

Universidad Nacional de Rosario
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Departamento de Microbiología

T 576.882.8 076
C 5506
F 13-5-99

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE PROTEÍNAS DE ESTRÉS
DE *STREPTOMYCES COELICOLOR*.**

Lelia M. Orsaria
Tesis para optar al título de Doctor

Director: Dr. Hugo Gramajo

1998

A la memoria de mi padre

A mi esposo Hernán

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad estatal, abierta y gratuita, por haberme formado profesionalmente, y brindarme la posibilidad de realizar mi trabajo científico con absoluta libertad de pensamiento.

A Hugo Gramajo, por haberme dirigido en la realización de esta Tesis Doctoral y por su constante estímulo y buena predisposición para la discusión y el diálogo.

A Diego De Mendoza, por haber avalado mi ingreso al laboratorio de Microbiología.

A Charles Thompson, por haber confiado en mi trabajo y haberme permitido trabajar en el grupo bajo su dirección en el Departamento de Microbiología del Biozentrum de la Universidad de Basilea (Suiza), en donde se realizó gran parte del trabajo de esta Tesis.

A Jiri Vohradský, por su colaboración en el análisis estadístico de los geles bidimensionales.

A mis compañeros del Biozentrum, quienes me brindaron su apoyo y buenos consejos en el laboratorio.

A Jorge Ghiso, por su importante contribución en la secuenciación de proteínas.

A todo el grupo de Microbiología y Biología Molecular, por su valiosa colaboración.

A Raquel Chan, por su ayuda y buenos consejos.

A Luciana Paoletti, con quien compartí la realización de algunos experimentos.

A Amadeo Cellino, por su contribución a mi formación universitaria.

A Mónica Arévalo, Marta Vijande, Delma Bertolini y Luis Serrano.

Quiero expresar un especial agradecimiento, por haber tenido una actitud desinteresada y de excelente predisposición a brindarme su ayuda a las siguientes personas: Hebe Dionisi, Susana Checa, Adrián Arakaki, Carlos Perez, Tato Rodríguez y Gustavo Schujman.

INDICE

Indice	II
Abreviaturas	VII
Publicaciones y presentaciones a congresos	IX
I.-Introducción	1
I.1.-Introducción general al género <i>Streptomyces</i> .	2
I.2.-Diferenciación morfológica en <i>Streptomyces</i> .	2
I.3.-Diferenciación fisiológica en <i>Streptomyces</i> .	4
I.4.- <i>Streptomyces coelicolor</i> como modelo de estudio.	9
I.5.-El genoma de <i>Streptomyces coelicolor</i> .	9
I.6.-Mutantes de <i>S. coelicolor</i> .	10
I.7.-Crecimiento de <i>S. coelicolor</i> en medio líquido y sólido.	12
I.8.-Estrés y desarrollo en <i>S. coelicolor</i> .	15
II.-Materiales y Métodos	17
II.1.-Microorganismos.	18
II.1.2.-Mantenimiento de cepas.	19
II.1.3.-Preparación de esporos.	19
II.2.-Medios de cultivo.	20
II.2.1.-Medios complejos (ricos).	20
II.2.2.2.-Medios mínimos.	21
II.2.2.3.-Medios diferenciales.	22
II.2.2.4.-Antibióticos.	23
II.3.-Cuantificación de actinorodina.	23
II.4.-Condiciones de cultivo y de crecimiento.	23
II.4.1.-Cultivo principal (para los estudios de estrés por frío).	23
II.4.2.-Cultivo principal (para los estudios de fase estacionaria).	24
II.5.-Manipulación de proteínas.	24

II.5.1.-Marcación de proteínas <i>in vivo</i> (para los estudios de estrés al frío).	24
II.5.2.-Marcación de proteínas <i>in vivo</i> (para los estudios de fase estacionaria).	24
II.5.3.-Preparación de los extractos celulares (para los estudios de estrés al frío).	24
II.5.4.-Preparación de los extractos celulares (para los estudios de fase estacionaria)	25
II.5.5.-Cuantificación de la radioactividad incorporada.	26
II.5.6.-Determinación de la concentración de proteínas.	27
II.6.-Electroforesis de proteínas.	27
II.6.1.-Electroforesis bidimensional (para estudios de estrés al frío)	27
II.6.2.-Electroforesis bidimensional (para los estudios de fase estacionaria).	32
II.6.3.-Preparación de las tiras de calibración.	35
II.6.4.-Medida del PM y del gradiente de pH en los geles 2-D.	35
II.6.5.-Electroforesis monodimensional de geles de tricina.	36
II.6.6.-Gel 2-D para la purificación de proteínas en extractos con SDS.	38
II.7.-Electroelución de proteínas.	38
II.8.-Transferencia y secuencia amino terminal.	39
II.9.-Espectrometría de masa de proteínas.	39
II.10.-Construcción de la base de datos y análisis computarizado.	40
II.11.-Ensayo de actividad de la superóxido dismutasa.	40
II.12.-Manipulación de ADN <i>in vitro</i> .	41
II.12.1.-Extracción de ADN cromosómico de <i>Streptomyces</i> y <i>Nocardia</i> .	41
II.12.2.-Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .	42
II.12.3.-Digestión con enzimas de restricción y tratamiento con	42

II.1.2.2.-Caracterización de proteínas que se inducen en diferentes estadios de crecimiento y por estrés hipotérmico utilizando geles bidimensionales.	57
III.1.3.-Discusión.	66
III.2.-Capítulo 2: Purificación y caracterización de una proteína de 9 kDa que se induce por estrés hipotérmico y fisiológico.	72
III.2.1.-Introducción y objetivos	72
III.2.2.-Resultados	73
III.2.2.1.-Curva de crecimiento en medio líquido de <i>Streptomyces coelicolor</i> J1501. Condiciones de reproducibilidad.	73
III.2.2.2.-Construcción de una base de datos para el estudio de los cambios en la expresión génica de <i>S. coelicolor</i> durante los distintos estadios de crecimiento y en condiciones de estrés hipotérmico.	77
III.2.2.3.-Análisis de la expresión génica en las distintas fases de crecimiento.	77
III.2.2.4.-Análisis de la expresión de la proteína de 9 kDa en fase logarítmica y de transición a 30°C y 12°C.	80
III.2.2.5.-Purificación de la proteína de 9 kDa que se induce a bajas temperaturas y a 30°C en fase de transición.	86
III.2.2.6.-Secuencia amino terminal de la proteína de 9 kDa.	89
III.2.2.7.-Espectrometría de masa de proteínas ácidas de bajo PM	91
III.2.3.-Discusión	95
III.3.-Capítulo 3: Clonado y caracterización del gen que codifica para la proteína TPP1 (9 kDa) de <i>S. coelicolor</i> J1501.	99
III.3.1.-Introducción.	99
III.3.2.-Resultados.	99
III.3.2.1.-Amplificación del gen que codifica la proteína hipotética de 9,6 kDa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	99

III.3.2.2.-Clonado del gen <i>tpp1</i> de <i>Streptomyces coelicolor</i> J1501	100
III.3.2.3.-Secuenciación del fragmento de 4,5 kpb.	102
III.3.2.4.-Búsqueda de secuencias homólogas a los genes <i>thr</i> y <i>tpp1</i> en ADN cromosomal de <i>S. coelicolor</i> J 1501	116
III.3.2.5.-Búsqueda de secuencias homólogas a <i>tpp1</i> en otras bacterias.	118
III.3.3.-Discusión.	119
III.4.-Capítulo 4: Caracterización de proteínas de fase estacionaria de <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2).	123
III.4.1.-Introducción.	123
III.4.2.-Resultados.	126
III.4.2.1.-Determinación de la viabilidad de <i>S. coelicolor</i> durante prolongados períodos de crecimiento.	126
III.4.2.2.-Análisis de los perfiles proteicos en diferentes fases del crecimiento.	128
III.4.2.3.-Identificación de proteínas de <i>S. coelicolor</i> reguladas en diferentes fases de crecimiento.	135
III.4.2.4.-Medición de la actividad superóxido dismutasa a lo largo del crecimiento.	137
III.4.3.-Discusión.	139
IV.-Conclusiones.	143
V.-Resumen.	147
VI.-Bibliografía.	151

Abreviaturas.

A	Absorbancia
Ac	Acetato
ADN	Acido deoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
AMPS	Amonio persulfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CHAPS	(3-[(3-amidopropil)dimetilamonio]-1-propano-sulfonato
CSPs	Proteínas de estrés al frío (cold shock proteins)
cpm	Cuentas por minuto
dNTP	Deoxinucleótidos trifosfato
Da	Dalton
d.i.	Diámetro interno
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
HSPs	Proteínas de estrés térmico (heat shock proteins)
hs	Horas
IEF	Isoelectroenfocado
IPTG	Isopropil β -D-tiogaláctosido
kDa	Kilodalton
kpb	Kilo pares de bases
Mb	mega base
LB	Luria-Bertani
min	Minuto/s
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino] propano sulfónico
NBT	Nitro blue tetrazolium
nm	Nanometros

ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p/p	Peso en peso
p/v	Peso en volúmen
PM	Peso molecular
PMFS	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
PVDF	Polivinilideno difluoruro
PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SOD	Superóxido dismutasa
SSC 20X	3M NaCl y 0,3 M citrato de sodio
TE	10 mM Tris-HCl pH=8 y 1 mM EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina
TES	Acido (N-tris[hidroximetil]metil-2-aminoetano sulfónico
TRIS	N-tris-(hidroximetil)- aminoetano
UV	Ultravioleta
v/v	Volúmen en volúmen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
2-D	Bidimensional

Anglicismos.

Buffer	Tampón
Scanner	Registrador de imágenes
Blot	Mancha
Pellet	Precipitado

Parte de los resultados que se describen en esta Tesis han sido dados a conocer previamente en las siguientes Publicaciones y Reuniones científicas:

Publicaciones:

- "Characterization of stationary-phase proteins in *Streptomyces coelicolor* A3(2)."

L. Orsaria, L. Paoletti and Hugo Gramajo. 1998. FEMS. Vol 162: 275-281.

Presentaciones a Congresos:

- "Caracterización de la respuesta al estrés por frío y al estrés fisiológico en *Streptomyces coelicolor*." L Orsaria y H. Gramajo.

XXXIII reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular, Villa Giardino, Córdoba, 1997.

- "Stress associated developmental transition in *Streptomyces coelicolor*".X.

Li, G. Dale, M. Folcher, H. Gramajo, J. Novotná, **L. Orsaria**, U. Süssstrunk. P. Viollier, J. Vohradsky and C. Thompson.

10 th International Symposium on Biology of Actinomycetes, Beijing, China, 1997.

I- INTRODUCCIÓN

I.-Introducción.

I.1.- Introducción general al género *Streptomyces*.

Las bacterias Gram+ se dividen en dos grupos principales, con bajo o alto contenido de G+C en su ADN. El grupo de bajo contenido incluye a los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Thermoactinomyces* y *Mycoplasma*. El grupo de alto contenido de G+C, llamado normalmente actinomycetes, incluye géneros como *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Thermonospora* y *Streptomyces* [1].

Los *Streptomyces* son bacterias que normalmente habitan el suelo y poseen algunas características que las hacen académica e industrialmente importantes, como ser: a) la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios b), su complejo ciclo de diferenciación morfológica y fisiológica c) grandes áreas silentes de su genoma d) inestabilidad en la herencia por deleciones y amplificaciones de sectores de su genoma e) elementos genéticos extracromosomales circulares y lineales y f) un cromosoma lineal demostrado solamente para *S. lividans* y *S. coelicolor* [2] [3] [4].

En general las bacterias cuando crecen y se reproducen dan como resultado dos células sin mayores diferencias a la que le dió origen [5]. Sin embargo, algunas bacterias manifiestan un proceso complejo de diferenciación, tal es el caso de la formación de endosporas en *Bacillus* o la formación del micelio que posteriormente dará origen a los esporos en *Streptomyces* [6]. En los *Streptomyces* se da además una diferenciación fisiológica que acompaña de alguna manera a la diferenciación morfológica, ya que lleva a la producción de metabolitos secundarios.

I.2.- Diferenciación morfológica en *Streptomyces*.

En el estudio del crecimiento y diferenciación de los *Streptomyces*, el esporo es el punto de partida. En medio sólido un esporo germina y da lugar a una colonia. Si el alimento es suficiente la colonia comienza a experimentar un rápido crecimiento dando lugar a la formación del micelio sustrato, caracterizado por una red de hifas multinucleadas que penetran en el medio (o en el suelo), para solubilizar compuestos

orgánicos que posteriormente necesitará para continuar el crecimiento y la diferenciación. El crecimiento de las hifas en medio líquido o sólido ocurre principalmente por extensión de la pared celular de las puntas de las hifas; las mismas se multiplican cuasi-exponencialmente por la formación de ramificaciones en las partes más viejas de las hifas [7]. Los compartimentos de las hifas (especialmente las puntas) contienen muchas copias del genoma. Los septos vegetativos son poco comunes y generalmente no son el sitio de separación celular. En un estadio posterior de desarrollo, comienza la diferenciación del micelio sustrato en micelio aéreo a expensas de un proceso de “canibalización” del micelio sustrato parcialmente lisado [8] [9]. A medida que las colonias crecen adquieren un aspecto blanco y algodonoso, y las partes más alejadas del extremo de crecimiento acumulan materiales como glucógeno, lípidos y polifosfatos [10]. Esto ocurre también en *E. coli* y otras bacterias cuyo crecimiento se ve limitado por falta de nutrientes [11]. La formación del micelio aéreo se produce luego de un período corto de reducida síntesis macromolecular [12] que podría estar involucrado con el reciclado del material asimilado previamente por el micelio sustrato. Por eso, cuando el micelio aéreo crece parte del sustrato muere. Los cambios en el potencial osmótico intracelular, que puede ser generado por la solubilización de macromoléculas como el glucógeno, ayudarían al desarrollo de las hifas aéreas [13] [3]. En este punto, una gran variedad de proteínas se depositan sobre la superficie de la hifa, las que persistirán a lo largo del proceso de esporulación. Estas proteínas, que han sido denominadas en conjunto proteínas Sap (por sporulation associated protein), juegan un rol importante en el desarrollo de las hifas que emergen del micelio sustrato [14]. Las Sap garantizan el mantenimiento de la hidrofobicidad de las hifas y de los esporos como forma de protegerlos de la desecación. El agotamiento de los nutrientes en el micelio sustrato podría ser una causa que limite el crecimiento de las hifas aéreas, las cuales comienzan a enrollarse y continúan acumulando glucógeno y trehalosa [10]. Más tarde, la formación de los septos a intervalos regulares, producirá la compartimentalización unigenómica de las puntas de las hifas que luego darán lugar a los esporos. Se ha comprobado que existen diferencias estructurales en estos septos con aquellos encontrados

ocasionalmente en las paredes de las hifas vegetativas [3]. Finalmente, aparecen cambios en el grosor de la pared y la forma de los esporos concomitantemente al depósito de un pigmento gris en los esporos (WhiE) y a la desaparición del glucógeno del citoplasma [10]. Una hifa genera un promedio de 10 esporos y una colonia en 6 días en medio mínimo llega a dar $\approx 10^7$ esporos [3]. En las Figuras 1, 2, 3 y 4 se muestran el diagrama del ciclo de vida del *S. coelicolor*, los dos tipos de micelio, los esporos y una fotografía de las colonias de las bacterias crecidas en medio sólido en el laboratorio, respectivamente.

En general los *Streptomyces* no esporulan en medio líquido [15] pero, en los últimos tiempos, se han encontrado diversas especies con la capacidad de esporular bajo determinadas condiciones en medio líquido. Por ejemplo, *S. griseus* no esporula en medio rico líquido, pero sí lo hace en un medio de composición definida. En un período que va de 26 a 30 hs esta bacteria experimenta la germinación de los esporos, desarrollo del micelio y esporulación; es por eso, que *S. griseus* es una especie que se utiliza para los análisis genéticos y fisiológicos de la esporulación [16]. *S. coelicolor* en cambio, es incapaz de esporular en medio líquido, al menos, en las condiciones utilizadas comúnmente en el laboratorio.

1.3.- Diferenciación fisiológica en *Streptomyces*.

La diferenciación fisiológica en *Streptomyces* se refiere a la producción de metabolitos secundarios, definidos como productos naturales que no poseen un rol en la economía interna del organismo que los produce. De los *Streptomyces* proviene el 70% de los antibióticos conocidos [17], además de una gran variedad de sustancias con diversas actividades biológicas (antifúngicos, anticancerígenos, antiparasitarios, inmunosupresores, etc.) [18] [19] [20] y numerosas exoenzimas de importancia industrial (celulasas, amilasas, proteasas, etc.) [21].

La producción de antibióticos y su asociación con organismos que esporulan (*Bacillus*, *Streptomyces*), sugiere que estas sustancias cumplen un rol muy importante en la protección del productor en ciertos estadios del desarrollo, cuando es vulnerable a la invasión por microorganismos competidores (por ejemplo, durante el desarrollo de la

hifas aéreas o durante la germinación de los esporos) [22]. Los argumentos más importantes que apoyan esta postura son: a) los organismos productores carecen de sistema inmunitario [19], b) el microorganismo productor del antibiótico es sensible a su propio producto si este es adicionado al medio antes de que comience a producirlo [23] y c) presencia de genes de resistencia en productores [24] [19].

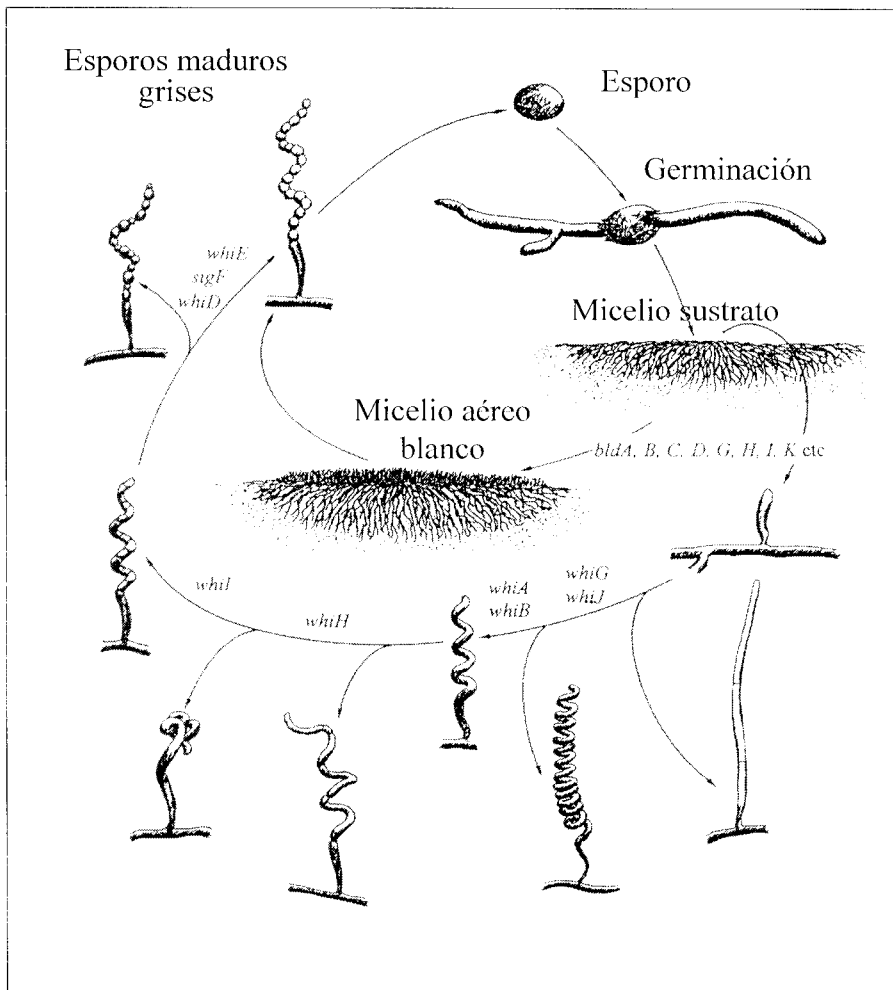


Figura 1: Diagrama del ciclo de vida de *S. coelicolor*, mostrando los estadios del desarrollo de la bacteria en medio sólido (reproducido de [4]). Los fenotipos de las hifas aéreas en las mutantes *whi* difieren de las normales. Las mutantes están señaladas con flechas que divergen del ciclo de vida antes de la designación del gen.

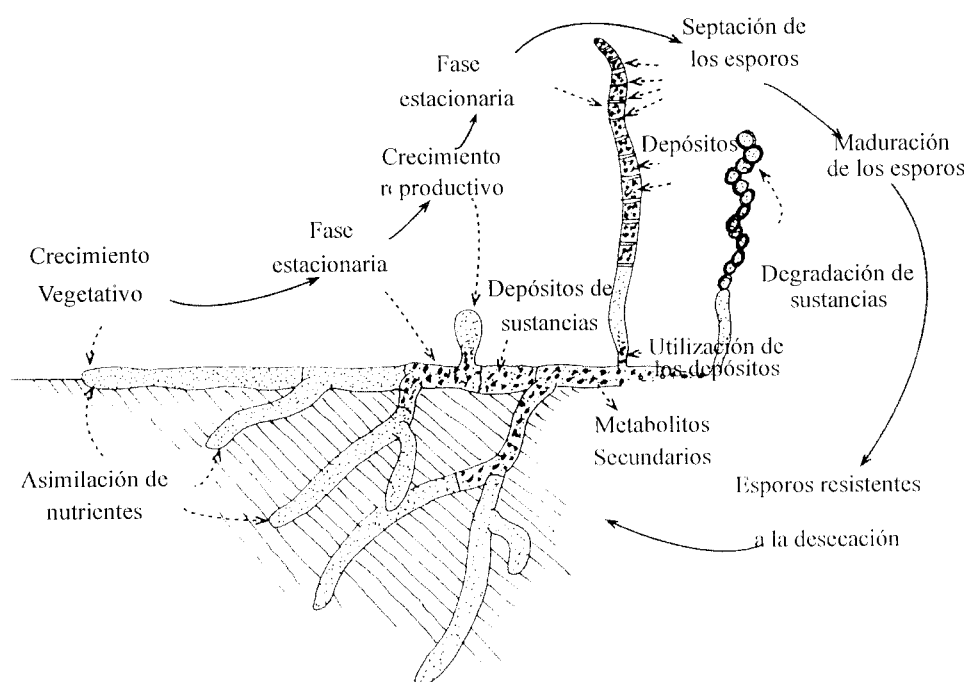


Figura 2: Diagrama de un corte longitudinal de una colonia de *Streptomyces* indicando los estados fisiológicos en diferentes localizaciones de la hifa. Los depósitos de sustancias representan principalmente al glucógeno pero es extensivo a otros compuestos como lípidos y polifosfatos. (reproducido de [4] [1]).

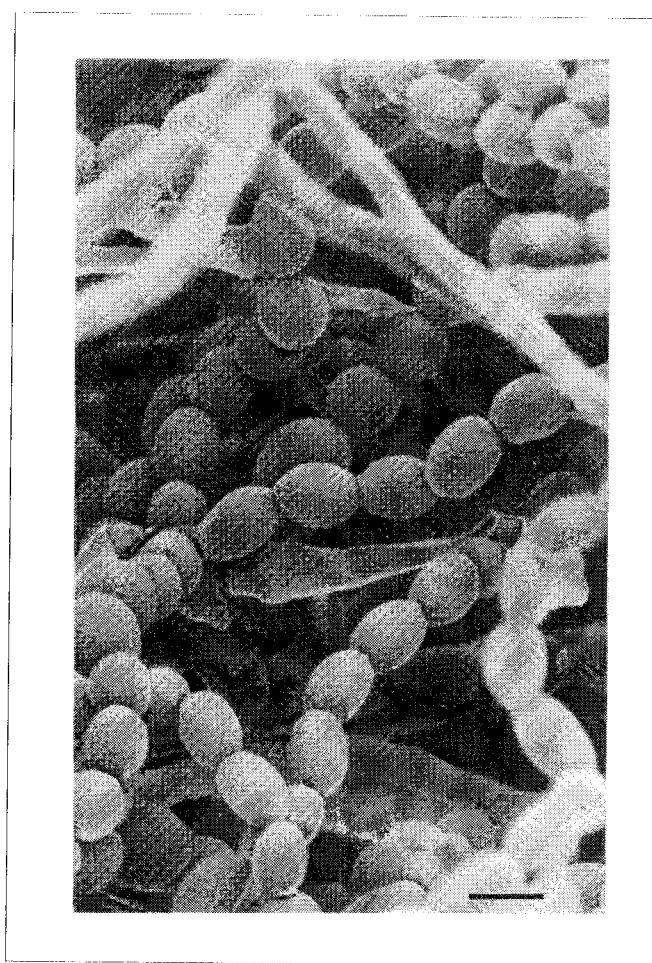


Figura 3: Fotografía de microscopía electrónica en donde se muestran las cadenas de esporos formadas en el micelio aéreo de *S. coelicolor* (reproducido de [4]).



Figura 4: Colonias de *S. coelicolor* crecidas en medio sólido en el laboratorio. Se distinguen el micelio aéreo (blanco algodonoso), zonas de esporulación (micelio gris) y sobre la superficie gotas exudadas que contienen actinorrodina.

1.4.- *Streptomyces coelicolor* como modelo de estudio.

S. coelicolor no produce ningún antibiótico de utilidad comercial. Sin embargo, se ha tomado a esta especie como un modelo ideal para realizar los estudios genéticos de los *Streptomyces*, debido a que se disponen de sistemas muy bien desarrollados de clonado y expresión de genes, disrupción génica y elementos móviles. Además, esta cepa produce pigmentos de color de los cuales dos, actinorodina (azul) y la undecilprodigiosina (rojo), son antibióticos lo que facilita el estudio genético de la biosíntesis de metabolitos secundarios [25].

1.5.- El genoma de *Streptomyces coelicolor*.

S. coelicolor produce, al menos, cuatro antibióticos durante su fase estacionaria de crecimiento en medio líquido. Dos de ellos, actinorodina y undecilprodigiosina, son compuestos policetónicos; los otros dos son un antibiótico Ca^{2+} -dependiente y la metilenomicina. Aunque todos poseen actividad antibacteriana ninguno de ellos es usado comercialmente.

S. coelicolor es la especie de *Streptomyces* más estudiada genéticamente. Tiene un cromosoma lineal de aproximadamente 8 Mb [26] y un contenido G+C de 70% [27].

El genoma de *S. coelicolor* tiene la característica de poseer dos grandes regiones genéticamente silentes separadas por dos regiones activas genéticamente [28]. Otra peculiaridad es la simetría circular de los genes mapeados; es decir, que un gen que tiene una función relacionada a otro gen dado (por ejemplo, el paso siguiente de una vía metabólica), puede encontrarse en la posición opuesta en el mapa genético [28]. Esta simetría podría ser el resultado de una duplicación del genoma y la posterior pérdida de un miembro de la mayoría de los pares de los genes duplicados.

El genoma de *S. coelicolor* tiene una marcada predisposición a la inestabilidad genética, debido a deleciones y amplificaciones de algunas secuencias en particular (generalmente entre 3 y 35 kpb) [29]. A veces las amplificaciones están asociadas con un fenotipo en particular, tal es el caso de una mayor resistencia a los antibióticos [30].

