentra ampliamente conservado en el grupo bacteriano de los actinomicetes. La divergencia evolutiva entre especies acarrea consigo, entre otras cosas, cambios en la secuencia genómica que son fijadas en el proceso de especiación y pueden resultar, o no, en cambios fenotípicos. Sin embargo, las secuencias implicadas en la viabilidad celular se encuentran bajo una presión de selección que impide la fijación de mutaciones en estas regiones. Es de

esperar entonces, que de existir una secuencia involucrada en la regulación de un proceso esencial como lo es la síntesis de ácidos grasos, la misma se encuentre conservada interespecífica e incluso intergenéricamente. Teniendo en cuenta esto, y con el fin de encontrar la secuencia específica de unión de FasR al ADN, se realizó el alineamiento de secuencias correspondientes a la región intergénica *fasR-fabD* en distintos actinomicetes, utilizando el programa CLUSTALW [75]. A través de este análisis se identificó la presencia de dos repeticiones invertidas (IR, por *inverted repeat*) conservadas de 6 pb cada una, que se encuentran en las posiciones -87 y -72 respecto al sitio de inicio de la transcripción del operón *fab*, dentro de las regiones protegidas por FasR (Figura 18.C). Para evaluar el rol de estas IR en la unión *in vitro* His-FasR:ADN, una de ellas fue reemplazada por una secuencia al azar a través de mutagénesis dirigida, generando la sonda  $P_{fabDmut}$  (Figura 18.D). Al utilizar esta sonda en los ensayos de EMSA se aprecia la aparición de una débil banda de retardo recién a los 200 ng de proteína, lo que indicaría una disminución en la afinidad de la interacción respecto a la sonda nativa (Figura 17.A, calles 6-10, página 74). Además, el agregado de un exceso de esta sonda mutada fría en ensayos de competencia es incapaz de disociar el complejo específico His-FasR: $P_{fabD}$ , lo que confirma la baja afinidad de FasR por esta sonda, respecto de la sonda nativa (Figura 17.B, calle 4, página 74). Para determinar si el rol *in vitro* de la IR mutada en la interacción ADN:proteína podría estar correlacionado con una función *in vivo* en la expresión del operón *fab*, se construyó una fusión reportera transcripcional al fragmento  $P_{fabDmut}$ . La determinación de la actividad CDO en una cepa salvaje de *S. coelicolor* que porta esta construcción demostró que la expresión a partir del promotor  $P_{fabDmut}$  disminuye en un 41% respecto a la secuencia  $P_{fabD}$  nativa (Figura 18.E). Este hecho apoya las evidencias observadas en los ensayos de EMSA, donde la mutación de la IR disminuye la afinidad de FasR por la sonda, pero no logra la disociación total del complejo ADN:proteína.

En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que FasR es un regulador transcripcional que actúa uniéndose en forma específica a la región promotora del operón *fab*, induciendo la expresión de los genes que lo componen y que al menos una de las repeticiones invertidas identificadas está involucrada en dicha interacción y en la activación *in vivo* del operón *fab* mediada por este regulador.

### 6.3.6. FasR está involucrado en la activación transcripcional del operón *fab* como respuesta a la inhibición de la síntesis de ácidos grasos

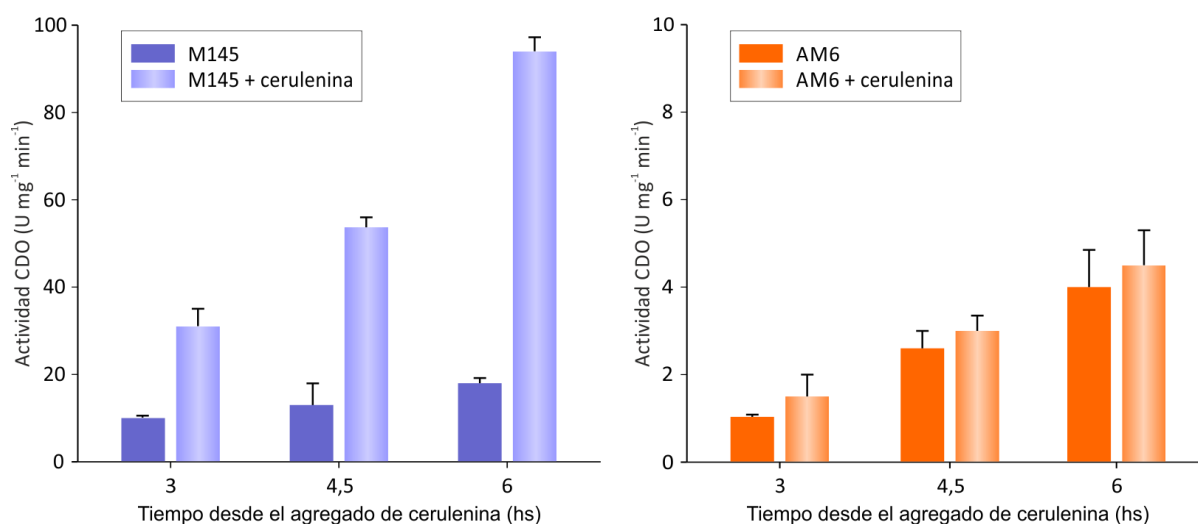
El antibiótico cerulenina es un potente inhibidor de la síntesis de ácidos grasos. Este compuesto se une en forma irreversible a las enzimas condensantes  $\beta$ -cetoacil sintasa I y II (FabB y FabF, respectivamente) inactivándolas y causando un bloqueo de la síntesis de ácidos grasos [106-108]. FadR de *E. coli* es un regulador transcripcional positivo de *fabB* y *fabA*. *fabB* codifica para una enzima condensante responsable de la síntesis de ácidos grasos insaturados, un proceso esencial en este organismo. En este contexto, la mutación en *fadR* provoca una marcada disminución en la expresión de *fabB* y un fenotipo de hipersensibilidad a cerulenina [89]. Resultados similares se encontraron al mutar el gen ortólogo de *fadR* en *Vibrio vulnificus* [109].

En *S. coelicolor* el gen que codifica para FabF, blanco de la inhibición por cerulenina, se encuentra dentro del operón *fab*. Para observar las consecuencias que tiene la interrupción del gen *fasR* sobre la sensibilidad a este antibiótico, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para cerulenina en las cepas mutante y salvaje, como se describe en la sección Materiales y Métodos. Los resultados muestran que la falta de una copia funcional de FasR provoca un marcado aumento en la sensibilidad al antibiótico cerulenina, en todos los medios evaluados (Tabla VI), probablemente a causa de la disminución en expresión de FabF. Consistentemente, la adición de ácidos grasos al medio de cultivo disminuye la sensibilidad de la cepa AM6 a cerulenina (Tabla VI).

**Tabla VI.** Sensibilidad a cerulenina de las cepas M145 y AM6

Medio de cultivo	CIM M145	CIM AM6
SMM-Glc	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
YEME	>150 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
YEME-Ác. Palmítico	>150 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

En estudios previos se reportó que el bloqueo de la síntesis de ácidos grasos mediado por cerulenina provoca una acumulación de intermediarios de la vía [108]. Los mismos pueden tener un rol importante en la regulación de la propia ruta metabólica actuando como efectores de reguladores transcripcionales. Por ejemplo,



**Figura 19. Expresión de  $P_{fabD}$  ante el bloqueo de FAS en las cepas salvaje y mutante en  $fasR$ .** La expresión del operón  $fab$  fue medida a través de fusiones reporteras transcripcionales a distintos tiempos luego del agregado del inhibidor cerulenina. Nótese la diferencia de escalas entre ambos gráficos.

ensayos en *B. subtilis* demuestran que la expresión del operón  $fabHAF$ , que codifica para las enzimas condensantes FabHA y FabF, aumenta con el agregado de cerulenina en el medio de cultivo [108]. Este aumento está mediado por el regulador FapR, el cual responde al incremento de los niveles de malonil-CoA producido al bloquear la síntesis de ácidos grasos [97, 108].

Con el objetivo de evaluar el rol fisiológico de FasR ante el bloqueo de la síntesis de ácidos grasos en *S. coelicolor*, se realizaron estudios de expresión del operón  $fab$  mediante fusiones reporteras  $P_{fabD}$ - $xyITE$  en presencia y ausencia de cerulenina, tanto en la cepa salvaje como en la mutante  $fasR$ . Para ello se realizaron cultivos de las cepas M145 y AM6 en medio mínimo suplementado con glucosa (SMM-Glc), y a las 20 horas de crecimiento cada uno fue dividido en dos: a una mitad se le adicionó cerulenina (a las concentraciones inhibitorias mínimas de cada cepa), mientras que a la otra sólo se le agregó el solvente DMSO (controles sin antibiótico). A partir de este momento se tomaron alícuotas de cada uno de los cultivos a las 3, 4,5 y 6 h, y se ensayó actividad CDO en los correspondientes extractos celulares. Los resultados muestran que el agregado de cerulenina dispara un incremento de hasta 4 veces en la expresión del operón  $fab$  en la cepa salvaje (Figura 19). Es probable que en estas condiciones los cambios en los niveles de los metabolitos de la vía -ya sea acumulación intracelular de

sustratos, como depleción de los productos- estén mediando este incremento en la expresión del operón *fab*. Más aún, en la cepa carente de una copia íntegra de *fasR*, la expresión a partir de  $P_{fabD}$  no cambia significativamente con el agregado de cerulenina (Figura 19). En conjunto, estos resultados indicarían que el regulador FasR sería el responsable de la activación transcripcional del operón *fab*, y que el mismo estaría respondiendo al cambio de algún metabolito relacionado con la biosíntesis de ácidos grasos.

#### **6.4. Discusión y conclusiones**

La ruta de biosíntesis de ácidos grasos en *S. coelicolor* se encuentra conservada en relación a los paradigmas estudiados previamente en organismos modelo como *E. coli* y *B. subtilis*: la misma ocurre a través de un sistema de sintasa de tipo II, utilizando malonil-ACP como unidad de elongación y tioésteres de CoA ramificados como unidad iniciadora, dando origen a ácidos grasos saturados con metil ramificaciones *iso-* y *anteiso-* en el extremo distal de los mismos. Sin embargo, la capacidad de este organismo de sintetizar compuestos policétidos, también derivados del malonil-CoA, y la capacidad de acumular activamente triglicéridos como compuestos de reserva, hacen que el escenario regulatorio se prevea de una mayor complejidad. Así, la síntesis de ácidos grasos no sólo debe estar regulada conforme al crecimiento y división celular, sino también a las necesidades biosintéticas alternativas como la síntesis de TAG. Por lo tanto, conocer cómo este microorganismo define el destino de los ácidos grasos en cada estadio de crecimiento, y cómo regula en forma coordinada las distintas rutas biosintéticas es un área de investigación sumamente relevante y un punto indispensable para lograr una mejor comprensión de la fisiología de esta bacteria.

En este capítulo de tesis nos propusimos analizar la regulación transcripcional del operón *fab* en *S. coelicolor*. En un trabajo de tesina previo al inicio de este trabajo de tesis, se logró identificar al gen que codifica para un putativo regulador transcripcional, denominado FasR por sus siglas en inglés (Fatty acid synthesis Regulator) [65]. La cepa mutante en *fasR* presentó una marcada disminución en la velocidad de crecimiento, tanto en medio de cultivo mínimo como rico. La actividad FAS medida *in vitro* para esta

cepa resultó ser un 64% menor respecto a la cepa salvaje, y la expresión del operón *fab* medida a través de fusiones reporteras disminuyó 10 veces en el contexto mutante respecto al escenario génico salvaje. Todas estas evidencias sugirieron fuertemente que FasR era un activador transcripcional de los genes del operón *fab*. Sin embargo, fue necesario profundizar estos estudios a fin de determinar los mecanismos moleculares utilizados por esta proteína para cumplir su función regulatoria.

Para ello primero fuimos capaces de complementar la deficiencia en el crecimiento de la cepa AM6 por medio de la suplementación de ácidos grasos al medio de cultivo. Este resultado indica que los ácidos grasos incorporados por la célula son capaces de suplir la deficiencia en la síntesis *de novo* de estos lípidos. Además, esta observación atribuye directamente el déficit de crecimiento a la baja disponibilidad de ácidos grasos en la cepa AM6. Cabe destacar que en estas condiciones la expresión del operón *fab* se mantuvo en niveles significativamente menores respecto a la cepa salvaje, demostrando que la mejora en el crecimiento de la cepa mutante no fue causada por cambios en el perfil transcripcional de este operón sino por la disponibilidad de los ácidos grasos adicionados al medio de cultivo, los cuales podrían ser utilizados para suplir la deficiencia en la síntesis *de novo* de estas moléculas esenciales.

Al analizar la expresión particular de cada uno de los genes del operón *fab* (*fabD-fabH-*acpP*-fabF*) pudimos observar que el nivel de transcritos de todos ellos se encontraban disminuídos en la cepa AM6, confirmando el rol de FasR como activador transcripcional de todos los genes del operón *fab*. Sin embargo, en el contexto de la cepa mutante en *fasR* los genes *acpP-fabF* presentaron una menor disminución que los genes *fabD-fabH* (Figura 11, página 67). En *E. coli*, el gen que codifica para la proteína ACP se expresa como parte del operón *fabH-fabD-fabG-*acpP*-fabF*, encontrándose además, en la región intergénica *fabG-*acpP**, un promotor específico que dirige su expresión [110]. Además, en *B. subtilis* el gen *acpP* es el último gen del operón *fapR* y posee un promotor fuerte y específico inmediatamente corriente arriba del mismo [111]. Considerando estos antecedentes y los resultados antes mencionados, es factible que en *S. coelicolor* también exista un promotor no identificado corriente arriba de *acpP*, cuya transcripción es activa aún en ausencia de FasR. Es sabido que

ACP es capaz de interactuar con otras vías metabólicas, no relacionadas con la síntesis de ácidos grasos, transfiriendo grupos acilos hacia otras proteínas [112, 113]. De esta manera, la presencia de promotores específicos para *acpP* asegura el abastecimiento de esta proteína ubicua en forma independiente de la regulación de ácidos grasos [111].

A continuación, con el objetivo de determinar las secuencias operadoras reconocidas por FasR, se realizaron ensayos de retardo en gel y protección frente a DNasa I. Así fue posible determinar que FasR se une en forma específica a la región promotora del promotor  $P_{fabD}$ . En particular, encontramos que existen dos secuencias IR presentes en esta región, las cuales están implicadas tanto en la interacción FasR:ADN como en la activación *in vivo* del promotor  $P_{fabD}$ . Este resultado es consistente con el hecho de que la mayoría de los reguladores transcripcionales bacterianos se unen a secuencias palindrómicas, o pseudopalindrómicas [114]. Si bien existen excepciones, los reguladores que poseen un dominio de tipo hélice-giro-hélice interaccionan con el ADN generalmente como homodímeros, en donde una  $\alpha$  hélice de cada monómero reconoce una secuencia específica en la cavidad mayor del ADN [114]. Cabe destacar que la búsqueda *in silico* de estas repeticiones invertidas en el genoma de *S. coelicolor* reveló que este motivo se encuentra presente sólo en  $P_{fabD}$ , por lo que este promotor podría ser el único blanco de regulación por FasR.

En micobacterias se ha caracterizado al ortólogo de FasR, denominado MabR. Éste sería un regulador transcripcional negativo del operón *fab* (*fabD-acpM-kasA-kasB-accD6*), que codifica para algunas de las subunidades del complejo FAS II en estos organismos [99]. El rol *in vivo* de FAS II en los géneros productores de ácidos micólicos -*Mycobacterium*, *Rhodococcus*, entre otros- es muy distinto al de la mayoría de las bacterias [39]. En estos géneros, la síntesis *de novo* de ácidos grasos se da a través de una sintasa de ácidos grasos de tipo I (FAS I). En cambio, FAS II es capaz de tomar los acil-CoA de 12-20 átomos de carbonos generados por FAS I como iniciadores para producir C50-C70 acil-ACPs [39]. Estos grupos acilos de cadena larga serán luego utilizados para la síntesis de ácidos micólicos presentes en la pared celular de estos organismos [39]. Al igual que FasR, MabR se une específicamente a las IR presentes en

la región promotora del operón *fab*, que serían las únicas presentes en el genoma de estos organismos [99].

El factor sigma vegetativo más relevante en *S. coelicolor* se encuentra codificado por el gen *hrdB* [115, 116]. A través del análisis bioinformático de secuencias, se ha logrado determinar las secuencias consenso óptimas para la unión de HrdB al ADN como TTGACN (-35) - 17 nt - TAGAPuT, siendo Pu=A/G [117]. En lo que respecta a la estructura del promotor  $P_{fabD}$ , no se pudieron encontrar totalmente conservadas las secuencias de unión al factor sigma vegetativo HrdB. Este hecho es algo común en promotores que necesitan de un activador transcripcional para su óptima expresión [118]. Se puede pensar a un promotor regulado por un activador como un promotor que ha perdido secuencias importantes en el reclutamiento de la ARN polimerasa o en la iniciación de la transcripción, de manera que es necesaria la asistencia de un factor en *trans* para el correcto ensamblaje de la maquinaria transcripcional [118]. En concordancia, se puede observar a lo largo de este capítulo que la expresión basal del operón *fab* en ausencia de FasR es muy baja. FasR, al reclutarse sobre las repeticiones invertidas que se encuentran a 87 y 72 pb corriente arriba respecto al sitio de inicio de la transcripción del operón *fab*, podría interactuar con la ARN polimerasa y de esta manera favorecer el ensamblado o la iniciación de la transcripción. Al encontrarse sus sitios de unión distantes a las posiciones -10 y -35, es probable que FasR actúe por un mecanismo de activación de Clase I, interactuando con el extremo C-terminal de la subunidad  $\alpha$  de la ARN polimerasa [118, 119].

Como se describió en la introducción particular a este capítulo, la afinidad por el ADN de los reguladores transcripcionales del metabolismo lipídico está modulada por sustratos, intermediarios o productos de esta vía. Dependiendo del caso particular, el malonil-CoA, los acil-ACPs o los acil-CoAs interactúan con los respectivos reguladores modificando su afinidad por sus secuencias operadoras [31, 82, 84, 90, 91, 93, 99, 100]. Ante estos antecedentes decidimos evaluar cuál era el rol de FasR durante el bloqueo de la síntesis de ácidos grasos causado por cerulenina, teniendo en cuenta que esta inhibición trae aparejado el cambio en los niveles de los metabolitos que podrían ser ligandos de este regulador. A partir de estos ensayos pudimos concluir que FasR mediaría la respuesta al bloqueo de FAS. Además, este regulador sería capaz de

senzar el estado metabólico de la síntesis de ácidos grasos, probablemente a través del cambio en los niveles de algún intermediario de la síntesis de ácidos grasos, ajustando entonces la transcripción del operón *fab* a las necesidades celulares. Cabe destacar que para el regulador MabR de *M. tuberculosis* los acil-CoA de 18-24 átomos de carbono, sustratos de FAS II, actúan como ligandos que regulan su afinidad por las secuencias operadoras. Ante este resultado, y con el fin de determinar la identidad del ligando que modula la unión de FasR al ADN, se realizaron ensayos en colaboración con el grupo del Dr. Thomas R. Pieber en los que se determinó el perfil de ésteres de CoA a través de cromatografía en fase reversa seguida por detección por espectrometría de masa [120, 121]. Los resultados preliminares indican que 6 hs después de la adición de cerulenina a cultivos de la cepa salvaje, los niveles de malonil-CoA aumenta casi 5 veces respecto al control sin antibiótico, mientras que el C16:0-CoA y C18:0-CoA disminuyen aproximadamente en un 40%. Sin embargo, al realizar ensayos de retardo en gel adicionando distintas cantidades de malonil-CoA y acil-CoAs de distinta longitud de cadena en las reacciones de unión, no fue posible detectar cambios significativos en la afinidad de este regulador por la sonda utilizada.

En conjunto, todas estas evidencias sostienen que FasR es un activador transcripcional directo del operón *fab*, lo que constituye el primer ejemplo de regulador transcripcional positivo de los genes de la síntesis de ácidos grasos saturados descrito en la literatura.

Teniendo en cuenta las evidencias antes mencionadas, se necesitarán estudios más específicos y más sensibles para identificar el ligando que interactúa con FasR *in vivo*, y determinar de qué manera este regulador sensa el estado de la síntesis de ácidos grasos. Creemos que tanto la mejora en la calidad de la preparación y purificación de FasR recombinante, como la utilización de técnicas complementarias a los ensayos de retardo en gel -como por ejemplo medición de la anisotropía de la fluorescencia, calorimetría isoterma de titulación (ITC) y resonancia de plasmón en superficie (SPR)- constituyen estrategias posibles para abordar esta cuestión.

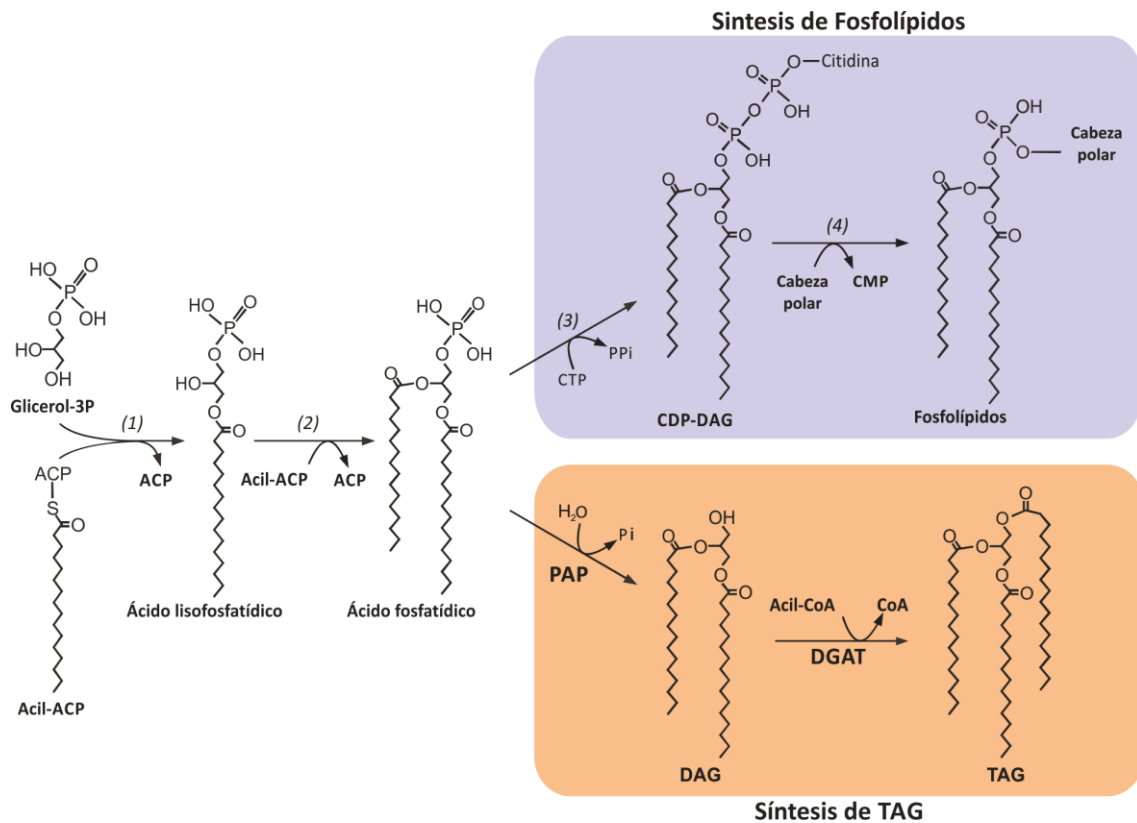
## 7. Capítulo II

### Identificación y caracterización del paso enzimático clave para la síntesis de TAG en *S. coelicolor*.

#### 7.1. Introducción: Fosfatidato fosfatasas en la naturaleza

Los triglicéridos (TAG) son compuestos de reserva comúnmente utilizados por animales, plantas y otros organismos eucariotas como fuente de energía y carbono [12]. Sin bien ésta no es una característica ampliamente difundida entre organismos procariotas, varias especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Mycobacterium* [122], *Nocardia* [45], *Rhodococcus* [123], y *Streptomyces* [124] son capaces de sintetizar y acumular TAG como compuestos de reserva.

El único paso asociado específicamente con la biosíntesis de TAG en la naturaleza comprende la acilación del diacilglicerol (DAG) con un tercer grupo acilo, haciendo de este lípido un precursor fundamental de esta ruta biosintética. Se conocen tres actividades enzimáticas diferentes capaces de catalizar esta reacción: acil-CoA:DAG aciltransferasa (DGAT), fosfolípido:DAG aciltransferasa y DAG:DAG aciltransferasa [47, 125-128]. Sin embargo, en bacterias las enzimas más relevantes implicadas en esta reacción son las acil-CoA:DAG aciltransferasas, que catalizan la formación de TAG utilizando acil-CoA y DAG como sustratos [42]. En particular, las DGAT bacterianas se encuentran agrupadas en una familia de DGAT procarióticas, diferente de las familias DGAT1 y DGAT2 halladas en organismos eucariotas [46, 47]. La misma se caracteriza, entre otras cosas, por poseer especificidad de sustrato relajada en cuanto al alcohol que actúa como sustrato, pudiendo acilar tanto DAG como alcoholes primarios, generando tanto TAG como ceras, respectivamente [47]. En nuestro laboratorio se identificaron tres enzimas pertenecientes a esta familia de proteínas en *S. coelicolor*, siendo la aciltransferasa codificada por el gen Sco0958 la principal DGAT involucrada en la acumulación de TAG en este organismo [46].



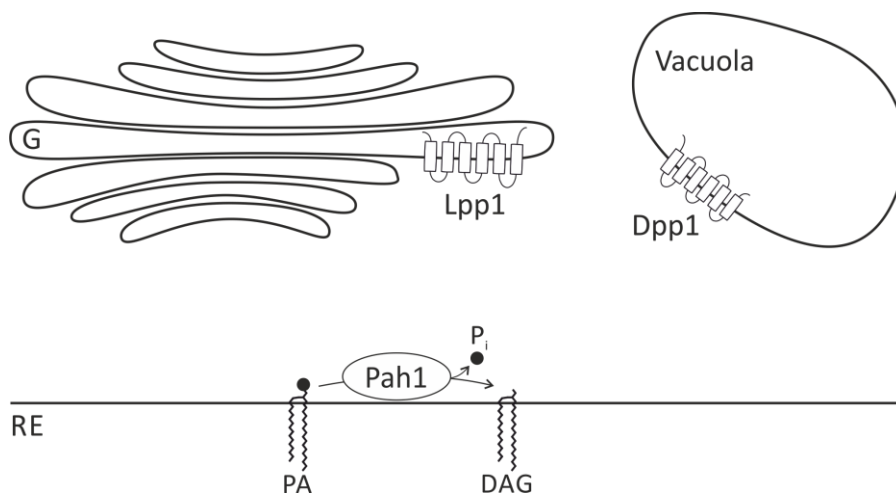
**Figura 20. Síntesis de fosfolípidos y triglicéridos en bacterias.** El ácido fosfatídico representaría el punto de bifurcación entre ambas vías. (1), glicerol-3P aciltransferasa; (2), lisofosfatidato aciltransferasa; (3), fosfatidato citidiltransferasa; (4), fosfolípido sintasa. PAP, fosfatidato fosfatasa; DGAT, diacilglicerol aciltransferasa; DAG, diacilglicerol; TAG, triacilglicerol; PP<sub>i</sub>, pirofosfato

La biosíntesis de DAG involucra reacciones compartidas con la ruta de síntesis de glicerofosfolípidos. La misma consiste en dos acilaciones sucesivas de glicerol-3-fosfato (G3P), catalizadas por la G3P:aciltransferasa y la lisofosfatidato:aciltransferasa, generando ácido fosfatídico (PA, por phosphatidic acid) (Figura 20) [124, 129, 130]. El PA puede ser canalizado hacia la síntesis de fosfolípidos a través del intermediario liponucleotídico CDP-DAG, o alternativamente puede ser dirigido hacia la síntesis de TAG por medio de la hidrólisis catalizada por la enzima fosfatidato fosfatasa (PAP, por phosphatidic acid phosphatase), generando DAG y fosfato inorgánico (Figura 20). Las bacterias producen sus glicerofosfolípidos exclusivamente a través de la vía dependiente de CDP-DAG, por lo que el PA representa un punto de bifurcación en el metabolismo lipídico de estos organismos (Figura 20) [28, 131]. En este contexto, la generación de DAG sería la primera reacción específica de la síntesis de TAG en

bacterias oleaginosas, lo que sugiere un rol clave de la actividad PAP en la regulación del flujo de PA hacia síntesis de TAG.

Las PAP han sido caracterizadas casi exclusivamente en organismos eucariotas, por lo que se desconoce la relevancia funcional de estas enzimas en bacterias. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, las enzimas con actividad PAP juegan un rol central tanto en el metabolismo lipídico como en los mecanismos de señalización intracelular [132, 133]. Existen dos familias de enzimas PAP, denominadas PAP1 y PAP2: las primeras son enzimas solubles, utilizan PA como único sustrato y muestran una actividad  $Mg^{2+}$  dependiente [134-136]; en cambio las segundas son enzimas integrales de membrana, con actividad  $Mg^{2+}$  independiente y que pueden defosforilar varios lípidos-fosfato estructuralmente relacionados como PA, lisofosfatidato (LPA), isoprenoles-fosfato, diacilglicerol-pirofosfato (DGPP), entre otros. Esta característica hace que la familia PAP2 sea también llamada lípido-fosfato fosfatasa (LPP, por *lipid-phosphate phosphatase*) [137].

Si bien la actividad enzimática PAP1 de levaduras había sido extensamente caracterizada en lo que respecta a su enzimología y regulación, los genes responsables de codificar esta actividad recién fueron identificados en el año 2006 [138-140]. El primer miembro de esta familia fue Pah1, responsable de proveer el DAG necesario para la síntesis lipídica en *S. cerevisiae* (Figura 21) [58]. La mutación en *pah1* causa acumulación de PA, niveles reducidos de DAG y TAG, y una alteración del perfil de fosfolípidos de la célula; es importante aclarar que en levaduras el DAG puede ser utilizado para la síntesis de los fosfolípidos fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina a través de la ruta de Kennedy [58]. Otros fenotipos de esta cepa mutante consisten en una marcada expansión de membranas a nivel del retículo endoplasmático y del núcleo, aumento en la expresión de los genes responsables de la síntesis de fosfolípidos, disminución de la velocidad de crecimiento a 30 °C y un fenotipo de termosensibilidad a 37 °C [58, 141]. Los genes de la familia PAP1 están altamente conservados entre organismos eucariotas, y su existencia parece estar restringida a este taxón, ya que no se han reportado homólogos a esta enzima fuera del reino Eukarya.



**Figura 21. Esquema de las distintas enzimas con actividad PAP en *S. cerevisiae*.** Lpp1 y Dpp1 son proteínas integrales de membrana localizadas en Golgi y vacuola, respectivamente. Pah1 es una enzima soluble que cataliza la defosforilación del ácido fosfatídico cuando se asocia a la membrana del retículo endoplásmico. G, Golgi; RE, retículo endoplásmico; PA, ácido fosfatídico; DAG, diacilglicerol.

Las enzimas PAP2 de *S. cerevisiae* están codificadas por los genes *dpp1* y *lpp1*, siendo el primero el principal responsable de esta actividad *in vivo* [142, 143]. Dpp1 y Lpp1 poseen 6 segmentos transmembrana y se encuentran localizadas en las vacuolas y en el aparato de Golgi, respectivamente (Figura 21) [144-146]. En cuanto a la especificidad de sustrato, Dpp1 muestra una clara preferencia por DGPP, mientras que en Lpp1 la afinidad por PA y DGPP es similar [147, 148]. En conjunto, la familia PAP2 está formada por más de 600 proteínas tanto eucariotas como procariontas. Dentro de este grupo, la única enzima bacteriana con actividad PAP caracterizada en cuanto a su especificidad de sustrato es hasta el momento PgpB de *E. coli* [149]. En un principio, la mutante en *pgpB* fue identificada en un aislamiento de cepas deficientes en la actividad fosfatidilglicerol-fosfato (PGP) fosfatasa [150]. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que, *in vitro*, PgpB presenta una especificidad de sustrato relajada que le permite defosforilar tanto PGP, como PA, LPA, DGPP y undecaprenil-pirofosfato (C55-PP) [149-152]. Posteriormente, Touzé *et al.* reportaron que PgpB prefiere lípidos-pirofosfato como sustrato, y sugirió un rol de esta enzima en el metabolismo del C55-PP [151].

Por otra parte, dentro de la familia PAP2 también han sido caracterizadas una enzima de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC6803, denominada synLPP, y sus homólogas plastídicas en *Arabidopsis thaliana*, denominadas LPP $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ 1 y  $\epsilon$ 2 [153]. En este trabajo se sugiere que estas proteínas pertenecerían a una subfamilia procariótica de LPPs, y su rol *in vivo* consistiría en proveer el precursor DAG para la síntesis del monogalactosil y digalactosil-DAG presentes en las membranas fotosintéticas [153].

Teniendo en cuenta estos antecedentes nos propusimos encontrar las enzimas responsables de proveer el DAG necesario para la síntesis de TAG en *S. coelicolor*. Al no encontrarse homólogos a proteínas de tipo PAP1 en este organismo, nuestra búsqueda se orientó hacia la familia de PAP2 procarióticas descrita anteriormente, utilizando a la proteína synLPP como sonda en los análisis bioinformáticos subsiguientes.

## **7.2. Objetivos particulares**

Teniendo en cuenta que se desconocía el paso enzimático que genera el DAG necesario para la síntesis de TAG en bacterias, nos propusimos identificar y caracterizar las enzimas responsables del abastecimiento de DAG en *S. coelicolor*. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos particulares:

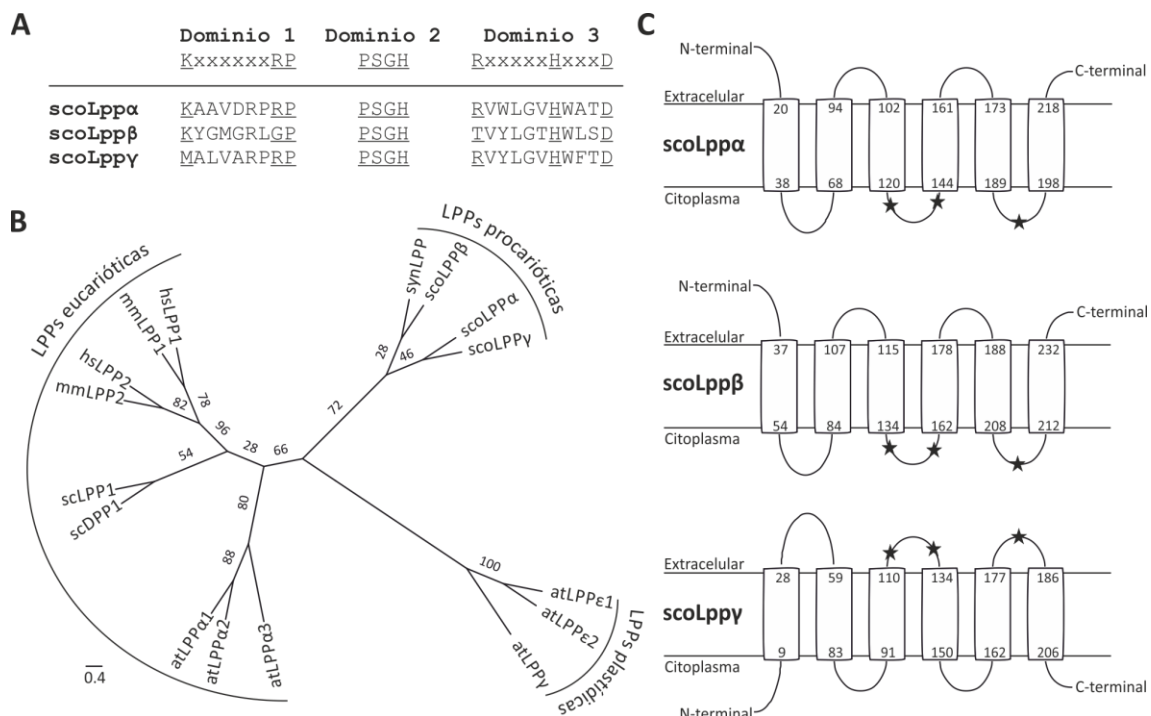
- Identificar y caracterizar las enzimas responsables de la actividad PAP en *S. coelicolor*.
- Estudiar el rol fisiológico de estas enzimas mediante la construcción y análisis de mutantes en los genes que las codifican.

## **7.3. Resultados**

### **7.3.1. Identificación de tres probables PAPs en *S. coelicolor***

Con el fin de identificar los genes que codificarían para posibles proteínas pertenecientes a la familia PAP2, se realizó un análisis bioinformático del genoma de *S. coelicolor* a través de las herramientas “Conserved Domain Database” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) y “Pfam” (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Las mismas predicen la existencia de al menos 14 proteínas que poseen el dominio PAP2 (pfam1569) en el genoma de *S. coelicolor*. Como se mencionó anteriormente, este tipo de enzimas está involucrado en una

diversidad de reacciones que comprenden la defosforilación de lípidos-fosfato, por lo que muchas de ellas podrían no estar necesariamente implicadas en el metabolismo lipídico de este organismo. Por lo tanto, para identificar las probables proteínas con actividad PAP responsables de la producción de DAG, realizamos una búsqueda de homología de secuencia en el genoma de *S. coelicolor* utilizando a la proteína SynLPP de *Synechocystis* sp. PCC6803 como sonda. Para ello utilizamos las herramientas “BLAST” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y “FASTA” (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>). La herramienta BLAST se basa en la búsqueda de similitud local entre las secuencias que se comparan, mientras que el algoritmo FASTA se caracteriza por realizar un análisis de secuencias a nivel global [76, 77]. En ambos casos las herramientas evalúan la significancia de los resultados asignando un determinado valor E (“E-value”) para cada secuencia similar encontrada. Este valor representa la probabilidad de encontrar al azar la coincidencia que está calificando, y por ello cuanto menor es el E-value, mayor significancia tiene el resultado obtenido. A través de la herramienta FASTA se obtuvieron valores de E-value significativos ( $E\text{-value} < 10^{-3}$ ) sólo para las proteínas Sco1102, Sco1753 y Sco6355, en este orden. En el resultado del análisis mediante BLAST, estas tres proteínas presentaron los mejores parámetros de coincidencia, mientras que a continuación se encontraron otras proteínas con E-value significativo, pero en las que la similitud estuvo sólo limitada a la región del sitio activo. A partir de estos resultados, decidimos concentrar el análisis en estos tres candidatos, que fueron nombrados como Lpp $\alpha$  (Sco1102), Lpp $\beta$  (Sco1753) y Lpp $\gamma$  (Sco6355). Estas proteínas presentan un peso molecular estimado de 24,7, 37,8 y 28,3 kDa, respectivamente, serían proteínas integrales de membrana (ver más abajo) y además poseerían conservados los aminoácidos que definen el sitio catalítico de la familia PAP2 (Figura 22.A).



**Figura 22. Identificación de tres probables PAPs en *S. coelicolor*.** **A.** Las tres proteínas candidatas presentan conservados los dominios que definen el sitio catalítico PAP2. **B.** Análisis filogenético de distintas PAP2. Las enzimas de *S. coelicolor* (scoLPPs) se agrupan en un clado denominado LPPs procarióticas. **C.** Predicción de topología de membrana para las tres proteínas candidatas de *S. coelicolor*. Los números denotan los aminoácidos que marcan el principio y fin de cada segmento transmembrana. Las estrellas muestran la ubicación de los dominios catalíticos.

El análisis filogenético de las secuencias curadas de LPPs pertenecientes a diferentes organismos, revelan que las proteínas LPP de *S. coelicolor* (denominadas en conjunto, scoLPPs) se encuentran cercanas evolutivamente a synLPP, en el grupo de “LPPs procarióticas”. Como se describe en Nakamura *et al.*, las “LPPs plastídicas de origen procariótico de *A. thaliana*” (atLPP $\gamma$ ,  $\epsilon$ 1 and  $\epsilon$ 2) forma un grupo separado, mientras que en un clado diferente, las LPPs no plastídicas de *A. thaliana* (atLPP $\alpha$ 1,2,3) se encuentran junto con las LPP de humanos (hsLPPs), ratón (mmLPPs) y levaduras (scLPPs), en un grupo denominado “LPPs eucarióticas” (Figura 22.B).

La predicción de estructura secundaria y topología de membrana se realizó mediante el algoritmo MEMSAT-SVM (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) [78]. El mismo revela que las tres scoLPPs poseerían 6 segmentos transmembrana, pero que

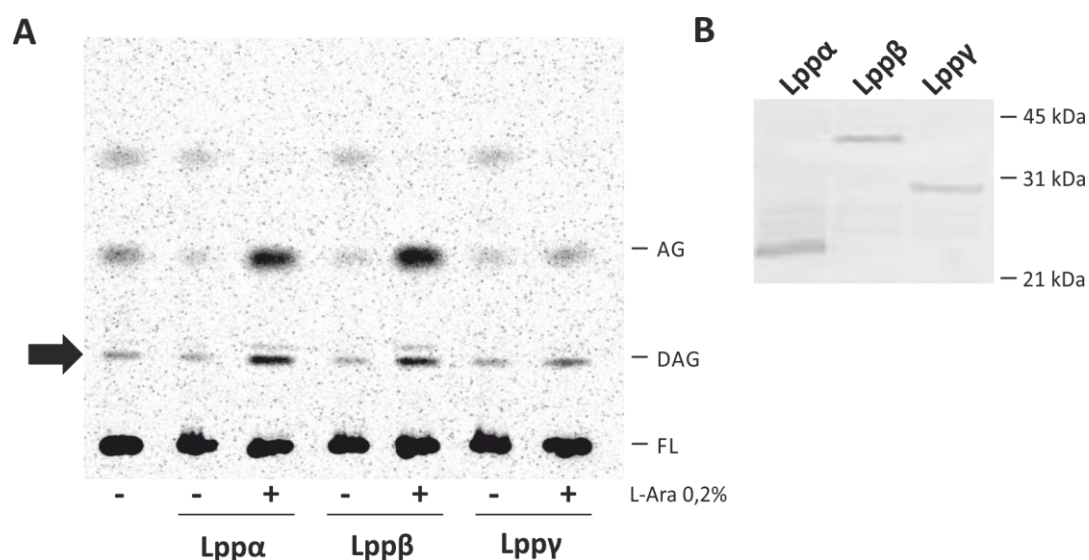
tanto en Lpp $\alpha$  como en Lpp $\beta$  los sitios activos se encontrarían hacia el citosol, mientras que en Lppy estarían orientados hacia el exterior celular (Figura 22.C).

El subsecuente análisis de homología de scoLPPs en otras especies reveló que existen ortólogos de Lpp $\alpha$  (Sco1102) conservados en todas las especies de *Streptomyces* secuenciadas hasta el momento, así como también en otras especies de actinomicetes pertenecientes a los géneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Nocardia*, entre otros. La presencia de secuencias ortólogas a Lpp $\beta$  (Sco1753) está en cambio limitada al género *Streptomyces*. Por otra parte, el marco abierto de lectura de Lppy (Sco6355) es parte de un operón compuesto por 5 genes (SCO6357-SCO6353) que también codifica para una histidin quinasa sensora y un regulador de respuesta putativos. Además, esta agrupación de genes se encuentra conservada sólo en *S. coelicolor* y *S. avermitilis*.

La predicción de los sitios activos hacia el exterior celular, y la ubicación de Lppy dentro de un operón que no está altamente conservado en *Streptomyces* ni en otros actinomicetes, serían evidencias en contra de una relevancia biológica significativa de esta enzima en el metabolismo lipídico bacteriano. En cambio, los sitios activos de Lpp $\alpha$  y Lpp $\beta$  se predicen hacia el interior celular, y además se encuentran secuencias ortólogas a las mismas distribuídas en bacterias oleaginosas, mayormente actinomicetes; por lo tanto postulamos que estas dos proteínas serían las mejores candidatas a ser las PAP involucradas en la síntesis de DAG en este microorganismo.

### 7.3.2. La expresión heteróloga de Lpp $\alpha$ y Lpp $\beta$ causa un aumento de DAG en *E. coli*

Con el objetivo de iniciar la evaluación de la actividad de las scoLPPs *in vivo* en *E. coli*, los genes codificantes de las tres posibles PAP fueron amplificados por PCR y posteriormente clonados en el plásmido de expresión pBAD33. Se generaron constructos de ADN capaces de expresar una fusión de cada proteína a 6 residuos de histidina N-terminal, bajo el promotor P<sub>BAD</sub> inducible por L-Arabinosa (L-Ara). Los plásmidos de expresión conteniendo los genes *lpp $\alpha$* , *lpp $\beta$*  y *lppy* se denominaron pBAD-Lpp $\alpha$ , pBAD-Lpp $\beta$  y pBAD-Lppy, respectivamente. Para la expresión heteróloga se utilizó la cepa *E. coli* C41, que deriva de *E. coli* BL21 (DE3) y ha sido seleccionada por



**Figura 23. Sobreexpresión de scoLPPs en *E. coli*.** **A.** Autorradiografía de lípidos totales marcados con [ $^{14}$ C]-acetato y resueltos por TLC para cada una de las cepas inducidas, o no, con L-Arabinosa. La flecha marca la banda correspondiente al DAG. **B.** Western blot con anticuerpos anti-His para cada una de las cepas expresantes de las scoLPPs. AG, ácidos grasos; DAG, diacilglicerol; FL, fosfolípidos; L-Ara, L-Arabinosa.

su capacidad para expresar en forma eficiente proteínas de membrana [154]. Las cepas de *E. coli* C41 transformadas con cada uno de estos plásmidos fueron cultivadas en medio LB a 37°C hasta  $DO_{600nm}=0,5$ , e inducidas mediante el agregado de L-Ara 0,2%. Luego de la inducción de las scoLPPs, se adicionó [ $^{14}$ C]-acetato, incubándose luego a 23°C con agitación durante 16 horas. Los lípidos totales fueron extraídos por medio de la técnica de Bligh y Dyer, resueltos por cromatografía en capa delgada (TLC) y detectados por posterior autorradiografía (Figura 23.A). A partir de este ensayo se observó que la expresión de Lpp $\alpha$  y Lpp $\beta$  provoca un marcado aumento en los niveles de DAG respecto de los controles sin inducir, como así también un incremento en la fracción de ácidos grasos libres. Si bien estos ácidos grasos pueden provenir de la hidrólisis del exceso de DAG generado por las putativas PAPs, otro tipo de ensayos serían necesarios para determinar si este cambio se debe particularmente a la introducción de esta actividad enzimática en *E. coli*.