S. coelicolor posee dos plásmidos, SCP1 [31] y SCP2 [32]. SCP1 es un plásmido lineal de 350 kpb y es uno de los pocos plásmidos de *Streptomyces* que codifica un fenotipo reconocible, la producción del antibiótico metilenomicina [33]. En realidad este es el único metabolito producido por *Streptomyces* cuyos genes biosintéticos se encuentran codificados en un plásmido. En cambio, SCP2 es un plásmido circular de 31 kpb. También contiene a SLP1 que es un plásmido que puede integrarse al cromosoma o ser un elemento autónomo en el genoma [34]. SLP1 puede ser transferido a cepas SLP1⁻ por conjugación [35].

En *Streptomyces spp.* se han encontrado diversos elementos genéticos accesorios tales como plásmidos circulares de alto y bajo número de copias, fagos virulentos, fagos temperados similares a lambda (por ejemplo Φ C31), un transposon de la familia Tn3 un gran número de secuencias de inserción y plásmidos gigantes (por ejemplo, SCP1) [34]. Los vectores plasmídicos que se usan normalmente para el clonado y análisis de *S. coelicolor* son derivados de los plásmidos nativos SCP2 y pIJ101. SCP2*, una variante inestable de SCP2, y sus derivados han sido usados en la mayoría de los casos como vectores de clonado. El pIJ101 es usado en situaciones en que se requiere un plásmido de alto número de copias [36]. El fago temperado Φ C31, que se encuentra en *Streptomyces spp.*, también ha sido desarrollado como vector de clonado. La delección del sitio *attP* permite la inserción de grandes fragmentos clonados y previene su integración al cromosoma [37], por lo que se lo ha utilizado mucho en experimentos de disrupciones génicas.

I.6.- Mutantes de *S. coelicolor*.

Los estudios de la diferenciación morfológica en *S. coelicolor* se concentran en mutantes que no producen micelio aéreo (mutantes *bld*) y en aquellas que desarrollan micelio aéreo, que permanece blanco por su incapacidad de producir esporos maduros asociados a un pigmento gris característico *WhiE* (mutantes *whi*) [3].

Las mutantes *bld* o *bald* de *S. coelicolor* pueden identificarse como colonias brillosas y han sido mapeadas en diferentes loci. De ellas (*bldA-I*), se han identificado por la incapacidad de producir micelio aéreo. La mayoría de las mutantes *bld* (excepto

bldC) son pleiotrópicamente defectivas en la producción de antibióticos [3], lo que sugiere que la diferenciación morfológica y fisiológica comparten algunos elementos de control genético. Es importante destacar que estas mutantes (excepto *bldB* y *bldI*) son condicionales; es decir, pueden producir micelio aéreo y esporos en medio mínimo conteniendo manitol (en lugar de glucosa como fuente de carbono), o bien creciendo cerca de una cepa salvaje [38]. Pope y colaboradores sugieren que el “defecto primario en las mutantes *bld* está en la regulación de la utilización de la fuente de carbono.....y que la incapacidad de iniciar la morfogénesis es una consecuencia secundaria de su incapacidad de sensar el hambreado” [39]. Varios genes *bld* han sido clonados y de los cuales *bldA* ha sido el más estudiado. *bldA* codifica un ARNt que puede traducir un codón de leucina (TTA) [40] que no se encuentra en genes esenciales y es “raro” debido a la gran desviación que tienen los *Streptomyces* en el uso de codones [41]. La presencia del codon TTA en genes que se expresan en fases tardías del desarrollo sugirió una regulación a nivel traduccional para la formación del micelio aéreo [3]. Sin embargo, otros experimentos realizados por Gramajo y colaboradores [42] cuestionaron esta postura. Ellos demostraron que el ARNt *bldA* no es controlado en el desarrollo y que además es capaz de traducir codones UUA aún durante estadios tempranos del crecimiento.

Willey y colaboradores [43] descubrieron que la mayoría de las mutantes *bld* (*bldA-H*, *bldK* y *bld261*) fallan en producir una proteína, SapB, que se excreta al medio en las cepas *Bld*⁺ y que está asociada a la superficie de las hifas aéreas y a los esporos [4]. A todas estas mutantes *bld* se les puede inducir el desarrollo del micelio aéreo por el agregado de SapB al medio de cultivo. Esta proteína, de 17 amino ácidos, no es sintetizada ribosomalmente [38].

Las mutantes *whi* han sido identificadas como colonias cuyo micelio aéreo permanece blanco luego de períodos prolongados de incubación [3]. De una colección de 52 mutantes *whi*, nueve loci (*whiA-I*) se han identificado por mapeo genético. Algunas mutantes *whi* están directamente involucradas en la biosíntesis del pigmento gris característico de los esporos. Sin embargo, muchas mutantes son incapaces de producir la compartimentalización unigenómica de los preesporos [4]. Estas últimas

mutantes involucran a un grupo de genes relacionados con la cascada que gobierna los primeros estadios de la esporulación. Estudios realizados con microscopía electrónica y de contraste de fase han revelado que *whiA*, *B*, y *H* son mutantes que producen hifas aéreas enrolladas típicas a diferencia de *whiG*, cuyas hifas son largas y rectas. Por el contrario, las hifas *whiI* son extremadamente enrolladas. Tres genes *whi* han sido clonados y secuenciados: *whiB* [44], *whiG* [13] y *whiE* [45]. *whiB* codifica una proteína de 87 amino ácidos de función desconocida cuyas características supone una proteína de unión a ADN. El producto de *whiG* codifica un factor sigma [4] y muestra un 40% de amino ácidos idénticos a otros factores sigma de *B. subtilis*, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa* [3]; cuando este gen es superexpresado, causa una esporulación desmedida provocando la formación de cadenas de esporos del micelio que se encuentra en la superficie del agar en el medio sólido (esporulación ectópica) y en medio líquido [3]. Finalmente, *whiE* es un grupo de genes que codifica para una poliketido sintetasa tipo II, lo que indica que el pigmento gris de los esporos es un compuesto aromático policetónico similar a la actinorodina y a muchos otros antibióticos [4]. Los fenotipos de las mutantes en relación con el ciclo de vida de una cepa salvaje se muestran en la Figura 1.

I.7.- Crecimiento de *S. coelicolor* en medio líquido y sólido.

En medio de cultivo líquido, mínimo o rico, *S. coelicolor* muestra una curva de crecimiento característica y compleja con cuatro fases claramente diferenciadas: una primera fase de crecimiento logarítmico (CR1), luego una fase de transición (T) que antecede a una segunda fase de crecimiento logarítmico (CR2) y por último la fase estacionaria (S). Este tipo de curva no es única para esta especie, sino que fue observada en *S. higroscópica* [46], *S. ambofaciens* [47] y *S. albus* [48].

En medio sólido también pueden diferenciarse 4 fases: una de crecimiento rápido que corresponde a la formación de micelio sustrato, luego un período en el cual se detiene el desarrollo y que antecede a una segunda fase de crecimiento que dará lugar a la formación del micelio aéreo y producción de antibióticos [12] y finalmente, la etapa de la esporogénesis..

Estudios realizados durante todo el desarrollo de la bacteria creciendo en medio líquido, han demostrado que en la fase de transición ocurren importantes cambios fisiológicos que se reflejan en : a) disminución de la síntesis proteica [12], b) cambios en la expresión génica [49], c) activación de regulones de estrés [50] [51], d) cambios en el pH del medio (X. Li, comunicación personal), e) inducción de genes de la biosíntesis de antibióticos [46] f) disminución general de la síntesis de proteínas ribosomales [52] y g) acumulación de ppGpp [46]. La fase de transición en medio líquido puede relacionarse al corto período de disminución del crecimiento observado en la diferenciación colonial en medio sólido (Figura 5), por lo que sugeriría aunque no probaría que la CR2 y los cambios morfológicos que dan lugar al micelio aéreo están relacionados [12].

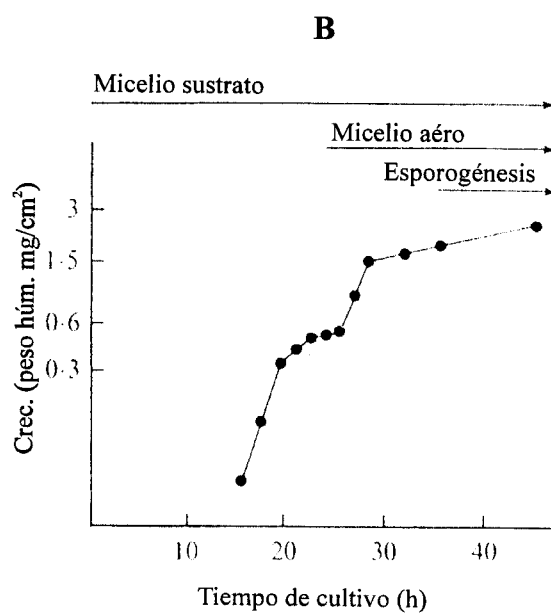
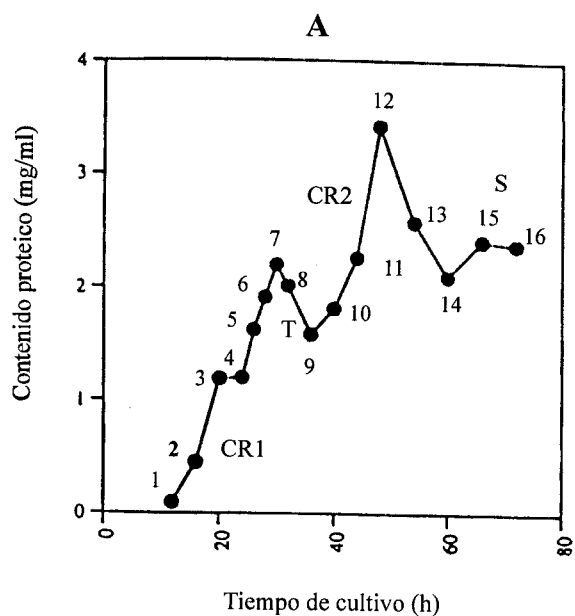


Figura 5: Curvas típicas de crecimiento en medio líquido (A) y en medio sólido (B) de *Streptomyces coelicolor*.

I.8.- Estrés y desarrollo en *S. coelicolor*.

Muchos de los conceptos que han surgido de estudios realizados en *E. coli* y *B. subtilis* han servido de guía para los estudios del desarrollo en *Streptomyces*. El conocimiento del ciclo de vida de estas bacterias se ha basado fundamentalmente en estudios a nivel bioquímico, genético y de observación microscópica. Recientes avances en la tecnología de geles bidimensionales y sus modernos programas de análisis, han facilitado estudiar el proteoma de los *Streptomyces* durante el desarrollo y en situaciones de estrés. Esta técnica se basa en marcar las proteínas con [³⁵S]-metionina y resolverlas en geles bidimensionales para luego realizar las comparaciones de las autoradiografías usando programas de computación apropiados. Por ejemplo, en *S. higroscopicus* esta técnica confirmó de qué manera se regula la producción del antibiótico bialaphos que se había observado en estudios previos y que reveló, a un nivel nunca alcanzado, las interacciones de todas las proteínas expresadas [46]. Por otro lado, Dary y colaboradores usando la misma tecnología, estudiaron las alteraciones de la expresión génica causadas por amplificaciones espontáneas y reordenamiento genómico en diferentes cepas de *S. ambifaciens* [47]. El grupo de J. Salas, en cambio, estudió los cambios en la expresión génica de genes de proteínas ribosomales durante todo el ciclo de vida de *S. coelicolor* A3(2) en medio líquido [52]. Recientemente se ha publicado un trabajo detallado sobre la expresión proteica durante el desarrollo de *S. coelicolor* a 30°C. Los análisis del mismo permitieron clasificar los distintos geles bidimensionales en cuatro grupos diferentes, reflejando cada uno la expresión génica específica de cada fase del desarrollo de *S. coelicolor* (RC1, RC2, T y S) creciendo en medio líquido [49].

Experimentos recientes han demostrado que la fase de transición es una consecuencia directa del hambre. Análisis cuantitativos de la composición del medio de cultivo MG (ver Materiales y Métodos), revelaron que la fase de transición es el reflejo de una curva diáuxica. Luego del CR1 la fuente de carbono y nitrógeno, el glutamato, se agota y la bacteria entra en el estado de transición en el cual se produce una reprogramación metabólica para comenzar a consumir nuevas fuentes de carbono (maltosa) y nitrógeno (amonio) (J. Novotná, comunicación personal). Otros estudios de la expresión génica y fisiología de la etapa de transición también han demostrado una

coincidencia entre la fase de transición, el hambreado y los regulones de estrés. Por ejemplo, la respuesta al estrés por calor en *S. coelicolor* ha sido muy bien caracterizada. Puglia y colaboradores determinaron que la expresión de las proteínas de estrés térmico y la inducción de las mismas como respuesta al aumento de temperatura, están reguladas a lo largo del desarrollo de la bacteria [51]. Además, la mitad de las proteínas analizadas en el estrés por calor, son inducidas espontáneamente en la fase de transición simultáneamente a la reducción de la síntesis proteica (X. Li, comunicación personal y [51]).

Thompson y colaboradores, basados en el rol de la presión osmótica en la erección del micelio aéreo [13], indujeron cultivos crecidos en la primera fase logarítmica (CR1) con NaCl. Lo interesante es que más del 50% de las proteínas inducidas por NaCl fueron apagadas o encendidas durante la fase de transición (P. Viollier y J Vohradsky, comunicación personal).

Hasta el momento no hay trabajos comparables en otros microorganismos a los llevados a cabo en *S. coelicolor*, que relacionen ciclo de vida con activación de regulones de estrés. Sin embargo, la respuesta adaptativa ha sido descripta en *E. coli* [53] y *B. subtilis* [54]. En *B. subtilis*, las proteínas de estrés general pueden ser inducidas por calor, sal y hambreado [54]. Por otro lado, el grupo de Neidhardt observó en *E. coli* que algunos antibióticos inducen la respuesta al estrés térmico mientras que otros inducen la del estrés al frío [53]. La respuesta inducida de estrés al calor por antibióticos está sustentada en la observación que mutantes de *E. coli* en el principal activador de esta respuesta, el factor sigma 32, son sensibles a algunos antibióticos [55].

Los diversos estudios realizados y otros en marcha (incluidos los resultados que se presentan en esta Tesis) tienen como objetivo unificar un modelo en el cual el hambreado es el desencadenante de la inducción de regulones de respuesta a diferentes estrés. Los distintos regulones tal vez han sido utilizados por los *Streptomyces* como mediadores del desarrollo a lo largo de la evolución. No cabe duda que el modelo final podrá ser concluido cuando se dispongan de diversas mutantes en los diferentes sistemas reguladores de la respuestas a estrés.

II-MATERIALES Y MÉTODOS

II.-Materiales y Métodos.

II.1.-Microorganismos.

Las cepas de *E. coli* y *S. coelicolor* que fueron utilizadas en este trabajo derivan de *E. coli* K-12 y *S. coelicolor* A(3)2 respectivamente. El genotipo de las distintas cepas bacterianas y las características de los plásmidos usados se detallan en la Tabla I. Las bacterias fueron cultivadas en medios sólidos o líquidos a la temperatura correspondiente según las características de cada una de ellas.

Tabla I. Cepas bacterianas y plásmidos.

Cepas bacterianas	Genotipo relevante	Referencia
-------------------	--------------------	------------

S.coelicolor

YU105	<i>proA1 argA1 red60</i> [56] <i>act::ermE whiE::hig</i> , SCP1 ⁻ y SCP2 ⁻	
-------	--	--

CH1	<i>proA1 argA1 redE60</i> , SCP1 ⁻ [57] SCP2 ⁻	
-----	---	--

J1501	<i>hisA1 uraA1 strA1 pgl</i> [58] SCP1 ⁻ SCP2 ⁻	
-------	---	--

M145	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻	[58]
------	-------------------------------------	------

E.coli

XL ₁ Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1</i> [59] <i>endA1</i> <i>gyrA46 thi relA1 lac⁻ /</i> F'[<i>proAB⁺ lacI^q lacZ ΔM15</i>	
----------------------	---	--

Tn10(tet^r)]**Plásmidos**

pUC 18/19

Plásmido de alto número de [60]
copias de 2,7 kb con el gen
bla y el fragmento *lacZ* α

II.1.2.-Mantenimiento de cepas.

Las bacterias se mantuvieron en medios agarizados por períodos cortos de tiempo a 4°C. Para mantenerlas estables por largos períodos las *E.coli* se congelaron en presencia de DMSO al 0,7% (v/v) y se mantuvieron a -70°C. Para el caso de los *Streptomyces* se prepararon esporos y se los almacenó en glicerol 20% (v/v) a -20°C.

II.1.3.-Preparación de esporos.

Los esporos fueron obtenidos a partir de cultivos en placa utilizando medio Soja. Las placas preparadas fueron secadas durante 3 a 4 horas para favorecer la esporulación. Las placas se incubaron durante 6 días hasta que fueron visibles los esporos grises o blancos según la cepa utilizada. La recolección de los mismos se realizó utilizando una solución estéril de glicerol al 20% (v/v) y raspando la superficie de las colonias con un ansa estéril. Luego el líquido fue filtrado a través de una jeringa estéril con un trocito de algodón, a fin de obtener una suspensión de esporos libres de micelio y restos de medio. La suspensión de esporos fue recibida directamente en un frasco estéril y a -20°C. La concentración de esporos viables fue determinada plaquendo una serie de diluciones en medio LB.

II.2.-Medios de cultivo

II.2.1.-Medios complejos (ricos).

a) Medio LB (Luria-Bertani):

Tryptona	10 g
NaCl	5 g
Extracto de levadura	5 g
H ₂ O c.s.p.	1 l

b) Medio YEME:

Extracto de levadura	3 g
Bacto peptona	5 g
Extracto de malta	3 g
Glucosa	10 g
Sacarosa	340 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

Después de autoclavar se adicionan 2 ml de 2,5 M MgCl₂.6H₂O.

c) Medio J:

Sacarosa	100 g
Trypton soya broth	30 g
Yeast extract	10 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	10 g

Disolver los componentes en agua destilada y llevar el volumen a 1l. Mantener el pH natural. Autoclavar a 1,5 atmósferas durante 30 minutos.

d) Medio Soja:

Manitol	10 g
Harina de soja	10 g

Adicionar 300 ml de agua de la canilla a la harina de soja y disolver en caliente. En un

recipiente calentar el manitol con 200 ml de agua corriente hasta que se disuelva bien y luego agregar esta solución a la de soja. Enrasar a 500 ml y fraccionar 100 ml en frascos de 250 ml. Agregar 2 g de agar a cada uno. Autoclavar dos veces durante 20 minutos cada vez.

II.2.2.2.-Medios Mínimos.

Medio MG (para *Streptomyces*):

Este medio está basado en el medio MG descrito por Doull y Vining [61]. Para un litro se preparan por separado las siguientes soluciones:

A) Base (800 ml).

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	9 mg
CaCl ₂ .H ₂ O	1 mg
NaCl	1 mg
MOPS	21 g
Elementos trazas stock **	4,5 ml
Glutamato de Na.1H ₂ O	11,23 g
Buffer fosfato, 1M stock *	15 ml

*Solución stock de buffer fosfato pH 6,5, 1M.

Mezclar en partes iguales 1M KH₂PO₄ y 1M K₂HPO₄ para llevar la solución a pH 6,5.

****Solución stock de elementos trazas (1L).**

Sulfato Cúprico ($5\text{H}_2\text{O}$)	39 mg
Acido Bórico	5,7 mg
Molibdato de Amonio ($4\text{H}_2\text{O}$)	3,7 mg
Sulfato de manganeso ($1\text{H}_2\text{O}$)	6,1 mg
Sulfato de Zinc ($7\text{H}_2\text{O}$)	880 mg
H_2O	1000 ml

Autoclavar a 1,5 atmósferas durante 25-30 minutos para almacenar a largo plazo.

B) Fuente de Carbono (200ml):

Maltosa. $1\text{H}_2\text{O}$	50 g
--------------------------------	------

Las soluciones A y B se mezclan después de la esterilización.

Para los estudios de fase estacionaria se trabajó con otra solución de elementos trazas:

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
NaCl	0,1 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{Ca Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
H_2O	1000 ml

II.2.2.3.-Medios diferenciales.

La capacidad de α -complementación de los vectores de clonado fue detectada mediante ensayo de actividad β -galactosidasa utilizando medio LB sólido, suplementado con IPTG y Xgal en concentraciones finales de $40\mu\text{g/ml}$.

II.2.2.4.-Antibióticos.

La solución concentrada de antibiótico se preparó según Sambrook y col. [62] y se conservó a 4°C. La concentración final de ampicilina en el medio de cultivo fue 100 µg/ ml.

II.3.-Cuantificación de actinorodina.

A 1 ml de cultivo se le adicionó 1 ml de NaOH 1 M, se agitó vigorosamente y se centrifugó. El sobrenadante se removió y se leyó su absorbancia a 608 nm. Para la actinorodina 1 DO₆₀₈= 120 µg/ ml.

II.4.-Condiciones de cultivo y de crecimiento.

II.4.1.-Cultivo principal (para los estudios de estrés por frío).

Se utilizó la técnica de cultivo en dos pasos para *Streptomyces* en medio líquido. El primer paso es la germinación de esporos y obtención de micelio:

1) Se inocularon 10^7 - 10^8 esporos en 10 ml de medio J en un tubo de ensayo (20 cm de largo, 2,5 cm de diámetro interno), conteniendo un pequeño resorte de acero para favorecer el crecimiento disperso y mejorar la aereación.

2) Se colocó el tubo en una gradilla con 45 grados de inclinación y se lo fijó en un agitador rotatorio a 200 rpm y a 30°C durante 48 horas. El cultivo normalmente es muy denso y disperso. El micelio se centrifugó y se eliminó el medio J. Este sería el material que se utilizó luego para el segundo paso:

1) Se colocaron 500 ml de de medio MG en un Erlenmeyer de 2 litros con aletas de vidrio internas que permitían obtener un cultivo muy disperso. El pH del medio en el momento de su uso es de aproximadamente 6,0.

2) Se resuspendió el micelio, proveniente del paso anterior, en 10 ml de medio MG fresco, suplementado con histidina 50 µg/ml y uracilo 7,5 µg/ml y se inoculó el medio MG.

3) Se colocó el frasco en el agitador orbital a 200 rpm y 30°C.

II.4.2.-Cultivo principal (para los estudios de fase estacionaria).

10^8 esporos se inocularon directamente en 500 ml de medio MG en un Erlenmeyer de 2 l suplementado con prolina 37 $\mu\text{g/ml}$, arginina 37 $\mu\text{g/ml}$ y casaaminoácidos 0,2% (p/v).

II.5.-Manipulación de proteínas.

II.5.1.-Marcación de proteínas *in vivo* (para estudios de estrés por frío).

Se utilizó una mezcla de metionina-cisteína Easy tag Express [^{35}S] de Du Pont NEN® (1175.0 Ci/mmol).

En cada punto deseado del cultivo, se transfirieron 2 ml del mismo cultivo a un Erlenmeyer de 25 ml, se adicionaron 10 μl ($\cong 100 \mu\text{Ci}$) de los aminoácidos radioactivos y se colocó el frasco en un agitador orbital (Gyrotory® Model G76, New Brunswick Scientific) en punto 6, ya sea a 30°C para los controles o a 8, 12 y 16 °C para los puntos de estres por frío. La duración de las marcaciones fue de 40, 60 o 90 minutos según el protocolo. Luego las muestras se centrifugaron y se descartó el sobrenadante con el radioactivo no incorporado. Finalmente, las muestras fueron almacenadas hasta su posterior procesamiento.

II.5.2.-Marcación de proteínas *in vivo* (para los estudios de fase estacionaria).

1 ml del cultivo principal se incubó en presencia de 100 μl de metionina [^{35}S] Du Pont, NEN® (1000Ci/mmol) durante 3 horas con agitación continua.

II.5.3.-Preparación de los extractos celulares (para los estudios de estrés por frío).

Los pellets fueron lavados 3 veces con 2 ml de buffer de sonicación, se centrifugaron a 12.000 rpm (Biofuge 15R, Heraeus AG) durante 4 minutos y se resuspendieron en 150 o 200 μl del mismo buffer. La rotura de las células se realizó con tres rondas de sonicación de 10 segundos cada una en amplitud mínima y constante (Branson Sonifier 250). Los restos celulares se eliminaron centrifugando a 12.000 rpm durante 40 minutos a 4°C.

Buffer de sonicación.

Base:

TES pH 7,4	50 mM
EDTA pH 8,0	1 mM
Glicerol	5 % (v/v)
DTT	5 mM
NaCl	50 mM

Inhibidores de proteasas:

PMSF	0,4 mM
Benzamidina	15 µg/ml
Leupeptina	1 µg/ml
Pepstatina	1 µg/ml

Inhibidores de fosfatasa:

NaF	20 mM
Na ₃ VO ₄	100 µM

II.5.4.-Preparación de los extractos celulares (para estudios de fase estacionaria).

Los cultivos de *Streptomyces coelicolor* fueron recolectados, enfriados y centrifugados a 5.000 rpm (Sorvall ® RC-5B) 10 minutos a 4°C. Luego estos pellets fueron resuspendidos, lavados y recentrifugados en buffer frío A. Las células finalmente fueron resuspendidas en 1 ml del mismo buffer conteniendo 0,3% (p/v) de SDS y 0,5% (v/v) de β-Mercaptoetanol. Las suspensiones se sonicaron dos veces durante 15 segundos con una amplitud del 10% (Sonics and Materials Inc.). Luego fueron rápidamente calentadas a 100°C durante 5 minutos y finalmente enfriadas en hielo. Los restos celulares se eliminaron centrifugando las muestras a 10.000 rpm 15 minutos a 4°C (Sigma 2K 15).

Para realizar los geles bidimensionales, las proteínas fueron precipitadas con dos

volúmenes de acetona fría y recolectadas por centrifugación a 12.000 rpm 30 minutos a 4°C. Los pellets fueron resuspendidos en buffer de isoelectroenfocado.

Buffer A.

Base:

Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	5 mM
DTT	1m M

Inhibidores de proteasas:

PMSF	0,5 mM
Leupeptina	0,5 µg/ml
Pepstatina	7 µg/ml
Benzamidina	4 mg/ml

Buffer de isoelectroenfocado:

Urea	9,9 M
Nonidet P-40	4 % v/v
Anfolito rango 3-10	20 % v/v
Anfolito rango 5-7	80 % v/v

II.5.5.-Cuantificación de la radioactividad incorporada.

2 µl de extracto crudo de cada muestra fueron sembrados en pedacitos de papel de filtro. Se colocaron en TCA 10 % frío, metanol y acetona durante 20, 10 y 15 min.respectivamente. Finalmen-te, se secaron a temperatura ambiente. Cada muestra se procesó por triplicado. Los papelitos fueron introducidos en viales conteniendo líquido de centelleo (Ultima Gold™, Packard®) y leídos en un equipo 2200 CATRICARB®. Packard®.

II.5.6.-Determinación de la concentración de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas fueron realizadas mediante algunos de los siguientes métodos:

- Lowry, basado en la oxidación de aminoácidos aromáticos utilizando el reactivo de Folin Ciocalteu [63].
- Bradford, basado en la variación del espectro del colorante Coomassie Brilliant Blue G250 cuando se une a proteínas [64]. Como referencia se utilizaron soluciones patrones de BSA.

II.6.-Electroforesis de proteínas.

II.6.1.-Electroforesis bidimensional (para estudios de estrés por frío).