Para Lpp $\gamma$ , sin embargo, no es posible detectar un aumento significativo en el contenido de DAG, lo que puede deberse a un bajo nivel de expresión de esta proteína o, alternativamente, a que ésta no presenta actividad PAP (Figura 23.A). En este

sentido, el análisis de la expresión de estas proteínas a través de experimentos de Western blot utilizando anticuerpos anti-His, reveló que las tres scoLPPs están siendo expresadas a niveles detectables en este hospedador heterólogo (Figura 23.B)

En conjunto, estos resultados sugieren que Lpp $\gamma$  no presentaría actividad PAP, o bien que bajo las condiciones de expresión utilizadas en este ensayo existirían problemas de plegamiento en la proteína que conducirían a la formación de una enzima inactiva. Por otro lado, estos experimentos demostraron concluyentemente que las proteínas Lpp $\alpha$  y Lpp $\beta$  son enzimas funcionales capaces de generar DAG en *E. coli*.

### 7.3.3. Lpp $\alpha$ y Lpp $\beta$ son capaces de defosforilar fosfatidato *in vitro*

Para cuantificar la actividad PAP en las cepas de *E. coli* que expresan las scoLPPs, se diseñaron ensayos *in vitro* de micelas mixtas en presencia del detergente Tritón X-100, utilizando dipalmitoil fosfatidato (PA) como sustrato [155]. En estas condiciones, el sustrato lipídico es presentado a la enzima inmerso en una micela de detergente [155, 156]. En este modelo, la actividad enzimática depende tanto de la concentración volumétrica de sustrato (moles/L), como de su abundancia en las micelas (fracción molar respecto al detergente) [157]. Estudios previos realizados variando las concentraciones del sustrato y del detergente determinaron que la relación óptima de PA:Triton-X100 es 1:10, y los rangos de concentración de PA utilizados varían entre 0,1 y 0,5 mM [58, 138, 155, 156].

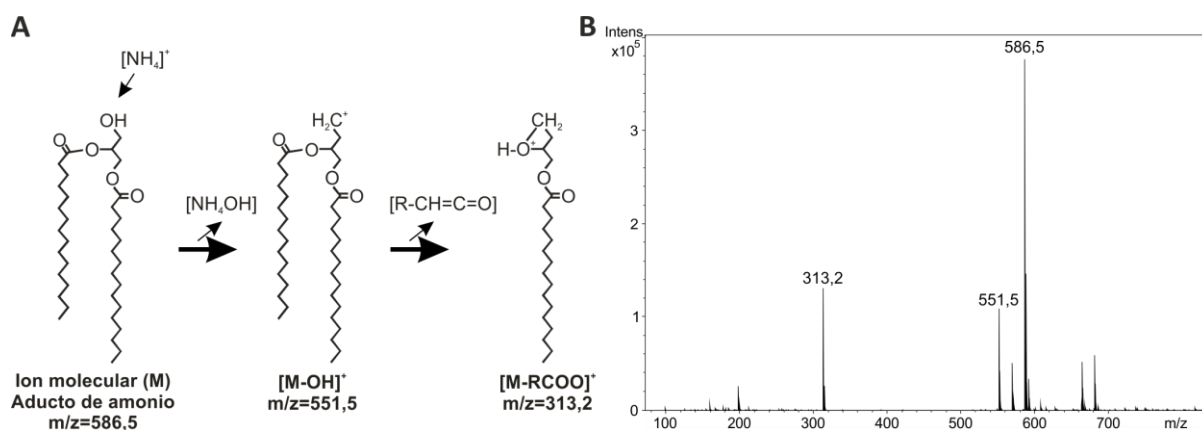
En cuanto a la cuantificación de los productos de la reacción, tradicionalmente se ha utilizado PA marcado radiactivamente para lograr una suficiente sensibilidad en la detección [155]. Además el uso de sustratos radiactivos permite la medición de esta enzima en matrices complejas, disminuyendo la interferencia con el fosfato o el DAG presentes en la muestra. En estos experimentos, el PA puede marcarse radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ , con el fin de cuantificar el fosfato liberado luego de la reacción, o bien con  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$ , para luego detectar el DAG generado [155, 158]. La principal desventaja de estos métodos radica en la necesidad de sintetizar enzimáticamente el sustrato radiactivo, debido a que el mismo no se encuentra disponible comercialmente. Un método alternativo consiste en medir la actividad PAP

a través de la detección colorimétrica de fosfato por medio de la técnica basada en verde de malaquita [151]. Sin embargo este protocolo sólo puede utilizarse para medir actividad de proteínas puras, ya que el fosfato presente en extractos o fracciones celulares parcialmente purificadas interfiere con la medición.

En un primer intento, se sintetizó enzimáticamente el sustrato PA marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$  por medio de la incubación de dipalmitoil-DAG y ATP- $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  en presencia de la enzima comercial DAG quinasa de *E. coli* según el protocolo descrito por Walsh y Bell [159]. Sin embargo, debido a sucesivos inconvenientes que se presentaron en la purificación del  $^{32}\text{P}$ -PA, se decidió desarrollar un nuevo método de detección de DAG basado en espectrometría de masa con ionización por electrospray (ESI-MS, por electrospray ionization-mass spectrometry), evitando así el uso de sustancias radiactivas para la medición de actividad PAP. La técnica de ESI-MS permite detectar moléculas con alta sensibilidad y precisión a través de su ionización en un campo eléctrico. En presencia de iones  $\text{NH}_4^+$  en solución, el dipalmitoil-DAG genera un aducto del ion molecular,  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ , y sus productos de fragmentación  $[\text{M}-\text{OH}]^+$  y  $[\text{M}-\text{RCOO}]^+$ , que pueden ser detectados por sus relaciones masa/carga ( $m/z$ ) de 586,5, 551,5 y 313,2 respectivamente (Figura 24) [160].

Para los ensayos de medición de actividad PAP se utilizaron las fracciones de membrana de las cepas de *E. coli* C41 que expresan las respectivas scoLPPs; las membranas fueron purificadas por ultracentrifugación como se detalla en la sección

**Figura 24. Ionización de dipalmitoil-DAG por medio de ESI-MS. A.** Ionización y fragmentación de la molécula de DAG en presencia de iones  $\text{NH}_4^+$ . **B.** Espectro de masa obtenido mediante la inyección de dipalmitoil-DAG puro, en presencia de acetato de amonio.

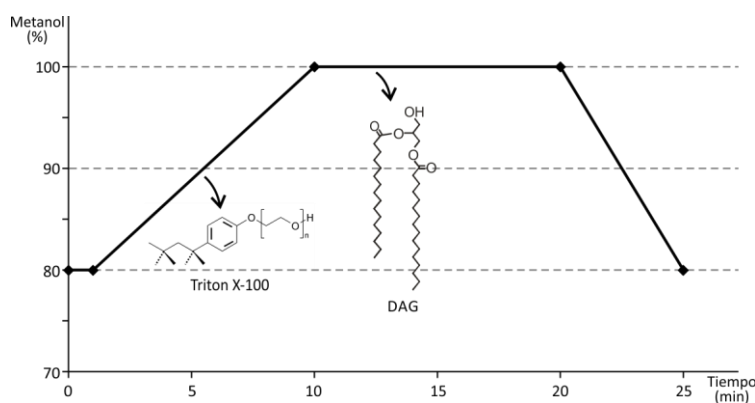


Materiales y Métodos. Los ensayos fueron realizados en un volumen de 100  $\mu\text{L}$ , conteniendo 25 mM Tris-HCl pH7,5, 2,5 mM Triton X-100 y 0,25 mM dipalmitoil fosfatidato. La reacción transcurrió a 30  $^{\circ}\text{C}$  durante 0-30 min, luego de los cuales se procedió a una extracción de tipo Bligh y Dyer, secando luego la fase orgánica y resuspendiendo la misma en cloroformo:metanol (1:4).

El proceso de optimización y validación de la técnica ESI-MS por medio de la inyección directa de estándares puros, o sometidos a las condiciones de reacción arrojó los siguientes resultados:

- En presencia de acetato de amonio, el DAG pudo ser detectado como el ion  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  ( $m/z=586,5$ ) (Figura 24).
- Se observaron a su vez los iones correspondientes a la fragmentación del ion molecular:  $[\text{M}-\text{OH}]^+$  ( $m/z=551,5$ ) y  $[\text{M}-\text{RCOO}]^+$  ( $m/z=313,2$ ) (Figura 24).
- El PA utilizado como sustrato no contiene niveles detectables de DAG.
- El Triton X-100 co-purifica en la fase orgánica de la extracción de Bligh y Dyer pos-reacción y enmascara completamente la detección del DAG.

Esta última observación determinó la necesidad de acoplar un protocolo de cromatografía previa al análisis de ESI-MS (LC-MS, por liquid chromatography-MS), de manera de separar el detergente altamente ionizable del producto de reacción (DAG); permitiendo entonces la ionización eficiente de este último. Este proceso se realizó por medio de una cromatografía de fase reversa C8, utilizando un sistema bifásico de agua y metanol, con un gradiente lineal de 80% a 100% metanol (Figura 25). Ambos solventes estuvieron suplementados con 5 mM acetato de amonio. En este caso se pudo observar la separación cromatográfica de Triton X-100 (2-5 minutos pos-

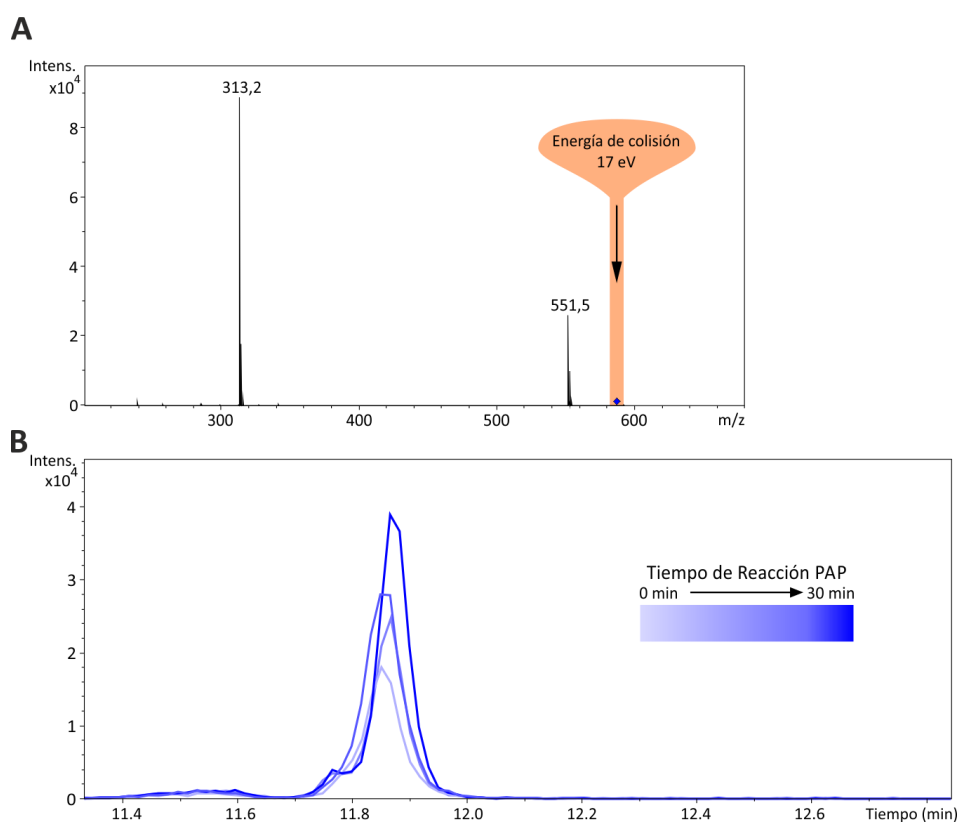


**Figura 25. Separación cromatográfica de DAG y Triton X-100.** Se utilizó una columna de fase reversa de matriz C8 y un sistema de solvente binario de metanol y agua, ambos suplementados con acetato de amonio 5 mM. DAG, diacilglicerol.

inyección) y DAG (12 minutos pos-inyección) (Figura 25). En estas condiciones el DAG se ionizó en forma satisfactoria, e independiente de la presencia de Triton X-100 en la muestra. La intensidad de detección del ion de  $m/z$  586,5 fue proporcional a la masa de DAG inyectada.

La presencia de cantidades significativas de dipalmitoil-DAG o de isómeros del mismo provenientes de las muestras, puede interferir en la determinación de actividad PAP ya que éstos son indistinguibles del DAG generado durante la reacción *in vitro*. Si bien la cantidad inicial de DAG puede ser cuantificada a través de un control a tiempo cero, nos propusimos aumentar la especificidad del método para detectar exclusivamente dipalmitoil-DAG, que es el producto generado *in vitro* por defosforilación del sustrato comercial dipalmitoil-PA. Para ello se incorporó al método un paso de fragmentación del aducto  $[M+NH_4]^+$ , y detección del ion  $[M-RCOO]^+$  a través de espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS). La intensidad de este

**Figura 26. Espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS) para la detección de dipalmitoil-DAG. A.** Espectro de masas obtenido al aplicar una energía de colisión de 17 eV sobre el ion molecular  $[M+NH_4]^+$  ( $m/z$  586,5). **B.** Detección de dipalmitoil-DAG en reacciones de actividad PAP mediante LC-MS/MS.



fragmento demostró ser proporcional a la masa de DAG inyectado como referencia. Este paso adicional tiene como consecuencia la identificación de DAG a través de la transición  $[M+NH_4]^+ \rightarrow [M-RCOO]^+$  ( $m/z$  586,5  $\rightarrow$   $m/z$  313,3), que es específica para moléculas de DAG que poseen esterificados dos grupos acilos saturados de 16 átomos de carbono, eliminando parte de la señal de fondo que provenga de isómeros estructurales del mismo.

Habiendo completado la optimización de la técnica descrita anteriormente, en la Tabla VII se detallan los resultados de la medición de la actividad PAP para cada cepa de *E. coli* sobre-expresante de scoLPPs. Se puede observar que tanto Lpp $\alpha$  como Lpp $\beta$  son capaces de hidrolizar dipalmitoil-PA; en contraposición, la cepa sobre-expresante de Lpp $\gamma$  sólo muestra una actividad similar a la cepa que porta el plásmido pBAD33 vacío utilizada como control.

**Tabla VII.** Actividad PAP de las cepas de *E. coli* que expresan las scoLPPs

Cepa	Actividad PAP (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> C41/pBAD33	0,9 $\pm$ 0,2
<i>E. coli</i> C41/pBAD-Lpp $\alpha$	2,51 $\pm$ 0,06
<i>E. coli</i> C41/pBAD-Lpp $\beta$	4,5 $\pm$ 0,1
<i>E. coli</i> C41/pBAD-Lpp $\gamma$	1,02 $\pm$ 0,08

<sup>a</sup>los valores representan la media  $\pm$  desvío estándar de triplicados para cada reacción

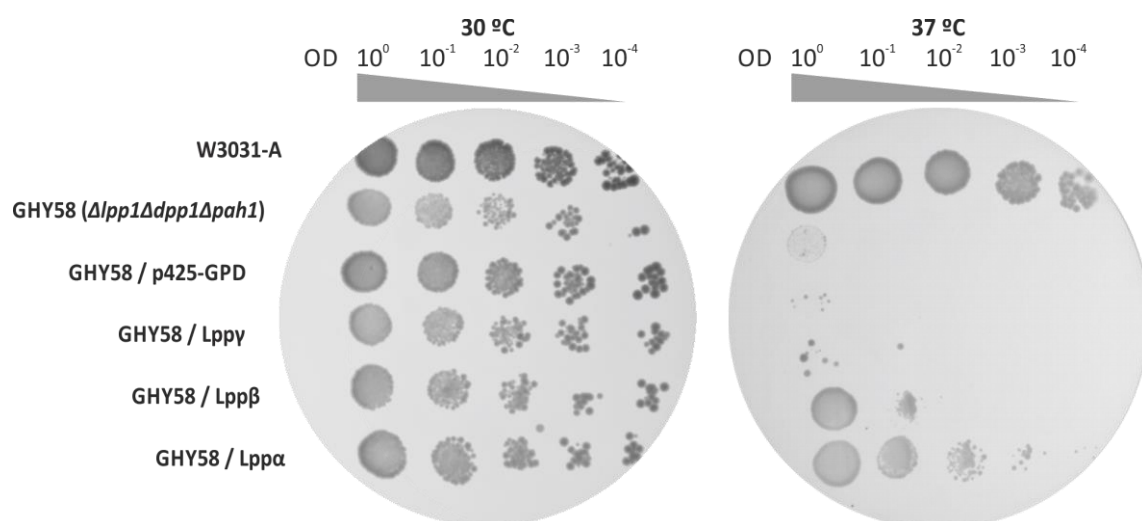
#### 7.3.4. La expresión de scoLPPs complementa el fenotipo temperatura sensible de *S. cerevisiae* $\Delta dpp1\Delta lpp1\Delta pah1$ .

El genoma de *S. cerevisiae* codifica tres proteínas con actividad fosfatidato fosfatasa: Dpp1, Lpp1 y Pah1. En este organismo, como se describió anteriormente, Pah1 es la responsable de la síntesis de DAG mientras que las LPPs -Dpp1 y Lpp1- tendrían un rol en señalización y carecerían de relevancia en el metabolismo lipídico [58, 161]. La mutante *pah1* presenta marcada disminución en los niveles de TAG y DAG, así como también un aumento en los niveles de PA y un perfil distorsionado de fosfolípidos [58]. Curiosamente, esta mutante también presenta un fenotipo

temperatura sensible a 37 °C [58, 141]. Si bien no se conoce con certeza la razón de esta sensibilidad, se sabe que está asociada a la actividad PAP que es relevante en la síntesis lipídica, ya que la mutante  $\Delta lpp1\Delta dpp1$  es capaz de crecer normalmente a 37°C [58]. Es por esto que decidimos tratar de complementar este fenotipo temperatura sensible a través de la expresión heteróloga de las scoLPPs. Para ello se clonaron los genes correspondientes en el vector p425GPD como fusión a histidinas, y se transformó con los mismos a la cepa GHY58 (*S. cerevisiae*  $\Delta pah1\Delta dpp1\Delta lpp1$ ). El plásmido p425GPD posee un promotor constitutivo que dirige la expresión de estos genes, y un marcador que confiere prototrofia a leucina en levaduras.

Las transformantes fueron seleccionadas en medio mínimo YNB sin leucina y suplementado con glucosa como fuente de carbono, y posteriormente inoculadas en medio de cultivo líquido rico YPD, a 30 °C con agitación durante 40 hs. A continuación los cultivos de las distintas cepas fueron normalizados a  $DO_{600nm}=1$ , diluidos en forma seriada, sembrados por duplicado en placas de YPD-agar y posteriormente incubados a 30 °C o 37 °C. Luego de 48 hs la cepa salvaje W303-1A fue capaz de crecer a 37 °C mientras que la cepa mutante GHY58 no (Figura 27). Sin embargo la expresión de  $Lpp\alpha$  y  $Lpp\beta$  fue capaz de complementar, al menos parcialmente, el fenotipo temperatura sensible de esta cepa mutante (Figura 27). Esta evidencia sugiere que tanto  $Lpp\alpha$  como

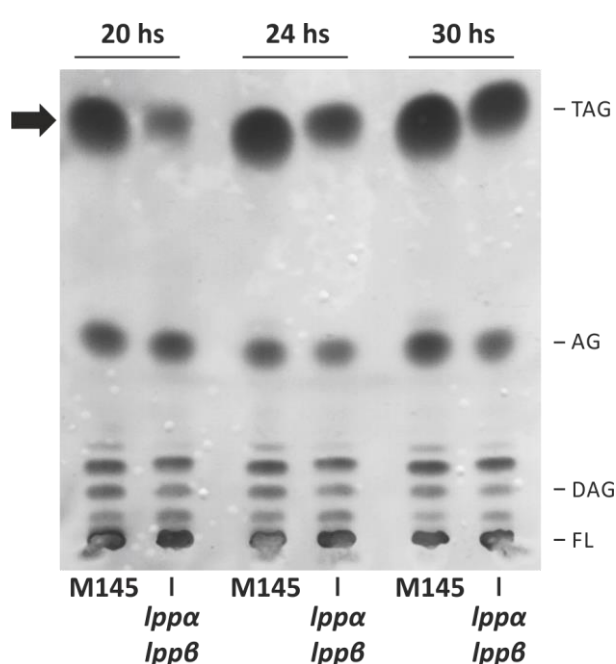
**Figura 27. Complementación del fenotipo temperatura sensible de la cepa de *S. cerevisiae* GHY58.** Las distintas cepas fueron cultivadas en medio líquido YPD a 30 °C, diluidas en forma seriada, sembradas en placas de YPD e incubadas a 30 o 37 °C.



Lpp $\beta$  estarían comportándose como PAPs involucradas en la síntesis de DAG, cumpliendo así una función diferente a las LPP nativas de levaduras. En cambio, no se observó reestablecimiento del crecimiento a 37 °C con la expresión de Lppy (Figura 27). En forma paralela, la estabilidad del plásmido fue comprobada sembrando todas las diluciones en placas selectivas, sin leucina, no observándose diferencia en el conteo de colonias entre las distintas cepas que poseían plásmidos.

### 7.3.5. Lpp $\alpha$ y Lpp $\beta$ estarían involucradas en el metabolismo lipídico de *S. coelicolor*

Para evaluar el rol *in vivo* de las scoLPPs en la síntesis de TAG en *S. coelicolor*, realizamos mutantes simples de los genes SCO1102, SCO1753 y SCO6355. Estas cepas se obtuvieron por intercambio alélico a través de un doble evento de recombinación, en el que se reemplaza el gen salvaje por un alelo interrumpido por la inserción del transposón Tn5062. Cada mutación se confirmó a través de PCR utilizando cebadores complementarios a las secuencias del gen blanco y del transposón, corroborando la amplificación de fragmentos específicos para cada inserción como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Se analizó el contenido de TAG en estas cepas, por medio de extracción orgánica de lípidos totales, resolución por TLC y posterior tinción con cobre-fosfórico y en todas las condiciones analizadas, la disrupción de cada uno de estos genes por separado no tuvo efectos sobre el perfil lipídico de *S. coelicolor*.



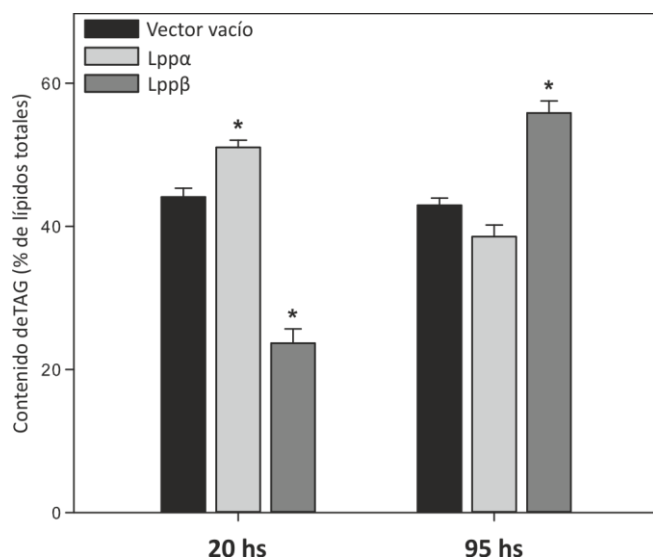
**Figura 28. Análisis de lípidos totales de la cepa salvaje M145 y la cepa mutante *lpp $\alpha$  lpp $\beta$*  cultivadas en medio SMM-Glc.** Se muestra la resolución por TLC de los lípidos totales extraídos a los tiempos que se indican sobre la figura. La flecha marca la banda correspondiente a los TAG. FL, fosfolípidos; DAG, diacilglicerol; AG, ácidos grasos; TAG, triacilglicerol.

Entonces, se procedió a construir mutantes dobles en los genes *lppα lppβ*, *lppα lppy* y *lppy lppβ*. El análisis del perfil lipídico de estas cepas reveló que la cepa doble mutante en los genes codificantes para las proteínas Lppα y Lppβ presenta niveles de TAG reducidos en hasta un 50%, mayormente evidenciados en fase exponencial y de transición de crecimiento en medio mínimo SMM-Glc (Figura 28). Este fenotipo pudo ser complementado por una copia en *trans* tanto de *lppα* como de *lppβ*, cada una bajo su respectivo promotor nativo. Se utilizó este medio de cultivo ya que en el mismo se induce una fuerte producción de TAG. Esto indica que tanto Lppα como Lppβ presentan un rol activo en la síntesis *in vivo* de TAG en *S. coelicolor*. La medición de actividad PAP asociada a membrana, utilizando el método descrito anteriormente, reveló además una disminución del 28,2% en la actividad PAP de la cepa doble mutante *lppα lppβ* ( $3,1 \pm 0,2$  U/mg), respecto a la cepa salvaje M145 ( $4,29 \pm 0,09$  U/mg).

Se puede observar además que a tiempos de cultivo mayores el contenido de TAG en la cepa *lppα lppβ* se aproxima a los niveles salvajes, sugiriendo entonces que si bien estas enzimas son PAP funcionales, existirían otras rutas capaces de generar DAG *in vivo*. Estas alternativas podrían estar representadas por proteínas de la misma familia de LPPs que podrían catalizar la defosforilación de PA; o bien, otras vías independientes de PA que aún no han sido descritas y que jugarían un rol significativo en el abastecimiento de DAG para la síntesis de TAG.

#### 7.3.6. La sobre-expresión de Lppα y Lppβ causa un aumento en el contenido de TAG de *S. coelicolor*

Para continuar caracterizando el rol fisiológico de estas enzimas, se sobre-expresaron los genes *lppα* y *lppβ* bajo el promotor constitutivo fuerte  $P_{ermE^*}$  en el contexto génico de la cepa salvaje M145. El cultivo de estas cepas en medio SMM-Glc reveló que el crecimiento de las cepas sobre-expresantes de Lppα y Lppβ estaba afectado respecto a la cepa control que poseía el vector vacío. Este hecho puede deberse intrínsecamente a la actividad enzimática de estas proteínas, que canalizan el intermediario PA hacia la síntesis de DAG, en detrimento de la síntesis de fosfolípidos de membrana; o a las consecuencias tóxicas que tiene *per se* el incremento en el



**Figura 29. Cuantificación del contenido de TAG de las cepas de *S. coelicolor* que sobreexpresan Lpp $\alpha$  y Lpp $\beta$ .** Se extrajeron los lípidos totales a los tiempos que se indican debajo de la figura y se resolvieron por TLC. En este caso los TAG fueron cuantificados por densitometría luego de una tinción por Cu-fosfórico. Los valores corresponden a triplicados para cada determinación

contenido intracelular de DAG para la célula, probablemente a causa de la alteración de las propiedades biofísicas de las membranas [162]; o bien meramente a la toxicidad que puede tener la sobre-expresión de proteínas de membrana [154]. Entonces, a pesar de que el medio mínimo SMM-Glc es el medio de cultivo preferencial para el análisis de TAG, decidimos realizar cultivos en medio rico R5, donde el crecimiento fue afectado en menor medida. En estas condiciones la expresión de Lpp $\alpha$  provocó un aumento del 15,7% respecto al control durante la fase estacionaria inicial; en cambio Lpp $\beta$  causó un incremento mayor (29,9%), pero en fase estacionaria tardía (Figura 29). En ambos casos estos resultados se debieron a un aumento en la tasa de biosíntesis de TAG, ya que la medición de la incorporación de [ $^{14}$ C]-acetato en TAG para estas cepas demostró ser mayor al control salvaje en estos tiempos de cultivo.

En conjunto, estas observaciones están de acuerdo con el rol de estas proteínas como PAP funcionales capaces de generar DAG en *S. coelicolor*.

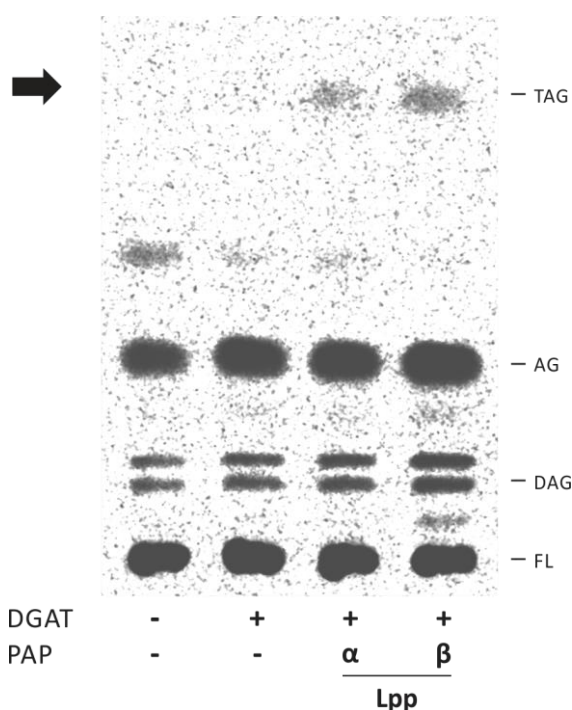
### 7.3.7. La co-expresión de scoLPP y DGAT es suficiente para la síntesis de TAG en *E. coli*

*E. coli* es una bacteria gram negativa no productora de TAG. En este organismo, el DAG se genera como consecuencia de la síntesis de oligosacáridos derivados de membrana (MDO, por membrane derived oligosaccharide), y es luego fosforilado por la enzima DAG quinasa DgkA para reintroducirlo en la ruta de síntesis de fosfolípidos

[163]. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se demostró que la sola expresión de la enzima DGAT no es suficiente para lograr la síntesis de TAG en esta bacteria [46]. Sin embargo, la mutación en *dgkA* aumenta los niveles de DAG intracelular y permite la síntesis de TAG cuando se expresa una DGAT en esta cepa de *E. coli* [46, 164]. Por lo tanto, el DAG sería el sustrato limitante de esta reacción *in vivo*.

Teniendo en cuenta estas observaciones, se decidió evaluar en qué medida la expresión de las scolPPs en *E. coli* podría generar suficiente DAG como para permitir la síntesis de TAG en esta bacteria. Para ello se expresaron en forma simultánea la principal DGAT de *S. coelicolor*, Sco0958, en conjunto con Lpp $\alpha$  o Lpp $\beta$ , en una cepa de *E. coli* BL21. Se cultivaron entonces las cepas BL21/pBAD0958/pET28-Lpp $\alpha$  y BL21/pBAD0958/pET28-Lpp $\beta$  a 37 °C, y una vez alcanzada una DO<sub>600nm</sub>=0,6 se indujo la expresión de las enzimas DGAT y PAP por el agregado de L-Arabinosa 0,2% y de IPTG 0,1 mM, respectivamente, como se detalla en la Sección Materiales y Métodos. En este momento los cultivos fueron marcados radiactivamente por la adición de [<sup>14</sup>C]-acetato e incubados durante 20 hs a 23 °C con agitación.

A través del análisis del perfil lipídico de estas cepas fue posible detectar síntesis de TAG sólo cuando se expresó la enzima Sco0958 en conjunto con Lpp $\alpha$  o Lpp $\beta$ . Estas evidencias indican que estas PAP son capaces de proveer el DAG necesario para la



**Figura 30. Síntesis de TAG en *E. coli* por medio de la co-expresión de las enzimas PAP y DGAT de *S. coelicolor*.** Autorradiografía de lípidos totales marcados con [<sup>14</sup>C]-acetato y resueltos por TLC para las cepas que expresan las proteínas que se indican en la figura. DGAT, DAG aciltransferasa Sco0958; PAP, fosfatidato fosfatasa; FL, fosfolípidos; DAG, diacilglicerol; AG, ácidos grasos; TAG, triacilglicerol.

síntesis de TAG en una bacteria no oleaginosa como *E. coli* (Figura 30) y apoyan la hipótesis de que estas dos enzimas son PAP funcionales.

#### **7.4. Discusión y conclusiones**

La síntesis de TAG en bacterias es un campo de investigación relativamente reciente y en continuo crecimiento desde la identificación de la enzima AtfA en el año 2003 [47]. Los TAG sirven como compuestos de reserva de energía y carbono, siendo mayormente sintetizados en condiciones de estrés y ante la disponibilidad de fuente de carbono en el medio circundante. Organismos del género *Rhodococcus* son capaces de acumular, en determinadas condiciones, hasta un 60% de su peso seco en triglicéridos de reserva [12, 165]. Esto ha despertado un gran interés a nivel académico, sobre todo en relación a la industria del biocombustible, ya que estos microorganismos podrían ser utilizados como fuente alternativa de ácidos grasos para la síntesis de, por ejemplo, biodiesel. Por otro lado, estos lípidos neutros también son acumulados por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* antes de ingresar al estado de dormancia, siendo éstos utilizados como fuente de carbono al restablecerse el crecimiento de esta bacteria y comenzar el desarrollo de la patología [44]. En el género *Streptomyces*, la capacidad de acumulación de TAG no se encuentra tan desarrollada como en *Rhodococcus*, pero la síntesis y degradación de los TAG están relacionadas con la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica [11, 46, 53]. Se ha hipotetizado que estos compuestos pueden servir como reserva, donando unidades de carbono a partir de su degradación para la síntesis de metabolitos secundarios en una fase estacionaria tardía del crecimiento bacteriano [11]. Sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio indican que en la transición entre las fases exponencial y estacionaria de crecimiento, donde la producción de triglicéridos y de actinorrodina se dispara prácticamente en forma simultánea, estas vías estarían compitiendo por las unidades de carbono disponibles en la célula [46].

Teniendo en cuenta la gran relevancia que estos compuestos de reserva poseen en los distintos géneros bacterianos, resulta de vital importancia comprender de qué manera estos organismos los sintetizan, acumulan y finalmente los utilizan. Se han realizado numerosos avances en lo que respecta a la identificación y caracterización

del último paso enzimático de la síntesis de TAG catalizado por la enzima DGAT; sin embargo hasta el inicio de nuestros estudios se desconocían las proteínas responsables de proveer el DAG en organismos procariotas. Por lo tanto nos propusimos identificar las proteínas responsables de la biosíntesis de DAG en *S. coelicolor* y trabajamos bajo la hipótesis de que las PAP de tipo 2 serían las responsables de esta actividad. Por medio de análisis bioinformáticos, identificamos tres genes candidatos a codificar putativas PAP2. La expresión de dos de estos genes, *Lpp $\alpha$*  y *Lpp $\beta$* , provocó un aumento en el contenido de DAG y de la actividad PAP asociada a membranas en *E. coli*. Además, estas dos proteínas fueron capaces de complementar el fenotipo temperatura sensible asociado a la deficiencia en actividad PAP de una cepa de *S. cerevisiae*. Estas observaciones indican que estas dos proteínas son PAP2 funcionales, capaces de defosforilar ácido fosfatídico. Luego, con el fin de demostrar la relevancia fisiológica de las tres PAPs putativas identificadas en *S. coelicolor* en el metabolismo de TAG se realizaron cepas mutantes simples y dobles, comprobándose que solamente una doble mutante en los genes *lpp $\alpha$*  y *lpp $\beta$*  generaba un fenotipo de reducción en el contenido de TAG. Estos resultados sugieren que existe cierta redundancia en las actividades de ambas enzimas, y que una podría complementar la deficiencia de la otra. Sin embargo, en el contexto de una doble mutante aún fue posible detectar síntesis activa de TAG, que si bien fue menor respecto a la cepa salvaje -o las correspondientes cepas mutantes simples-, la misma se niveló durante la fase estacionaria de crecimiento respecto a la cepa salvaje. Esta observación sugiere fuertemente que en este caso el DAG está siendo generado por vías alternativas, ya sea por otras proteínas con actividad PAP o a través de rutas independientes al PA.

Los miembros de la familia de proteínas PAP2 se encuentran distribuidos ampliamente en organismos eucariotas y procariotas [166]. Los estudios sobre estas enzimas se han focalizado mayoritariamente sobre los primeros, donde las PAP2 tendrían funciones relacionadas con la señalización celular [140, 161]. En lo que respecta al reino procariota, hasta el inicio de este trabajo de tesis se habían caracterizado al menos dos enzimas de esta familia capaces de defosforilar PA en especies no productoras de TAG: PgpB de *E. coli* y synLPP de *Synechocystis* sp.

PCC6803. Recientemente se ha descrito una proteína de la familia PAP2 en la especie oleaginosa de *Rhodococcus jostii*, denominada Ro00075 [166]. Esta enzima demostró ser una PAP capaz de defosforilar PA y generar DAG tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Además, la sobre-expresión de esta enzima en especies oleaginosas del género *Rhodococcus*, como *R. opacus* y *R. jostii*, provoca un aumento en el contenido de TAG [166]. Curiosamente, esta proteína es esencial y su mutación no es viable a menos que se exprese esta proteína en forma ectópica [166]. Sin embargo, en forma análoga a lo que ocurre en *S. coelicolor*, en el contexto génico mutante aún se detecta una síntesis de TAG significativa, por lo que también deberían existir en este microorganismo vías alternativas -ya sea dependientes, o independientes de enzimas PAP- que provean el DAG para la síntesis de TAG [166]. Por ejemplo, en bacterias gram negativas como *E. coli*, el DAG es generado como consecuencia de la síntesis de MDO en periplasma, en el que se utilizan la cabezas polares de los fosfolípidos para la síntesis de estos oligosacáridos, liberando entonces el esqueleto de DAG como subproducto [163]. En bacterias gram positivas en cambio, no hay síntesis de MDO. Sin embargo, en *Bacillus subtilis* se ha reportado la generación de DAG durante la síntesis de los ácidos lipoteicoicos [167]. Estos ácidos pueden estar constituidos por cadenas de glicerol-fosfato derivado del fosfolípido de membrana fosfatidilglicerol. En este caso, la remoción del grupo glicerol-fosfato del fosfatidilglicerol genera DAG como subproducto [167]. Teniendo en cuenta la longitud de estos componentes de membrana, la síntesis de cada molécula de ácido lipoteicoico generaría en promedio 33 moléculas de DAG [167]. En ambos casos, la reintroducción del DAG al circuito de la síntesis de ácidos grasos se da a través de una DAG quinasa: DgkA en *E. coli* y DgkB en *B. subtilis* [163, 167].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, cabe preguntarse qué otra vías de generación de DAG, como por ejemplo la vía de síntesis de ácidos lipoteicoicos, existen en *S. coelicolor*; cómo este organismo reintroduce las moléculas de DAG a la síntesis de fosfolípidos o si, en cambio, las destina a la síntesis de TAG dependiendo de las condiciones de crecimiento. Este tipo de conocimiento sería de gran importancia para comprender las vías bacterianas de síntesis de TAG con vistas en un potencial interés industrial, farmacéutico y/o médico.

## 8. Capítulo III

### **Producción de TAG en *E. coli* utilizando enzimas de *S. coelicolor***

#### **8.1. Introducción: Producción microbiana de biocombustibles**

La mayoría de los compuestos químicos utilizados industrialmente, así como también los combustibles que se usan en todo el mundo, son actualmente derivados de fuentes fósiles [168]. La combustión de estos petroquímicos tiene consecuencias negativas para el ambiente debido a la emisión de CO<sub>2</sub> -y el concomitante aumento del efecto invernadero- y a la liberación de gases contaminantes derivados del azufre y del nitrógeno [169]. Este hecho, sumado a la disponibilidad cada vez menor de estas fuentes, hace que encontrar sustancias renovables y químicamente equivalentes a las derivadas del petróleo sea un desafío impostergable en estos tiempos.

Los compuestos hidrocarbonados derivados de ácidos grasos como alcanos, alcoholes y biodiesel -entre otros-, poseen un gran potencial como biocombustibles [170]. Sin embargo, la acumulación celular de estos compuestos se encuentra generalmente limitada debido a una regulación por retroalimentación negativa y a problemas de toxicidad [170, 171]. Una alternativa para solucionar estos inconvenientes es la acumulación de ácidos grasos en forma de triglicéridos o ceras, formando inclusiones lipídicas osmóticamente inactivas. En el ámbito industrial, estos compuestos son obtenidos tradicionalmente a partir de plantas, tal es así que alrededor del 20% del aceite vegetal producido mundialmente es utilizado en la industria oleoquímica [172, 173]. Sin embargo también existen bacterias que pueden producir y acumular cantidades significativas de TAG y ceras. Las mismas son por lo general bacterias gram positivas de alto contenido de GC en su genoma, como las pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* y *Nocardia* [12]; aunque también se han encontrado algunas especies gram negativas, como *Acinetobacter baylyi*, con la capacidad de acumular TAG y ceras [47, 48].

En términos productivos, y comparados con las plantas, los microorganismos poseen un ciclo de vida más corto, menor superficie requerida para su crecimiento, son menos afectados por los cambios climáticos estacionales y tienen la posibilidad de

ser escalados a nivel industrial [174]. Los microorganismos ofrecen, además, la posibilidad de utilizar fuentes de carbono alternativas y sustentables como celulosa, lignina, CO<sub>2</sub>, evitando así la competencia por materias primas con el sector alimenticio [175]. Sin embargo, los microorganismos que en forma nativa producen TAG en altas cantidades generalmente poseen una baja velocidad de crecimiento respecto a otras bacterias modelo como *E. coli* o *B. subtilis* [12, 176]. Además, en estas especies la síntesis de TAG se encuentra regulada en función de la disponibilidad de nutrientes y el estadio de crecimiento. Esto hace que sean necesarias numerosas modificaciones genéticas para lograr una alta producción de TAG en condiciones industriales [177]. En este contexto, la producción de TAG en *E. coli* puede ser una alternativa válida en el futuro [176]. Este organismo constituye un hospedador heterólogo de crecimiento rápido, ampliamente utilizado para la expresión de proteínas recombinantes y para el cual existen numerosas herramientas que permiten su modificación genética y metabólica [170, 176]. *E. coli* se ha utilizado satisfactoriamente para la producción de ácidos grasos libres, alcoholes de cadena corta y larga, biodiesel, alcanos, y otros productos con potencial biocombustible [12, 171, 178, 179]. Sin embargo, se han publicado hasta el momento unos pocos estudios en los que se expresan rutas biosintéticas en *E. coli* con el fin de producir TAG [164, 177, 180]. Estas vías se basan en la expresión de una enzima con actividad DGAT, capaz de esterificar los precursores DAG y acil-CoA. Sin embargo, para lograr la síntesis de TAG es fundamental aumentar los niveles de DAG en *E. coli*, ya que la disponibilidad de este metabolito se encuentra fuertemente regulada en este organismo [163, 176, 181]. Para ello se han implementado dos estrategias distintas: por un lado, la sobre-expresión de la fosfatidilglicerol fosfatasa nativa PgpB en un contexto genético salvaje [177]; por otro, la generación de una cepa mutante en el gen *dgkA*, que codifica para una DAG quinasa [46, 176, 180]. Esta mutación impide el reciclaje de DAG producido durante la síntesis de MDO, y por lo tanto provoca un aumento en los niveles intracelulares de DAG [163].

En el año 2003, Kalscheuer y Steinbüchel caracterizaron la primer DGAT bacteriana: AtfA de *Acinetobacter baylyi* ADP1, capaz de acilar tanto DAG como alcoholes primarios, generando TAG o ceras respectivamente [47]. Posteriormente en nuestro laboratorio se identificó la enzima DGAT Sco0958 de *S. coelicolor* como la

principal enzima responsable de la síntesis de TAG en esta bacteria [46]. Este trabajo fue pionero en relación a la síntesis de TAG en *E. coli* donde, con el objetivo de caracterizar a la enzima DGAT, se expresó la misma en una cepa de *E. coli* mutante en el gen *dgkA* y se detectó por primera vez la síntesis *de novo* de TAG en esta bacteria naturalmente no oleaginosa [46]. A posteriori Rucker *et al.* reportaron la producción de TAG en *E. coli* a través de la expresión de la fosfatasa PgpB y la DGAT AtfA, alcanzando títulos de 1,1 mg/L [177]. Hacia fines del año 2013 Lin *et al.* [180], siguiendo el enfoque de Arabolaza *et al.* [46], expresaron las DGAT Sco0958 y WS1, de *S. coelicolor* y *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, respectivamente, en una cepa de *E. coli*  $\Delta dgkA$  [180]. En este trabajo se llegó a obtener 4,55% de TAG (g TAG/100 g de material celular seco) expresando la enzima WS1. Por último, en el año 2014 Janssen y Steinbüchel, lograron alcanzar una producción de 8,2% de TAG y 522 mg/L de medio de cultivo expresando AtfA en una cepa de *E. coli*  $\Delta dgkA$  y cultivando esta cepa en *batch* alimentado con limitación en la fuente de nitrógeno [164]. En este mismo trabajo, la expresión de AtfA junto con la fosfatasa PgpB, en un contexto de una cepa de *E. coli* salvaje, acumuló un 0,3% de TAG mientras que, curiosamente, no se evaluó la co-expresión de las enzimas AtfA-PgpB en un contexto  $\Delta dgkA$  [164].