Se utilizó el equipamiento del sistema Millipore “Investigator 2-D Electrophoresis System™”.

Metodología.

a) Preparación de la muestra para 2-D.

Se mezclaron las proteínas marcadas radioactivamente con dos volúmenes de buffer de muestra, para dar un total de 10-15 μ l. La capacidad de sembrado es de 100 μ g, pero mucha mejor resolución se logró utilizando entre 10-50 μ g de proteínas. En cada gel se aplicó aproximadamente 1.000.000 cpm. En muchos casos fue necesario precipitar las proteínas con acetona fría, dejarlas en hielo y centrifugarlas a 12.000 rpm durante 20 min. Se removió el sobrenadante y se secó el pellet al vacío (Speedfuge HSC10 K, Savant). Luego se resuspendió en 5 μ l de agua y 10 μ l de buffer de muestra.

Buffer de muestra:

Urea	3 g
CHAPS	0,2 g
DTT	0,08 g
anfolitos 3-10 (Millipore)	275 μ l
anfolitos 8-10,5 (Pharmacia)	25 μ l
H ₂ O	2,3 ml

Esta solución se fracciona y se guarda a -20°C.

b) Preparación de los geles en tubo para IEF.

Se usaron de rutina los tubos analíticos Millipore. Los tubos son de 1 mm de d.i. y 26 cm de largo. En su interior tienen incorporado a lo largo del tubo un hilo de 0,08 mm de diámetro. La función del hilo es la de reforzar internamente y de manera flexible el gel de acrilamida, haciéndolo más fuerte y fácil de manipular.

Los tubos se dejaron varias horas en agua destilada con el fin de retirar el resto de impurezas y favorecer luego una buena polimerización. Luego se les drenó el exedente de líquido y se marcó a una distancia de 21 cm uno de los extremos. Se retiró del freezer un tubo conteniendo 6 ml de solución stock para gel de IEF, se agregaron 360 µl y 40 µl de anfolitos de rango 3-10 y 8-10,5 respectivamente. Se agitó y centrifugó durante 5 minutos a 1.500 rpm en una centrífuga de mesa. Este último paso fue esencial porque permite eliminar las burbujas y obtener un gel de óptimas condiciones. La polimerización se inició con el agregado de 30 µl de AMPS al 10 % (p/v). En este paso se utilizó el aparato diseñado por Garrels para realizar el llenado de los tubos. Se pipetó toda la mezcla en un tubo de plástico de 1,5 cm de d.i. y 26 cm de largo con uno de los extremos sellado con Parafilm®. Luego, se introdujeron los capilares y lentamente se agregó agua destilada sobre la superficie de la solución del gel. La cantidad de agua agregada fue la necesaria como para obtener una presión hidrostática que empujara la solución hacia arriba hasta una altura de 21 cm. Se dejó en reposo durante tres horas por lo menos, para permitir la polimerización.

Solución stock para geles de IEF (para 100 capilares):

Urea	22,8 g
CHAPS	0,8 g
H ₂ O	15 ml
stock de acrilamida *	5,2 ml

Al disolver completamente los ingredientes de la solución, su volumen final será de 30 ml. Se la filtra a través de un filtro de 0,45 µm (Millipore). Se almacena a -20°C en

alícuotas de 6 ml.

* Stock de acrilamida:

Acrilamida	30 g
N,N'-Metilen-bis	0,8 g
Acrilamida	
H ₂ O c.s.p.	100 ml

La solución se filtra y almacena a 4°C. Este stock se usa solamente para la preparación de geles de IEF.

c) Pre-enfoque del IEF.

Una vez polimerizados los capilares se lavaron con agua destilada y se colocaron en la cuba especial para IEF del sistema Investigator™. En la parte superior de cada tubo se adicionó 30 µl de buffer de protección, que es una dilución 1:5 del buffer de muestra para 2-D. Esto sirvió como una barrera de protección entre la muestra y el buffer del cátodo.

Luego se preparó una solución fresca de 100 mM de NaOH como buffer del cátodo y una solución de 100 mM de ácido fosfórico como buffer del ánodo. Se colocó el buffer anódico en el tanque inferior y el catódico en el superior. Se comenzó inmediatamente la corrida, que para este sistema es de aproximadamente de 70 minutos hasta que el voltaje alcanza 1.500.

d) Siembra de la muestra y corrida del IEF.

Después de la precorrida, se sembró cada muestra en la parte superior del capilar con una jeringa Hamilton®. Debido a la alta densidad de la muestra por el contenido de urea, la solución desciende a través de la solución de protección. El IEF se corrió durante 15,5 horas hasta llegar a la condición de equilibrio. Se aplicó alto voltaje (hasta 2.500 V) durante los últimos 30 minutos, para dar un total de 16.000 volt-hora.

e) Preparación del gel para la segunda dimensión.

Se utilizó acrilamida de alta resistencia (Duracryl™) para los geles de gran tamaño del sistema Millipore (28 x 23 cm). Para las proteínas de *Streptomyces coelicolor* los geles de 12,5 % dan una muy buena resolución.

Las soluciones para la segunda dimensión en condiciones disociantes son esencialmente las mismas que para un gel normal de SDS-PAGE pero sin gel concentrador. Debido al gran número de geles que fueron procesados fue muy útil incorporar pequeños trocitos de papel numerados en el extremo inferior izquierdo de cada gel a fin de tener una marca permanente. Una vez colocados los vidrios en el tanque especial del sistema, se agregó lentamente la mezcla hasta que el nivel alcanzó 0,5 cm por debajo del extremo superior de los vidrios. Luego se adicionó 0,5 ml de isobutanol saturado en agua a cada gel. La polimerización completa se alcanzó a las 2 horas aproximadamente.

Solución para geles (100 ml):

Duracryl™	41,5 ml
Buffer del gel	25 ml
H ₂ O	32,2 ml
SDS 10 % (p/v)	1 ml
TEMED	50 µl
AMPS 10 % (p/v)	250 µl

Esta solución se prepara en el momento.

Buffer del gel (1l):

Tris base	130,8 g
Tris-Cl	66,3 g

El pH final es 8,8.

f) Equilibrio de los capilares y siembra de la segunda dimensión.

Una vez finalizado el isoelectroenfoque se retiraron los tubos de la cuba y se los

colocó en hielo durante 30 minutos. En la parte superior se agregó agua o buffer de equilibrio a los fines de evitar roturas de la trama de poliacrilamida cuando se sacan los geles con presión.

Una vez obtenido el gel de la primera dimensión se lo colocó en buffer de equilibrio por un lapso de 2 minutos. Para su posterior transferencia a la superficie del gel de la segunda dimensión. Este es el paso más crítico de todo el proceso. Y para terminar con éxito todo el proceso, se tuvo especial cuidado en: a) remover el líquido remanente en la parte superior del gel que está normalmente 1-1,5 cm por debajo del borde del vidrio; b) luego de alinear el IEF apropiadamente entre los dos vidrios se fue introduciendo lentamente el gel con la ayuda de una espátula de extremos romos hasta apoyar directamente en el gel desnaturalizante, teniendo cuidado de no dejar ninguna burbuja de aire.

Buffer de equilibrio (100 ml):

Tris 1M pH 6,8	12,5 ml
Glicerol	20 ml
SDS 10% (p/v)	30 ml
Bromofenol Blue 0,05 % (p/v)	2,5 ml

Inmediatamente antes del uso se disuelve 0,23 g de DTT.

g) Corrida de la segunda dimensión.

El buffer de corrida que se usó es el mismo que para un SDS-PAGE. El buffer de la parte superior fue 2X y el de la parte inferior 1X. La temperatura se mantuvo a 20°C. La electroforesis duró hasta que el frente del colorante alcanzó 1 cm del borde inferior del gel. Para el istema Investigator se requieren 6 hs y una potencia de 14 W por cada gel.

Buffer de corrida (10X para 2l):

Glicina	288,4 g
Tris base	60,6 g
SDS	20 g

h) Visualización de los resultados.

Los geles fueron fijados con solución de fijación y luego se secaron sobre papel Whatman® 3MM durante una hora. Se expusieron con películas de alta sensibilidad (Curix RP1 PLUS, AGFA) durante una semana y un mes para la primera y segunda exposición respectivamente. El revelado de las películas se realizó automáticamente (FUJI X-ray RGII®, FUJI).

II.6.2.-Electroforesis bidimensional (para los estudios de fase estacionaria).

Se utilizó el equipamiento del sistema Hoefer SE 600 para la primera y segunda dimensión. Los geles bidimensionales se realizaron según una modificación del procedimiento de O' Farrel [65].

Metodología.

a) Preparación de los geles en tubos para IEF.

Se usaron de rutina los tubos preparativos del sistema. Los tubos son de 15 cm de largo y 3 mm de d.i.. Previamente a cada corrida los tubos fueron exhaustivamente lavados en solución alcohólica de KOH al 20 % durante 2 horas y luego en solución sulfocrómica durante 1 hora. Se retiró del freezer un tubo conteniendo 5,6 ml de la solución stock para el IEF al cual se le agregó 70 µl y 280 µl de anfolitos de rango 3-10 y 5-7 respectivamente. Se agitó y filtró con el objeto de eliminar las burbujas y obtener un gel de óptimas condiciones. La polimerización se inició con el agregado de 40 µl de AMPS 10 % (p/v). Para el llenado de los tubos se procedió primeramente a marcar una altura de 12 cm y luego sellar con Parafilm® lo que sería el extremo inferior. Luego con una jeringa y una aguja espinal se comenzó a llenar lentamente los capilares hasta el nivel de la marca y finalmente se agregó cuidadosamente agua destilada sobre la

superficie. Se los dejó polimerizar aproximadamente 1 hora.

Solución stock para IEF:

Urea	9,5 M
Nonidet P-40	2 % v/v
stock de Acrilamida *	4,1 % (v/v)

*Solución stock de acrilamida:

Acrilamida	30,8 g
N-N'-Metilen-bis-	2,6 g
Acrilamida	
H ₂ O c.s.p.	100 ml

b) Siembra de la muestra y corrida del IEF.

Una vez que los geles en los tubos polimerizaron se colocaron en la cuba con los accesorios correspondientes. Se les adicionó en la parte superior 25 µl de buffer de protección.

Buffer de protección:

Urea	8 M
anfolitos rango 5-7	0,8 ml
anfolitos rango 3-10	0,2 ml
H ₂ O c.s.p.	100 ml

Almacenar a -20°C.

Se prepararon soluciones frescas del buffer del cátodo (100 mM de Na OH) y del buffer del ánodo (100 mM de ácido fosfórico). Cada muestra se sembró en la parte superior del capilar y por debajo del buffer de protección utilizando una jeringa Hamilton®.

El plan de corrida puesto a punto para llegar a las condiciones de equilibrio fue: 15 min 200 V, 30 min 300 V, 30 min 400, V 15 hs a 600 V y finalmente la última

hora a 800 V. La temperatura fue controlada a 20°C. No se realizó preenfocado.

c) Preparación de la segunda dimensión.

La metodología y soluciones fueron las mismas que para un gel desnaturalizante SDS-PAGE. El gel separador fue de 12 % de acrilamida y el concentrador de 3 %. Luego de agregar la solución del gel concentrador, en el lado izquierdo se realizó una calle para sembrar el marcador de pesos moleculares. Para el sistema Hoefer utilizado se requieren 4 horas de corrida a 40 mA si se corren dos geles simultáneamente.

d) Equilibrio de los capilares y siembra de la segunda dimensión.

Una vez finalizada la corrida del IEF se retiraron los capilares con la ayuda de una aguja espinal realizando una suave presión con el objeto de no producir ninguna rajadura. Se los colocó durante 30 minutos a temperatura ambiente en solución de equilibrio, para luego ser colocados en la parte superior del gel de la segunda dimensión. Para evitar cualquier movimiento todo fue sellado con agarosa 0,5 %.

Solución de equilibrio:

Tris pH 6,8	0,125 M
SDS	2 % (p/v)
Glicerol	10 %
β-Mercaptoetanol	0,5 % (v/v)

e) Visualización de los resultados.

Los geles fueron fijados 30 minutos en solución fijadora, teñidos, decolorados y secados sobre un papel Whatman® 3MM. En el caso de los geles con proteínas marcadas radioactivamente, los mismos fueron expuestos durante 3 días con películas X-OMAT® de Kodak.

Tincón azul de Coomassie Blue:

Comassie Blue R 250	0,5 % (p/v)
Acido acético	10 % (v/v)
etanol	50 % (v/v)

Solución decolorante:

Acido acético	10 % (v/v)
Etanol	30 % (v/v)

Solución fijadora:Acido acético 10 % (v/v).

II.6.3.-Preparación de las tiras de calibración.

Básicamente se siguió el método descrito por Garrels [66] con algunas modificaciones. La tira de calibración es una tira de poliacrilamida de 5 mm de ancho y 12 cm de largo con 12 segmentos diferentes, cada uno de los cuales contiene proteínas radioactivas de una actividad específica conocida. La radioactividad de cada segmento es dos veces como máximo la del segmento anterior y el rango es de $0,1 \text{ cpm/mm}^2$ a 300 cpm/mm^2 . La concentración de acrilamida fue la misma que la de los geles a ser calibrados. Las tiras se prepararon polimerizando 12 capas diferentes con cantidades conocidas de proteína radioactiva, comenzando por la menos concentrada. Entre cada una fue necesario agregar isobutanol saturado en agua para favorecer una buena polimerización. El alcohol y la acrilamida no polimerizada fueron cuidadosamente removidos para dar lugar a la segunda ronda de polimerización y así sucesivamente. Cuando se terminó con la última capa, el gel se secó y se cortaron varias tiras en dirección vertical. Finalmente, las tiras fueron expuestas y las películas se registraron en una computadora para su análisis de calidad.

II.6.4.-Medida del PM y del gradiente de pH en los geles 2-D.

Un gel de IEF, libre de proteínas, se cortó en secciones de 1 cm y cada una de ellas fueron colocadas en viales conteniendo 2 ml de agua bidestilada. Estos viales fueron mantenidos a temperatura ambiente con suave agitación durante 2 hs como máximo. El pH se midió en un pH metro.

Para la medida de PM de las proteínas, se realizaron geles monodimensionales SDS-PAGE y de tricina en los cuales se sembraron marcadores comerciales.

II.6.5.-Electroforesis monodimensional de geles de tricina.

Para realizar los geles de tricina se siguió la técnica del procedimiento discontinuo de Schägger and Von Jagow [67]. Se utilizó el equipo del sistema Hoefer SE 600. Se corrieron simultáneamente dos geles a 90 V constantes que corresponden a 45 mA durante 15 horas.

Metodología.

Se arman los vidrios y lentamente se comienza a agregar la solución de separación. Lentamente, sin hacer burbujas ni turbulencia y antes de que comience a gelificar se agrega la solución espaciadora. En este momento es muy importante agregar agua destilada hasta el borde superior de los vidrios con el fin que quede una interfase gelificada perfectamente recta. Se lo deja gelificar durante 4 horas aproximadamente. Luego se vuelca el agua y escurre muy bien antes de agregar la solución de detenimiento. En este momento se agrega el peine o se lo deja gelificar sin él, según las necesidades. Se agrega isobutanol saturado en agua y se deja equilibrar durante toda la noche a 4°C. En el caso de tener que sembrar diferentes muestras, las mismas se prepararon a una concentración aproximada de 1 mg/ml en buffer de muestra y se las trató durante 5 min a 80°C.

Solución para 4 geles (12 x 15 x 0,1 cm):

Gel	Detenedor	Espaciador	Separador
stock de Acrilamida	1 ml	4,5 ml	30 ml
*			
Buffer del gel	3,1 ml	7,5 ml	30 ml
Glicerol 50% (v/v)			19 ml
H ₂ O	8,4 ml	10,5 ml	11 ml
AMPS 10% (p/v)	100 µl	75 µl	300 µl
TEMED	10 µl	7,5µl	30 µl
para cada uno	2 ml	4 ml	20 ml

* Stock de Acrilamida:

Acrilamida	48 g
N,N'-Metilen-bis	1,5 g
Acrilamida	
H ₂ O c.s.p.	100 ml

Buffer del gel:

Tris base	36,34 g
SDS	0,3 g
H ₂ O c.s.p.	100 ml

El pH final es 8,45.

Buffer para las muestras:

SDS 20 % (p/v)	4 ml
Glicerol	2,4 ml
2-β mercaptoetanol	0,4 ml
Brilliant Blue G	2 ml
Tris-Cl, 1 M pH 6,8	1 ml

H ₂ O c.s.p.	20 ml
Buffer anódico (5 X):	
Tris base	121,1 g
H ₂ O c.s.p.	5 l

El pH final es 8,9.

Buffer catódico (5 X):	
Tris base	12,11 g
Tricina	17,92 g
SDS	1 g
H ₂ O c.s.p.	1 l

El pH debe ser aproximadamente 8,2.

II.6.6.-Gel 2-D para la purificación de proteínas en extractos con SDS.

Básicamente se realizó el mismo protocolo que el descrito anteriormente para los estudios de estrés por frío. La única diferencia es que se cambió el detergente CHAPS por Nonidet P-40 a fin de eliminar el SDS y poder obtener el mismo patrón.

II.7.-Electroelución de proteínas.

Se realizó un gel preparativo monodimensional de tricina para separar las proteínas entre 8 y 10 kD de un extracto crudo de *S. coelicolor*. Luego de 16 horas de corrida a 90 mA constantes se tiñó el gel con tinción de Coomassie, se decoloró y se procedió a cortar la banda deseada. Con un bisturí se trituro el pedazo de gel en pequeños trocitos lo que facilitó enormemente el poder colocarlos dentro del concentrador de corte 10 (Centricom-10™, Amicon). La electroelución se desarrolló durante 10 horas entre 200 a 300 V constantes. Se trabajó con el mismo buffer de una electroforesis SDS-PAGE. El equipo electroeluidor usado fue Centrilitor™, Amicon.

Una vez finalizada la electroelución se retiró el concentrador y se procedió a centrifugar a 5.000 rpm (Biofuge 15 R, Heraeus AG) y a 4°C, con el fin de concentrar el

extracto al volumen deseado.

II.8.-Transferencia y secuencia aminoterminal.

Los geles bidimensionales fueron transferidos directamente a membranas de PVDF (Immobilon-P Transfer, Millipore), según la técnica descrita por Matsudaira [68]. Los equipos usados fueron Mini-Blotter (Sigma.,U.S.A.) y Transphor II® Electrophoresis Unit TE 62 (Hoefer Pharmacia Biotech Inc. U.S.A.)

Para las proteínas de entre 8-10 kDa se transfirió durante 45 min a 400 mA y 4°C; para las proteínas de los estudios de fase estacionaria, la transferencia se realizó durante 12 hs a 90 mA y 4°C. Las secuencias fueron realizadas por Jorge Ghiso en el laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad de New York, en un equipo Protein Sequencer A473a, Applied Biosystems.

II.9.-Espectrometría de masa de proteínas.

La espectrometría de masa se realizó en el laboratorio de la División Gene Technology de la empresa Hoffmann-La Roche, Basilea, (Suiza). Se utilizó el sistema MALDI-MS que genera iones moleculares con una mínima fragmentación de los péptidos [69].

Las proteínas ácidas entre 8 y 10 kDa fueron resueltas en un gel 2-D cuya segunda dimensión fue un gel de tricina. El gel se tiñó directamente con Coomassie y luego destiñó con las soluciones descritas en la sección II.6.2., con la salvedad que se utilizó metanol en lugar de etanol. Los geles fueron registrados debidamente con un scanner con el objeto de asignar números a cada proteína y así poder identificar su posición luego del análisis. Las zonas del gel conteniendo las proteínas, se cortaron con un bisturí y cada trocito se colocó en un Eppendorf diferente conteniendo agua destilada. Los tubos se agitaron suavemente durante 2 hs. La digestión se realizó directamente con el agregado de 0,5 µg de endoproteinasa Lys-C (Boehringer Mannheim) con el fin de obtener péptidos internos y poder ser inyectados directamente al espectrómetro Finnigan Mat TS Q 7000, Mass Spectrometry Company, U.S.A.

1.10.-Construcción de la base de datos y análisis computarizado.**Hardware.**

Las autoradiografías de los geles 2-D fueron registradas con un scanner (Molecular Dynamics Model 300 Series Computing Densitometer and Image Quant, Molecular Dynamics), y un programa de adquisición de imágenes de 74 μm /pixel de resolución, y conectado a una computadora Sun-Sparc 1.

Software.

Las imágenes se convirtieron a 8 bits/pixel y se importaron a un programa PDQuest™ (PDI Inc.Huntington Station, NY, USA).

Metodología para el análisis.

1) Adquisición de datos: Se realizó a través de un barrido con el scanner. Las imágenes del gel y de la tira de calibración dieron digitalizadas en una escala de grises correspondiente a distintos valores de radioactividad. Todo fue almacenado en un archivo en el disco rígido.

2) Extracción del fondo: En este paso se eliminó el fondo del original.

3) Localización de las proteínas: Cada imagen de ellas fue especificada y registrada mediante procedimientos matemáticos.

4) Integración de las manchas (proteínas): en este paso se obtuvo detallada información de la intensidad como así también de las manchas superpuestas y de las difusas.

5) Comparación de imágenes: Se realizó la superposición de los diferentes geles o se los comparó con un patrón.

II.11.-Ensayo de actividad de la superóxido dismutasa.

Los extractos celulares se sometieron a electroforesis monodimensional en condiciones nativas. Los geles separador y detenedor de poliacrilamida se prepararon al

9 % y 3 % respectivamente. La corrida se realizó a 15 mA, en cámara fría y en un equipo Hoefer SE 600. Las soluciones y buffer fueron las mismas que para un SDS-PAGE pero sin SDS.

La actividad de la SOD se realizó de acuerdo al método modificado por Steinman [70]. Una vez finalizada la corrida, el gel se dejó 20 min en oscuridad en un volumen de solución A, luego se lo introdujo durante 15 min en oscuridad en un volumen de solución B y finalmente, para la visualización de la actividad enzimática, se colocó el gel a 5 cm de un fluorescente. La actividad SOD se apreció como bandas claras contra un fondo violeta.

Solución A:

NBT	0,02 g
PBS	10 ml

Solución B:

Riboflavina	0,5 mg
EDTA	0,15 g
PBS	50 ml

II.12.-Manipulación de ADN *in vitro*.

II.12.1.-Extracción de ADN cromosómico de *Streptomyces* y *Nocardia*.

Las extracciones se hicieron a partir de 40 ml de cultivo en medio YEME en fase exponencial. Las células se cosecharon centrifugando 10 minutos a 5.000 rpm en rotor Sorvall SS34. El micelio se resuspendió en 10 ml de buffer TES. Luego se agregó 0,2 ml de lisozima 30 mg/ml y 0,2 ml de RNasa 5 mg/ml, se incubó a 37°C durante 30 minutos. Luego se agregó 0,5 ml de SDS 20 % (p/v) y se desproteinizó con tres extracciones sucesivas con fenol saturado en TE, fenol-cloroformo y cloroformo. A la fase acuosa se le adicionó 3 volúmenes de etanol absoluto frío. El ADN precipitado se extrajo con varilla de vidrio y enjuagó con etanol 70 %, se secó aire y se resuspendió en

agua estéril.

Buffer TES:

Tris	25 mM
EDTA	25 mM
Sacarosa	10,3 % (p/v)

II.12.2.-Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*.

Para extraer ADN de *E. coli* se realizaron preparaciones en pequeña escala según las indicaciones del manual técnico de Wizard™ Minipreps DNA Purification System, Promega o de RPM™ Rapid Pure Minipreps, Bio 101.

II.12.3.-Digestión con enzimas de restricción y tratamiento con fosfatasa alcalina.

Las condiciones generales empleadas para los cortes con enzimas de restricción y la desfosforilación de los extremos 5' fosfato con la enzima fosfatasa alcalina, fueron las indicadas por Sambrook y col. [62] y según las indicaciones de los manuales de los laboratorios comerciales proveedores.

II.12.4.-Ligado de moléculas de ADN.

Previo al ligado de las moléculas de ADN, las enzimas de restricción utilizadas fueron inactivadas calentando la muestra a 65°C 10 minutos o bien, en caso de ser termorresistentes, fueron extraídas con un volumen de fenol- cloroformo y luego un volumen de cloroformo. El ADN fue luego precipitado con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío en presencia de AcNa 0,3 M Se trabajó con el Rapid DNA Ligation Kit (Boehringer Mannheim).

II.12.5.-Aislamiento y purificación de fragmentos de ADN.

Para aislar fragmentos de ADN para su posterior clonado o para utilizarlos como sondas en ensayos de hibridización, las muestras de ADN digeridas con enzimas de restricción se sometieron a corrimiento electroforético en geles de agarosa de bajo punto

de fusión. La zona del gel conteniendo el fragmento de interés se recortó y se fundió la agarosa a 70°C con el agregado de un volumen de agua. Luego se purificó el ADN contenido en la agarosa mediante tres extracciones sucesivas con fenol, fenol-cloroformo, y cloroformo. Posteriormente a la fase acuosa se le agregó 2,5 volúmenes de etanol frío y AcK 0,3 M y se dejó precipitando 1 hora a -20°C. Por último, se centrifugó y el ADN se resuspendió en agua estéril.

II.13.-Construcción de una mini biblioteca de ADN.

50 µg de ADN cromosomal digeridos durante 10 horas con la enzima *Sph* I se corrieron en agarosa 0,8 % 1 hora a 20 mA y 11 hs a 10 mA. Se cortaron tres fragmentos: uno correspondiente al tamaño deseado, otro por encima y otro por debajo de dicho tamaño. Los trocitos de agarosa se colocaron en tubos de centrifuga de 2 ml a -70°C durante 15 minutos. Se los retiró del freezer y centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos para permitir que la agarosa exudara el buffer con los fragmentos de ADN. El sobrenadante se extrajo con un volumen de fenol y uno de fenol-cloroformo. El ADN se preccipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto con AcNa 0,3 M. Finalmente, se resuspendió el ADN en 10 µl de agua estéril.

II.14.-Preparación de células competenes de *E.coli* y electrotransformación.

Previo a la transformación , las mezclas de ligado se dializaron durante media hora sobre membranas de 0,025 µm (Millipore). Las células de *E.coli* competentes y las condiciones de electrotransformación se realizaron según recomendaciones del manual comercial del Gen Pulser™ de Bio-Rad. Se tomó del freezer un tubo de células competentes a los cuales se les adicionó menos de 10 ng de plásmido. Después de que las células fueron transformadas se les agregó 1 ml de LB e incubaron 1 hora a 37°C. Luego fueron plaqueadas en cajas de LB con el antibiótico apropiado, IPTG y Xgal. Se incubaron 37°C durante 20 horas.

II.15.-Electroforesis de ácidos nucleicos.

II.15.1.-Geles de agarosa.

Los geles de agarosa fueron preparados según las indicaciones de Sambrook y col. [62].

Las concentraciones de agarosa usadas variaron entre 0,7 y 1% de acuerdo a las necesidades. Las corridas electroforéticas se realizaron entre 20 y 90- mA en buffer TBE. Los geles fueron teñidos con solución de Bromuro de Etidio (1µg/ml) y observados bajo luz UV de onda corta o larga. Las muestras de ADN se sembraron utilizando buffer de siembra en una proporción 5:1(muestra de ADN: bufer). Como marcadores de PM se utilizaron ADN del fago λ digerido con *Hind*III, *Eco*RI y *Pst*I (Biolabs) o la escalera de ADN de 1 kpb (B.R.L.).