## **8.2. Objetivos particulares**

En el presente capítulo nos propusimos utilizar los conocimientos acerca de la síntesis de TAG en *S. coelicolor* desarrollados en nuestro laboratorio, a fin de optimizar una cepa de *E. coli* para la producción de estos lípidos neutros. Para ello nos planteamos:

- Analizar el efecto de la expresión de la enzima PAP Lpp $\beta$  sobre la síntesis de TAG de una cepa de *E. coli*  $\Delta dgkA$  que también expresa la DGAT Sco0958.
- Optimizar el flujo de carbono hacia la síntesis de TAG a través de herramientas de ingeniería metabólica.
- Evaluar la producción de TAG en cultivos de *batch* alimentado con el fin de maximizar la productividad volumétrica de nuestro sistema.



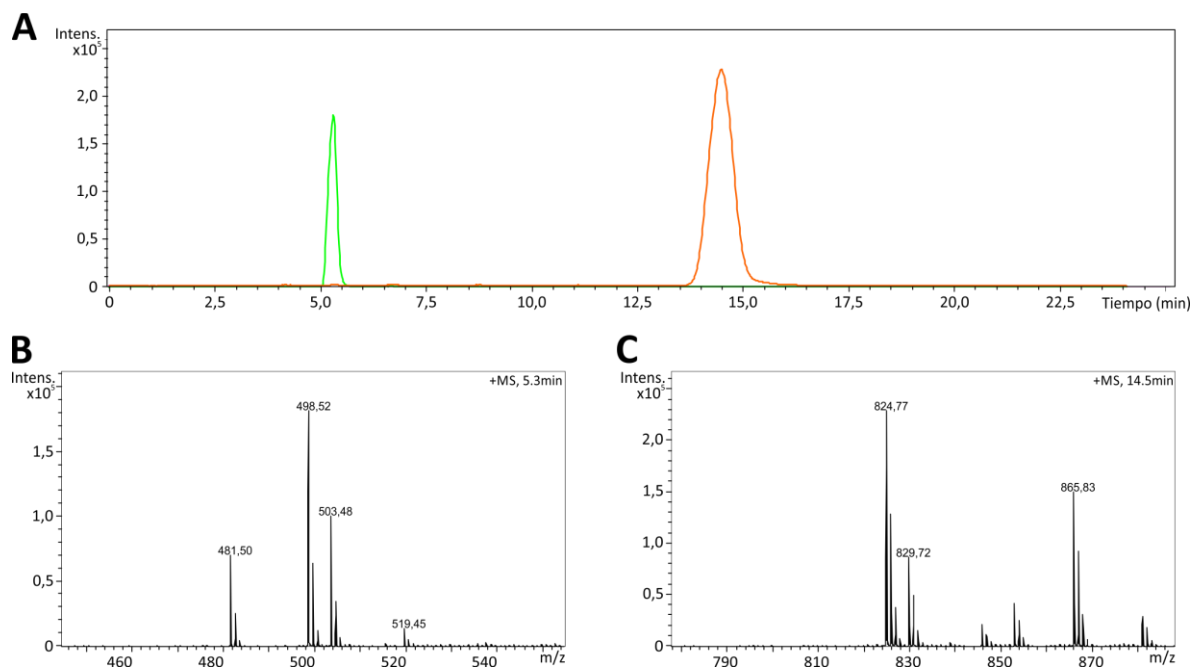
pET28-LPP $\beta$ , en donde la expresión de la DGAT es inducida por L-Arabinosa y la expresión de la PAP por IPTG, respectivamente.

El experimento de inducción se realizó cultivando la cepa generada a 37 °C hasta  $DO_{600nm}=0,6$ , donde se dividió el cultivo inicial en cuatro alícuotas y se indujo la expresión de la DGAT en las fracciones correspondientes. Luego, se disminuyó la temperatura de incubación a 23 °C, y una hora más tarde se adicionó IPTG 0,1 mM para inducir Lpp $\beta$  en los cultivos correspondientes, a la vez que se marcó radiactivamente a los mismos por agregado de [ $^{14}C$ ]-acetato. Estos cultivos fueron incubados a 23 °C con agitación durante 16 hs, luego se extrajeron los lípidos totales y se separaron por medio de TLC. A partir de la autorradiografía de la TLC correspondiente se puede observar que, efectivamente, la sola expresión de la enzima DGAT es suficiente para la síntesis de TAG en esta cepa (Figura 31, calle 2). Más aún, la co-expresión de Sco0958 y Lpp $\beta$  es capaz de aumentar los niveles de TAG 1,6 veces respecto de la cepa que sólo expresa Sco0958 (Figura 31, calle 4). Curiosamente, también se detectó síntesis de TAG en condiciones donde Sco0958 no había sido inducida (Figura 31, calles 1 y 3), posiblemente debido a una expresión residual de esta DGAT a partir del promotor  $P_{BAD}$  o, como sugiere Rotering H. *et al.*, debido a la existencia de un metabolismo minoritario de lípidos neutros aún no descrito en *E. coli* [182].

En definitiva, estos resultados indican que la disponibilidad de DAG es crucial para obtener mayores niveles de síntesis de TAG, y que la expresión de la enzima PAP Lpp $\beta$  ayuda a superar esta limitante.

### 8.3.2. Cuantificación de TAG por medio de espectrometría de masas

Los TAG son generalmente cuantificados a través de la derivatización de sus ácidos grasos a metil-ésteres y posterior resolución por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) [164], o por saponificación de sus ácidos grasos y posterior detección colorimétrica de los mismos [45]. Ambas técnicas incluyen un paso de modificación en el que se pierde la información de la identidad de las especies de TAG, determinándose el contenido promedio de cada ácido graso en la muestra. Más aún, cuando los TAG son compuestos minoritarios en el total lipídico de



**Figura 32. LC-MS de los compuestos puros tripalmitina y cetil palmitato. A.** Cromatograma seleccionando los iones  $[M+NH_4]^+$  correspondientes a cetil palmitato (verde,  $m/z$  498,52) y tripalmitina (anaranjado,  $m/z$  824,77). **B.** Espectro de masa tomado a los 5,3 min de elución, correspondiente a la elución de cetil palmitato. **C.** Espectro de masa tomado a los 14,5 min de elución, correspondiente a la elución de tripalmitina.

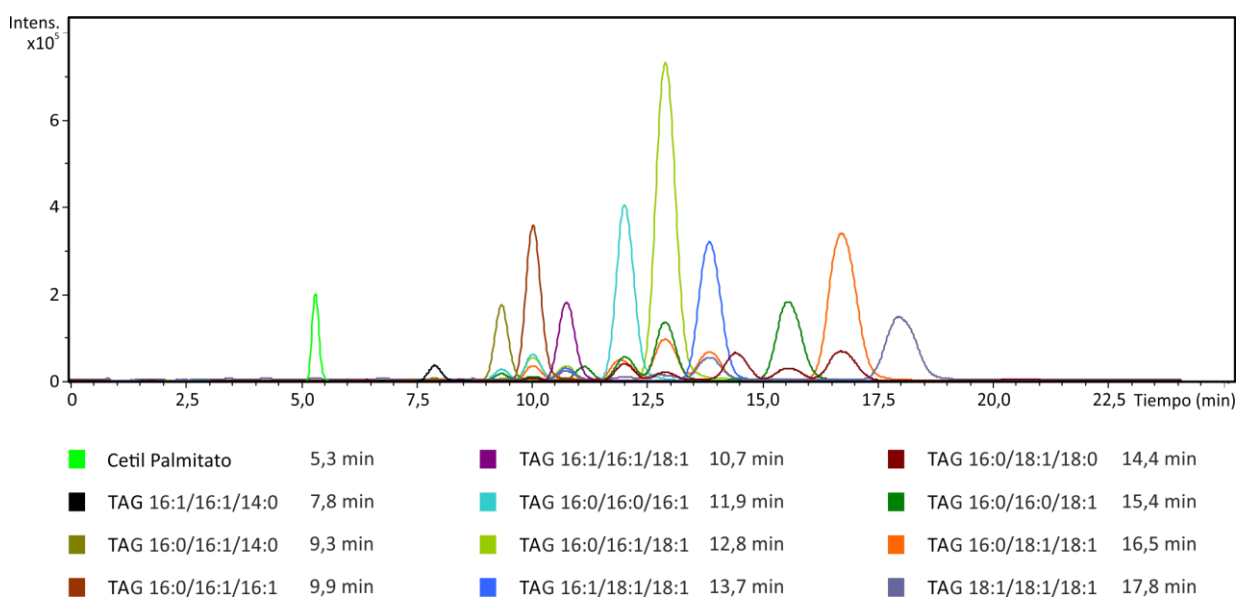
la célula, es necesario un paso previo de separación y purificación, generalmente realizado a través de TLC preparativa y extracción orgánica de la porción de sílica que contiene a los lípidos de interés. Estos tratamientos previos a la identificación, adicionan tiempo y dificultad a la técnica, y son potenciales fuentes de error en las determinaciones.

La técnica de LC-MS es una herramienta precisa y sensible que permite, a través de un paso de LC, separar los compuestos en función de sus características químicas, y luego por medio de MS ionizar la molécula de TAG completa, generando un ion molecular del que se puede inferir la composición de grupos acilos a partir de su relación  $m/z$  [160]. Además, en los casos en que es necesario determinar inequívocamente la identidad de los grupos acilos en cada posición, se pueden realizar ensayos de fragmentación de cada especie de TAG a través de MS/MS [160, 177]. Por ejemplo, Rucker *et al.* utilizó la técnica de LC-MS/MS para la cuantificación de TAG en cepas de *E. coli* [177]: los autores realizan una separación cromatográfica en columna de fase reversa C18 a una temperatura de 55 °C, utilizando acetonitrilo e isopropanol

suplementados con formiato de amonio como fase móvil. A través de este método, los autores lograron ionizar los TAG formando el ion molecular  $[M+NH_4]^+$  e identificaron cada compuesto por fragmentación en ensayos de MS/MS. Sin embargo, este método requiere un análisis exhaustivo de los iones moleculares y sus fragmentos derivados. Además, como los picos de elución correspondientes a cada especie de TAG eluyen solapados, debido a una baja resolución cromatográfica, se requiere una corrida cromatográfica adicional para identificar cada especie de TAG, en el caso que se quiera analizar su identidad por MS/MS.

Teniendo en cuenta nuestra experiencia previa en la determinación de DAG por LC-MS, se desarrolló un método basado en una separación cromatográfica en fase reversa con matriz C8, utilizando metanol suplementado con acetato de amonio como fase móvil. Se utilizó tripalmitina como TAG estándar, y a partir de la inyección del mismo en el sistema de LC-MS se pudo corroborar su ionización como  $[M+NH_4]^+$  con un  $m/z= 824,77$  (Figura 32). El cetil palmitato se adicionó a la muestra con el fin de utilizarlo como un control interno (Figura 32). Además se calculó una curva de calibración a partir de la regresión lineal entre el área de los picos para el ión  $[M+NH_4]^+$  y la cantidad de moles inyectados en la muestra.

**Figura 33. Cromatograma de una muestra de *E. coli* productora de triglicéridos obtenido a partir de la técnica de LC-MS.** Debajo del gráfico se muestra la leyenda de colores que identifica a cada especie de TAG detectada, acompañada de su tiempo de elución en este sistema.



La inyección de extractos lipídicos totales de las cepas de *E. coli* productoras de TAG en el sistema de LC-MS arrojó como resultado perfiles de elución de los distintos TAG como el que se muestra en la Figura 33. La inferencia de los isómeros de ácidos grasos a los que corresponde cada especie de TAG se realizó en función de la composición de ácidos grasos de *E. coli* a 20-22 °C reportadas en estudios previos (Tabla VIII) [183].

En conclusión, se desarrolló un método que permite separar los TAG del resto de los lípidos celulares a través de una columna cromatográfica de fase reversa C8 y a la vez determinar tanto la cantidad como la composición de los mismos por MS, sin necesidad de derivatizar ni separar previamente los distintos compuestos del extracto lipídico.

**Tabla VIII.** Composición de ácidos grasos de *E. coli* cultivada a 20-22 °C. Adaptada de Cahoon *et al.* [183]

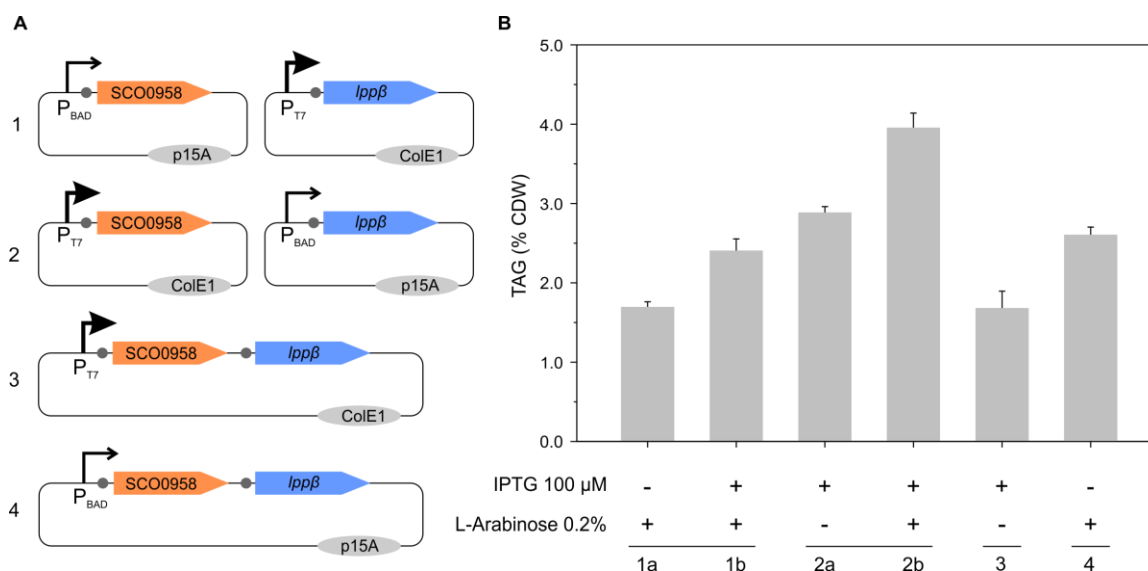
Ácido graso	14:0	16:0	16:1 $\Delta^6$	16:1 $\Delta^9$	18:1 $\Delta^8$	18:1 $\Delta^{11}$	Otros <sup>a</sup>
Contenido (%)	5,3	27,8	ND <sup>b</sup>	21,1	ND <sup>b</sup>	36,6	6,7

<sup>a</sup>Incluye ácidos grasos de 12:0, 18:0 y derivados ciclopropanos

<sup>b</sup>ND: No detectable

### 8.3.3. La optimización del sistema de expresión de Sco0958 y Lpp $\beta$ conlleva a un aumento en el contenido de TAG

Con el objetivo de optimizar la producción de TAG, se construyeron distintos vectores plasmídicos, que difieren en el promotor y en el origen de replicación, de manera de modular la expresión de Sco0958 y Lpp $\beta$  y evaluar su impacto sobre el contenido de TAG. Para ello, los genes que codifican para estas proteínas fueron clonados en los vectores pET28 (*ori* ColE1, P<sub>T7</sub>) y pBAD33 (*ori* p15A, P<sub>BAD</sub>), ya sea en forma independiente, o formando operones bicistrónicos (Figura 34.A). Estos plásmidos fueron introducidos en *E. coli* BL21  $\Delta$ *dgkA* por transformación, generando cuatro cepas derivadas cuyo contenido de TAG fue analizado a través de ensayos de

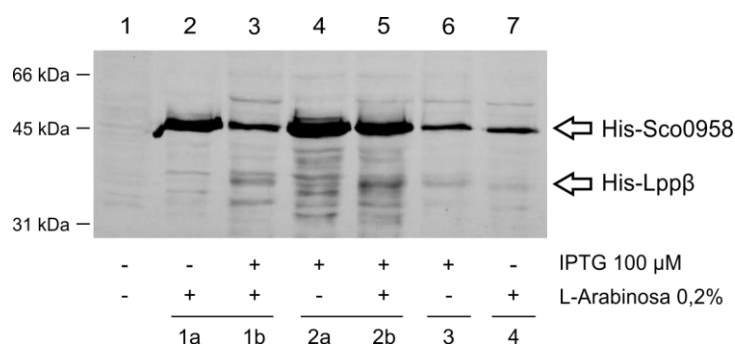


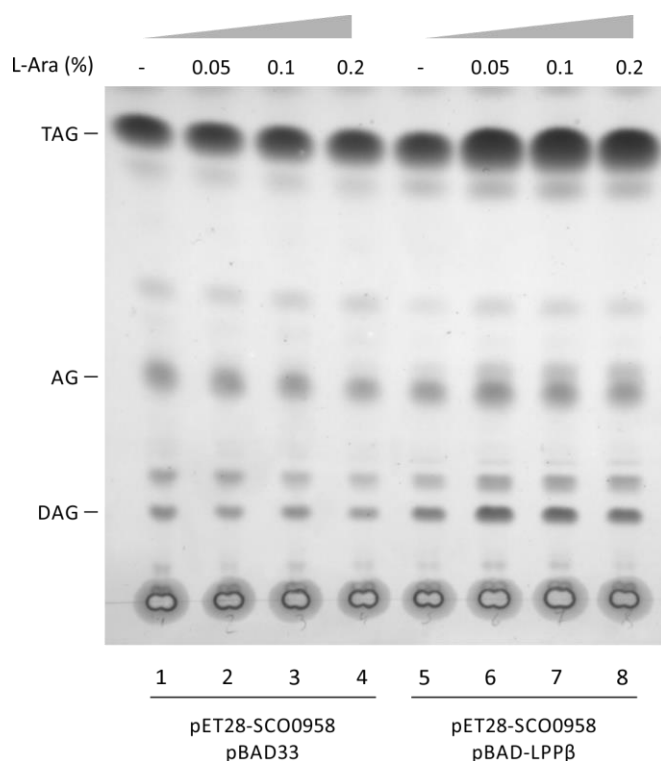
**Figura 34. Optimización del sistema de expresión de los genes SCO0958 y *lppβ* en la cepa MPS11.** **A.** Esquema de los vectores utilizados. Los círculos grises representan las secuencias de unión a ribosoma de cada gen. **B.** Cultivos de la cepa MPS11 portando los diferentes sistemas de expresión (1-4) fueron inducidos con IPTG y/o L-Arabinosa como se describe en Materiales y Métodos y la producción de TAG fue cuantificada por LC-MS.

expresión de proteínas similares a los descritos anteriormente. Los resultados de esta cuantificación revelan que el sólo hecho de expresar la DGAT Sco0958 con el promotor P<sub>T7</sub> es suficiente para aumentar los niveles de TAG respecto a las cepas evaluadas en la sección previa (Figura 34.B, columna 2a vs 1b). Esto sugiere que esta actividad enzimática es limitante para la formación de TAG cuando se la expresa a partir del promotor P<sub>BAD</sub>. En forma consecuente con los ensayos anteriores, en ambos casos la expresión adicional de la enzima PAP Lppβ logró incrementar los niveles de TAG (Figura 34.B, columnas 1b y 2b). La producción máxima (3,95% TAG) fue alcanzada mediante la co-expresión de SCO0958 desde el promotor fuerte T7, y *lppβ* desde P<sub>BAD</sub> (Figura 34.B, columna 2b). Curiosamente la expresión de los operones SCO0958-*lppβ*, tanto desde P<sub>T7</sub> como desde P<sub>BAD</sub>, causó una menor acumulación de TAG (Figura 34.B, columnas 3 y 4). El análisis de la expresión de ambas proteínas a través de ensayos de Western blot con anticuerpos anti-His reveló que en ambos casos los niveles de Sco0958 se ven severamente afectados en comparación a las cepas donde ambas proteínas son expresadas en replicones independientes; siendo ésta posiblemente la causa de la baja eficiencia en la acumulación de TAG en dichas cepas (Figura 35).

Los resultados anteriores demuestran que para alcanzar un nivel máximo de TAG es necesario alcanzar un balance relativo en la fuerza de expresión de ambas proteínas (Figura 35). En este sentido, se observó que existe una interacción entre ambos sistemas de expresión: en la Figura 35 puede observarse que los niveles de expresión de Sco0958 disminuyen marcadamente cuando esta proteína es co-expresada junto a Lppβ, respecto a la situación donde es expresada sola. Esto puede deberse a una cuestión meramente regulatoria, relacionada con la represión catabólica del metabolismo de azúcares, o bien, a que la alta demanda energética celular asociada a la co-expresión de ambas proteínas, provoque una disminución en la eficiencia de transcripción-traducción respecto a la situación en la cual sólo Sco0958 es expresada. Teniendo en cuenta estas hipótesis, se decidió evaluar en la cepa cuyo contenido de TAG fue máximo, el efecto de la modulación de la concentración del inductor de Lppβ, L-Arabinosa (L-Ara), sobre la acumulación de TAG. A través de ensayos de expresión, se pudo comprobar que existe un máximo en el contenido de TAG de 4,15%, cuando la concentración de L-Ara es de 0,1% (Figura 36). El ensayo realizado con una cepa isogénica, pero que porta el vector vacío pBAD33 en reemplazo del vector pBAD-LPPβ, permitió corroborar que el incremento en el contenido de TAG observado tras la adición de cantidades crecientes de L-Ara fue debido a la expresión de la PAP, y no a la utilización de este azúcar como fuente de carbono (Figura 36).

**Figura 35. Análisis de la expresión de His-Sco0958 y Lppβ en los distintos sistemas de expresión.** Cultivos de las cepas de *E. coli* MPS11 portando los diferentes sistemas de expresión (1-4, Figura 34.A) fueron inducidos con IPTG y/o L-Arabinosa como se describe en Materiales y Métodos. La expresión de estas proteínas fue detectada a través de western blot utilizando anticuerpos anti-His. La calle 1 corresponde a la cepa MPS11 sin plásmidos. Los números inferiores se corresponden con los sistemas de expresión de la Figura 34.





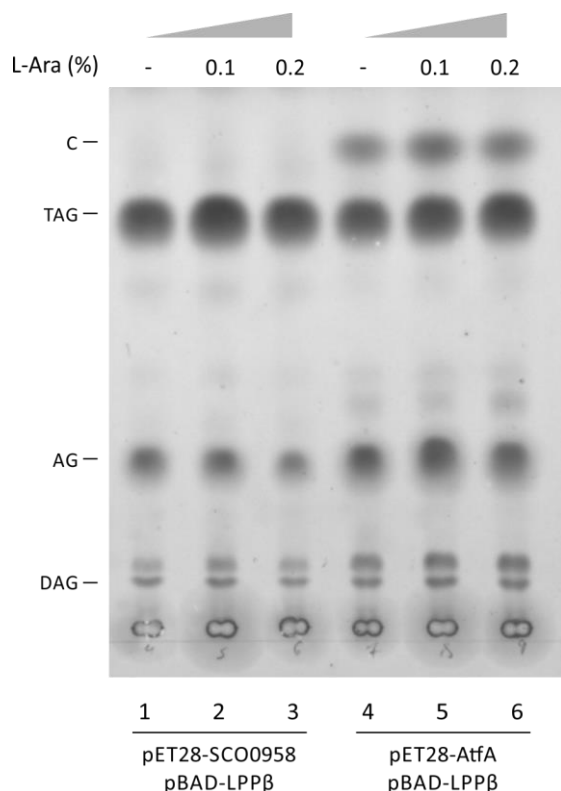
**Figura 36. Efecto del agregado del inductor L-Arabinosa sobre el contenido de TAG de la cepa MPS11/pET28-0958/pBAD-Lppβ.**

Cultivos de las cepas MPS11 que portan los plásmidos detallados en la parte inferior fueron inducidos con IPTG y distintas concentraciones de L-Arabinosa como se describe en Materiales y Métodos. A partir de las células inducidas se realizaron los extractos lipídicos totales que fueron resueltos por TLC y revelados con Cu-fosfórico. DAG, diacilglicerol; AG, ácidos grasos; TAG, triacilglicerol

En conclusión, a través del ensayo de distintas variantes en los vectores de expresión de Sco0958 y Lppβ se logró incrementar el contenido de TAG de un 2,4% en la condición 1b a un 3,95% en condición 2b (Figura 34). Luego, a través de la modulación de la cantidad de inductor de Lppβ fue posible lograr un incremento adicional de alrededor del 5%, lográndose alcanzar un máximo de 4,15% de TAG (Figura 36).

#### 8.3.4. Comparación del perfil lipídico de las DGAT Sco0958 y AtfA

La enzima AtfA de *A. baylyi* ADP1 fue el primer miembro caracterizado de la familia de DGAT procarióticas, desde entonces nombrada WS/DGAT (por wax synthase/diacylglycerol acyltransferase) [47]. La expresión heteróloga de esta enzima ha sido utilizada para la producción de una gran variedad de metabolitos en *E. coli*, entre los que se encuentran metil- y etil-ésteres de ácidos grasos, ceras de cadena larga y triglicéridos [177, 178, 184]. Con el objetivo de evaluar la capacidad de esta enzima de generar TAG en *E. coli*, y compararla con la DGAT de *S. coelicolor*, Sco0958, se generó una cepa de expresión *E. coli* BL21  $\Delta dgkA$ /pET28-AtfA/pBAD-LPPβ, que posee al gen *atfA* bajo el control de  $P_{T7}$  y a *lppβ* bajo el control de  $P_{BAD}$ . Esta cepa fue capaz de producir TAG en forma satisfactoria, pero a niveles 10,6% menores



**Figura 37. Perfil lipídico de cepas que expresan Sco0958 o AtfA** Cultivos de las cepas MPS11 que portan los plásmidos detallados en la parte inferior fueron inducidos con IPTG y distintas concentraciones de L-Arabinosa como se describe en Materiales y Métodos. A partir de las células inducidas se realizaron los extractos lipídicos totales que fueron resueltos por TLC y revelados con Cu-fosfórico. DAG, diacilglicerol; AG, ácidos grasos; TAG, triacilglicerol; C, ceras.

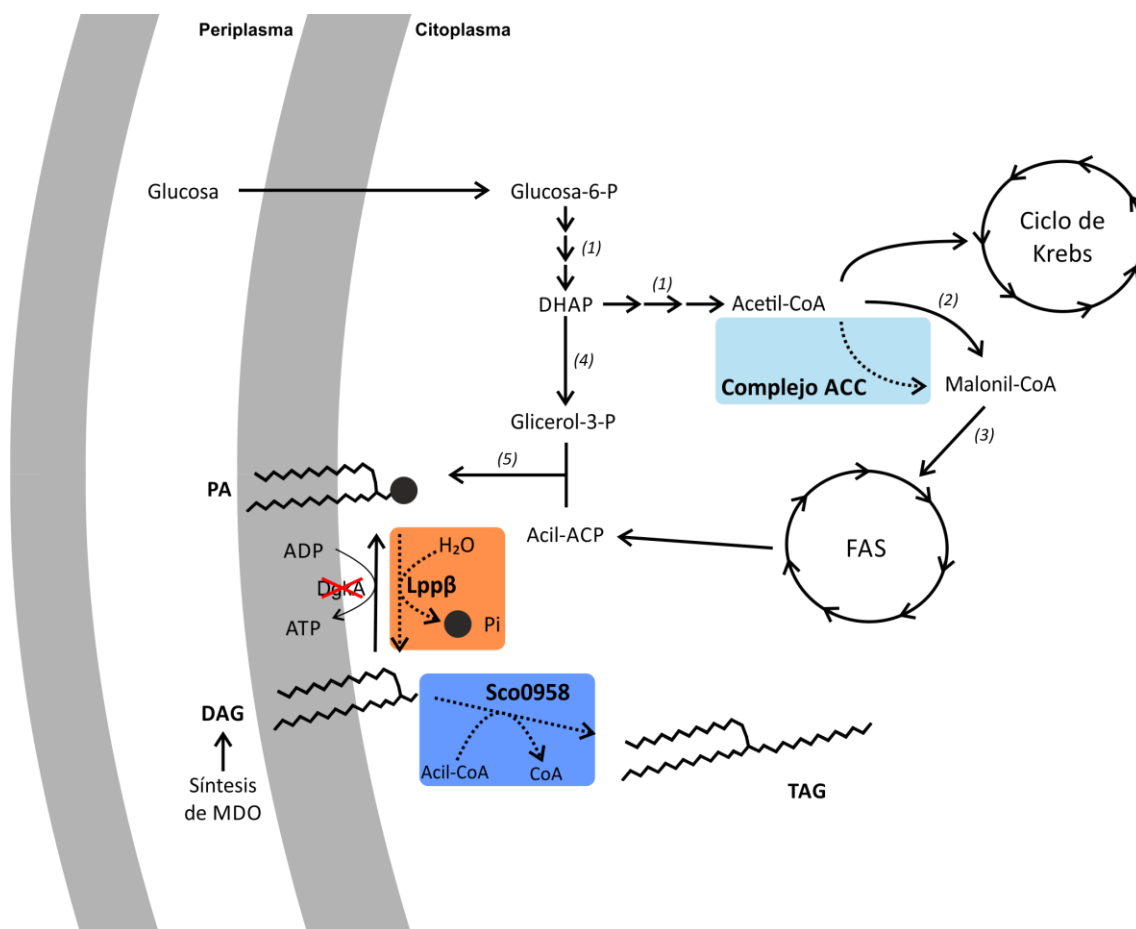
comparados con la expresión de Sco0958. Además, en las cepas que expresan AtfA se detectó un compuesto adicional, cuya migración en TLC indicaría que se trata de una cera (Figura 37). Este resultado está de acuerdo con estudios previos en donde se demostró que AtfA es capaz de sintetizar butil-ésteres de ácidos grasos en *E. coli*, aún sin suplementar el medio de cultivo con el alcohol correspondiente [178].

Estos resultados indican que Sco0958 tiene una mejor eficiencia de producción de TAG en *E. coli*, pudiéndose deber esto a una mejor actividad de esta enzima frente a DAG, o bien a una mejor expresión de la misma en este hospedador heterólogo. Sin embargo, aún cuando la expresión de AtfA pudiera ser optimizada para incrementar el contenido de TAG, las observaciones anteriores indican que Sco0958 tendría una mejor especificidad que AtfA para generar TAG como producto, y por ende Sco0958 sería un mejor candidato de enzima DGAT para la producción de este lípido neutro en *E. coli*.

### 8.3.5. Optimización del sistema de producción de TAG a través de ingeniería metabólica

Habiendo dirigido nuestro esfuerzo en los apartados anteriores a asegurar la disponibilidad de DAG para la síntesis de TAG, nos propusimos evaluar qué otros metabolitos podrían estar siendo limitantes para alcanzar un mayor contenido de TAG en *E. coli*. Primero decidimos aumentar los niveles del otro sustrato de Sco0958, los acil-CoA, a través de la sobre-expresión de *fadD* y la delección del gen *fadE*. FadD es una acil-CoA sintetasa capaz de activar ácidos grasos (AG) libres esterificándolos con una molécula de CoA [23], mientras que FadE es una acil-CoA deshidrogenasa que cataliza la primer reacción del ciclo de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, la oxidación de un acil-

**Figura 39. Rutas metabólicas implicadas en la síntesis de TAG en *E. coli*.** Los pasos enzimáticos expresados en forma heteróloga se encuentran encuadrados en color. La mutación en el gen *dgkA* está señalada a través de una cruz roja. Sco0958, Lpp $\beta$  y ACC corresponden a las enzimas DAG aciltransferasa, fosfatidato fosfatasa y acetil-CoA carboxilasa de *S. coelicolor*, respectivamente. (1) Glicólisis; (2) Acetil-CoA carboxilasa; (3) Malonil-CoA:ACP transacilasa; (4) Glicerol-3P deshidrogenasa; (5) Glicerol-3P y lisofosfatidato aciltransferasas; DHAP, dihidroxiacetona-fosfato; FAS, sintasa de ácidos grasos; MDO, oligosacáridos derivados de membrana; PA, ácido fosfatídico; DAG, diacilglicerol; TAG, triacilglicerol.



CoA a un 2-enoil-CoA [185]. En este sentido, la co-expresión de las enzimas Sco0958 y Lpp $\beta$  en un contexto genético BL21  $\Delta dgkA \Delta fadE$  llevó a un incremento de un 9% en el contenido de TAG (Tabla IX). Curiosamente, la sobre-expresión de FadD en esta cepa no contribuyó a un aumento en la síntesis de TAG, indicando que probablemente la expresión endógena de esta enzima es suficiente para cubrir las necesidades de acil-CoA por parte de Sco0958 (Tabla IX).

**Tabla IX.** Contenido de TAG de las cepas evaluadas en esta sección

Genotipo relevante	Gen (s) expresados desde		TAG (% peso celular seco) <sup>a</sup>
	pBAD	pET28	
1 $\Delta dgkA$	<i>lpp<math>\beta</math></i>	SCO0958	4,15 $\pm$ 0,05
2 $\Delta dgkA \Delta fadE$	<i>lpp<math>\beta</math></i>	SCO0958	4,52 $\pm$ 0,08
3 $\Delta dgkA \Delta fadE$	<i>lpp<math>\beta</math></i>	SCO0958- <i>fadD</i>	3,9 $\pm$ 0,1
4 $\Delta dgkA \Delta fadE$	<i>lpp<math>\beta</math></i>	SCO0958- <i>gpsA</i>	4,1 $\pm$ 0,2
5 $\Delta dgkA \Delta fadE$	<i>lpp<math>\beta</math></i>	SCO0958-SCO0958	4,45 $\pm$ 0,07
6 $\Delta dgkA \Delta fadE$	<i>lpp<math>\beta</math></i>	SCO0958- <i>fadR</i>	2,9 $\pm$ 0,3
7 $\Delta dgkA \Delta fadE$	<i>lpp<math>\beta</math></i>	SCO0958- <i>accA2-accE-accB</i>	4,85 $\pm$ 0,08

<sup>a</sup>los valores representan la media  $\pm$  desvío estándar de triplicados para cada determinación

Con el fin de lograr un incremento mayor en el contenido de TAG de esta cepa, nos propusimos sobre-expresar proteínas involucradas en pasos claves del metabolismo, que pudieran estar limitando el flujo de carbono hacia triglicéridos. En este sentido, se generaron vectores de expresión derivados del plásmido pET28-0958 en el que los genes codificantes de las siguientes enzimas fueron clonados formando un operón bicistrónico en conjunto con SCO0958: 1) GpsA, glicerol 3-fosfato (G3P) deshidrogenasa (G3P dH) de *S. coelicolor* que cataliza la generación de G3P a partir del intermediario dihidroxiacetona-fosfato. El G3P es un precursor de la síntesis de ácido fosfatídico, y en este sentido se ha reportado que la expresión de la G3P dH de *Sacharomyces cerevisiae* en *Brassica napus* provoca un aumento del 40% en el contenido de aceites en semilla [186]; 2) una segunda copia de SCO0958; 3) FadR, el

regulador transcripcional del metabolismo de AGs en *E. coli* [84, 89], cuya sobre-expresión causa un incremento significativo en el contenido de ácidos grasos de esta bacteria [187]; 4) El complejo acetil-CoA carboxilasa (ACC) de *S. coelicolor*, formado por las subunidades AccA2, AccB y AccE, que genera el malonil-CoA necesario para la síntesis de AG [39, 102]. El análisis del contenido de TAG en cada una de las cepas derivadas de *E. coli* BL21  $\Delta dgkA \Delta fadE$  (MPS13) reveló que sólo la expresión adicional del complejo ACC de *S. coelicolor* fue capaz de lograr a un moderado aumento en el contenido de TAG (Tabla IX). La cepa *E. coli* BL21  $\Delta dgkA \Delta fadE/pET28-0958-ACC/pBAD-LPP\beta$  (Figura 39) alcanzó un contenido de TAG de 4,85%, un 7,3% de incremento respecto a la cepa isogénica que no expresa la ACC (*E. coli* BL21  $\Delta dgkA \Delta fadE/pET28-0958/pBAD-LPP\beta$ ). Este efecto podría deberse a un incremento en la síntesis de ácidos grasos en forma análoga a lo que ocurre cuando se sobre-expresa la ACC nativa de *E. coli* [188]. En estas condiciones, la mejora en la síntesis de TAG podría deberse tanto al incremento en el abastecimiento de DAG, a través del intermediario PA, como del precursor acil-CoA.

#### 8.3.6. Aumento de la productividad volumétrica por medio de cultivos de alta densidad en *batch* alimentado

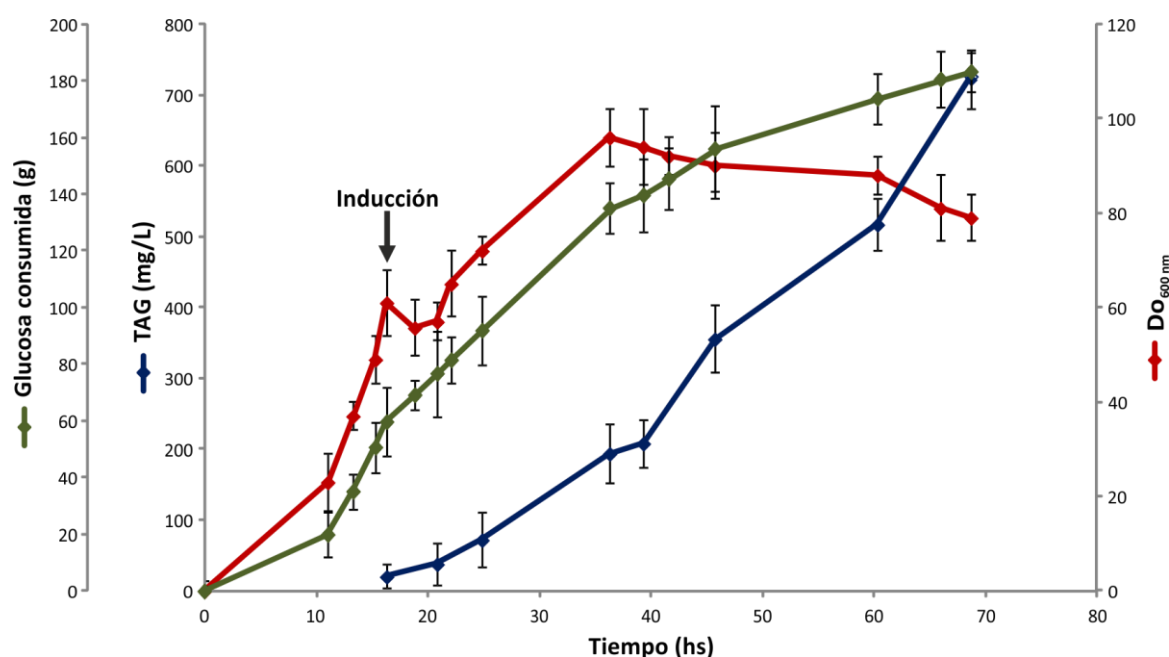
Uno de los objetivos primordiales en el desarrollo de un sistema heterólogo de producción de TAG es el posterior escalado del proceso a niveles industriales. En este sentido, los cultivos en *batch* alimentado han sido ampliamente utilizados para producir proteínas recombinantes y/o metabolitos celulares en *E. coli*. Esta técnica se basa en el control continuo de los parámetros de oxigenación, temperatura, pH y concentración de fuente de carbono del cultivo en crecimiento. En un primer momento se cultiva al organismo en un medio de cultivo apropiado hasta el consumo total de la fuente de carbono. Luego, por medio de una bomba peristáltica, se adiciona fuente de carbono a un flujo controlado que permite variar la velocidad de crecimiento del mismo, logrando de esta manera un control integral del proceso y llegando a concentraciones celulares mayores a 100 unidades de  $DO_{600nm}$  para *E. coli*.

En este sentido, se decidió cultivar en *batch* alimentado a la cepa *E. coli*  $\Delta dgkA \Delta fadE/pET28-0958-ACC/pBAD-LPP\beta$ . Se utilizó medio de cultivo mínimo mineral,

descrito en la sección de Materiales y Métodos, y glucosa como fuente de carbono. Como en la inducción del sistema se utiliza el azúcar L-Arabinosa, se decidió realizar una delección en el operón *araBAD*. Estos genes codifican para las enzimas responsables del catabolismo de L-Arabinosa y por ende su delección asegura la no degradación del inductor a lo largo del proceso de cultivo generándose entonces un inductor gratuito.

Los cultivos se realizaron inicialmente a 37 °C, con una concentración de glucosa de 20 g/L y asegurando un nivel de saturación de oxígeno mayor al 40% para mantener a las células en un metabolismo aeróbico. Luego del consumo total de la fuente de carbono ( $DO_{600nm}$  aprox. 20), se conectó la bomba de alimentación de manera de suministrar glucosa pero manteniéndola como sustrato limitante. El objetivo de no lograr un exceso de la fuente de carbono radica en que en esas condiciones, el ciclo de Krebs de *E. coli* se ve saturado, siendo la bacteria es capaz de respirar y fermentar el azúcar de manera simultánea. Esta situación metabólica lleva a un menor rendimiento de la fuente de carbono y a la producción de ácido acético, cuya acumulación es

**Figura 40. Cultivo de *E. coli* MPS15/pET28-0958/pBAD-Lpp $\beta$  en batch alimentado.** Esta cepa de *E. coli* fue cultivada a altas densidades como se describe en el texto, tomándose alícuotas periódicamente para la determinación de  $DO_{600nm}$ , concentración de glucosa y contenido de TAG. Los valores corresponden a triplicados para cada determinación.



detrimental para la producción heteróloga de proteínas. La inducción de la producción de proteínas heterólogas se realizó a una  $DO_{600nm}$  de 60, luego de bajar la temperatura del cultivo a 23 °C para mejorar la solubilidad de las proteínas expresadas. Periódicamente se tomaron muestras para analizar  $DO_{600nm}$ , concentración de glucosa, y el contenido de TAG durante el proceso.

La Figura 40 muestra el desarrollo del proceso de *batch* alimentado. El proceso completo demoró 68 hs, tras las cuales fue posible obtener 722,1 mg TAG L<sup>-1</sup>, con un contenido de TAG celular de 2,83%. La composición de los triglicéridos producidos refleja la composición de ácidos grasos totales de *E. coli*, ya que se encuentran mayoritariamente derivados saturados y monoinsaturados de ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono (Tabla X).

**Tabla X.** Composición de TAG extraído de cultivos en *batch* alimentado

Composición de AG en TAG	Contenido relativo de TAG <sup>a</sup>
16:0/16:1/18:1	23,4 ± 0,9%
16:0/18:1/18:1	15,0 ± 0,8%
16:1/18:1/18:1	11,3 ± 0,6%
16:0/16:0/16:1	11,1 ± 0,2%
18:1/18:1/18:1	8,2 ± 0,4%
16:0/16:1/16:1	8,0 ± 0,9%
16:0/16:0/18:1	7,3 ± 0,5%
16:1/16:1/18:1	4,4 ± 0,5%
16:0/16:1/14:0	3,5 ± 0,5%
18:1/18:1/18:0	2,1 ± 0,2%
Otros <sup>b</sup>	5,7 ± 0,9%

<sup>a</sup> Los valores representan la media ± desvío estándar de mediciones por triplicado.

<sup>b</sup> Incluye especies de TAG minoritarias: 16:0/16:0/16:0, 16:0/18:1/18:0, 16:1/16:1/14:0, 16:0/16:0/14:0, 16:0/16:1/12:0, 16:1/16:1/16:1, 16:0/16:0/12:0, 16:1/16:1/12:0, 16:1/14:0/12:0, 14:0/14:0/14:0.

#### **8.4. Discusión y conclusiones**

En los últimos años, se realizaron numerosos esfuerzos con la finalidad de desarrollar sistemas microbianos capaces de producir compuestos con potencial aplicación como biocombustibles; siendo uno de los objetivos principales el de producir estos compuestos a partir de recursos renovables que no compiten con los alimentos por áreas cultivables aptas para agricultura [176, 189, 190].

En este sentido, los TAG constituyen un compuesto de reserva con una alta densidad energética y que pueden ser acumulados en altas cantidades intracelulares sin tener consecuencias osmóticas negativas para la supervivencia celular [12]. Los ácidos grasos que se encuentran esterificados a la molécula de glicerol pueden ser luego transesterificados con metanol o etanol, para generar biodiesel [165]. Alternativamente, los AG pueden ser potencialmente reducidos para generar alcoholes o aldehídos [170]; e incluso podrían ser descarboxilados, generando alcanos [190]. En este contexto, utilizando los conocimientos acerca de la síntesis de TAG en *S. coelicolor* desarrollados en nuestro laboratorio, nos propusimos diseñar un microorganismo capaz de acumular TAG en altas cantidades. Teniendo en cuenta que para que la producción microbiana de TAG sea factible, es necesario generar un hospedador que no sólo acumule altos niveles de TAG, sino que también posea una alta velocidad de crecimiento y bajos requerimientos nutricionales [176], decidimos utilizar a *E. coli* como plataforma para expresar los genes correspondientes a la biosíntesis de TAG de *S. coelicolor*.