Buffer TBE (10 X):

Tris base	108 g
Acido bórico	55 g
EDTA 0,5 M pH=8	40 ml
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

Ajustar pH a 8,3.

II.15.2.-Geles de agarosa de bajo punto de fusión.

Los geles de agarosa (1,5 %) de bajo punto de fusión se utilizaron para el aislamiento y purificación de bandas de ADN para su posterior clonado o para marcación de sondas radioactivas. Las soluciones y condiciones empleadas durante las corridas electroforéticas, fueron las mismas a las utilizadas para los geles convencionales de agarosa, con la sola diferencia de que los geles se manipularon en frío (5°-10°C).

II.16.-Secuenciación de ADN.

II.16.1.-Construcción de subclones.

La estrategia desarrollada para la secuenciación del fragmento clonado de $\cong 4,5$ kpb, consistió en la construcción de una serie de subclones a partir del plásmido pP1. Para ello se trabajó únicamente con las enzimas del sitio de múltiple clonado del pUC19.

II.16.2.-Secuenciación de los subclones.

Las reacciones de secuencia se llevaron a cabo utilizando el reactivo Dye Terminator Cycle sequencing y la enzima AmpliTaq® DNA Polymerase FS (Applied Biosystems). Como molde se utilizó ADN doble cadena y las reacciones de secuencias se iniciaron a partir de oligonucleótidos con las secuencias del cebador universal y reverso del pUC19. Los productos obtenidos de la reacción fueron resueltos en geles de poliacrilamida que fueron corridos en un aparato ABI PrisM™ 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) acoplado a una Power Macintosh 7300/200 con los programas apropiados. El protocolo seguido, las condiciones de preparación de los geles y la electroforesis, fueron las recomendadas en el manual comercial del proveedor.

II.16.3.-Análisis de las secuencias.

En el manejo de las secuencias de ADN y de las proteínas se utilizaron los siguientes programas: EditSeq, MapDraw, Protean, MegaLign, SeqMan, todos estos pertenecientes al DNASTAR para Windows. Además, se usaron los programas GENEPRO (versión 4.20, Riverside Scientific) y OLIGO (versión 4.1).

II.17.-Reacción en cadena de la polimerasa.

La amplificación por PCR se realizó en un equipo Perkin Elmer Thermocycler a partir de 10 ng de ADN y en un volumen final de 100 μ l que contenía: 100 pmol de oligonucleótido, 0,2 mM de dNTPs, 1 mM de $MgCl_2$, buffer de reacción 1 X y 5

unidades de la enzima TAQ Polymerase™ (Boehringer Mannheim). El programa aplicado consistió en un primer ciclo de desnaturalización de 5 min a 94°C. Luego se amplificó durante 25 ciclos de la siguiente manera: 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C. Finalmente, un único ciclo de 10 min a 72°C.

II.18.-Detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos por hibridización.

II.18.1.-Preparación y marcado de sondas radioactivas.

Los fragmentos de ADN utilizados para la preparación de las sondas radioactivas se purificaron de agarosa de bajo punto de fusión y luego fueron marcados con [α -³²P]dATP (>111 Tbq/mmol, NEN® Research Products, Du Pont) por el método de iniciación al azar descrito por Feinberg y col [71], utilizando el Random Primed DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim). Después de detener la reacción, los productos marcados no se purificaron. La sonda fue desnaturalizada por tratamiento a 100°C durante 5 min y rápidamente enfriada.

II.18.2.-Transferencia de ADN a filtros de nylon (Southern Blot).

La transferencia de ADN a membranas de nylon Hybond™-N+ (Hybond Membranes, Amersham International plc, Amersham UK.), se realizó como se describe a continuación. Las muestras de ADN, tratadas con las enzimas de restricción descritas en las leyendas de las figuras, fueron resueltas mediante electroforesis de geles de agarosa al 1 %. El gel fue posteriormente tratado 10 min con 0,25 M ClH para producir la hidrólisis parcial del ADN y luego sumergido en una solución alcalina de 0,4 M NaOH para neutralizar. Así tratado, fue transferido a la membrana de nylon mediante capilaridad durante 10 hs, utilizándose como solución de transferencia 0,4 M Na OH.

II.18.3.-Selección de clones recombinantes por hibridización en colonias.

Se hicieron réplicas de los clones en placas de Petri conteniendo medio LB sólido suplementado con Amp 100µg/ml y se cultivaron durante 24 hs a 37°C. Una vez crecidas las colonias se depositó sobre ellas la membrana de nylon y luego fue tratada

como se describe en el manual comercial de Hybond™-N+(Amersham, U.K.).

II.18.4.-Hibridización.

Las membranas de nylon fueron incubadas con solución de hibridización durante 1 hora a 60°C o 65°C en un horno Hybaid™ y previamente horneadas durante 2 horas en un equipo Salvis™. En esta misma solución se agregó la sonda marcada con [α - 32 P]dATP y se continuó durante 14-16 horas a la misma temperatura. Las membranas se lavaron secuencialmente durante 15 min con cada una de las distintas soluciones que se detallan más abajo. Sin dejar que se sequen, se las colocó en bolsas plásticas y se expusieron con placas de alta sensibilidad (Curix RP1 PLUS, AGFA) a -70°C y con placas intensificadoras. El revelado se realizó con un equipo automático (Fuji X-ray RGII®, FUJI).

Solución de hibridización:

20X SSC	6,25 ml
100X solución Denhardt's	1,25 ml
10 % SDS (p/v)	1,25 ml
H ₂ O c.s.p.	25 ml

Solución Denhardt's (100 X)

	2 % (p/v)
Ficoll™	2 % (p/v)
PVP	2 % (p/v)

Soluciones de lavado de las membranas después de hibridizar:

- 1) 2X SSC
- 2) 2X SSC; 0,1 % SDS
- 3) 1X SSC; 0,1 % SDS
- 4) 0,5X SSC; 0,1 % SDS.

III-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1- CAPÍTULO 1

III.1.- Capítulo 1: Estudio de la respuesta al estrés por frío en *Streptomyces coelicolor* J1501.

III.1.1.- Introducción

Las bacterias, en general, responden a los estrés físicos y químicos y al hambreado con ajustes en su síntesis proteica tanto en forma cuali como cuantitativa. Estas proteínas han sido divididas en dos grandes grupos: a) proteínas de estrés general (GSPs) y b) proteínas específicas de un tipo de estrés (SSPs) [54]. Las GSPs son un grupo de proteínas no específicas que se inducen como respuesta a diversos estrés tales como anoxia, etanol, metales pesados, etc. A pesar de que se desconoce la función adaptativa de estas proteínas, se cree que las mismas proveen a la célula de un mecanismo de protección general y no específico. Esto les permitiría a los microorganismos adaptarse a diversas condiciones límites de crecimiento en el medio ambiente que los contiene. Las SSPs, en cambio, son un grupo de proteínas específicas, cuya síntesis puede ser inducida por las mismas señales extracelulares que inducen a las GSPs pero que, a diferencia de estas últimas, confieren protección contra un estrés en particular. En *E. coli*, por ejemplo, como respuesta al estrés por calor se inducen una gran cantidad de proteínas (HSPs) [72]. Un grupo de estas proteínas, también son sintetizadas cuando las células son expuestas al peróxido de hidrógeno [73], etanol [73], radiación ultravioleta [74] o limitación de aminoácidos [75].

La disminución de la temperatura también induce una respuesta específica en bacterias. Los efectos que produce esta respuesta en el crecimiento y en la síntesis proteica han sido estudiados en *E. coli* [76]. Se sabe que un estrés hipotérmico, producido al transferir los cultivos de este microorganismo de 37°C a 10°C, frena el crecimiento durante 4 a 5 y horas y produce concomitantemente una drástica reducción de la síntesis proteica. Sin embargo, la síntesis de 14 proteínas aumenta significativamente [76]. Algunas han sido identificadas y se sabe que están involucradas en procesos celulares tales como la transcripción (NusA), traducción (factor 2 de iniciación), degradación del ARNm (polinucleótido fosforilasa), condensación del cromosoma (H-NS), etc. [77]. La respuesta al estrés por frío también está caracterizada

por la represión de proteínas de estrés al calor, un aumento de la síntesis de proteínas ribosomales [78] [79] y la disminución de los niveles de (p)ppGpp [77]. Las condiciones que causan un aumento en la cantidad de (p)ppGpp antes del estrés hipotérmico dan como resultado una menor inducción de la respuesta a la baja temperatura; en cambio, una cepa que contiene niveles no detectables de (p)ppGpp mostró una mayor inducción [80]. Estos resultados demostraron que la disminución del contenido de (p)ppGpp cumple un rol fisiológico en la adaptación a las bajas temperaturas [80].

A pesar de que el estudio de la respuesta al estrés por frío es relativamente reciente si se lo compara con otros estrés, hoy se dispone de cierta información con respecto a las proteínas involucradas en esta respuesta. Algunos autores, en un intento de clasificación de esas proteínas, definen como CAPs (por cold acclimatization proteins) a aquellas que se sintetizan en alto nivel a bajas temperaturas durante períodos prolongados y como CSPs (por cold shock proteins) a aquellas que se inducen transitoriamente a una alta velocidad, inmediatamente después de la disminución de la temperatura [81]. No obstante, estas dos clases de proteínas pueden superponerse [82]. Hasta el momento no se dispone de mucha información sobre las CAPs, es por ello que en general se habla de las CSPs.

La inducción de CSPs ha sido observada en numerosos organismos tales como: bacterias termófilas [83], mesófilas [76] y psicrófilas [84], levaduras [85], plantas [86] y animales [87]. Esto indica que la reacción al estrés por frío estaría presente en todos los organismos vivos. *Pseudomonas fragi* [84], *Listeria monocytogenes* [88] y *Arthrobacter globiformis* SI55 [82], al igual que *E. coli*, experimentan una fase lag de crecimiento luego de que los cultivos son transferidos a bajas temperaturas. Esto significa que cuando las células sufren un estrés hipotérmico, las mismas entran en un estado caracterizado por: a) inducir un grupo de proteínas que se sintetizan a un nivel muy bajo a la temperatura óptima de crecimiento, b) reprimir la velocidad basal de síntesis de las HSPs y c) continuar la síntesis de muchas proteínas que intervienen en los mecanismos de traducción y transcripción y que normalmente están reprimidos en los

estados de no crecimiento [80]. Por el contrario, *Vibrio vulnificus* [89], *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* [90] y *Bacillus subtilis* [91], no experimentan fase lag de crecimiento. En este último ejemplo, después de un cambio de 37°C a 15°C, la síntesis de la mayoría de las proteínas se reprime y continúa su crecimiento a una velocidad intermedia, seguida por un crecimiento a una velocidad característica de la nueva temperatura de crecimiento. Las células responden al estrés con una sobreexpresión de 37 proteínas CSPs [91]. Inmediatamente después del estrés por frío se suprime la síntesis de la mayoría de las proteínas GSPs y de las HSPs lo que demuestra que estas dos respuestas, al frío y al calor, son antagonistas en *B. subtilis* [91]. Esto es análogo a lo que ocurre en *E. coli* donde la respuesta a estos estrés son mutuamente excluyentes [92] [77].

Lo más característico de la respuesta al estrés por frío en *E. coli*, es el alto nivel de inducción de una proteína de 70 aminoácidos ($\cong 7,5$ kDa), denominada CspA, que pertenece al grupo de la principal familia de CSPs. Esta proteína no se detecta en el crecimiento a 37°C y es la primera que se induce inmediatamente después del estrés al frío; su producción alcanza el 13% del total de la síntesis proteica [93] [94]. Además, en *E. coli* se han identificado 8 genes homólogos (*cspB-cspI*) a *cspA*, de los cuales *cspA*, *cspB* y *cspG* son inducidos transcripcionalmente como respuesta a una disminución de la temperatura [94] [95]. De las demás proteínas se sabe que CspD se induce por estrés nutricional, CspC y CspE intervienen en la condensación del cromosoma y de CspF, CspH y CspI aún no se conocen sus funciones [96]. También se han encontrado familias de proteínas similares a la de la CspA en *Bacillus cereus* [97], *Pseudomonas fragi* [84] y *Bacillus subtilis* [91]. En este último caso, la familia está compuesta por tres proteínas homólogas con una identidad mayor al 70 %: CspB (homóloga a CspA de *E. coli*), CspC y CspD, siendo todas inducidas en respuesta al estrés hipotérmico pero a su vez esenciales para el crecimiento a la temperatura óptima y para la supervivencia en la fase estacionaria [98]. Es importante resaltar que todas las proteínas que pertenecen a estas familias comparten las característica de ser pequeñas (7-8 kDa) y ácidas.

Otras proteínas homólogas a CspA, que comparten secuencias muy conservadas

(identidades mayores a 45 %), también han sido encontradas en diversas bacterias tales como *Arthrobacter globiformis* [82], *Listeria monocytogenes* [99], *Salmonella typhimurium* [100], *Streptomyces clavuligerus* [101] y otras bacterias gram positivas y gram negativas.

Función de las proteínas de estrés al frío (CSPs).

En general, las CSPs son fuertemente inducidas por el estrés hipotérmico. A diferencia de lo que ocurre con las proteínas de estrés al calor, las proteínas de estrés al frío están involucradas en varios procesos celulares tales como la recombinación de ADN, la transcripción y la traducción, lo que hace pensar que la función principal de estas proteínas es la adaptación de las células a las bajas temperaturas.

En *B. subtilis* la delección de *cspB* afecta el nivel de inducción de al menos 15 CSPs [91]. Esto sugiere que CspB tiene una función regulatoria después del estrés al frío. Sin embargo, el crecimiento de esta mutante no se vió alterado a 15°C comparado con la cepa salvaje; en cambio, sí es marcadamente sensible al congelamiento-descongelamiento, demostrando su participación en la resistencia de las células a las bajas temperaturas [91]. Las disrupciones de *cspC* o de *cspD* dieron mutantes no diferenciables fenotípicamente con la cepa salvaje. Sin embargo, la doble mutante *cspCD* mostró un crecimiento reducido a 15°C. Además, la doble mutante *cspBC* mostró una tendencia marcada a la lisis celular durante la fase estacionaria y una reducción del crecimiento a 15° y 37°C mucho más acentuado que la doble mutante *cspBD*. La triple mutante *cspBCD* pudo ser generada únicamente en la presencia de un gen *cspB* en *trans*, lo que indica que al menos es necesario una de estas tres CSPs para la viabilidad de *B. subtilis*. [98]. Estudios realizados en geles bidimensionales de proteínas evidenciaron que, en mutantes simples o dobles los niveles de las restantes CSPs son más altos que en la cepa salvaje a 37°C y después del estrés hipotérmico, indicando que hay un reconocimiento de la pérdida de uno o más de estas proteínas específicas y una compensación de las mismas con el incremento de los niveles de las demás CSPs. [98].

La delección del gen *cspA* de *E. coli*, en cambio, no mostró ningún defecto ya sea a 37 o a 15°C. Sin embargo, la producción de sus proteínas homólogas CspB y CspG aumentaron y la duración de sus expresiones se prolongaron, sugiriendo que ambas compensan la carencia de CspA [102]. Recientemente se ha demostrado que la CspA actúa como una chaperona de ARN al bloquear la formación de estructuras secundarias en diversos ARN mensajeros y en el propio [103]. Además, CspA es un activador de la transcripción de *hns* y *gyrA* por lo que se ha sugerido que es un activador general del regulón de estrés al frío [104].

En *E. coli* existe otra proteína de estrés al frío, CsdA, que es casi exclusivamente producida cuando las células son sometidas a un estrés hipotérmico de 37 a 15°C. CsdA pesa 70 kDa y es la proteína principal asociada a los ribosomas a bajas temperaturas. Se ha probado que CsdA tiene una actividad desestabilizadora de hélices, proponiéndose que su rol fundamental es a nivel de la traducción actuando junto a CspA [92]. A bajas temperaturas *E. coli* experimenta una represión a nivel transcripcional de las proteínas de estrés al calor seguida de una desrepresión de las mismas [80]. En las mutantes *csdA* este efecto no se observa, indicando que CsdA está involucrada en la respuesta al estrés por calor seguido de un estrés hipotérmico.

RbfA de *E. coli*, una proteína de unión a la subunidad 30S ribosomal, es una proteína de estrés al frío. La misma se requiere para el crecimiento óptimo a bajas temperaturas y está involucrada en la iniciación de la traducción [105]. Esto indica que, a bajas temperaturas, las CSPs tendrían un rol fundamental en la iniciación de la traducción.

La mayoría de las proteínas CSPs son muy similares (identidad mayor al 40%) al extremo amino-terminal del dominio de unión a ácidos nucleicos de las proteínas Y-box de eucariotas. A este dominio, que es evolutivamente el más conservado entre las proteínas de unión a ADN y ARN, se lo llama dominio de estrés al frío (CSD, cold shock domain). Las proteínas Y-box fueron en un principio identificadas como factores que se unen con mucha afinidad a la secuencia Y-box (ATTGG) que está presente en muchos elementos reguladores de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad

[106]. El CSD conferiría funciones a nivel molecular tanto en la Y-box como en las CSPs. Teniendo en cuenta que se ha demostrado que dicho dominio interviene a nivel de la transcripción y de la traducción en muchos genes eucariotas [107] [106] y que las CSPs estudiadas funcionan también en las bacterias [77], podría especularse que todas las proteínas de estrés al frío, que posean este dominio, intervendrían en las funciones similares.

III.1.2.- Resultados-

III.1.2.1.- Respuesta de *Streptomyces coelicolor* J 1501 al estrés hipotérmico en los diferentes estadios de crecimiento y a diferentes temperaturas.

El diseño de este protocolo tuvo como objetivo determinar a qué temperatura, por debajo de la temperatura óptima de crecimiento, podían observarse los cambios más importantes a nivel de la expresión de proteínas. Se puso énfasis en analizar fundamentalmente las proteínas de bajo peso molecular, porque son las que comúnmente se inducen como respuesta al estrés por frío en la mayoría de los microorganismos estudiados [106]. Para ello se realizó un cultivo de *S. coelicolor* J1501 en medio MG a 30°C y a diferentes tiempos del crecimiento (18, 35 y 69 hs), alícuotas de 2 ml fueron transferidas a 30 (control), 8, 12 y 16°C e inmediatamente marcadas con 100 µCi de una mezcla de [³⁵S]-metionina/cisteína. A los controles (30°C) se les realizó solamente un marcado de 40 min, en cambio, para las otras temperaturas estudiadas se realizaron dos marcados: 1) desde el tiempo 0 de inducción hasta los 40 min y 2) desde 50 a 90 min después de haber realizado el cambio de temperatura. Las muestras, luego de marcadas, fueron lavadas y congeladas a -70°C hasta su posterior manipulación. Una vez finalizado el experimento se procesaron todas las muestras simultáneamente. Los extractos celulares de los controles como los de los puntos 1 y 2 de cada temperatura, fueron sometidos a electroforesis monodimensional en geles de tricina. Los geles fueron teñidos con Coomassie, secados y finalmente expuestos durante tres días. Los autoradiogramas se muestran en la Figura 6. En general, no se observaron grandes diferencias de expresión entre las muestras control y las inducidas que puedan juzgarse

en estos geles monodimensionales. Sin embargo, fue muy clara la inducción de una proteína de peso molecular aparente de 9 kDa en los perfiles proteicos de las muestras de 18 y 35 hs sometidas a las temperaturas de 8 y 12°C. Este efecto no fue tan dramático a 16°C. A las 69 hs de cultivo, en cambio, no se observó inducción de ninguna proteína de bajo peso molecular luego de transferir las alícuotas del cultivo a las diferentes temperaturas de estrés.

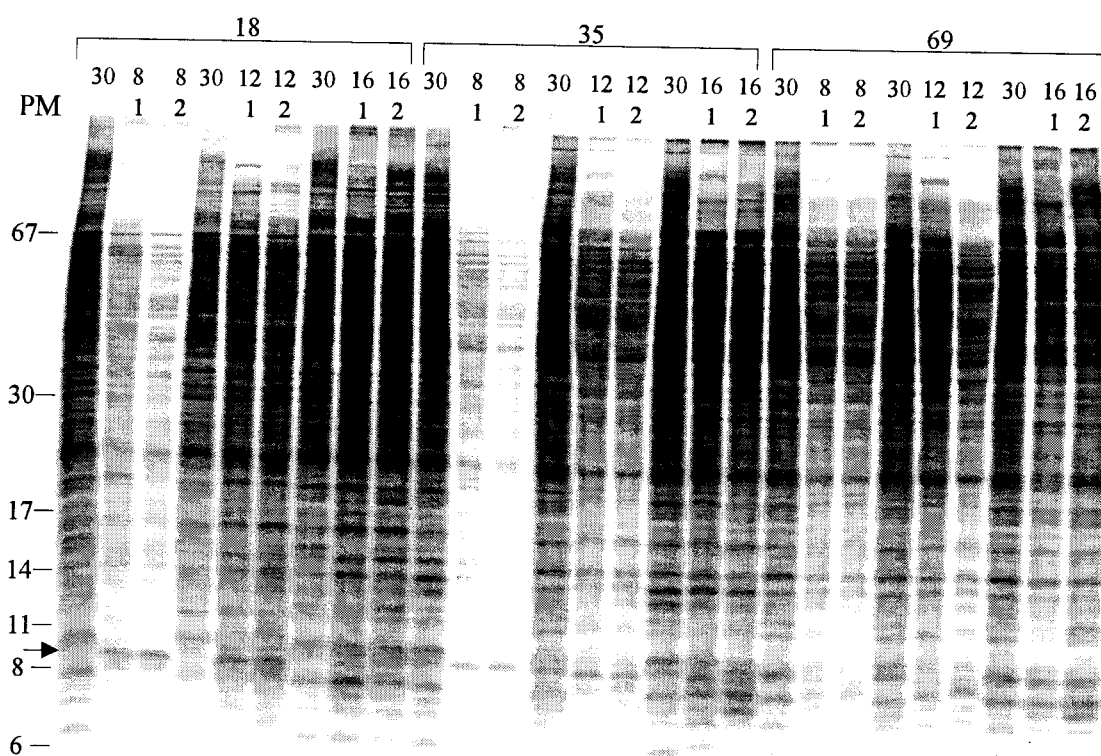


Figura 6: Perfiles proteicos de *S. coelicolor* J1501 crecidos en condiciones normales o sometidos a estrés hipotérmico. Alícuotas de un cultivo crecido durante 18, 35 y 69 hs en medio MG, fueron transferidas a 30, 8, 12 y 16°C como se indicó en el texto y se marcaron durante 40 min con [35 S]-metionina/cisteína. Aproximadamente 10^6 cpm de cada muestra se corrieron en un gel de tricina. PM, marcadores de peso molecular expresados en kDa. La flecha indica la proteína de 9 kDa inducida. 30, control a 30°C. 1 y 2, indican que los cultivos fueron marcados entre 0 a 40 min y entre 50 a 90 min respectivamente, luego del cambio de las alícuotas del cultivo a las temperaturas indicadas.

III.1.2.2.- Caracterización de proteínas que se inducen en diferentes estadios de crecimiento y por estrés hipotérmico utilizando geles bidimensionales.

Basados en los resultados obtenidos con los geles monodimensionales, las muestras inducidas a 12°C y los controles a 30°C de los distintos tiempos (18, 35 y 69 hs) fueron sometidas a electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida al 12,5%, con el objeto de realizar una primera inspección, y tratar de comparar la respuesta al estrés hipotérmico con los cambios que ocurren en el microorganismo en los diferentes estadios de crecimiento. Los geles bidimensionales, para los controles y para las muestras inducidas, se realizaron por triplicado. Para determinar el grado de inducción o represión de cada punto (proteína), se consideraron y promediaron las cpm de cada uno de ellos de la siguiente manera: aquellos puntos que aparecían solamente en un gel de los triplicados fueron excluidos para cualquier tipo de consideración; los otros fueron promediados dividiendo la suma total de las cpm por el número de apariciones en las repeticiones. En la Figura 7 se pueden ver los puntos que corresponden a todas las proteínas analizadas en geles bidimensionales a las 16, 35 y 69 hs. Luego, los perfiles de expresión de las proteínas inducidas o reprimidas más de dos veces con respecto a los controles a 30°C, se sometieron a un estudio estadístico (análisis de grupo) utilizando la base de datos construida por el Dr. J Vohradský y colaboradores [49] para la cepa de *S. coelicolor* J1501 crecida en medio líquido MG a 30°C (Figura 8). Dicha base sirvió como patrón para identificar las proteínas que se inducen o reprimen a 12°C y las proteínas expresadas por la bacteria en condiciones normales de crecimiento. Un total de 149 proteínas cambiaron significativamente su expresión, es decir que fueron inducidas o reprimidas más de dos veces con respecto al control de 30°C. Sin embargo, 88 de ellas fueron identificadas en la base de datos.

Inducidas:

inducidas más de dos veces	54
nuevas después del estrés	15
total de inducidas por el estrés	69
identificadas en la base de datos	35

Reprimidas:

reprimidas más de dos veces	53
desaparecen después del estrés	27
total reprimidas por el estrés	80
identificadas en la base de datos	53

La diferencia entre el número de proteínas totales inducidas (69) y las identificadas en la base de datos (35) se debe a que muchas de ellas (15) son posiblemente específicas del estrés estudiado (12°C) y por lo tanto no estaban registradas; otras, en cambio, estarían bajo el límite de detección o no fueron claramente reconocibles en la base. Consideraciones similares deben tenerse en cuenta para la diferencia observada entre las proteínas totales reprimidas y las identificadas. La imposibilidad de poder detectar el total de las proteínas inducidas y reprimidas nos llevó a plantear la necesidad de realizar una nueva base de datos más completa que abarcara todas las proteínas expresadas normalmente en el crecimiento a 30°C y aquellas que aumentan o reducen su expresión a 12°C (ver Capítulo 2).

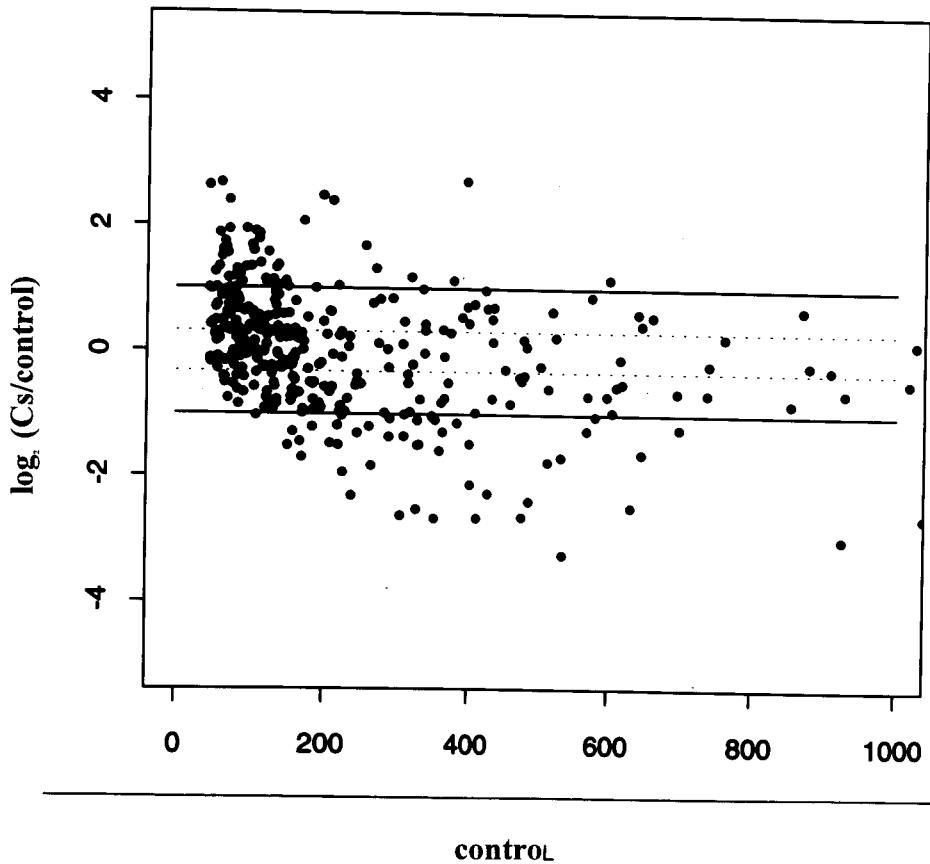


Figura 7: Relación inducción/represión entre controles y muestras inducidas. El eje horizontal representa promedios de densidades de las proteínas en los controles. El eje vertical representa promedios de densidades de muestras inducidas y control representadas como logaritmos de base 2. Las líneas horizontales continuas marcan el límite de inducción (superior) o represión (inferior) de 2 veces. La línea de puntos representa zonas de un 25 % de inducción o represión. La zona central entre líneas de puntos representa el error experimental.