Inicialmente, por medio de la expresión de *Lppβ* y *Sco0958* en un contexto genético  $\Delta dgkA$ , que impide el reciclado del DAG hacia la síntesis de fosfolípidos, fuimos capaces de lograr una acumulación de 2,4% TAG. Luego, por medio de la optimización del sistema de expresión, logramos incrementar este valor a un 4,15% TAG. Finalmente, a través de la delección en el gen *fadE*, que codifica para la primera enzima involucrada en el ciclo de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, y la sobre-expresión de la enzima ACC de *S. coelicolor*, fuimos capaces de lograr un contenido de TAG del 4,85%. Al fermentar esta cepa en biorreactores de *batch* alimentado observamos que el contenido de TAG en estas condiciones estaba severamente afectado respecto a los ensayos anteriores (2,83%). No obstante esta disminución, la implementación de nuestro sistema en cultivos de *batch* alimentado fue capaz de generar una

concentración de 722,1 mg de TAG/L de medio de cultivo al final del proceso, siendo ésta la mayor concentración de TAG reportada en la literatura hasta el momento para *E. coli* [164, 177, 180].

En este punto se pueden discutir básicamente dos aspectos del desarrollo logrado en este capítulo: 1) el menor contenido de TAG logrado en cultivos de *batch* alimentado respecto a los cultivos de *batch* (2,83% versus 4,85% TAG); y 2) la posible existencia de limitantes metabólicas o regulatorias en esta cepa, que impiden una mayor acumulación de TAG.

Respecto a la primer consideración, esta disminución en el contenido de TAG podría deberse al cambio en el medio de cultivo: los ensayos iniciales en *batch* se realizaron en medio LB mientras que en las fermentaciones, debido a su menor costo y mayor reproducibilidad, se utilizó medio mínimo mineral. Sin embargo, el uso de medio mínimo en cultivos en *batch* arrojó resultados similares a los obtenidos previamente con LB, lo que sugiere que las condiciones establecidas inicialmente no podrían ser extrapoladas directamente para el cultivo en biorreactores, y sería necesario un proceso de optimización particular para estos ensayos. La concentración de los inductores podría ser un factor a optimizar en este sistema: existen reportes que indican que la modulación de IPTG en función de la cantidad de células es fundamental para alcanzar altos rendimientos de producción en cultivos de alta densidad celular [191]. En estudios previos utilizando un contexto génico  $\Delta dgkA$  en *E. coli*, Janssen y Steinbüchel [164] fueron capaces de alcanzar una producción de 8,5% TAG y un título de 530 mg TAG/L luego de 68 hs de cultivo, utilizando un medio de cultivo mínimo mineral limitado en nitrógeno. Curiosamente, luego de ese período los autores lograron una  $DO_{600nm}$  de apenas 13,2. En este sentido, ha sido previamente reportado que la delección en el gen *dgkA* provoca una disminución en la velocidad de crecimiento [163, 164]. De manera análoga, en nuestro sistema de cultivo de *batch* alimentado también observamos esa disminución en la velocidad de crecimiento -si se la compara con una cepa de *E. coli* BL21-, sin embargo fuimos capaces de alcanzar una concentración de células mucho mayor ( $DO_{600nm}$  aprox. 100). Teniendo en cuenta estos antecedentes, a futuro nos proponemos optimizar el medio de cultivo variando la

osmolaridad y la disponibilidad de nitrógeno, así como también la concentración de inductor.

Respecto a la existencia de mecanismos regulatorios o reacciones metabólicas que limiten la acumulación de TAG, los trabajos de ingeniería metabólica más recientes en este área son capaces de lograr una producción de ácidos grasos libres de 5-7 g/L de medio de cultivo en *E. coli* [192-194]. Estos resultados indican que la maquinaria biosintética de este organismo es capaz de soportar una gran demanda de ácidos grasos, y sugiere que los pasos limitantes en nuestro sistema serían posteriores a la síntesis de los grupos acilos. En este sentido, el desencadenamiento de la respuesta astringente en *E. coli* podría ser una posible explicación ante la limitación observada en la acumulación de TAG. Los niveles intracelulares del efector nucleotídico (p)ppGpp en *E. coli* se mantienen bajos durante condiciones óptimas de crecimiento [195]. Sin embargo, los mismos pueden aumentar drásticamente ante el hambre de aminoácidos, fosfatos, fuente de carbono o inhibición de la síntesis de ácidos grasos [195-197]. Ante estas situaciones de estrés, el (p)ppGpp es capaz de unirse a la RNA polimerasa causando un cambio en el perfil transcripcional del genoma a gran escala [196, 198]. Además de esta regulación transcripcional, el (p)ppGpp también actúa a nivel bioquímico sobre determinadas enzimas. Como resultado general, la respuesta astringente provoca un aumento en la expresión y actividad de proteínas relacionadas con la resistencia a estrés, la síntesis de aminoácidos y la entrada a fase estacionaria [196]; como así también una disminución de la expresión de la maquinaria traduccional y de los factores requeridos para el crecimiento y duplicación celular [196, 198]. Entre estos factores, se destaca la disminución de la síntesis de ácidos grasos a través de la inhibición alostérica de la acil-transferasa PlsB y de la dehidratasa FabZ, y la represión transcripcional de los genes *fabH*, *fabD*, *fabG*, *plsB*, *accBC* y *fadR* [199]. En este panorama, una situación frecuente durante la producción de proteínas heterólogas es la depleción de aminoácidos debido al alto requerimiento de los mismos para la síntesis proteica, lo que puede desencadenar la respuesta astringente [200]. El hecho de que el uso de codones de estos genes sea sustancialmente diferente al utilizado por *E. coli*, genera además ribosomas atascados o una maquinaria traduccional enlentecida, lo que podría aumentar aún más la situación de estrés

celular. La fuerte inhibición *in vivo* reportada para PlsB ante elevados niveles de (p)ppGpp podría ser la limitante de nuestro sistema, ya que limitaría el flujo de carbono hacia el intermediario ácido fosfatídico. En los sistemas productores de ácidos grasos esto no constituiría un problema ya que en estos trabajos los autores desregulan la FAS a través de la expresión una acil-ACP tioesterasa, que hidroliza el enlace tioéster liberando el AG libre, en un paso previo a la acción de la acil-transferasa PlsB. En cambio, en la síntesis de TAG, donde es necesario acilar el glicerol-3P para generar el intermediario PA, la disminución de la actividad PlsB podría tener una influencia directa en el contenido de TAG final alcanzado.

Teniendo en cuenta la hipótesis planteada, futuros trabajos podrían indagar el efecto que tiene la respuesta astringente sobre los sistemas de síntesis de metabolitos derivados de ácidos grasos, y evaluar si este mecanismo de tolerancia al estrés constituye una barrera para la acumulación de lípidos a mayor escala en hospedadores heterólogos como *E. coli*.

## 9. Conclusiones generales

Las principales conclusiones obtenidas a partir del desarrollo del presente trabajo de tesis doctoral son las siguientes:

Se caracterizó a FasR, un regulador transcripcional de la síntesis de ácidos grasos de *S. coelicolor*. Se demostró, mediante análisis de fusiones reporteras transcripcionales y la cuantificación relativa de mRNA, que esta proteína es un activador transcripcional de todos los genes del operón *fab* (*fabD-fabH-acpP-fabF*), el cual codifica para subunidades del complejo FAS II esencial en este organismo. Ensayos de retardo en gel (EMSA) y protección frente a DNasa I demostraron que esta proteína es capaz de unirse directa y específicamente a la región promotora del operón *fab*. La presencia de repeticiones invertidas en esta región sería importante tanto en la unión del regulador al ADN, como en la activación *in vivo* del promotor  $P_{fabD}$ . En analogía con lo que sucede con reguladores transcripcionales en otras bacterias, la capacidad de FasR de unirse al ADN podría estar regulada por algún metabolito relacionado a la síntesis de ácidos grasos el cual aún no se ha identificado. Además, el gen que codifica para FasR se encuentra conservado en actinomicetes, tanto en identidad de secuencia como en sintenia respecto a su ubicación genómica, revelando la importancia de este factor transcripcional y de sus ortólogos en la regulación de la síntesis de ácidos grasos en este grupo bacteriano.

A continuación, con el objetivo de identificar el paso enzimático que genera el DAG necesario para la síntesis de TAG en bacterias oleaginosas, se identificaron tres genes que codifican para putativas fosfatidato fosfatasas de tipo 2 (PAP2) en *S. coelicolor*. Dos de ellas, Lpp $\alpha$  y Lpp $\beta$ , demostraron ser fosfatidato fosfatasas capaces de generar DAG tanto *in vitro* como *in vivo*. Las mismas fueron capaces también de complementar el fenotipo temperatura sensible asociado a la deficiencia de actividad PAP en *S. cerevisiae*. La mutación de ambos genes en *S. coelicolor* reveló que estas enzimas están involucradas en la vía de síntesis de TAG en este organismo. Sin embargo, este fenotipo sólo fue relevante durante la fase exponencial y de transición del crecimiento ya que a tiempos mayores de cultivo los niveles de TAG de la cepa mutante se equiparan con los de la cepa salvaje. Estos resultados indican que si bien

tanto Lpp $\alpha$  como Lpp $\beta$  son PAP funcionales involucradas en la síntesis de TAG, existen vías alternativas capaces de proveer el sustrato DAG en este organismo.

Por último, con el fin de evaluar la viabilidad del huésped heterólogo *E. coli* como posible plataforma para la síntesis de compuestos aptos para la producción de biocombustibles, se diseñó y construyó una cepa de *E. coli* capaz de acumular TAG. Para ello, se expresaron en este hospedador las enzimas PAP2 (Lpp $\beta$ ) y DAG aciltransferasa (Sco0958) de *S. coelicolor*, que catalizan las dos últimas reacciones en la síntesis de TAG. A continuación, se optimizó el sistema variando los sistemas de expresión de estas enzimas; y luego, utilizando estrategias de ingeniería metabólica para incrementar la disponibilidad de sustratos, fue posible incrementar el contenido de TAG en esta bacteria. Finalmente, a través del crecimiento de esta cepa en cultivos de *batch* alimentado en alta densidad, fue posible obtener el mayor título de TAG reportado en la literatura hasta el momento para *E. coli* (722,1 mg/L de TAG). Si bien aún es necesario superar limitantes metabólicas que impiden una mayor acumulación de TAG en esta bacteria, estos estudios constituyen un avance importante en el camino hacia el establecimiento de *E. coli* como futura plataforma de biosíntesis de compuestos con potencial de biocombustible.

Además, durante el desarrollo de este trabajo de tesis se desarrollaron dos métodos para la detección y cuantificación de DAG y TAG basados en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa.

**10. Referencias bibliográficas**

1. Madigan MT, Martinko JM, Parker J: *Brock, Biología de los Microorganismos* 8edn. Madrid: Prentice Hall Iberia; 1999.
2. Hopwood DA: **Soil to genomics: the Streptomyces chromosome.** *AnnuRevGenet* 2006, **40**:1-23.
3. McCarthy AJ, Williams ST: **Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment--a review.** *Gene* 1992, **115**:189-192.
4. Chater KF, Biro S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H: **The complex extracellular biology of Streptomyces.** *FEMS Microbiol Rev* 2010, **34**:171-198.
5. Hopwood DA: **Therapeutic treasures from the deep.** *Nat Chem Biol* 2007, **3**:457-458.
6. Kieser T, Bibb M, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA: *Practical Streptomyces genetics.* Norwich, United Kingdom: The John Innes Foundation; 2000.
7. Flardh K, Buttner MJ: **Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium.** *Nat Rev Microbiol* 2009, **7**:36-49.
8. Manteca A, Fernandez M, Sanchez J: **A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of Streptomyces antibioticus.** *Microbiology* 2005, **151**:3689-3697.
9. Angert ER: **Alternatives to binary fission in bacteria.** *Nat Rev Microbiol* 2005, **3**:214-224.
10. Berdy J: **Bioactive microbial metabolites.** *JAntibiot(Tokyo)* 2005, **58**:1-26.
11. Olukoshi ER, Packer NM: **Importance of stored triacylglycerols in Streptomyces: possible carbon source for antibiotics.** *Microbiology* 1994, **140 ( Pt 4)**:931-943.
12. Alvarez HM, Steinbuchel A: **Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms.** *ApplMicrobiolBiotechnol* 2002, **60**:367-376.
13. Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, et al: **Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2).** *Nature* 2002, **417**:141-147.
14. Bystrykh LV, Fernandez-Moreno MA, Herrema JK, Malpartida F, Hopwood DA, Dijkhuizen L: **Production of actinorhodin-related "blue pigments" by Streptomyces coelicolor A3(2).** *JBacteriol* 1996, **178**:2238-2244.
15. Tsao SW, Rudd BA, He XG, Chang CJ, Floss HG: **Identification of a red pigment from Streptomyces coelicolor A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives.** *JAntibiot(Tokyo)* 1985, **38**:128-131.
16. Chong PP, Podmore SM, Kieser HM, Redenbach M, Turgay K, Marahiel M, Hopwood DA, Smith CP: **Physical identification of a chromosomal locus encoding biosynthetic genes for the lipopeptide calcium-dependent antibiotic (CDA) of Streptomyces coelicolor A3(2).** *Microbiology* 1998, **144 ( Pt 1)**:193-199.
17. Pawlik K, Kotowska M, Chater KF, Kuczek K, Takano E: **A cryptic type I polyketide synthase (cpk) gene cluster in Streptomyces coelicolor A3(2).** *ArchMicrobiol* 2007, **187**:87-99.

18. Gottelt M, Kol S, Gomez-Escribano JP, Bibb M, Takano E: **Deletion of a regulatory gene within the cpk gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2).** *Microbiology* 2010, **156**:2343-2353.
19. Gomez-Escribano JP, L. S, Fox DJ, Yeo V, Bibb MJ, L CG: **Structure and biosynthesis of the unusual polyketide alkaloid coelimycin P1, a metabolic product of the cpk gene cluster of *Streptomyces coelicolor* M145.** *Chemical Science* 2012, **3**:2716-2720.
20. White SW, Zheng J, Zhang YM, Rock: **The structural biology of type II fatty acid biosynthesis.** *AnnuRevBiochem* 2005, **74**:791-831.
21. Rock CO, Cronan JE: **Escherichia coli as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis.** *BiochimBiophysActa* 1996, **1302**:1-16.
22. Cronan JE, Jr., Weisberg LJ, Allen RG: **Regulation of membrane lipid synthesis in *Escherichia coli*. Accumulation of free fatty acids of abnormal length during inhibition of phospholipid synthesis.** *JBiolChem* 1975, **250**:5835-5840.
23. Zhang YM, Rock CO: **Thematic review series: Glycerolipids. Acyltransferases in bacterial glycerophospholipid synthesis.** *J Lipid Res* 2008, **49**:1867-1874.
24. Choi KH, Heath RJ, Rock CO: **beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis.** *JBacteriol* 2000, **182**:365-370.
25. Kaneda T: **Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance.** *MicrobiolRev* 1991, **55**:288-302.
26. de Mendoza D, Klages UA, Cronan JE, Jr.: **Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I.** *JBiolChem* 1983, **258**:2098-2101.
27. Zhang YM, Marrakchi H, Rock CO: **The FabR (YijC) transcription factor regulates unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*.** *JBiolChem* 2002, **277**:15558-15565.
28. Zhang YM, Rock CO: **Membrane lipid homeostasis in bacteria.** *NatRevMicrobiol* 2008, **6**:222-233.
29. Marrakchi H, Choi KH, Rock CO: **A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in *Streptococcus pneumoniae*.** *JBiolChem* 2002, **277**:44809-44816.
30. Marrakchi H, Dewolf WE, Jr., Quinn C, West J, Polizzi BJ, So CY, Holmes DJ, Reed SL, Heath RJ, Payne DJ, et al: **Characterization of *Streptococcus pneumoniae* enoyl-(acyl-carrier protein) reductase (FabK).** *BiochemJ* 2003, **370**:1055-1062.
31. Lu YJ, Rock CO: **Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*.** *MolMicrobiol* 2006, **59**:551-566.
32. Aguilar PS, Cronan JE, Jr., de MD: **A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase.** *JBacteriol* 1998, **180**:2194-2200.
33. Aguilar PS, Hernandez-Arriaga AM, Cybulski LE, Erazo AC, de MD: **Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*.** *EMBO J* 2001, **20**:1681-1691.

34. Cybulski LE, Albanesi D, Mansilla MC, Altabe S, Aguilar PS, de MD: **Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase.** *MolMicrobiol* 2002, **45**:1379-1388.
35. Cybulski LE, del SG, Craig PO, Espinosa M, de MD: ***Bacillus subtilis* DesR functions as a phosphorylation-activated switch to control membrane lipid fluidity.** *JBiolChem* 2004, **279**:39340-39347.
36. Revill WP, Bibb MJ, Scheu AK, Kieser HJ, Hopwood DA: **Beta-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for fatty acid biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2).** *JBacteriol* 2001, **183**:3526-3530.
37. Li Y, Florova G, Reynolds KA: **Alteration of the fatty acid profile of *Streptomyces coelicolor* by replacement of the initiation enzyme 3-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH).** *JBacteriol* 2005, **187**:3795-3799.
38. Wallace KK, Zhao B, McArthur HA, Reynolds KA: **In vivo analysis of straight-chain and branched-chain fatty acid biosynthesis in three actinomycetes.** *FEMS MicrobiolLett* 1995, **131**:227-234.
39. Gago G, Diacovich L, Arabolaza A, Tsai SC, Gramajo H: **Fatty acid biosynthesis in actinomycetes.** *FEMS Microbiol Rev* 2011, **35**:475-497.
40. Revill WP, Bibb MJ, Hopwood DA: **Purification of a malonyltransferase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) and analysis of its genetic determinant.** *JBacteriol* 1995, **177**:3946-3952.
41. Revill WP, Bibb MJ, Hopwood DA: **Relationships between fatty acid and polyketide synthases from *Streptomyces coelicolor* A3(2): characterization of the fatty acid synthase acyl carrier protein.** *JBacteriol* 1996, **178**:5660-5667.
42. Sorger D, Daum G: **Triacylglycerol biosynthesis in yeast.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **61**:289-299.
43. Murphy DJ: **The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms.** *ProgLipid Res* 2001, **40**:325-438.
44. Low KL, Rao PS, Shui G, Bendt AK, Pethe K, Dick T, Wenk MR: **Triacylglycerol utilization is required for regrowth of in vitro hypoxic nonreplicating *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin.** *JBacteriol* 2009, **191**:5037-5043.
45. Alvarez HM, Kalscheuer R, Steinbuchel A: **Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126.** *ApplMicrobiolBiotechnol* 2000, **54**:218-223.
46. Arabolaza A, Rodriguez E, Altabe S, Alvarez H, Gramajo H: **Multiple pathways for triacylglycerol biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*.** *ApplEnvironMicrobiol* 2008, **74**:2573-2582.
47. Kalscheuer R, Steinbuchel A: **A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1.** *JBiolChem* 2003, **278**:8075-8082.
48. Manilla-Perez E, Lange AB, Hetzler S, Steinbuchel A: **Occurrence, production, and export of lipophilic compounds by hydrocarbonoclastic marine bacteria and their potential use to produce bulk chemicals from hydrocarbons.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **86**:1693-1706.

49. Stahl U, Carlsson AS, Lenman M, Dahlqvist A, Huang B, Banas W, Banas A, Stymne S: **Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from Arabidopsis.** *Plant Physiol* 2004, **135**:1324-1335.
50. Walsh C: *Antibiotics: actions, origins, resistance.* American Society for Microbiology (ASM); 2003.
51. Hopwood DA, Sherman DH: **Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis.** *Annu Rev Genet* 1990, **24**:37-66.
52. Staunton J, Weissman KJ: **Polyketide biosynthesis: a millennium review.** *Nat Prod Rep* 2001, **18**:380-416.
53. Zabala D, Brana AF, Florez AB, Salas JA, Mendez C: **Engineering precursor metabolite pools for increasing production of antitumor mithramycins in Streptomyces argillaceus.** *Metab Eng* 2013, **20**:187-197.
54. Hanahan D: **Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.** *JMolBiol* 1983, **166**:557-580.
55. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H: **Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection.** *Mol Syst Biol* 2006, **2**:2006 0008.
56. Arabolaza A, D'Angelo M, Comba S, Gramajo H: **FasR, a novel class of transcriptional regulator, governs the activation of fatty acid biosynthesis genes in Streptomyces coelicolor.** *Mol Microbiol* 2010, **78**:47-63.
57. Thomas BJ, Rothstein R: **Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA.** *Cell* 1989, **56**:619-630.
58. Han GS, Wu WI, Carman GM: **The Saccharomyces cerevisiae Lipin homolog is a Mg<sup>2+</sup>-dependent phosphatidate phosphatase enzyme.** *JBiolChem* 2006, **281**:9210-9218.
59. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J: **Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter.** *JBacteriol* 1995, **177**:4121-4130.
60. Mumberg D, Muller R, Funk M: **Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds.** *Gene* 1995, **156**:119-122.
61. Datsenko KA, Wanner BL: **One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:6640-6645.
62. Cherepanov PP, Wackernagel W: **Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant.** *Gene* 1995, **158**:9-14.
63. Gregory MA, Till R, Smith MC: **Integration site for Streptomyces phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors.** *JBacteriol* 2003, **185**:5320-5323.
64. Gonzalez-Ceron G, Licona P, Servin-Gonzalez L: **Modified xylE and xylTE reporter genes for use in Streptomyces: analysis of the effect of xylT.** *FEMS MicrobiolLett* 2001, **196**:229-234.
65. D'Angelo M: **Regulación transcripcional de la síntesis de ácidos grasos en Streptomyces coelicolor.** Universidad Nacional de Rosario, 2009.

66. Menendez-Bravo S, Comba S, Sabatini M, Arabolaza A, Gramajo H: **Expanding the chemical diversity of natural esters by engineering a polyketide-derived pathway into Escherichia coli.** *Metab Eng* 2014, **24**:97-106.
67. Bishop A, Fielding S, Dyson P, Herron P: **Systematic insertional mutagenesis of a streptomycete genome: a link between osmoadaptation and antibiotic production.** *Genome Res* 2004, **14**:893-900.
68. Sambrook J, Fritsch FEF, Maniatis T: *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
69. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *AnalBiochem* 1976, **72**:248-254.
70. Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schonher BE: **Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from Escherichia coli to Streptomyces spp.** *Gene* 1992, **116**:43-49.
71. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR: **Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.** *Gene* 1989, **77**:51-59.
72. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:e45.
73. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.** *J Biol Chem* 1957, **226**:497-509.
74. Bligh EG, Dyer WJ: **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Can J Biochem Physiol* 1959, **37**:911-917.
75. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:4673-4680.
76. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:3389-3402.
77. Pearson WR: **Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA.** *Methods Enzymol* 1990, **183**:63-98.
78. Nugent T, Jones DT: **Transmembrane protein topology prediction using support vector machines.** *BMC Bioinformatics* 2009, **10**:159.
79. Edgar RC: **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:1792-1797.
80. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA: **Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:W71-74.
81. Zhang YM, Rock CO: **Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis.** *JLipid Res* 2009, **50 Suppl**:S115-S119.
82. Schujman GE, Paoletti L, Grossman AD, de MD: **FapR, a bacterial transcription factor involved in global regulation of membrane lipid biosynthesis.** *DevCell* 2003, **4**:663-672.
83. Zhu K, Zhang YM, Rock CO: **Transcriptional regulation of membrane lipid homeostasis in Escherichia coli.** *JBiolChem* 2009.