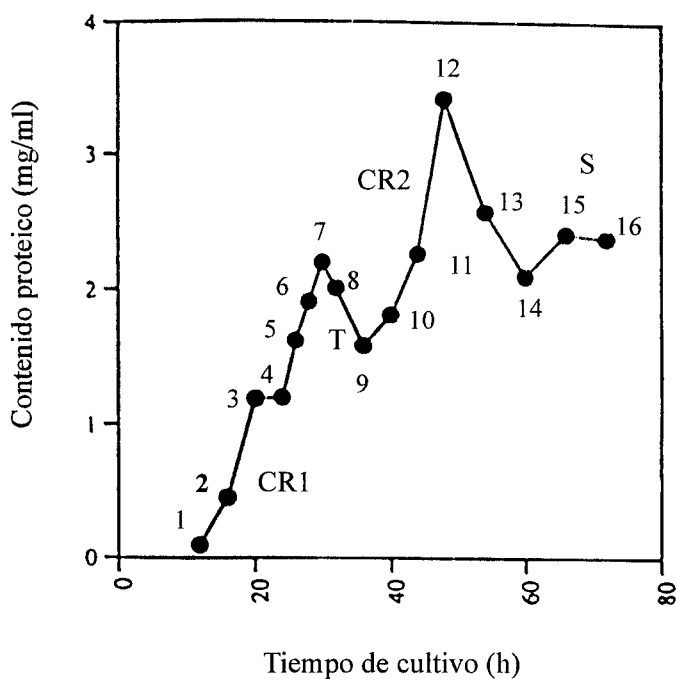


Figura 8: Curva de crecimiento de *S. coelicolor* J1501. Los números asignados corresponden al momento de la toma de las muestras procesadas para la realización de la base de datos realizada por J. Vohradský y colaboradores [49].

Análisis de grupo.

Para estudiar el perfil cinético a lo largo del desarrollo, de aquellas proteínas inducidas o reprimidas por el estrés por frío y que fueron previamente identificadas en la base de datos, se realizó el análisis de grupo (método UPGMA) [49]. El método se basa, fundamentalmente, en comparar las repeticiones de los geles de cada tiempo de la curva a 12°C con un “gel patrón” que fue construido con todas las proteínas encontradas en *Streptomyces* a lo largo del desarrollo [49]. A todas las proteínas se les asignó un número que se asocia con una única localización en el gel patrón. El número de cada proteína es idéntico en todos los geles. A fin de poder definir la cinética de expresión, de las proteínas inducidas o reprimidas a 12°C, se aplicaron fórmulas y criterios matemáticos que permitieron normalizar los geles de tal forma que todos los errores sistemáticos fueron eliminados (errores de siembra y manipulación) [51].

Para la confección de la base de datos previamente citada [49] se realizaron 48 geles 2-D que representaban 16 puntos durante el desarrollo y cuyos análisis estadísticos permitieron identificar matemáticamente 4 fases de crecimiento: CR1, T, CR2 y S. La Figura 8 muestra la curva de crecimiento correspondiente al experimento con el cual se realizó la base de datos mencionada. Los puntos y barras 1-7 representan la primera fase de crecimiento rápido (CR1); 8 y 9 la fase de transición (T); 10-12 la segunda fase de crecimiento rápido (CR2); 13-16 la fase estacionaria (S). Los gráficos de barras que se muestran en las Figuras 10 y 12 representan el perfil de expresión de grupos de proteínas en cada tiempo de la curva

A todas las proteínas inducidas o reprimidas después del estrés por frío, se les realizó un estudio del perfil cinético a lo largo del crecimiento tomando como patrón la base de datos construida por J. Vohradský y colaboradores. Se agruparon las proteínas cuyos perfiles cinéticos de inducción o represión era similar a lo largo del desarrollo. De esta manera, en la Figura 9 se muestra el árbol dividido en 6 grupos cuyas hojas representan a las 35 proteínas inducidas e identificadas en la base. Los tres primeros grupos por su gran similitud a su vez se combinaron en uno solo, dando como resultado final 4 perfiles diferentes. En la Figura 10 se muestra la representación en

gráficos de barra de los 4 grupos mencionados anteriormente. En la Figura 11 se puede observar el árbol dividido en 5 grupos cuyas hojas representan a las 53 proteínas reprimidas e identificadas en la base de datos de proteínas con un perfil similar y en la Figura 12 se ve la representación de estos grupos en gráficos de barras.

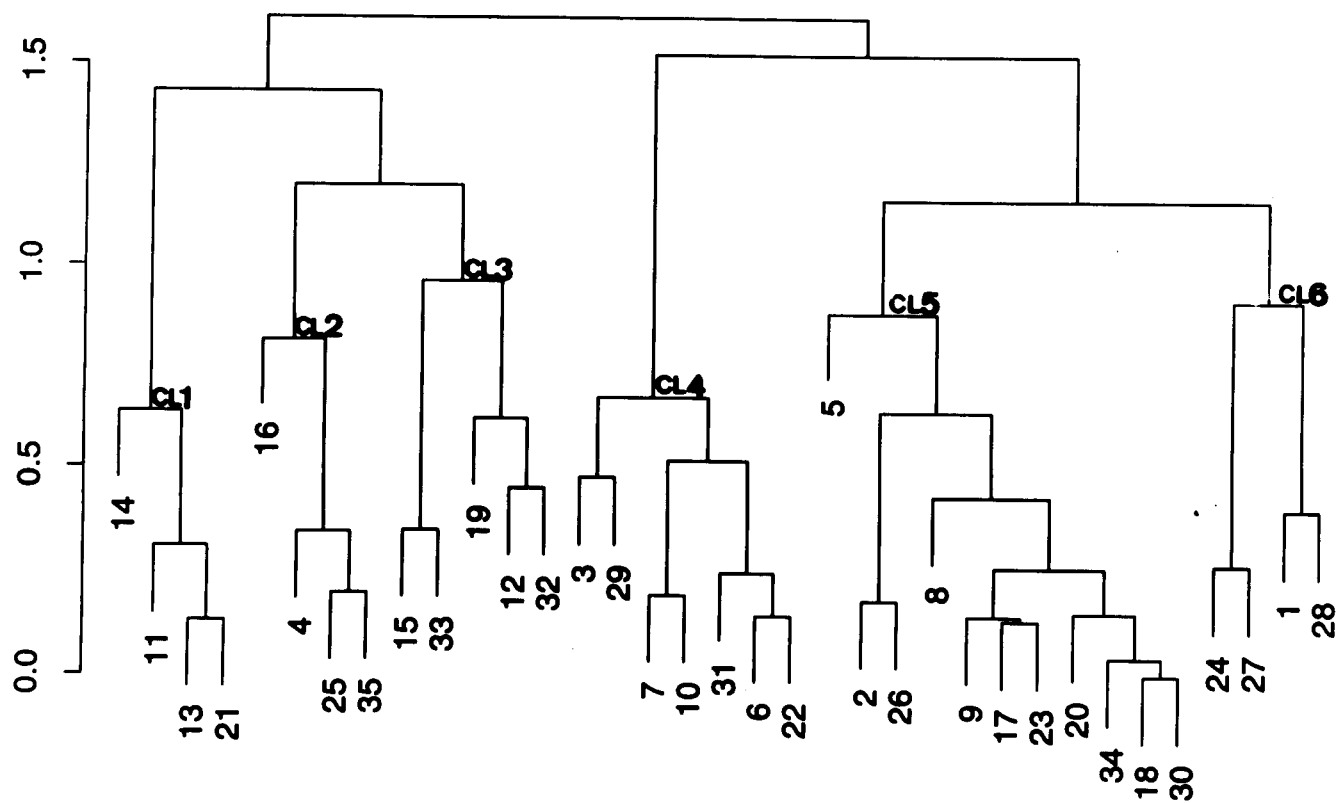


Figura 9: Dendrograma de similaridad de proteínas inducidas por estrés hipotérmico y cuyos perfiles cinéticos fueron estudiados en la base de datos. El árbol está dividido en 6 grupos cuyas hojas representan a las 35 proteínas inducidas.

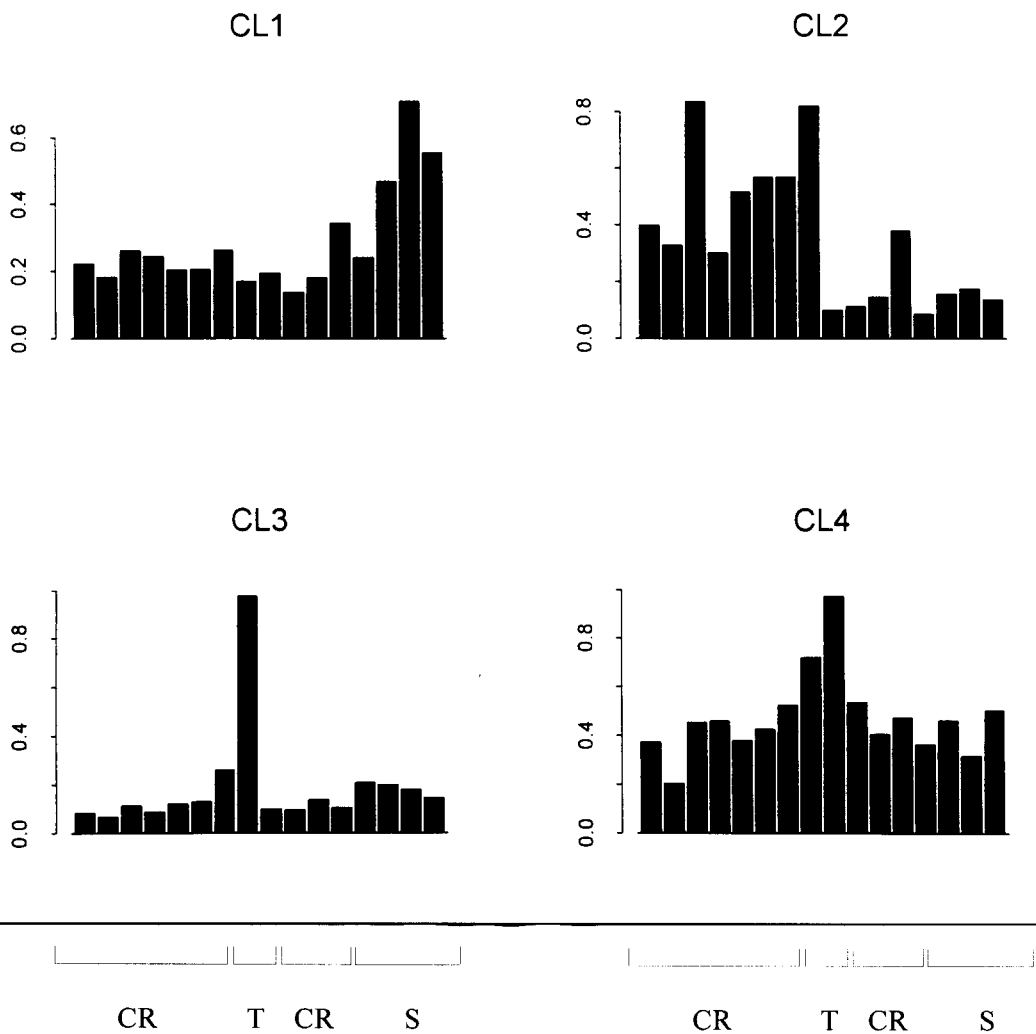


Figura 10: Perfiles de los grupos de proteínas inducidas identificadas en la base de datos de *S. coelicolor*. Las barras representan los promedios de los perfiles de expresión de los grupos de proteínas de la Figura 9. Las barras 1-16 corresponden a los puntos que se indican en la Figura 8, con los que se construyó la base de datos. Los tres primeros grupos representados en la Figura 9 se combinaron por su gran similitud en uno solo (CL1). Barras 1-7 representan fase CR1; 8-9, fase T; 10-12 fase CR2 y 13-16 fase S. Los perfiles están normalizados para tener un máximo de 1.

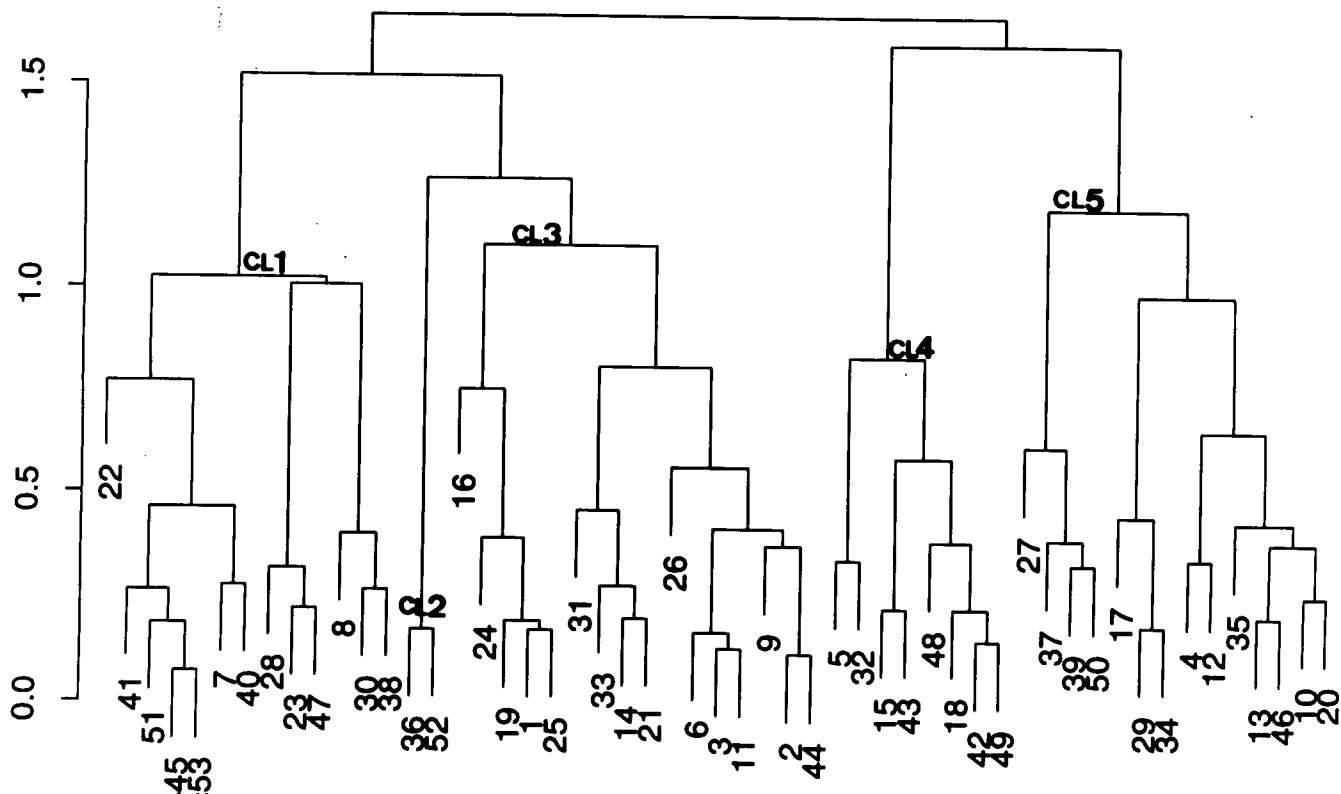


Figura 11: Dendrograma de similitud de proteínas reprimidas por estrés hipotérmico y cuyos perfiles cinéticos fueron estudiados en la base de datos. El árbol está dividido en 5 grupos cuyas hojas representan a las 53 proteínas reprimidas.

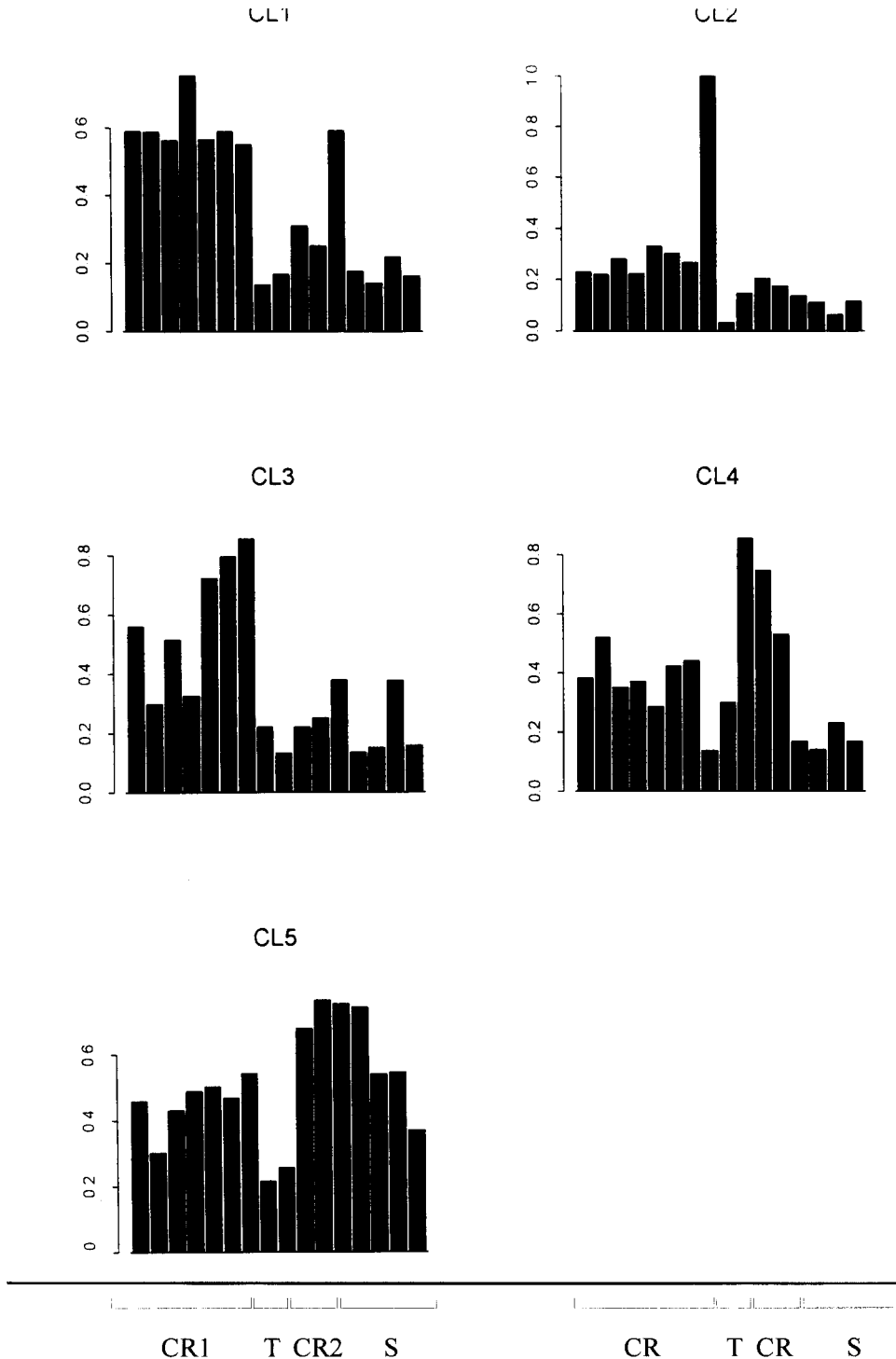


Figura 12: Perfiles de los grupos de proteínas reprimidas e identificadas en la base de datos de *S. coelicolor*. Las barras representan los promedios de los perfiles de expresión de los grupos de proteínas de la Figura 11. Las barras 1-16 corresponden a los puntos que se indican en la Figura 8, con los que se construyó la base de datos. Barras 1-7 representan la fase CR1; 8-9, fase T; 10-12, fase CR2 y 13-16, fase S. Los perfiles están normalizados para tener un máximo de 1.

III.1.3.- Discusión.

Se realizó un experimento de inducción a diferentes temperaturas (8, 12 y 16°C) y en distintos estadios de crecimiento (18, 35 y 69 hs) con el fin de estudiar la síntesis de *nov* de proteínas cuando las células sufren un estrés hipotérmico. Al someter las muestras a electroforesis en geles de tricina, se identificó una proteína de peso molecular aparente de 9 kDa, que no se detectaba a 30°C pero que era inducida fuertemente a 8 y 12°C y en menor medida a 16°C, en las muestras correspondientes de las 18 y 35 hs de cultivo. La inducción de proteínas de bajo peso molecular ha sido una constante en todas las bacterias estudiadas que han sido sometidas a estrés por frío, y en general, todas son homólogas a la CspA de *E. coli* [106]. A través de la información del gel monodimensional presentado (Figura 6) no se puede especular más allá de la simple observación de que esta proteína podría ser una homóloga a CspA. Este experimento nos permitió definir fundamentalmente las condiciones óptimas para realizar el estudio de proteínas de estrés al frío.

Con las muestras de cultivo de *S. coelicolor* crecido a 30°C e inducido a 12°C se realizaron geles bidimensionales SDS-PAGE, los cuales fueron analizados según lo descrito en la sección III.1.2.2. Se reconocieron 69 proteínas que se indujeron por estrés hipotérmico; de las mismas se identificaron 35 en la base de datos confeccionada por el Dr. J. Vohradský y colaboradores en base a los resultados obtenidos con muestras de *S. coelicolor* creciendo a 30°C. También se reconocieron 80 polipéptidos que se reprimieron por la disminución de la temperatura; de estos se identificaron 53 proteínas existentes en la misma base. Los perfiles cinéticos de las 88 proteínas (35 inducidas y 53 reprimidas) fueron analizados a lo largo del desarrollo. Las proteínas inducidas fueron agrupadas en 4 grupos: CL1, CL2, CL3 y CL4 (Figura 10). Las del grupo CL1 muestran una síntesis moderada en todas las fases de crecimiento con un incremento hacia la fase estacionaria (barras 14, 15 y 16). Por el contrario, las agrupadas en CL2 exhiben una alta velocidad de síntesis en la fase exponencial hasta la fase de transición (barras 1-8), decayendo significativamente en la segunda fase de crecimiento rápido

(barras 9-16). En cambio, las proteínas en CL3 comprenden a las que muestran una síntesis incrementada e importante solamente en la fase de transición (barra 8). Finalmente, en CL4 las proteínas son sintetizadas durante todo el crecimiento con un máximo hacia el final de la fase de transición (barra 9).

Las proteínas reprimidas fueron agrupadas en 5 grupos: CL1, CL2, CL3, CL4 y CL5 (Figura 12). Las pertenecientes a CL1 muestran una alta expresión en la primera fase de crecimiento rápido (barras 1-7), disminuyendo en la fase de transición (barras 8 y 9). Posteriormente, el perfil muestra inducción hacia la fase final de la segunda fase de crecimiento rápido (barra 12), decayendo nuevamente hasta el final de la fase estacionaria (barras 13-16). El perfil de CL1 de proteínas reprimidas es comparable al CL2 de proteínas inducidas descrito anteriormente (Figura 10). En cambio CL3, muestra una expresión similar a CL1; es decir, una fuerte inducción antes de la fase de transición (barras 1-7) y una posterior reducción en su síntesis. Por el contrario, las proteínas agrupadas en CL4, muestran una expresión moderada durante la primera fase de crecimiento rápido (barras 1-7) y una posterior represión durante la fase de transición (barras 8 y 9). Finalmente, en la fase del segundo crecimiento rápido aparece una importante inducción (barras 10-12) de los polipéptidos que desaparece durante la fase estacionaria (barras 13-16). Por último, las proteínas de CL5 exhiben altos niveles durante todo el crecimiento con un mínimo durante la fase de transición (barras 8 y 9).

Es de destacar que todos los perfiles de proteínas reprimidas muestran un mínimo de expresión durante la fase de transición, a excepción del grupo CL2 (Figura 12). Por el contrario, los perfiles de las proteínas inducidas muestran un máximo de síntesis en la fase de transición, a excepción del grupo CL1 (Figura 10).

Trabajos preliminares han establecido que la fase de transición, fenómeno descrito en medio sólido y líquido, es un período en el crecimiento de los *Streptomyces* donde ocurren importantes y variados cambios fisiológicos relacionados con ciertos estrés (C. Thompson, comunicación personal). Por ejemplo, la respuesta al estrés por calor ha sido muy bien caracterizada en *S. coelicolor* [51] y difiere notablemente a la descrita en otras bacterias. Los patrones de expresión génica en cultivos de *S.*

coelicolor sometidos al estrés por calor en varias fases del crecimiento, fueron estudiados utilizando geles bidimensionales de proteínas y analizados usando métodos estadísticos [51]. La respuesta de todas las proteínas de estrés al calor (HSPs) fue dependiente de la fase de crecimiento. Para muchas HSPs, los niveles de inducción alcanzados estaban relacionados con los niveles de síntesis en un determinado estadio de crecimiento antes del estrés térmico. Esto apoyaba la idea de que el estrés al calor y el desarrollo comparten elementos comunes de control. Los análisis estadísticos permitieron agrupar en cinco grupos a aquellas HSPs y proteínas dependientes de diferentes estados de desarrollo, que compartían cinéticas de síntesis similares [51].

Basados en el rol de la presión osmótica en la erección del micelio aéreo [13], colaboradores del Dr. Thompson indujeron cultivos en la primera fase de crecimiento rápido con NaCl. Más del 50% de las proteínas inducidas por NaCl aumentaban o disminuían su síntesis durante la fase de transición (P. Viollier y J. Vohradsky, comunicación personal).

Streptomyces crece en medio sólido formando un micelio sustrato el cual se diferencia más tarde en micelio aéreo para dar finalmente numerosos esporos uninucleados y pigmentados [6]. La formación del micelio aéreo coincide con el momento en que los metabolitos secundarios, pigmentos y antibióticos, comienzan a sintetizarse [13]. Granozzi y colaboradores [12] describieron que hacia el final de la formación del micelio sustrato, en medio sólido, se producía una cesación transitoria del crecimiento (fase de transición), con una importante reducción en la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas. Más tarde, al iniciarse la diferenciación morfológica, los valores de síntesis de las macromoléculas casi recuperaban sus valores normales. Estos autores concluyeron, que tales cambios se debían a un estrés fisiológico que ocurre justo antes de la diferenciación morfológica en medio sólido [12]. Experimentos recientes, realizados en medio mínimo líquido han demostrado que la fase de transición es una consecuencia directa del hambreado (J. Novotná y C. Thompson, comunicación personal). Análisis cuantitativos de la composición del medio de cultivo MG, revelaron que la fase de transición es el reflejo de una curva diáuxica. Luego de la primera fase de

crecimiento rápido la fuente de carbono y nitrógeno, el glutamato, se agota y la bacteria entra en un estado en el cual se produce una reprogramación metabólica para comenzar a consumir nuevas fuentes de carbono (maltosa) y nitrógeno (amonio). Al menos dos parámetros fisiológicos experimentan un cambio significativo en ese momento: 1) la velocidad de síntesis proteica disminuye un 90% y 2) el pH del medio cambia hasta alcanzar un valor máximo (ver Capítulo 2).

Se han realizado diversos estudios, y otros aún en marcha, que tienen como objetivo encontrar un modelo unificador en el cual el hambreado sea el desencadenante de la activación de las respuestas a diversos estrés. Probablemente, muchas de las proteínas de estrés han participado a lo largo de la evolución, como parte del sistema del desarrollo de los *Streptomyces*. No cabe duda que el modelo final podrá ser concluido cuando se dispongan de diversas mutantes en los diferentes sistemas reguladores de la respuesta a los estrés. Es por ello que la fase de transición es motivo de interés y de estudio enfocados desde un punto de vista bioquímico y genético, ya que se supone que es en ese momento, cuando se produce una respuesta fisiológica que desencadenaría la biosíntesis de metabolitos secundarios y el desarrollo del micelio aéreo.

Los estudios de los diferentes regulones están restringidos a simples observaciones. Es decir, se aplica un estímulo y luego se observa su consecuencia. El resolver un problema biológico, como ser el de estudiar la respuesta a un estrés, puede realizarse cambiando la óptica de lo que se ha venido haciendo hasta el momento en otros organismos. La aplicación de métodos estadísticos para analizar las expresión génica registrada en geles 2-D, permite entender la respuesta de grupos de genes a múltiples estímulos. Esta metodología, utilizada previamente en el estudio del estrés térmico en *S. coelicolor* [51], ha sido elegida para realizar el análisis de la respuesta al estrés hipotérmico en *Streptomyces coelicolor*.

Las condiciones de cultivo, marcado y manipulación de las proteínas fueron las mismas que las utilizadas en la realización de la base de datos preexistente, realizada con *Streptomyces coelicolor* J1501 en medio líquido [49]. De esta forma fue posible estudiar por los mismos métodos estadísticos, los perfiles de expresión después del

estrés hipotérmico y su relación con los cambios que ocurren en los diferentes estadios de crecimiento.

Con los resultados presentados en este capítulo se llegó a las siguientes conclusiones: el estrés por frío induce o reprime la expresión de 69 y 80 proteínas respectivamente. Muchas de ellas fueron identificadas en la base de datos y a su vez, dentro de ese grupo, muchas se inducen o reprimen en la fase de transición. Los datos obtenidos hasta el momento permiten establecer un nexo entre la fase de transición (estrés fisiológico) y el estrés por frío.

Hasta el momento no existen análisis detallados en otros microorganismos que indiquen cómo se relacionan los cambios producidos en los diferentes estadios de crecimiento con el estrés hipotérmico.

III.2- CAPÍTULO 2

III.2.-Capítulo 2: Purificación y caracterización de una proteína de 9 kDa que se induce por estrés hipotérmico y fisiológico.

III.2.1.-Introducción y objetivos.

La respuesta al estrés por frío en *E. coli* describe un patrón específico de expresión génica. Este patrón de expresión incluye la inducción de proteínas específicas de estrés al frío, represión de las proteínas de estrés por calor y síntesis de otras proteínas involucradas en la transcripción y traducción [78] [77].

Lo más característico de la respuesta al estrés por frío en *E. coli* es el alto nivel de expresión de una proteína de $\cong 7,5$ kDa denominada CspA, que pertenece al grupo principal de la familia de CSPs. Una proteína homóloga a CspA fue encontrada por casualidad en *Streptomyces clavuligerus* [101]. Esta proteína, de peso molecular aparente de 8-10 kDa, copurificó con la tioredoxina en estudios realizados sobre el sistema de la tioredoxina en *S. clavuligerus*. Además, había sido depositada en el GeneBank (nº de acceso x92686) la secuencia de una proteína, SCOF, de *S. coelicolor* M145 [108] con características similares a la de *S. clavuligerus* y a la de *E. coli*. En la sección III.1.2.1. se mostró la presencia de una proteína de peso molecular aparente de 9 kDa que es inducida a 8°C y 12°C, lo que hizo suponer que esa proteína pertenecería a la familia de CSPs (similar a CspA) de *E. coli*. Con este dato y con los demás resultados discutidos en III.1.3. se plantearon los siguientes objetivos: 1) realizar una nueva base de datos que registrase la expresión génica de *S. coelicolor* J1501 creciendo a 30°C en medio MG líquido y en condiciones de estrés hipotérmico (12°C). La misma se llevaría a cabo con la metodología con la que se había realizado la base mencionada en el capítulo anterior. En aquella, las muestras fueron procesadas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12,5 %, lo que restringía el análisis hasta las proteínas de $\cong 15$ kDa. En cambio, las muestras en la nueva base serían procesadas en geles SDS-PAGE y en geles de tricina, lo que permitiría registrar también, aquellas proteínas menores a 15 kDa. Esto complementaría los conocimientos sobre la cinética de expresión de “todos” los genes de *S. coelicolor* durante todo el desarrollo, 2) caracterizar y purificar la proteína de 9 kDa

que se induce por frío y 3) realizar su secuencia amino terminal con el fin de poder utilizar este dato para el clonado del gen que la codifica mediante genética reversa.

III.2.2.-Resultados.

III.2.2.1.-Curva de crecimiento en medio líquido de *Streptomyces coelicolor* J1501. Condiciones de reproducibilidad.

Las cuatro fases de crecimiento que muestran los cultivos de *Streptomyces* en medio líquido son bien conocidas y la forma de la curva es siempre constante [49] [51]. Sin embargo, las fases pueden estar desplazadas en el tiempo debido entre otras cosas a la calidad de las drogas usadas, el inóculo y la velocidad con que se toman las muestras; es por ello que fue necesario establecer rigurosas condiciones de reproducibilidad (ver Materiales y Métodos). Los cultivos en medio mínimo MG se inocularon con precultivos de *S. coelicolor* J1501. Alícuotas de 2 ml fueron transferidas a 30°C e inmediatamente se les agregó la mezcla de [³⁵S]-metionina/cisteína. Se incubaron durante 1 hora, deteniéndose la marcación introduciendo los frascos en hielo. Las células marcadas fueron centrifugadas, lavadas y congeladas a -70°C hasta su posterior procesamiento. A partir de cuatro curvas de crecimiento independientes realizadas en idénticas condiciones, se pudieron definir con certeza las cuatro fases de crecimiento de *S. coelicolor* J1501: el primer estadio de crecimiento rápido (CR1) termina aproximadamente a las 45 horas, cuando el cultivo disminuye su velocidad de crecimiento durante 4-6 hs. Luego de esta etapa, conocida como fase de transición (T), se reasume el crecimiento durante otras 10 horas (CR2) con un tiempo de duplicación similar a CR1. Aproximadamente, a las 80 horas las células ingresan a su fase estacionaria (S) de crecimiento. Para definir con certeza los diferentes estadios de crecimiento fue necesario contar con otros parámetros como ser: pH del medio, observación de los patrones de expresión en geles monodimensionales, medición de la incorporación de marca y aparición del antibiótico actinorodina en el medio, el cual es un marcador específico de la fase estado crecimiento [42].

Con las condiciones establecidas en el paso anterior se realizó una nueva curva de crecimiento con el objeto de construir una nueva base de datos utilizando la metodología de geles bidimensionales, que permitiría realizar el estudio de los cambios de expresión a 30°C y por estrés hipotérmico. A las 14 (1), 23 (2), 38 (3), 42 (4), 44 (5), 46 (6), 49 (7), 52 (8), 62 (9), 65 (10), 87 (11) hs, luego de inoculado el cultivo principal, se extrajeron 2 alícuotas de 2 ml cada una. A las alícuotas se les agregó la mezcla de [³⁵S]-metionina/cisteína y se las incubó a 30°C y 12°C respectivamente, durante 1 h. Para su procesamiento, se siguió lo indicado anteriormente. La curva de crecimiento a 30°C, la curva de pH y la velocidad de síntesis proteica se muestran en las Figuras 13, 14 y 15 respectivamente.

Curva de crecimiento

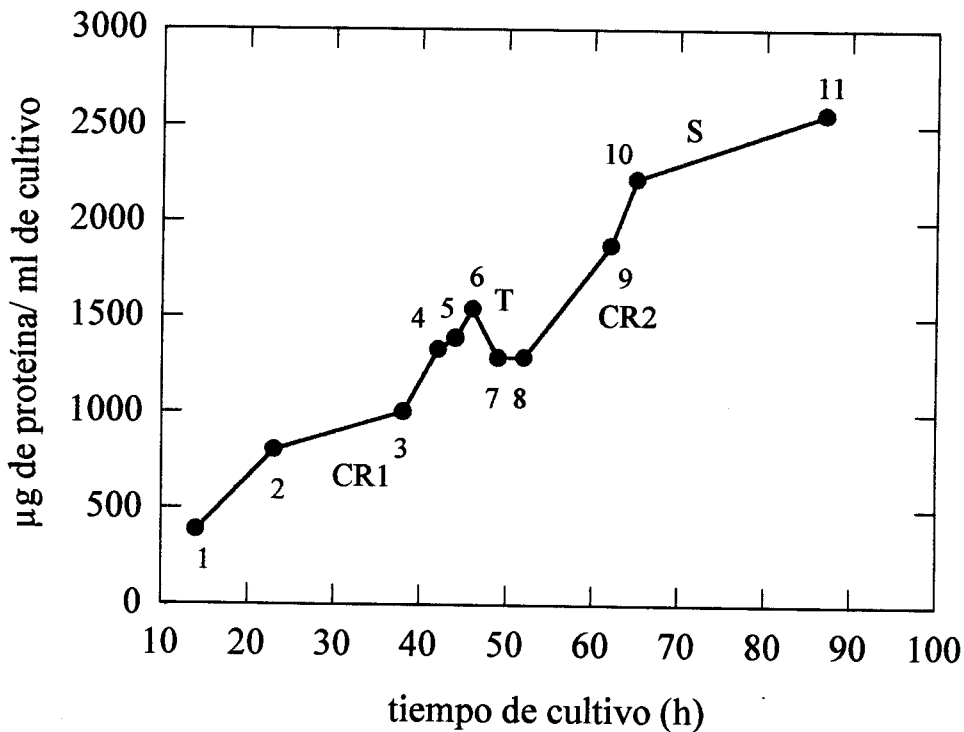


Figura 13: Curva de crecimiento de *S. coelicolor* J 1501 a 30°C. Típica curva de crecimiento bifásica de *S. coelicolor* en medio mínimo líquido (MG). Alícuotas de 2 ml de cultivo fueron incubadas durante 1 h a 30°C en presencia de [³⁵S]-metionina/cisteína. Luego las células fueron cosechadas y procesadas como se describe en Materiales y Métodos. El contenido proteico fue usado como medida del crecimiento. A cada una de las muestras se les asignó un número de 1-11 de acuerdo al tiempo en que fueron tomadas. 14 (1), 23 (2), 38 (3), 42 (4), 44 (5), 46 (6), 49 (7), 52 (8), 62 (9), 65 (10) y 87 (11) horas. CR1, primera fase de crecimiento rápido; T, fase de transición; CR2, segunda fase de crecimiento rápido y S, fase estacionaria.

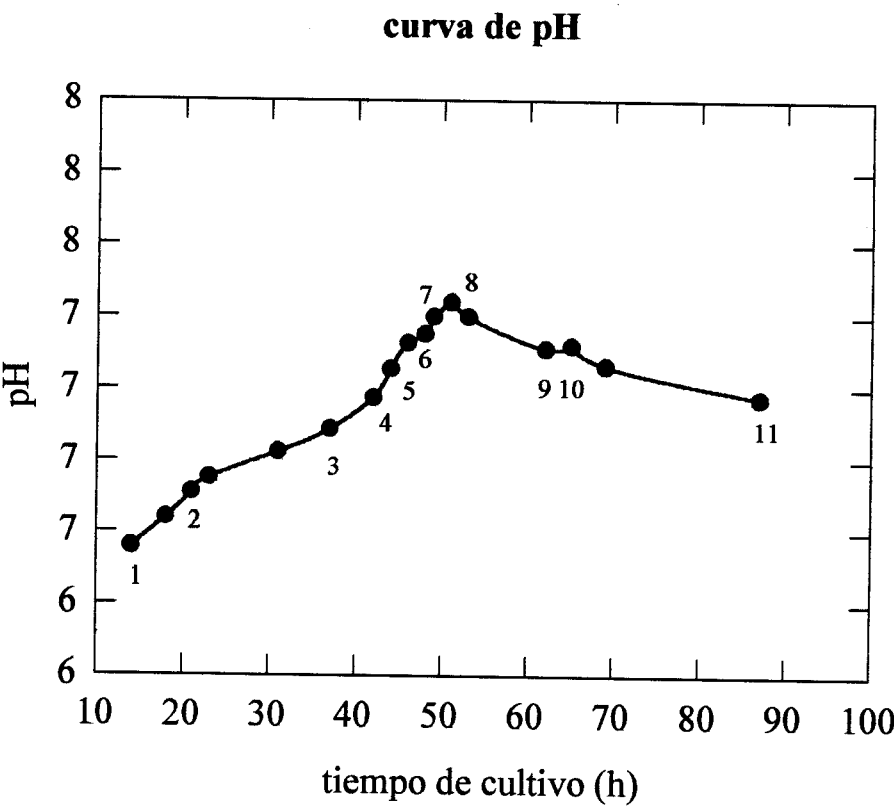


Figura 14: Curva de pH. Variación del pH del medio durante el crecimiento del *S.coelicolor* J1501 en medio MG

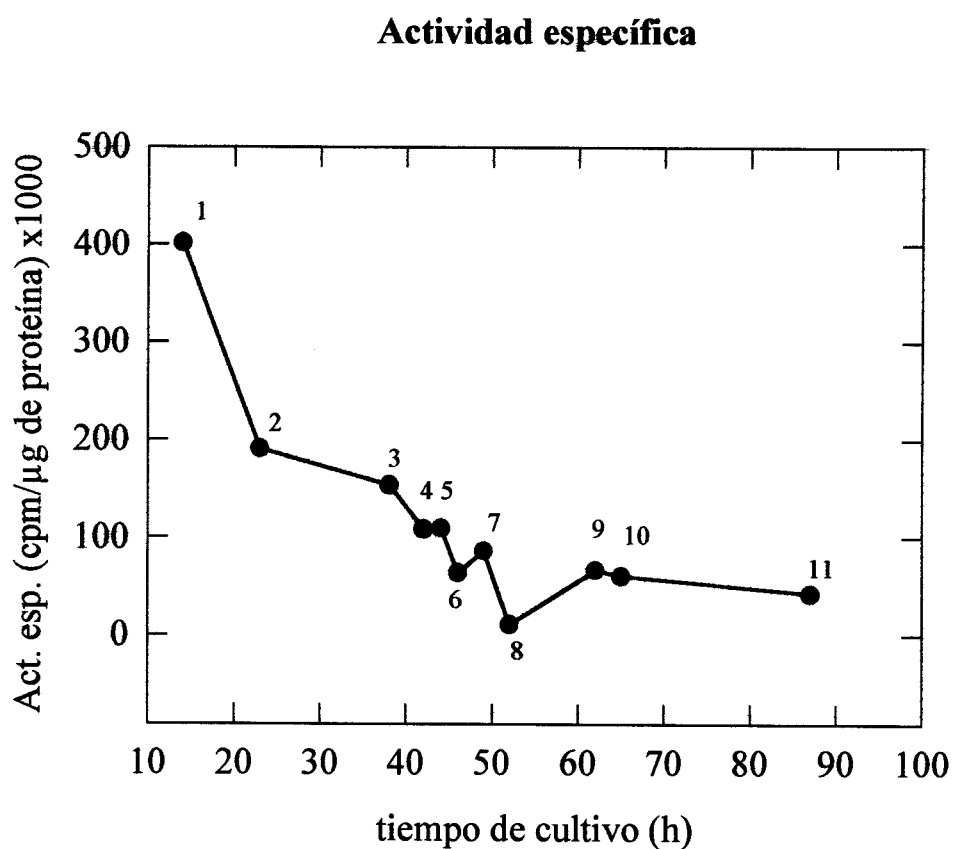


Figura 15: Velocidad de síntesis proteica a 30°C. Las muestras 1-11 marcadas con [35 S]-metionina/cisteína corresponden a las muestras de la Figura 13. La medición de la radioactividad incorporada a las proteínas, se realizó según lo descrito en Materiales y Métodos.

III.2.2.2.-Construcción de una base de datos para el estudio de los cambios en la expresión génica de *S. coelicolor* durante los distintos estadios de crecimiento y en condiciones de estrés hipotérmico.

Para la realización de la nueva base de datos se utilizaron las muestras 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 11, de la curva de crecimiento descrita anteriormente y que fueron marcadas con [³⁵S]-metionina/cisteína 30°C y 12°C. Las muestras fueron analizadas en geles bidimensionales de tricina y SDS-PAGE utilizando el sistema Investigator® de Millipore y Hoefer® S600. De cada una de las muestras se realizaron al menos triplicados comparables. Es decir que se realizaron 96 geles como mínimo. A su vez, se obtuvieron de cada uno de ellos exposiciones de una semana y de un mes para tener un registro de por lo menos 1.500 proteínas analizables que es el límite que permite este sistema en estas condiciones. Al momento de escribir esta Tesis no se disponía de las conclusiones finales del análisis estadístico de esta base de datos. Los 192 autoradiografías obtenidas están siendo procesadas y analizadas en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Basilea por el Doctor Jiri Vohradský. Sin embargo, hasta tanto se dispusieran de los datos finales de esta base, se contaba con las evidencias preliminares discutidas en la sección III.1.3.

III.2.2.3.-Análisis de la expresión génica en las distintas fases de crecimiento.

Las 11 muestras de la curva de crecimiento realizada a 30°C, y que se muestra en la Figura 13, fueron sometidas a electroforesis monodimensional en geles de tricina y SDS-PAGE. De cada muestra se sembró aproximadamente 1×10^6 cpm. Los geles fueron fijados, teñidos, secados y expuestos durante 3 días. En la Figura 16 se muestran los 11 extractos resueltos en un gel monodimensional de tricina. Los perfiles proteicos de los puntos 1, 2, 3, 4 y 5 son muy parecidos y pertenecen a la primera fase de crecimiento rápido. Sin embargo, en el punto 6 se ve un cambio repentino en la expresión de ciertas proteínas, haciendo que el perfil de esta muestra no sea comparable a los puntos anteriores ni parecido a los siguientes. Con el resto de las muestras se observaron diferencias muy sutiles; los puntos 7 y 8 son muy parecidos entre sí, como así también

9, 10 y 11. Los datos de pH, concentración de proteína y actividad específica demostraron que los puntos 6, 7 y 8 pertenecen a la fase de transición. Sin embargo, el cambio que se observa en el perfil de expresión del punto 6, confirmaría que éste es el punto más importante de la fase T. La inducción de 3 bandas características con un peso molecular aparente de 8, 32 y 69 kDa (Figura 16), son marcadores que aparecen siempre en el punto más crítico de esta fase. Los patrones monodimensionales de las 11 muestras fueron comparables a los de la base de datos preexistente (X.Li, comunicación personal), lo cual indica la confiabilidad de la curva de crecimiento realizada.

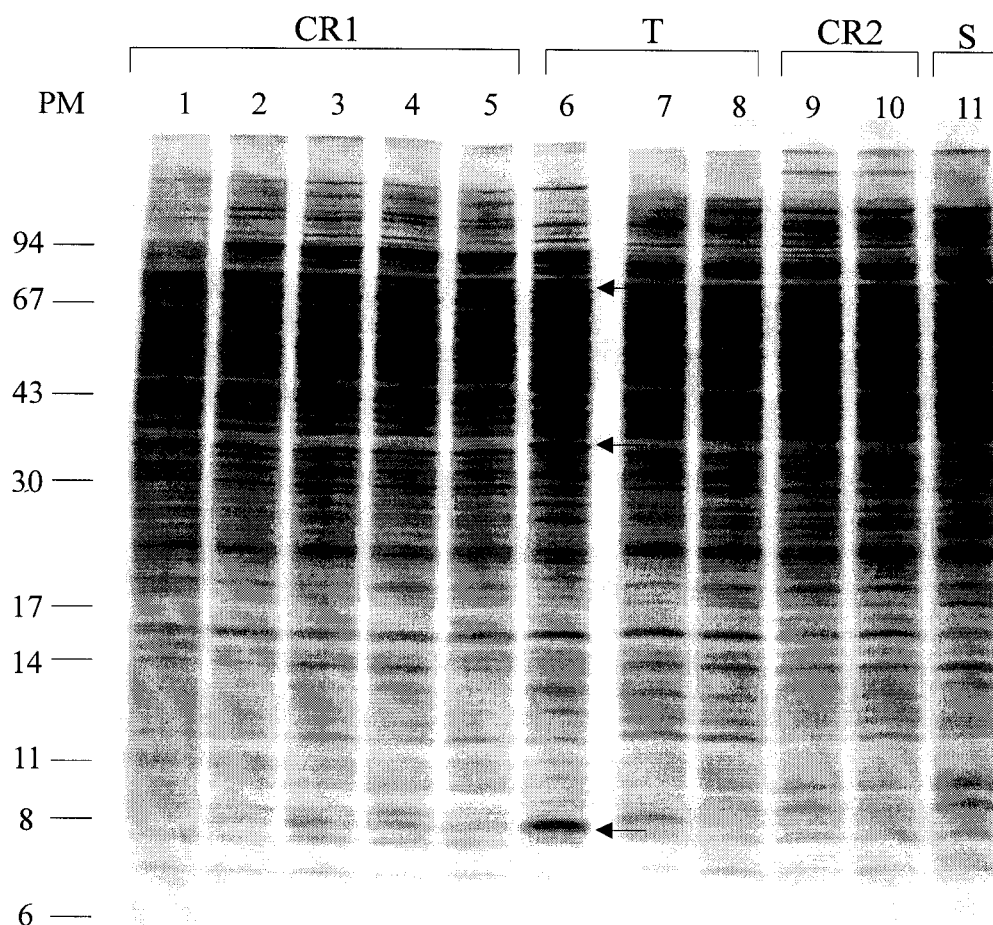


Figura 16: Cambios en la expresión génica en las distintas fases de crecimiento de *S. coelicolor* J1501 en medio líquido. Los puntos 1-11 representan las muestras de la curva de crecimiento que se muestra en la Figura 13. Alícuotas de 2 ml de cultivo creciendo a 30°C fueron marcadas durante 1 h con [35 S]-metionina/cisteína. Las células se trataron luego como se describe en la leyenda de la Figura 13. Las flechas indican la inducción de tres proteínas con peso molecular aparente de 8, 32 y 69 kDa, características de la iniciación de la fase de transición (punto 6).

III.2.2.4.-Análisis de la expresión de la proteína de 9 kDa en fase logarítmica y de transición a 30°C y 12°C.

Del análisis de los geles bidimensionales realizados, se observó que los cambios más importantes a nivel de síntesis proteica ocurrían durante la fase de transición (III.1.3.). Con el objeto de analizar la expresión de proteínas de bajo peso molecular, que son las que comúnmente se inducen por estrés hipotérmico en la mayoría de los microorganismos [106], se realizaron geles bidimensionales de tricina de las muestras 4, 5, 6, 7 y 9 (muestras 4 y 9 como datos no mostrados) a 30°C y 12°C (Figura 17). De cada muestra se sembró aproximadamente 1×10^6 cpm y los geles fueron teñidos con azul de Coomassie, secados y expuestos durante tres días. Los resultados se muestran en la Figura 18. Como se puede observar en los puntos 5 y 7 una proteína de peso molecular aparente de 9 kDa es inducida solamente a 12°C. En cambio, en el punto 6, la misma proteína se expresa tanto a 30°C como a 12°C. En las muestras 4 y 9 se observó lo mismo que en los puntos 5 y 7. También fue muy clara la inducción de una proteína de peso molecular aparente de ≈ 8 kDa en los perfiles proteicos de todas las muestras sometidas a 12°C. En el rango de peso molecular que va de 8 a 16 kDa no se observaron otros cambios a nivel de inducción de proteínas. Por tratarse de geles de tricina, no fue posible analizar por inspección visual más arriba de los 16 kDa.

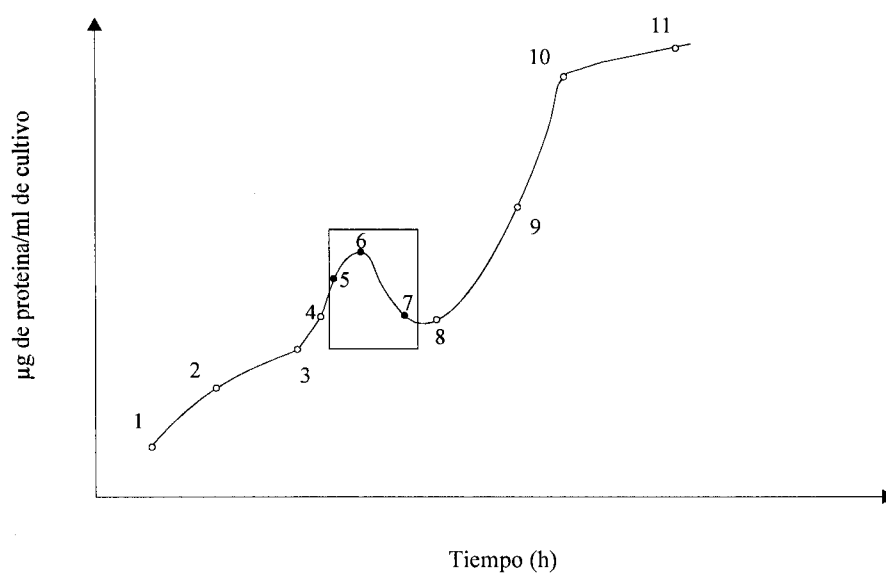


Figura 17: Representación de la curva de crecimiento de la Figura 13: Puntos 5, 6 y 7 son las muestras que se utilizaron para estudiar la expresión de la proteína de 9 kDa a 30°C y 12°C.

Figura 18: Expresión de la proteína de 9 kDa a 30°C y 12°C. Las muestras 5, 6 y 7 se resolvieron usando electroforesis bidimensional en geles de tricina. PI, puntos isoelectricos. PM, marcadores de peso molecular en kDa. Las flechas indican la ausencia (flecha vacía) o presencia (flecha llena) de la proteína de 9 kDa.