84. Cronan JE, Jr., Subrahmanyam S: **FadR, transcriptional co-ordination of metabolic expediency.** *MolMicrobiol* 1998, **29**:937-943.
85. Parsons JB, Rock CO: **Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis.** *Prog Lipid Res* 2013, **52**:249-276.
86. Davis MS, Cronan JE, Jr.: **Inhibition of Escherichia coli acetyl coenzyme A carboxylase by acyl-acyl carrier protein.** *JBacteriol* 2001, **183**:1499-1503.
87. Heath RJ, Rock CO: **Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) by acyl-acyl carrier protein in Escherichia coli.** *J Biol Chem* 1996, **271**:10996-11000.
88. Heath RJ, Rock CO: **Regulation of fatty acid elongation and initiation by acyl-acyl carrier protein in Escherichia coli.** *JBiolChem* 1996, **271**:1833-1836.
89. Campbell JW, Cronan JE, Jr.: **Escherichia coli FadR positively regulates transcription of the fabB fatty acid biosynthetic gene.** *JBacteriol* 2001, **183**:5982-5990.
90. My L, Rekoske B, Lemke JJ, Viala JP, Gourse RL, Bouveret E: **Transcription of the Escherichia coli fatty acid synthesis operon fabHGD is directly activated by FadR and inhibited by ppGpp.** *J Bacteriol* 2013, **195**:3784-3795.
91. Feng Y, Cronan JE: **Complex binding of the FabR repressor of bacterial unsaturated fatty acid biosynthesis to its cognate promoters.** *MolMicrobiol* 2011, **80**:195-218.
92. Subramanian C, Rock CO, Zhang YM: **DesT coordinates the expression of anaerobic and aerobic pathways for unsaturated fatty acid biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa.** *J Bacteriol* 2010, **192**:280-285.
93. Zhang YM, Zhu K, Frank MW, Rock CO: **A Pseudomonas aeruginosa transcription factor that senses fatty acid structure.** *Mol Microbiol* 2007, **66**:622-632.
94. Jerga A, Rock CO: **Acyl-Acyl carrier protein regulates transcription of fatty acid biosynthetic genes via the FabT repressor in Streptococcus pneumoniae.** *JBiolChem* 2009, **284**:15364-15368.
95. Eckhardt TH, Skotnicka D, Kok J, Kuipers OP: **Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in Lactococcus lactis.** *J Bacteriol* 2013, **195**:1081-1089.
96. Schujman GE, Guerin M, Buschiazzi A, Schaeffer F, Llarrull LI, Reh G, Vila AJ, Alzari PM, de MD: **Structural basis of lipid biosynthesis regulation in Gram-positive bacteria.** *EMBO J* 2006, **25**:4074-4083.
97. Schujman GE, de MD: **Regulation of type II fatty acid synthase in Gram-positive bacteria.** *CurrOpinMicrobiol* 2008, **11**:148-152.
98. Nickel J, Irzik K, van Ooyen J, Eggeling L: **The TetR-type transcriptional regulator FasR of Corynebacterium glutamicum controls genes of lipid synthesis during growth on acetate.** *Mol Microbiol* 2010, **78**:253-265.
99. Salzman V, Mondino S, Sala C, Cole ST, Gago G, Gramajo H: **Transcriptional regulation of lipid homeostasis in mycobacteria.** *Mol Microbiol* 2010, **78**:64-77.
100. Mondino S, Gago G, Gramajo H: **Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in mycobacteria.** *Mol Microbiol* 2013, **89**:372-387.
101. Comba S: **Homeostasis lipídica en Streptomyces coelicolor.** Universidad Nacional de Rosario, 2009.

102. Rodriguez E, Banchio C, Diacovich L, Bibb MJ, Gramajo H: **Role of an essential acyl coenzyme A carboxylase in the primary and secondary metabolism of *Streptomyces coelicolor* A3(2).** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:4166-4176.
103. Arthur CJ, Williams C, Pottage K, Ploskon E, Findlow SC, Burston SG, Simpson TJ, Crump MP, Crosby J: **Structure and malonyl CoA-ACP transacylase binding of *streptomyces coelicolor* fatty acid synthase acyl carrier protein.** *ACS Chem Biol* 2009, **4**:625-636.
104. Gramajo HC, Takano E, Bibb MJ: **Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) is transcriptionally regulated.** *Mol Microbiol* 1993, **7**:837-845.
105. Vincentelli R, Canaan S, Campanacci V, Valencia C, Maurin D, Frassinetti F, Scappucini-Calvo L, Bourne Y, Cambillau C, Bignon C: **High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies.** *Protein Sci* 2004, **13**:2782-2792.
106. Omura S: **The antibiotic cerulenin, a novel tool for biochemistry as an inhibitor of fatty acid synthesis.** *Bacteriol Rev* 1976, **40**:681-697.
107. Moche M, Schneider G, Edwards P, Dehesh K, Lindqvist Y: **Structure of the complex between the antibiotic cerulenin and its target, beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase.** *JBiolChem* 1999, **274**:6031-6034.
108. Schujman GE, Choi KH, Altabe S, Rock CO, de MD: **Response of *Bacillus subtilis* to cerulenin and acquisition of resistance.** *JBacteriol* 2001, **183**:3032-3040.
109. Brown RN, Gulig PA: **Regulation of fatty acid metabolism by FadR is essential for *Vibrio vulnificus* to cause infection of mice.** *JBacteriol* 2008, **190**:7633-7644.
110. Rawlings M, Cronan JE, Jr.: **The gene encoding *Escherichia coli* acyl carrier protein lies within a cluster of fatty acid biosynthetic genes.** *J Biol Chem* 1992, **267**:5751-5754.
111. Martinez MA, de Mendoza D, Schujman GE: **Transcriptional and functional characterization of the gene encoding acyl carrier protein in *Bacillus subtilis*.** *Microbiology* 2010, **156**:484-495.
112. Gully D, Moinier D, Loiseau L, Bouveret E: **New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification.** *FEBS Lett* 2003, **548**:90-96.
113. Byers DM, Gong H: **Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family.** *Biochem Cell Biol* 2007, **85**:649-662.
114. Huffman JL, Brennan RG: **Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif.** *Curr Opin Struct Biol* 2002, **12**:98-106.
115. Buttner MJ, Chater KF, Bibb MJ: **Cloning, disruption, and transcriptional analysis of three RNA polymerase sigma factor genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2).** *J Bacteriol* 1990, **172**:3367-3378.
116. Shiina T, Tanaka K, Takahashi H: **Sequence of hrdB, an essential gene encoding sigma-like transcription factor of *Streptomyces coelicolor* A3(2): homology to principal sigma factors.** *Gene* 1991, **107**:145-148.
117. Strohl WR: **Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters.** *Nucleic Acids Res* 1992, **20**:961-974.

118. Lee DJ, Minchin SD, Busby SJ: **Activating transcription in bacteria.** *Annu Rev Microbiol* 2012, **66**:125-152.
119. Minchin SD, Busby SJ: **Analysis of mechanisms of activation and repression at bacterial promoters.** *Methods* 2009, **47**:6-12.
120. Magnes C, Sinner FM, Regittnig W, Pieber TR: **LC/MS/MS method for quantitative determination of long-chain fatty acyl-CoAs.** *Anal Chem* 2005, **77**:2889-2894.
121. Magnes C, Suppan M, Pieber TR, Moustafa T, Trauner M, Haemmerle G, Sinner FM: **Validated comprehensive analytical method for quantification of coenzyme A activated compounds in biological tissues by online solid-phase extraction LC/MS/MS.** *Anal Chem* 2008, **80**:5736-5742.
122. Barksdale L, Kim KS: **Mycobacterium.** *Bacteriol Rev* 1977, **41**:217-372.
123. Alvarez HM, Mayer F, Fabritius D, Steinbuchel A: **Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by Rhodococcus opacus strain PD630.** *Arch Microbiol* 1996, **165**:377-386.
124. Borkenhagen LF, Kennedy EP: **The enzymatic synthesis of cytidine diphosphate choline.** *J Biol Chem* 1957, **227**:951-962.
125. Liu Q, Siloto RM, Lehner R, Stone SJ, Weselake RJ: **Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology.** *Prog Lipid Res* 2012, **51**:350-377.
126. Burgard AP, Pharkya P, Maranas CD: **Optknock: a bilevel programming framework for identifying gene knockout strategies for microbial strain optimization.** *Biotechnol Bioeng* 2003, **84**:647-657.
127. Stobart K, Mancha M, Lenman M, Dahlqvist A, Szymne S: **Triacylglycerols are synthesised and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds.** *Planta* 1997, **203**:58-66.
128. Fraser T, Waters A, Chatrattanakunchai S, Stobart K: **Does triacylglycerol biosynthesis require diacylglycerol acyltransferase (DAGAT)?** *Biochemical Society Transactions* 2000, **28**:698-699 %@ 0300-5127.
129. Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, et al: **The Pfam protein families database.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**:D290-301.
130. **FASTA/SSEARCH/GGSEARCH/GLSEARCH - Protein Similarity Search** [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>]
131. Kalscheuer R: **Genetics of Wax Ester and Triacylglycerol Biosynthesis in Bacteria.** In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* Edited by KN T. Berlin Heidelberg: Springer; 2010
132. Kocsis MG, Weselake RJ: **Phosphatidate phosphatases of mammals, yeast, and higher plants.** *Lipids* 1996, **31**:785-802.
133. Carman GM, Henry SA: **Special issue: Regulation of lipid metabolism in yeast.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1771**:239-240.
134. Reue K, Brindley DN: **Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism.** *J Lipid Res* 2008, **49**:2493-2503.

135. Edwards JS, Palsson BO: **Robustness analysis of the Escherichia coli metabolic network.** *Biotechnol Prog* 2000, **16**:927-939.
136. Han GS, Carman GM: **Characterization of the human LPIN1-encoded phosphatidate phosphatase isoforms.** *J Biol Chem* 2010, **285**:14628-14638.
137. Brindley DN, Pilquill C: **Lipid phosphate phosphatases and signaling.** *J Lipid Res* 2009, **50 Suppl**:S225-230.
138. Lin YP, Carman GM: **Purification and characterization of phosphatidate phosphatase from Saccharomyces cerevisiae.** *J Biol Chem* 1989, **264**:8641-8645.
139. Morlock KR, McLaughlin JJ, Lin YP, Carman GM: **Phosphatidate phosphatase from Saccharomyces cerevisiae. Isolation of 45- and 104-kDa forms of the enzyme that are differentially regulated by inositol.** *J Biol Chem* 1991, **266**:3586-3593.
140. Carman GM: **Phosphatidate phosphatases and diacylglycerol pyrophosphate phosphatases in Saccharomyces cerevisiae and Escherichia coli.** *Biochim Biophys Acta* 1997, **1348**:45-55.
141. Santos-Rosa H, Leung J, Grimsey N, Peak-Chew S, Siniosoglou S: **The yeast lipin Smp2 couples phospholipid biosynthesis to nuclear membrane growth.** *EMBO J* 2005, **24**:1931-1941.
142. Toke DA, Bennett WL, Dillon DA, Wu WI, Chen X, Ostrander DB, Oshiro J, Cremesti A, Voelker DR, Fischl AS, Carman GM: **Isolation and characterization of the Saccharomyces cerevisiae DPP1 gene encoding diacylglycerol pyrophosphate phosphatase.** *J Biol Chem* 1998, **273**:3278-3284.
143. Toke DA, Bennett WL, Oshiro J, Wu WI, Voelker DR, Carman GM: **Isolation and characterization of the Saccharomyces cerevisiae LPP1 gene encoding a Mg<sup>2+</sup>-independent phosphatidate phosphatase.** *J Biol Chem* 1998, **273**:14331-14338.
144. Han GS, Johnston CN, Chen X, Athenstaedt K, Daum G, Carman GM: **Regulation of the Saccharomyces cerevisiae DPP1-encoded diacylglycerol pyrophosphate phosphatase by zinc.** *J Biol Chem* 2001, **276**:10126-10133.
145. Han GS, Johnston CN, Carman GM: **Vacuole membrane topography of the DPP1-encoded diacylglycerol pyrophosphate phosphatase catalytic site from Saccharomyces cerevisiae.** *J Biol Chem* 2004, **279**:5338-5345.
146. Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK: **Global analysis of protein localization in budding yeast.** *Nature* 2003, **425**:686-691.
147. Wu WI, Liu Y, Riedel B, Wissing JB, Fischl AS, Carman GM: **Purification and characterization of diacylglycerol pyrophosphate phosphatase from Saccharomyces cerevisiae.** *J Biol Chem* 1996, **271**:1868-1876.
148. Furneisen JM, Carman GM: **Enzymological properties of the LPP1-encoded lipid phosphatase from Saccharomyces cerevisiae.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1484**:71-82.
149. Dillon DA, Wu WI, Riedel B, Wissing JB, Dowhan W, Carman GM: **The Escherichia coli pgpB gene encodes for a diacylglycerol pyrophosphate phosphatase activity.** *JBiolChem* 1996, **271**:30548-30553.

150. Icho T, Raetz CR: **Multiple genes for membrane-bound phosphatases in Escherichia coli and their action on phospholipid precursors.** *JBacteriol* 1983, **153**:722-730.
151. Touze T, Blanot D, Mengin-Lecreulx D: **Substrate specificity and membrane topology of Escherichia coli PgpB, an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase.** *JBiolChem* 2008, **283**:16573-16583.
152. Lu YH, Guan Z, Zhao J, Raetz CR: **Three phosphatidylglycerol-phosphate phosphatases in the inner membrane of Escherichia coli.** *J Biol Chem* 2011, **286**:5506-5518.
153. Nakamura Y, Tsuchiya M, Ohta H: **Plastidic phosphatidic acid phosphatases identified in a distinct subfamily of lipid phosphate phosphatases with prokaryotic origin.** *JBiolChem* 2007, **282**:29013-29021.
154. Wagner S, Klepsch MM, Schlegel S, Appel A, Draheim R, Tarry M, Hogbom M, van Wijk KJ, Slotboom DJ, Persson JO, de Gier JW: **Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:14371-14376.
155. Carman GM, Wu WI: **Lipid phosphate phosphatases from Saccharomyces cerevisiae.** *Methods Enzymol* 2007, **434**:305-315.
156. Lin YP, Carman GM: **Kinetic analysis of yeast phosphatidate phosphatase toward Triton X-100/phosphatidate mixed micelles.** *J Biol Chem* 1990, **265**:166-170.
157. Carman GM, Deems RA, Dennis EA: **Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics.** *J Biol Chem* 1995, **270**:18711-18714.
158. McDermott MI, Sigal YJ, Crump JS, Morris AJ: **Enzymatic analysis of lipid phosphate phosphatases.** *Methods* 2006, **39**:169-179.
159. Walsh JP, Bell RM: **sn-1,2-Diacylglycerol kinase of Escherichia coli. Mixed micellar analysis of the phospholipid cofactor requirement and divalent cation dependence.** *J Biol Chem* 1986, **261**:6239-6247.
160. Mu H, Sillen H, Hiy C-E: **Identification of diacylglycerols and triacylglycerols in a structured lipid sample by atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry.** *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2000, **77**:1049-1060.
161. Carman GM, Han GS: **Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism.** *Trends BiochemSci* 2006, **31**:694-699.
162. Zavaleta-Pastor M, Sohlenkamp C, Gao JL, Guan Z, Zaheer R, Finan TM, Raetz CR, Lopez-Lara IM, Geiger O: **Sinorhizobium meliloti phospholipase C required for lipid remodeling during phosphorus limitation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:302-307.
163. Raetz CR, Newman KF: **Diglyceride kinase mutants of Escherichia coli: inner membrane association of 1,2-diglyceride and its relation to synthesis of membrane-derived oligosaccharides.** *J Bacteriol* 1979, **137**:860-868.
164. Janssen HJ, Steinbuechel A: **Production of triacylglycerols in Escherichia coli by deletion of the diacylglycerol kinase gene and heterologous overexpression of atfA from Acinetobacter baylyi ADP1.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2014, **98**:1913-1924.

165. Kurosawa K, Boccazzi P, de Almeida NM, Sinskey AJ: **High-cell-density batch fermentation of *Rhodococcus opacus* PD630 using a high glucose concentration for triacylglycerol production.** *J Biotechnol* 2010, **147**:212-218.
166. Hernandez MA, Comba S, Arabolaza A, Gramajo H, Alvarez HM: **Overexpression of a phosphatidic acid phosphatase type 2 leads to an increase in triacylglycerol production in oleaginous *Rhodococcus* strains.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2014.
167. Jerga A, Lu YJ, Schujman GE, de Mendoza D, Rock CO: **Identification of a soluble diacylglycerol kinase required for lipoteichoic acid production in *Bacillus subtilis*.** *J Biol Chem* 2007, **282**:21738-21745.
168. Lee SY, Kim HM, Cheon S: **Metabolic engineering for the production of hydrocarbon fuels.** *Curr Opin Biotechnol* 2014, **33C**:15-22.
169. Lund MT, Berntsen TK, Fuglestvedt JS: **Climate Impacts of Short-Lived Climate Forcers versus CO<sub>2</sub> from Biodiesel: A Case of the EU on-Road Sector.** *Environ Sci Technol* 2014, **48**:14445-14454.
170. Liu T, Khosla C: **Genetic engineering of *Escherichia coli* for biofuel production.** *Annu Rev Genet* 2010, **44**:53-69.
171. Peralta-Yahya PP, Zhang F, del Cardayre SB, Keasling JD: **Microbial engineering for the production of advanced biofuels.** *Nature* 2012, **488**:320-328.
172. El Kinawy O: **Comparison between jojoba oil and other vegetable oils as a substitute to petroleum.** *Energy sources* 2004, **26**:639-645.
173. Fox NJ, Stachowiak GW: **Vegetable oil-based lubricants—a review of oxidation.** *Tribology International* 2007, **40**:1035-1046.
174. Liang MH, Jiang JG: **Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology.** *Prog Lipid Res* 2013, **52**:395-408.
175. Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, Hu Z, Schirmer A, McClure A, Del Cardayre SB, Keasling JD: **Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass.** *Nature* 2010, **463**:559-562.
176. Janssen HJ, Steinbuchel A: **Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels.** *Biotechnol Biofuels* 2014, **7**:7.
177. Rucker J, Paul J, Pfeifer BA, Lee K: **Engineering *E. coli* for triglyceride accumulation through native and heterologous metabolic reactions.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, **97**:2753-2759.
178. Kalscheuer R, Stoveken T, Luftmann H, Malkus U, Reichelt R, Steinbuchel A: **Neutral lipid biosynthesis in engineered *Escherichia coli*: jojoba oil-like wax esters and fatty acid butyl esters.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:1373-1379.
179. Choi YJ, Lee SY: **Microbial production of short-chain alkanes.** *Nature* 2013, **502**:571-574.
180. Lin F, Chen Y, Levine R, Lee K, Yuan Y, Lin XN: **Improving fatty acid availability for bio-hydrocarbon production in *Escherichia coli* by metabolic engineering.** *PLoS one* 2013, **8**:e78595.
181. Raetz CR, Newman KF: **Neutral lipid accumulation in the membranes of *Escherichia coli* mutants lacking diglyceride kinase.** *J Biol Chem* 1978, **253**:3882-3887.

182. Rotering H, Raetz CR: **Appearance of monoglyceride and triglyceride in the cell envelope of Escherichia coli mutants defective in diglyceride kinase.** *J Biol Chem* 1983, **258**:8068-8073.
183. Cahoon EB, Mills LA, Shanklin J: **Modification of the fatty acid composition of Escherichia coli by coexpression of a plant acyl-acyl carrier protein desaturase and ferredoxin.** *J Bacteriol* 1996, **178**:936-939.
184. Kalscheuer R, Stolting T, Steinbuchel A: **Microdiesel: Escherichia coli engineered for fuel production.** *Microbiology* 2006, **152**:2529-2536.
185. Campbell JW, Cronan JE, Jr.: **The enigmatic Escherichia coli fadE gene is yafH.** *J Bacteriol* 2002, **184**:3759-3764.
186. Bao X, Ohlrogge J: **Supply of fatty acid is one limiting factor in the accumulation of triacylglycerol in developing embryos.** *Plant Physiol* 1999, **120**:1057-1062.
187. Zhang F, Ouellet M, Batth TS, Adams PD, Petzold CJ, Mukhopadhyay A, Keasling JD: **Enhancing fatty acid production by the expression of the regulatory transcription factor FadR.** *Metab Eng* 2012, **14**:653-660.
188. Davis MS, Solbiati J, Cronan JE, Jr.: **Overproduction of acetyl-CoA carboxylase activity increases the rate of fatty acid biosynthesis in Escherichia coli.** *JBiolChem* 2000, **275**:28593-28598.
189. Zhang F, Rodriguez S, Keasling JD: **Metabolic engineering of microbial pathways for advanced biofuels production.** *Curr Opin Biotechnol* 2011, **22**:775-783.
190. Lennen RM, Pfleger BF: **Microbial production of fatty acid-derived fuels and chemicals.** *Curr Opin Biotechnol* 2013, **24**:1044-1053.
191. Fernandez-Castane A, Caminal G, Lopez-Santin J: **Direct measurements of IPTG enable analysis of the induction behavior of E. coli in high cell density cultures.** *Microb Cell Fact* 2012, **11**:58.
192. Dellomonaco C, Clomburg JM, Miller EN, Gonzalez R: **Engineered reversal of the beta-oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals.** *Nature* 2011, **476**:355-359.
193. Liu H, Yu C, Feng D, Cheng T, Meng X, Liu W, Zou H, Xian M: **Production of extracellular fatty acid using engineered Escherichia coli.** *Microb Cell Fact* 2012, **11**:41.
194. Torella JP, Ford TJ, Kim SN, Chen AM, Way JC, Silver PA: **Tailored fatty acid synthesis via dynamic control of fatty acid elongation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**:11290-11295.
195. Lazzarini RA, Cashel M, Gallant J: **On the regulation of guanosine tetrphosphate levels in stringent and relaxed strains of Escherichia coli.** *J Biol Chem* 1971, **246**:4381-4385.
196. Wendrich TM, Blaha G, Wilson DN, Marahiel MA, Nierhaus KH: **Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA.** *Mol Cell* 2002, **10**:779-788.
197. Seyfzadeh M, Keener J, Nomura M: **spoT-dependent accumulation of guanosine tetrphosphate in response to fatty acid starvation in Escherichia coli.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:11004-11008.
198. Durfee T, Hansen AM, Zhi H, Blattner FR, Jin DJ: **Transcription profiling of the stringent response in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 2008, **190**:1084-1096.

199. Podkovyrov SM, Larson TJ: **Identification of promoter and stringent regulation of transcription of the fabH, fabD and fabG genes encoding fatty acid biosynthetic enzymes of Escherichia coli.** *Nucleic Acids Res* 1996, **24**:1747-1752.
200. Sorensen HP, Mortensen KK: **Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli.** *J Biotechnol* 2005, **115**:113-128.