Punto 5

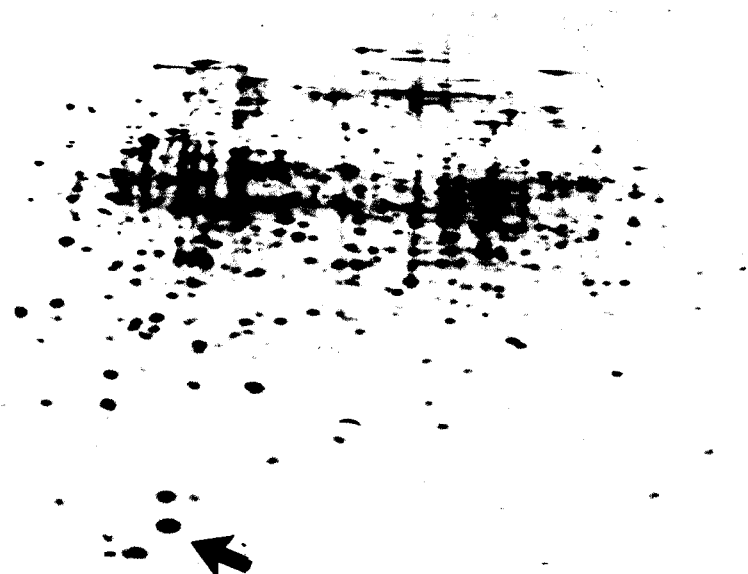
30°C

97 —
67 —
43 —
30 —
16 —
14 —
11 —
8 —



12°C

97 —
67 —
43 —
30 —
16 —
14 —
11 —
8 —



PM/
pI

4

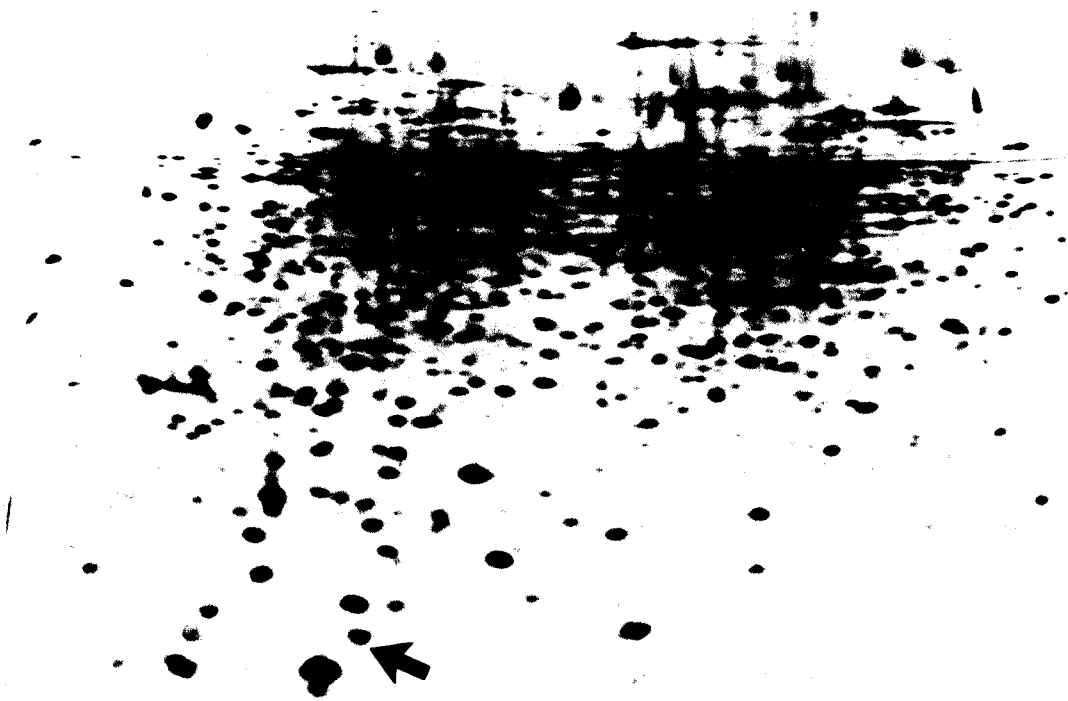
5

6

Punto 6

30°C

97—
67—
43—
30—
16—
14—
11—
8—



12°C

97—
67—
43—
30—
16—
14—
11—
8—



PM/
pI

4

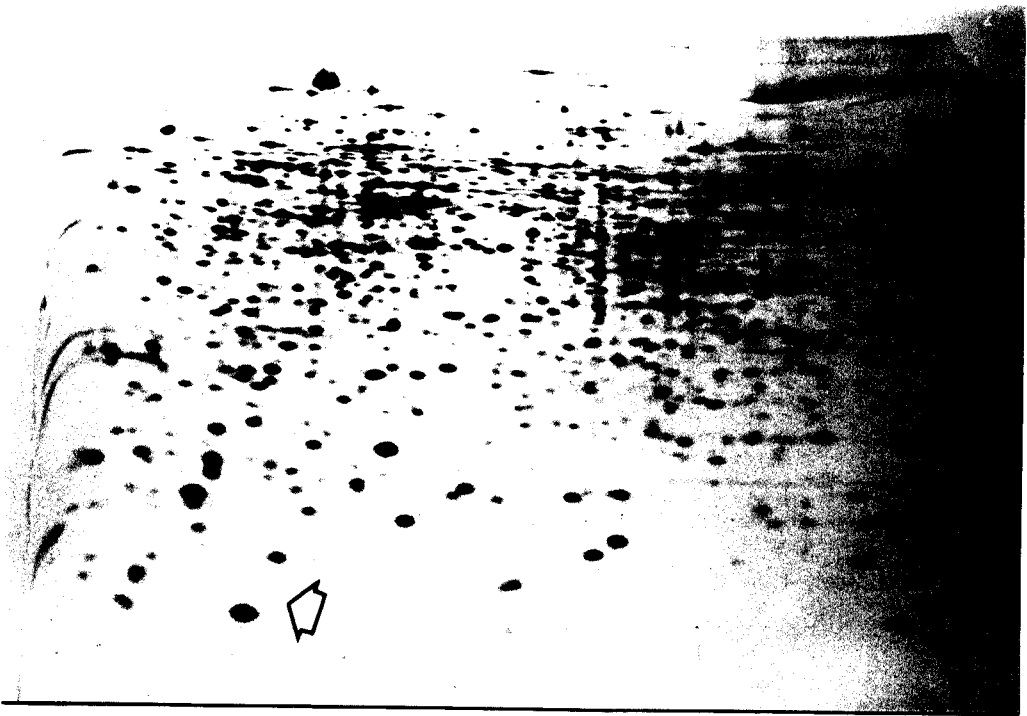
5

6

Punto 7

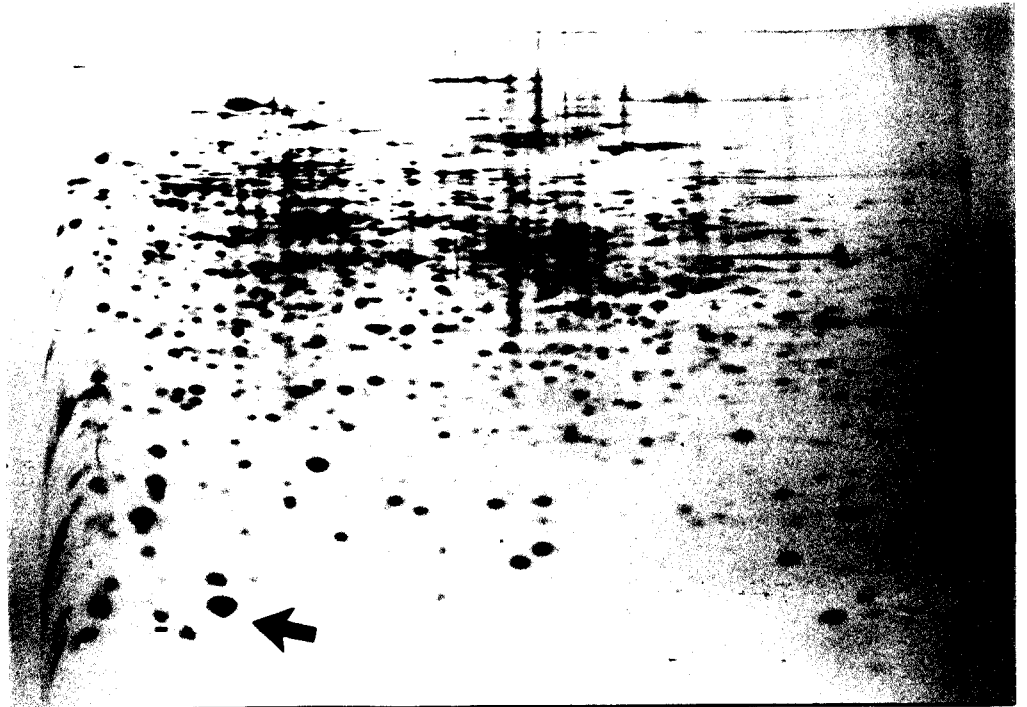
30°C

97 —
67 —
43 —
30 —
16 —
14 —
11 —
8 —



12°C

97 —
67 —
43 —
30 —
16 —
14 —
11 —
8 —



PM
pI

4

5

6

III.2.2.5.-Purificación de la proteína de 9 kDa que se induce a bajas temperaturas y a 30°C en fase de transición.

El hecho que una proteína de bajo peso molecular se expresase tanto en una situación de estrés hipotérmico como en una de estrés fisiológico (fase T), nos llevó a pensar en la importancia que podría tener esta proteína como sensora de estas dos situaciones de estrés; por lo que decidimos purificarla y caracterizarla.

Para ello fue necesario disponer de una gran cantidad de extracto crudo debido a que no era posible observar fácilmente mediante tinción con azul de Coomassie la proteína de 9 kDa. Se partió de medio litro de medio MG. Las células fueron crecidas hasta 20 hs a 30°C. Para control, se tomaron 2 alícuotas de 2 ml cada una, a las cuales se les adicionó 100 μ Ci de la mezcla de [35 S]-metionina/cisteína y se las dejó marcando durante 1 h a 30°C y 12°C respectivamente. El resto del cultivo fue inducido a 12°C durante 1 h y sin radioactivo. Los cultivos marcados y sin marcar fueron cosechados y las células rotas por ultrasonido y centrifugadas. Se realizaron 20 geles preparativos de poliacrilamida monodimensionales de tricina usando el sistema Hoeffer® S600. La electroforesis se realizó a 200 V entre 10-20 mA durante 8 horas. Una vez finalizada la corrida, los geles se tiñeron con azul de Coomassie y de cada uno se cortó la zona comprendida entre 8-11 kDa. Luego se procedió a la electroelución y concentración del extracto según lo descrito en Materiales y Métodos. Se controló la presencia de las proteínas electroeluidas realizando un gel monodimensional de tricina en las mismas condiciones. Se sembraron las siguientes alícuotas: proteínas marcadas a 30°C y 12°C, proteínas no marcadas electroeluidas del cultivo inducido a 12°C, una mezcla del extracto de electroelución más el control inducido a 12°C y finalmente el extracto no marcado a 12°C. Los perfiles proteicos teñidos con Coomassie y sus autoradiografías se muestran en la Figura 19. Como puede apreciarse, el extracto que contiene las proteínas de bajo peso molecular contiene la proteína de 9 kDa (comparar las calles 2 y 3) que se induce por frío.

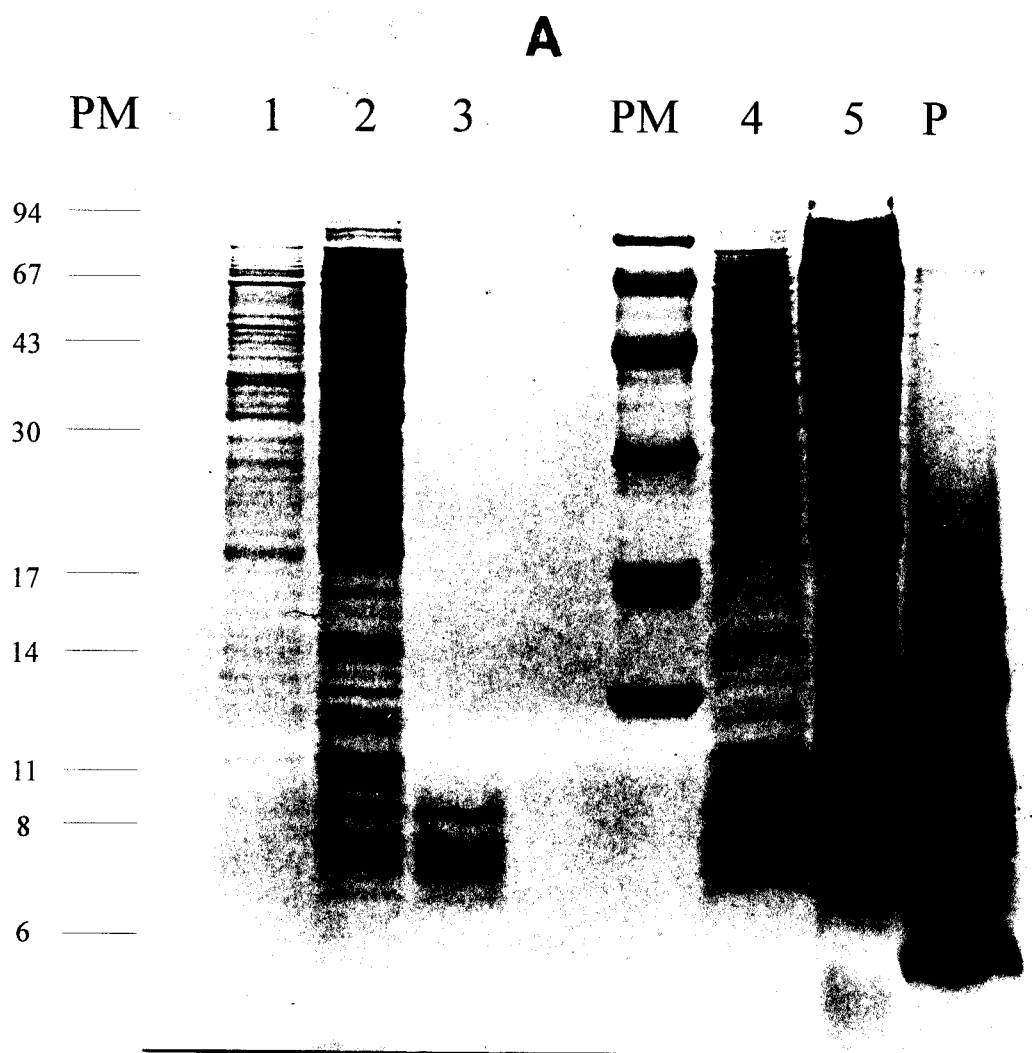
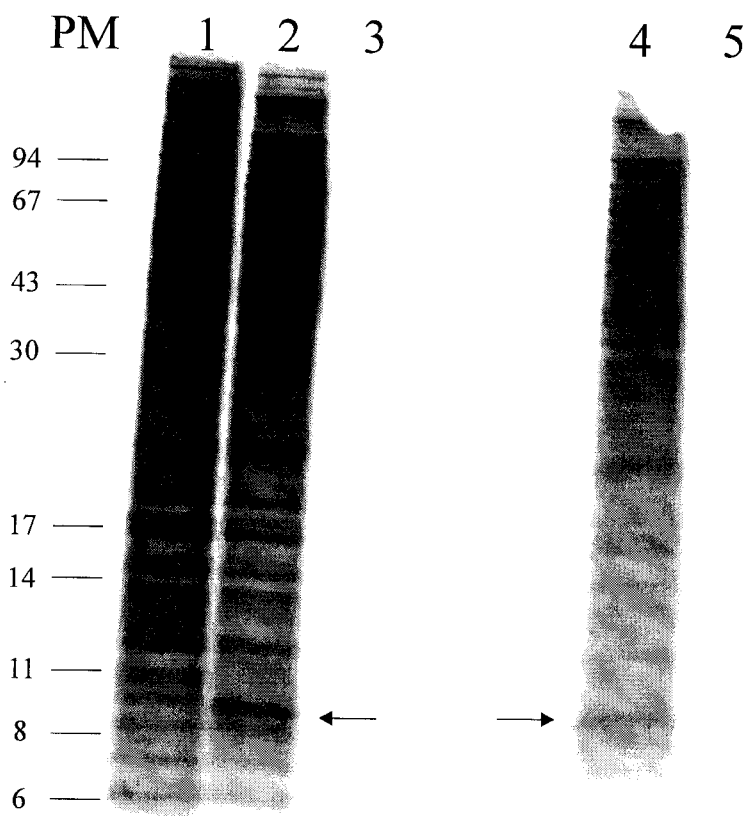


Figura 19: Purificación de la proteína de 9 kDa: Un cultivo de *S. coelicolor* J 1501 crecido a 30°C en medio MG hasta la fase CR1 fue inducido a 12°C. En paralelo, 2 alícuotas fueron separadas e incubadas 1 hora con [35 S]-metionina/cisteína a 30°C y 12°C, respectivamente. Las células fueron cosechadas y procesadas como se describe en Materiales y Métodos. Las calles muestran los perfiles proteicos de los diferentes extractos teñidos con Coomassie (A) y su autoradiografía (B). Calle 1, $1,5 \times 10^6$ cpm del control marcado a 30°C; calle 2, 1×10^6 cpm del control marcado a 12°C; calle 3, 20 μ l de las proteínas electroeluidas; calle 4, 10 μ l de proteínas electroeluidas más 5×10^5 cpm de control marcado a 12°C; calle 5, 80 μ g del extracto crudo inducido a 12°C y sin marcar. PM, proteínas marcadoras de peso molecular expresados en kDa. Las flechas indican en B la proteína de 9 kDa.

B



III.2.2.6.-Secuencia amino terminal de la proteína de 9 kDa.

Con el objeto de clonar el gen que codifica la proteína de peso molecular aparente de 9 kDa, se obtuvo la secuencia amino terminal de dicha proteína. Para tal fin se trabajó con las muestras obtenidas en el paso III.2.2.5. 1×10^6 cpm del extracto control marcado a 30°C y 1×10^6 cpm del marcado a 12°C y ambos con el agregado de una alícuota del electroeluído, fueron sometidos a electroforesis bidimensional en geles de tricina. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie, secados y expuestos durante 3 días. Cuando se superpusieron las autoradiografías con los geles teñidos, una señal radioactiva a la altura de 9 kDa, coincidía con una proteína de 9 kDa observada con Coomassie. Por el contrario, la misma señal radioactiva no se observó en el gel sembrado con el extracto control marcado a 30°C aunque sí estaba presente la proteína de 9 kDa teñida con Coomassie (datos no mostrados). Una vez identificada la posición de la proteína se procedió a realizar una electroforesis bidimensional del extracto obtenido por electroelución (III.2.2.5.). Para ello se hicieron 10 geles respetando las condiciones de trabajo utilizadas hasta el momento, excepto que se cambió CHAPS por Nonidet P-40 para conservar el perfil proteico. Finalizada la electroforesis, los geles fueron inmediatamente electrotransferidos a membranas de PVDF. La membrana teñida con azul de Coomassie se muestra en la Figura 20. La proteína de 9 kDa fue recortada de las membranas y enviada para su secuenciación. La degradación de Edman se realizó directamente sobre el fragmento de PVDF. La secuencia aminoterminal fue la siguiente: **S-V-T-V-R-I-P-I-L-R-P-H-?-G-G-Q.**

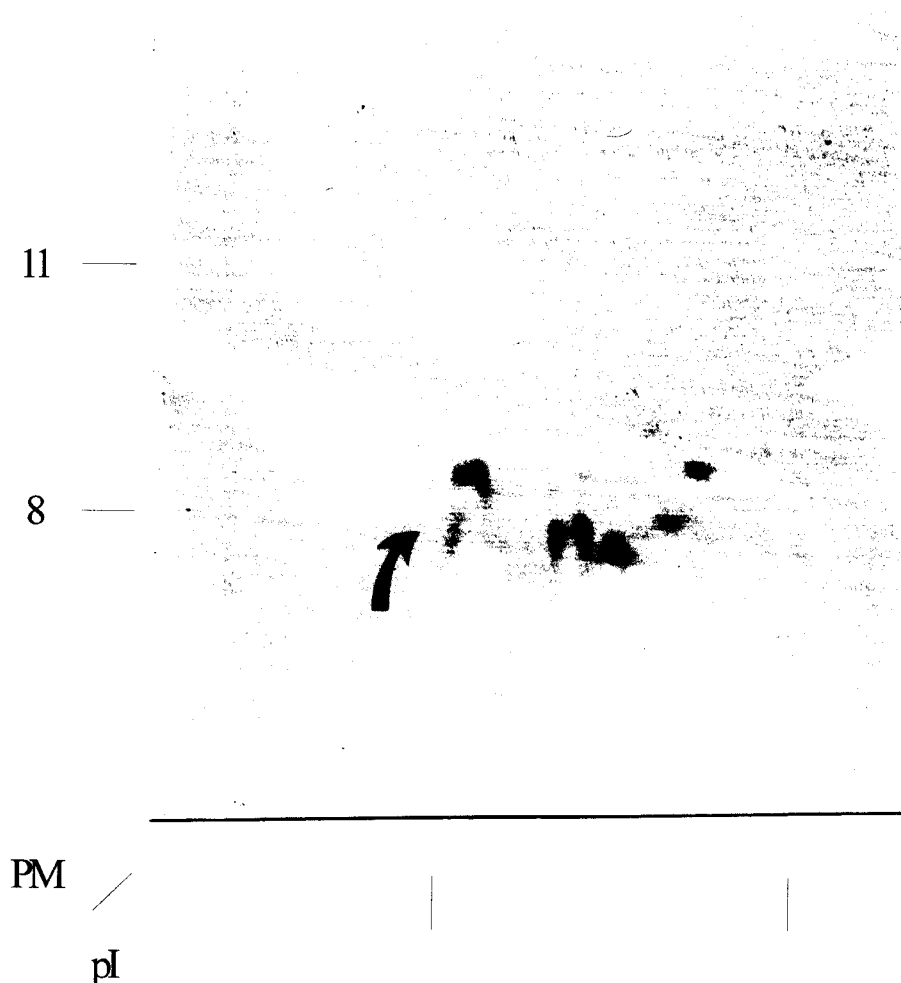


Figura 20: Purificación de las proteínas acídica de bajo peso molecular de 9 kDa. La electroforesis bidimensional fue utilizada para la separación y purificación de las proteínas comprendidas entre 8 -11 kDa. Un extracto de proteínas electroeluidas de peso molecular entre 8-11 kDa, fueron obtenidos a partir de un cultivo de *S. coelicolor* crecido a 30°C e inducido a 12°C durante 1 hora. El cultivo fue cosechado, sus células sonicadas y tratadas posteriormente según lo descrito en Materiales y Métodos. La primera dimensión fue un isoelectroenfoque y la segunda una electroforesis en gel de tricina. El gel posteriormente fue electrotransferido a una membrana de PVDF y teñido con azul de Coomassie. PM, pesos moleculares en kDa. pI, puntos isoeléctricos. La flecha indica la proteína de $\cong 9$ kDa cuya secuencia amino terminal fue determinada.

III.2.2.7.-Espectrometría de masa de proteínas acídicas de bajo PM.

Simultáneamente a la secuenciación de la proteína de 9 kDa se realizó la purificación y espectrometría de masa de otras proteínas acídicas y de bajo peso molecular. Para ello se realizó una electroforesis preparativa bidimensional en las condiciones ya descriptas. Luego de finalizada la corrida se tiñó el gel con azul de Coomassie y se lavó exhaustivamente con agua bidestilada. Inmediatamente fue registrado con un scanner y a cada una de las proteínas se les asignó un número del 1 al 11 para su posterior identificación (Figura 21). La espectrometría se realizó directamente en cada trocito del gel según lo descripto en Materiales y Métodos. El análisis del espectrograma de la proteína 5 (Figura 22) posibilitó reconocer un pico de 4,732 kDa que correspondía al peso molecular real (4,731 kDa) de un péptido interno de la proteína SCOF. Los fragmentos que se producen luego de la digestión de SCOF [108] con Endoproteinasa Lys-C son los siguientes:

Frag.	Posición	PM(kDa)	pI	Sequencia
1	1-7	0,693	9,67	(>)MASGTVK(W)
2	8-13	0,810	6,44	(K)WFNSEK(G)
3	58-67	0,997	3,91	(K)GPQAENITPA(<)
4	14-57	4,731	4,29	(K)GFGFIAQDGGGPDVFAHYSNINAQGYRE LQEGQAVTFDITQGQK(G)

Por otro lado, los datos del espectrograma de la proteína 1 (Figura 23) junto con la secuencia amino terminal permitieron reconocer en ésta una nueva proteína de estrés al frío no conocida hasta el momento. Aparecen en el espectrograma dos picos de 1,595 y 4,117 kDa que corresponderían a 2 péptidos internos deducidos de la secuencia nucleotídica del gen clonado (ver Capítulo 3).

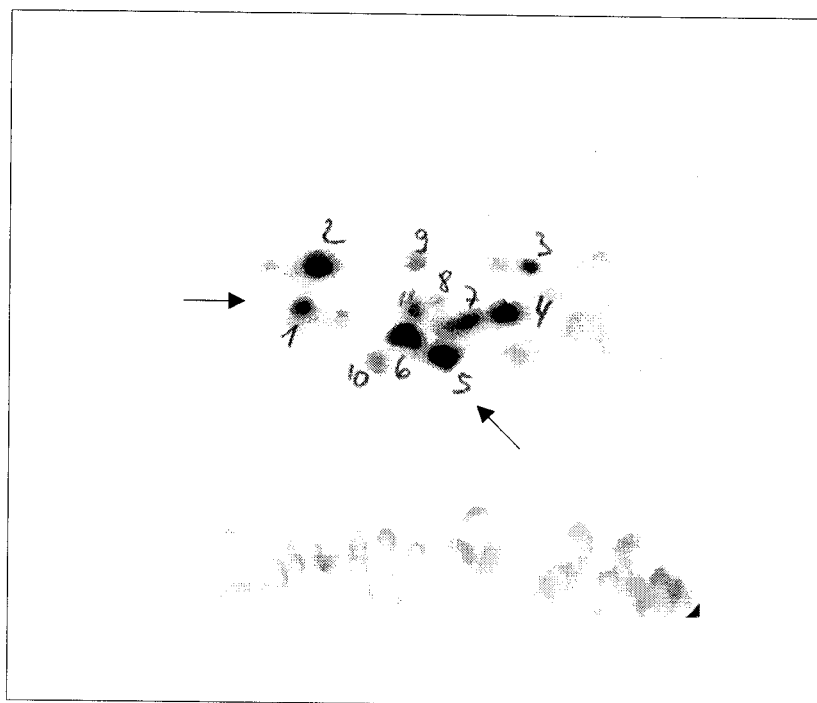


Figura 21: Purificación de las proteínas estudiadas por espectrometría de masa. Las proteínas ácidas y de bajo peso molecular fueron sometidas a electroforesis bidimensional para la su aislamiento y posterior estudio por espectrometría de masa. El extracto proteico utilizado y las condiciones de trabajo fueron las mismas a las descritas en la leyenda de la Figura 20. La digestión de las proteínas se realizó directamente en los trocitos de acrilamida. La enzima utilizada fue endoproteinasa Lys-C. Se asignaron números del 1 al 11 para su mejor identificación. Las flechas señalan las proteínas 1 y 5 que corresponden a la proteína de 9 kDa y a SCOF respectivamente.

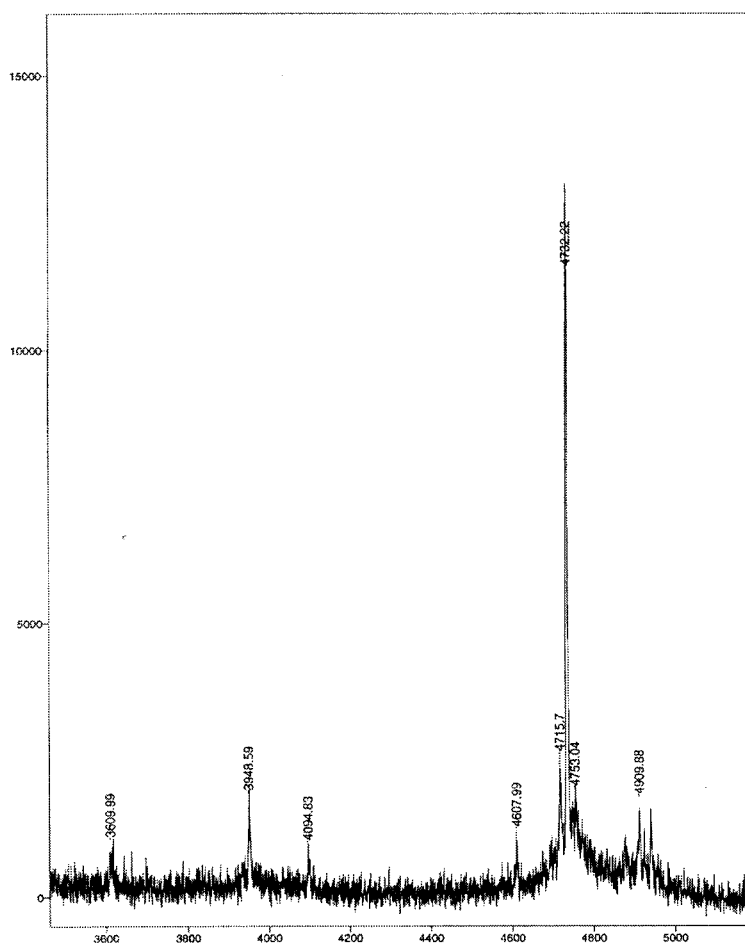


Figura 22: Espectrograma de la proteína 5 (SCOF). La espectrometría de masa de realizó según lo descrito en el texto. La proteína 5 se indica en la Figura 21.

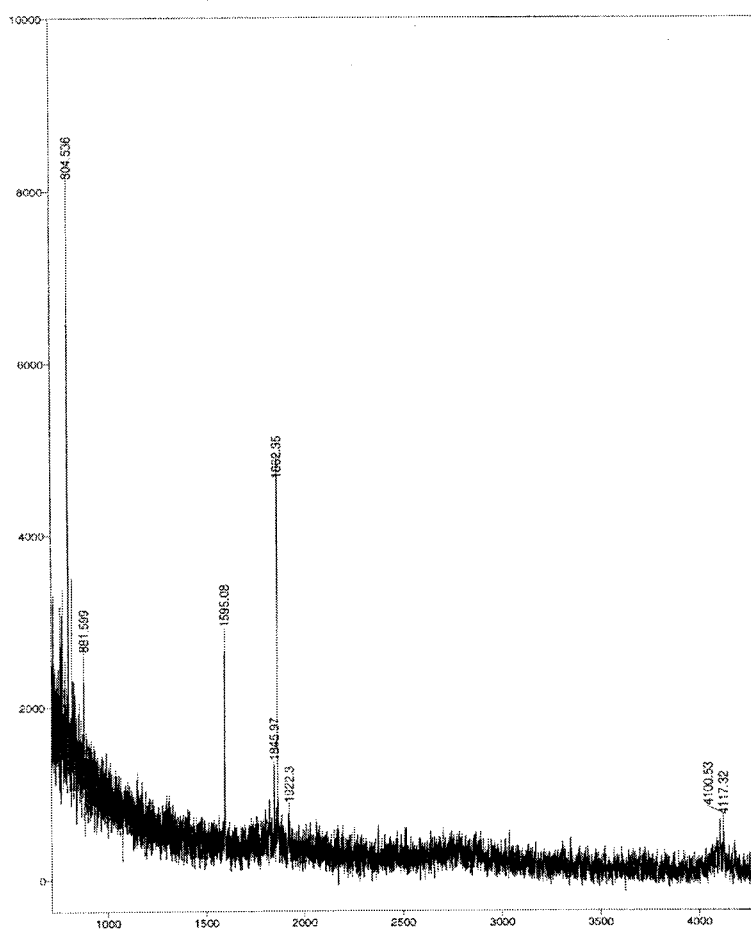


Figura 23: Espectrograma de la proteína 1 (9kDa). La espectrometría de masa se realizó según lo descrito en el texto. La proteína 1 se indica en la Figura 21.

III.2.3.-Discusión.

Se determinaron las condiciones de reproducibilidad del ciclo de crecimiento de *S. coelicolor* en medio mínimo líquido (MG), siguiendo diferentes parámetros fisiológicos. Cambios en el pH del medio y de la velocidad de síntesis proteica se correlacionaron con una disminución en el crecimiento entre 46-52 hs (Figuras 13, 14 y 15). El análisis de los perfiles proteicos de las muestras 1-11 marcados a 30°C, y que representan todo el ciclo de desarrollo de la bacteria, demostró que la primera fase de crecimiento rápido (CR1) finalizó a las 45 hs aproximadamente y abarca los puntos 1, 2, 3, 4 y 5. En el punto 6 se produjeron cambios muy apreciables con respecto al resto de las muestras. Estas importantes diferencias se correlacionaban también con el máximo valor de pH y una notable disminución de la síntesis proteica. Del resto de las muestras se pudo concluir solamente que los estadios de crecimiento 7 y 8 son muy parecidos entre sí como así también 9, 10 y 11. No fue posible realizar otras deducciones a partir de los perfiles proteicos monodimensionales. Como conclusión se puede decir que: muestras 1-5 pertenecen a CR1, 6-8 a fase T, 9 y 10 a CR2 y por último 11 a la fase S.

La realización de la base de datos en geles bidimensionales para el estudio de la expresión génica es una estrategia diferente a la que plantean los análisis bioquímicos y genéticos que se usan normalmente. Los resultados preliminares discutidos en la sección III.1.3., se basaron en una base de datos preexistente de *S. coelicolor* J1501 creciendo a 30°C y en medio mínimo líquido MG. Esta había sido realizada solamente en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12,5 % lo que restringía el conocimiento de la expresión de proteínas hasta aproximadamente 15 kDa. La nueva base de datos realizada como parte del trabajo de esta tesis, tuvo como objetivo ampliar el conocimiento desde dos puntos de vista: 1) estudiar la expresión proteica a 30°C y 12°C durante todo el crecimiento de la bacteria y especialmente en la fase de transición y 2) someter todas las muestras a electroforesis bidimensional en geles de tricina y SDS-PAGE. Las proteínas cuyas síntesis son inducidas o reprimidas durante la fase de transición y que estén relacionadas con el estrés al frío, serán confirmadas en el futuro a través de los análisis

estadísticos de los geles bidimensionales que forman parte de la nueva base de datos. No obstante será necesario diseñar estudios genéticos para confirmar sus roles fisiológicos.

Se llevó a cabo, por medio de la técnica de geles bidimensionales, la purificación y secuenciación amino terminal de una proteína de peso molecular aparente de 9 kDa, cuyo rol podría ser muy importante en el estrés fisiológico de la fase de transición como así también en el estrés hipotérmico. Además, con la misma técnica se purificaron otras proteínas ácidas (pI 3-5) y de bajo peso molecular (8-11 kDa), que fueron obtenidas a partir de un cultivo de *S. coelicolor* J1501 inducido a 12°C. Todas ellas fueron estudiadas con la técnica de espectrometría de masa. Tanto la secuencia amino terminal de la proteína de 9 kDa, como los datos provenientes del espectrograma de la proteína 1, correspondiente a la proteína purificada de 9 kDa (Figuras 21 y 23), demostraron que es una nueva proteína de estrés al frío. Además, se demostró que la proteína 5 (Figura 21) corresponde a la SCOF puesto que, un pico de 4,732 kDa que aparece en el espectrograma (Figura 22) coincide con la masa molecular real de uno de los péptidos internos de dicha proteína. Es importante recordar que SCOF es una proteína cuya secuencia se encontró en una búsqueda en el GeneBank (n° de acceso X92686) [108] y es homóloga a CspA de *E. coli* [93]. La superposición de los geles bidimensionales teñidos con azul de Coomassie y sus autoradiografías revelaron que la proteína 5 (SCOF) no manifiesta variación en su expresión durante el desarrollo y tampoco inducción en las condiciones estudiadas por estrés hipotérmico (dato no mostrado). CspA en *E. coli* es fuertemente inducida luego de un estrés por frío; sin embargo, se han identificado 8 genes homólogos a *cspA* de los cuales solamente 3 (*cspA*, *cspB* y *cspG*) son inducidos transcripcionalmente luego de la disminución de la temperatura [95] [94]. Otros genes de la familia se inducen como respuesta a otros estrés y de otros aún no se conocen sus funciones. En *B. subtilis*, por el contrario, sus tres genes *csp* son inducidos por el estrés al frío [98]. Esto quiere decir que la proteína SCOF en *S. coelicolor* podría estar relacionada con otras funciones fisiológicas o ser inducida por otros tipos de estrés.

Se estudió la expresión de la proteína de 9 kDa (proteína 1 de la Figura 21) en la fase logarítmica y de transición (Figuras 17 y 18). Se encontró que en los puntos 5 (fase

CR1) y 7 (fase T) de la curva la proteína era solamente inducida a 12°C y no se sintetizaba a 30°C. Sin embargo, en el punto 6 (fase T) se halló que la misma es producida a 30°C y su síntesis es inducida cuando los cultivos se pasan a 12°C. Este dato fue muy importante porque permitió disponer por primera vez de una proteína perfectamente caracterizada y purificada que fuera un punto en común entre la fase de transición y estrés al frío. No es extraño no haber encontrado dicha proteína inducida a 30°C en el punto 7, puesto que la expresión génica nunca es homogénea durante el transcurso de cualquier fase o estrés. Por ejemplo, cuando *E coli* es estresada a bajas temperaturas la respuesta inmediata es la inducción de proteínas de estrés al frío y simultáneamente la represión de las proteínas de estrés al calor [80]. CsdA y CspA se inducen para garantizar la traducción eficiente de los ARNm. Luego, a medida de que la célula se recupera del estrés hipotérmico ocurre lentamente la desrepresión de los genes de las HSPs [92]. Entonces, si pensamos que la proteína de 9 kDa cumple alguna función en la recuperación y readaptación a la disminución de la temperatura, como a las nuevas condiciones de crecimiento, podría explicarse porqué solamente la encontramos inducida a 30°C en el punto más crítico de la fase de transición y no después, cuando precisamente la célula ya se ha recuperado y muchos cambios han ocurrido para continuar su crecimiento utilizando nuevas fuentes de nitrógeno y carbono. Posiblemente las células son más sensibles al comienzo del estrés fisiológico que representa la fase T y no después (ver III.1.3.).

26

III.3- CAPÍTULO 3

III.3.-Capítulo 3: Clonado y caracterización del gen que codifica para la proteína TPP1 (9 kDa) de *S. coelicolor* J 1501.

III.3.1.-Introducción:

Con los datos de la secuencia amino terminal obtenidos de la proteína purificada de 9 kDa (de ahora en adelante TPP1 por transition phase protein 1), se llevó a cabo la búsqueda de secuencias homólogas en el GeneBank. Se encontró una secuencia, altamente homóloga, correspondiente a una proteína hipotética de función desconocida de 9,6 kDa de *Mycobacterium tuberculosis* (nº de acceso 1722987) [109]. Para clonar el gen *tpp1* de *S. coelicolor* se decidió utilizar como sonda heteróloga el gen de *M. tuberculosis* obtenido a partir de su amplificación por PCR.

III.3.2.-Resultados.

III.3.2.1.-Amplificación del gen que codifica la proteína hipotética de 9,6 kDa de *Mycobacterium tuberculosis*.

A partir de la secuencia del gen y de sus secuencias flanqueantes se diseñaron dos oligonucleótidos con el fin de amplificar por PCR dicho fragmento de ADN. Las secuencias de los oligos fueron: para el directo 5'-CTGAACCGTTCCGAGAAAGGCC-3' (n=22 y Tm=75°C) y para el reverso 5'-CGTATCGTGTTCATGTGCTCCGC-3' (n=22 y Tm= 75°C). Con estos oligos, que abarcan el gen completo, se esperaba amplificar un fragmento de ADN de 329 pb. En un mismo experimento se amplificaron menos de 10 ng de ADN de *M. tuberculosis* y de *S. coelicolor* J 1501 durante 25 ciclos. En un gel de agarosa 1% se corrieron las muestras pudiéndose comprobar que en la calle correspondiente a *Mycobacterium* aparecía un fragmento amplificado al tamaño esperado. Este fragmento se purificó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión para su posterior manipulación. La muestra de *Streptomyces* no mostró amplificación alguna.

III.3.2.2.-Clonado del gen *tpp1* de *Streptomyces coelicolor* J 1501.

Muestras conteniendo 2 μ g de ADN cromosomal de *S. coelicolor* J 1501 se digirieron con diversas enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes se corrieron en gel de agarosa 1 % durante 5 horas a 20 mA, y se transfirieron a filtros de nylon Hybond N+. El fragmento de 329 pb amplificado por PCR se marcó radioactivamente con [32 P]-dATP y se usó como sonda para el Southern blot. Las condiciones moderadas de hibridización (60°C, 5x SSC) y lavados utilizados, revelaron la existencia de una única banda de hibridización en cada una de las muestras analizadas (Figura 24). La digestión con la enzima de restricción *Sph* I dió un fragmento de $\cong$ 4,5 kpb conveniente para realizar el clonado. Para ello, 50 μ g de ADN de *S. coelicolor* J1501 se digirieron con *Sph* I y se corrieron en las mismas condiciones anteriores. En la región correspondiente a las 4,5 kpb se cortaron tres fragmentos de agarosa: uno del tamaño del fragmento deseado, otro por debajo y otro por encima de dicho peso molecular. El ADN purificado fue sujeto nuevamente a un análisis Southern blot usando la misma sonda proveniente de *M. tuberculosis*, con el fin de determinar qué fracción contenía el gen buscado. La fracción que dió hibridización positiva, se ligó en un pUC 19 digerido con *Sph* I y posteriormente tratado con fosfatasa alcalina. Esta mezcla de ligación se introdujo por electrotransformación en células competentes de *E. coli* XL1 Blue. Los clones transformantes se seleccionaron en cajas de LB-agar conteniendo ampicilina, IPTG y X-gal. La hibridización de las colonias blancas portadoras de los plásmidos recombinantes dió varios clones positivos, seleccionándose uno, al que se lo llamó pP1 y que contenía una sola copia del inserto de *Sph* I de 4,5 kpb.

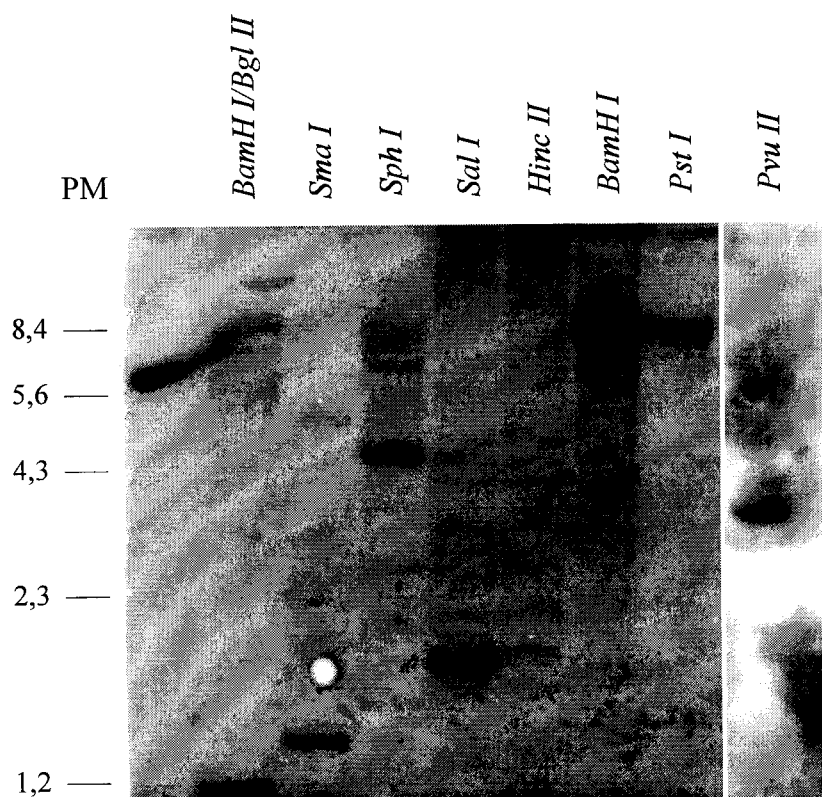


Figura 24: Identificación de las secuencias que codifican para el gen *tpp1* de *S. coelicolor*. Muestras conteniendo 2 μ g de ADN cromosomal de *S. coelicolor* J 1501 fueron digeridas con varias enzimas de restricción. Las mismas fueron analizadas por Southern blot, utilizándose como sonda el fragmento de PCR de 329 pb proveniente de *M tuberculosis*. PM: marcador de peso molecular en kpb.

III.3.2.3.-Secuenciación del fragmento de 4,5 kpb.

La estrategia desarrollada para la secuenciación del fragmento de 4,5 kpb consistió en la construcción de una serie de subclones, utilizándose para ello solamente las enzimas del sitio múltiple de clonado del pUC19. De la digestión del pP1 con *Sal* I y *Xma* I resultaron 4 fragmentos de $\cong 2,5$; 1,6; 1,1 y 0,65 kpb y de 3 fragmentos de $\cong 2,6$; 2,1 y 1,3 kpb respectivamente. Los siete fragmentos se purificaron a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión y se ligaron nuevamente en el pUC19 digerido ya sea con *Sal* I o *Xma* I a excepción de los fragmentos de 2,5 y 2,6 kpb que correspondían a secuencias del pUC19. Los nuevos subclones se denominaron:

pS1	frag. <i>Sal</i> I de 2,5 kpb religado
pS2	frag. <i>Sal</i> I de 1,6 kpb ligado en pUC19
pS3	frag. <i>Sal</i> I de 1,1 kpb ligado en pUC19
pS4	frag. <i>Sal</i> I de 0,65 kpb ligado en pUC19
pX1	frag. <i>Xma</i> I de 2,6 kpb religado
pX2	frag. <i>Xma</i> I de 2,1 kpb ligado en pUC19
pX3	frag. <i>Xma</i> I de 1,3 kpb ligado en pUC19

El plásmido pP1 también se digirió con la enzima *Bgl* II y un fragmento de $\cong 1,2$ kpb se aisló y religó en un sitio *Bam*H I del pUC18, para dar origen al pB2. Este último plásmido se digirió con la enzima *Hinc* II y tres fragmentos de esta digestión de $\cong 600$, 500 y 150 pb se religaron en pUC19 digerido con *Hinc* II para dar origen a los plásmidos pB₂H₁, pB₂H₂ y pB₂H₃ respectivamente. El inserto no contenía sitios para las enzimas *Hind* III, *Bam*H I, *Kpn* I y *Xba* I. La Figura 25 muestra el mapa de restricción del fragmento de 4,5 kpb y esquematiza la estrategia empleada para la secuenciación. La secuencia de ADN se realizó en ambas cadenas, utilizándose los oligonúcleótidos con la secuencia del cebador universal y reverso del pUC19. Cada secuencia se realizó como mínimo tres veces.

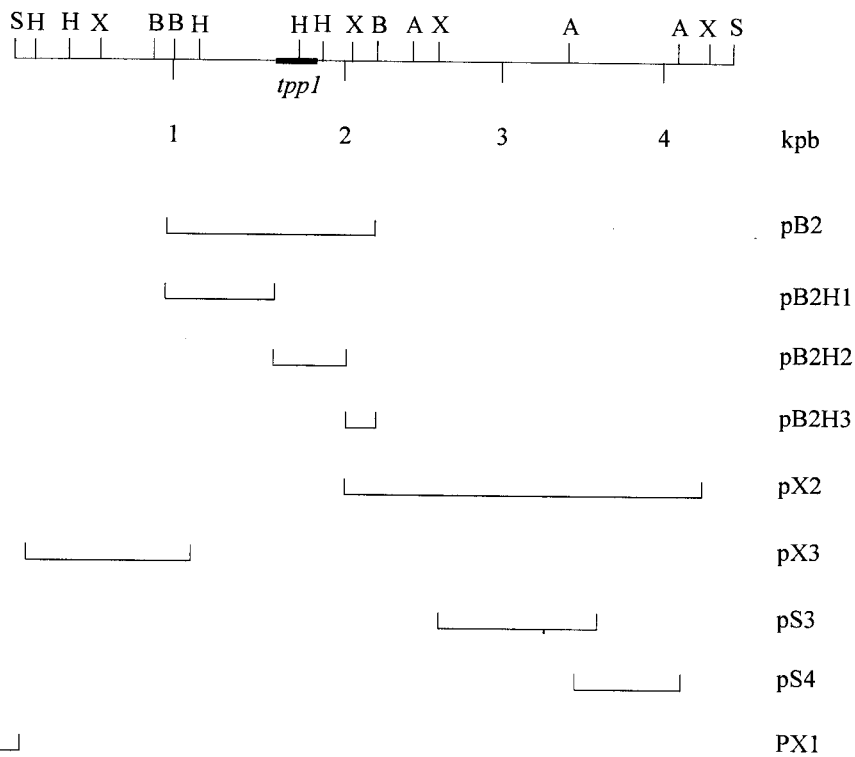


Figura 25: Mapa físico y estrategia de secuenciación del fragmento clonado en pP1. Los subclones fueron construidos y secuenciados como se indica en el texto. Las barras indican la extensión de algunos de los clones usados para la secuenciación. Está representada la región codificante del gen *tpp1* y algunos sitios de restricción: S, *Sph* I; H, *Hinc* II; X, *Xma* I; B, *Bgl* II, A, *Sal* I.

La secuencia nucleotídica que se muestra en la Figura 26 contiene 4 marcos abiertos de lectura (ORFs). El primero de ellos comienza con un codón ATG, precedido por dos posibles zonas de unión a ribosoma (GAAGA y GAGGAA) [110], en el nucleótido 188 del fragmento *Sph* I, extendiéndose 1.314 nucleótidos y terminando con un codón TGA. La secuencia reveló que este gen codifica una proteína de 438 aminoácidos con un peso molecular calculado de 46,256 kDa. La comparación de la secuencia aminoacídica de esta proteína con secuencias de proteínas previamente depositadas en el GeneBank, reveló una alta homología con treonina sintetasa de diversas bacterias, siendo las más homólogas en orden decreciente las de *Synechocystis* sp (n° de acceso D90908), *Methanococcus jannaschii* (n° de acceso U67587) y *Bacillus subtilis* (n° de acceso X04603). El codón de terminación de la treonina sintetasa mostró una superposición de 2 nucleótidos con el ATG del segundo ORF, que está precedido de una zona potencial de unión a ribosoma (GAGAGG) [110] (ver Figura 26). El segundo ORF se extiende desde el nucleótido 1.502 del fragmento clonado hasta el 1.774, terminando con un codón TGA. La secuencia de aminoácidos comprendida entre el codón 2 y el 12 de este marco de lectura, se corresponde completamente con la secuencia de los primeros 11 aminoácidos determinados por la degradación de Edman de la proteína purificada a partir de los geles bidimensionales (Capítulo 2). Además, las características de este polipéptido de 91 aminoácidos, de 9,569 kDa y un pI calculado de 4,7, son consistentes con el peso molecular aparente y pI determinados empíricamente (9 kDa y pI= 4,5). Por lo tanto, se concluye que este marco de lectura es la región codificante de un gen homólogo encontrado en *M. tuberculosis* y que codifica para una proteína de 9,6 kDa de función desconocida. Este nuevo gen se denominó *tpp1*.

Además de la homología de TPP1 con la proteína deducida de un ORF de *M. tuberculosis*, se encontró también homología con otras dos proteínas hipotéticas y de función desconocida. Una de ellas de 109 aminoácidos correspondiente a *Synechocystis* sp (n° de acceso 1653220) [111] y la otra, de 88 aminoácidos, encontrada en *Archaeoglobus fulgidus* (n° de acceso g2650067) [112] (Figura 27).

Corriente abajo del gen *tpp1*, desde los nucleótidos 1.777 hasta el 2.195 existe una zona intergénica. No se observaron estructuras que pudieran funcionar como terminador transcripcional factor Rho independiente aunque sí se encontró una secuencia de repetición invertida pero que, por su característica energética no parece funcionar como terminador.

El tercer marco de lectura abierto encontrado comienza con un codon ATG en el nucleótido 2.196, y termina con un codon TGA en el nucleótido 2.396. La secuencia reveló que este marco de lectura codifica para una proteína de 67 aminoácidos de peso molecular y pI calculados de 7,387 kDa y 4,7 respectivamente. Sorprendentemente, al comparar esta secuencia con otras depositadas previamente en el GeneBank, se encontró que este marco de lectura tiene una alta homología a una proteína de estrés al frío de la familia de las Csp. Este nuevo gen se denominó *csp1*. La misma no se corresponde exactamente con la Csp SCOF, homóloga a CspA de *E. coli* (Capítulo 2). No se halló a esta proteína entre aquellas de bajo peso molecular y ácidas analizadas por espectrometría de masa. Existe, además, una tercera Csp en *S. coelicolor* que fue secuenciada simultáneamente a la realización de este trabajo (C. Thompson, comunicación personal), y de la cual aún no hay elementos para determinar su función. En la Figura 28 se muestra la comparación de las secuencias aminoacídicas de la proteína Csp1 secuenciada con la proteína más homóloga hallada en el GeneBank, la CspLb de *Listeria monocytógenes* (n° de acceso U90213) y SCOF. Corriente abajo se encontró, entre los nucleótidos 2.432 y 2.470, una secuencia de repetición invertida que podría funcionar como un terminador transcripcional factor Rho independiente.

Por último, en el nucleótido 2.727 comienza el ATG del cuarto ORF encontrado y que está incompleto. Entre el tercero y cuarto marcos de lectura, existe una zona intergénica que se extiende desde el nucleótido 2.399 hasta el 2.726. Este ORF corresponde al gen *groEL2*. En la Figura 29 se muestra la organización genética del fragmento *Sph* I secuenciado.

45 GCA TGC CGG GGT CGC CGC GTG CGC CAC CGC GAA ACA ACT TTC ATA
 90 CCG CTC ATC CAA AGG GGC AGA GGG ATA CGG CCC GAT GAA GCC CCG
 135 GCA ACC CTC CAG TCG GTT CTT GTC ACA CGG ACG TGG CGA GGC TCC
 180 CGG CTA GGG AAG GTG CCA AAT CCG TCT CAC GGC GAA GAT GCG TCG
 225 TGA GGA AGA *thr sintetasa* SD TGA GGA GAA AGG GCC TCG CCT CCA TGG CTG TGC AGA
 270 SD M R R K G L A S M A V Q T
 315 CTG CCG AAA CCT CCA CGA ACC CCA CCG ACG CCG CCG TCG ACC TCG
 360 A E T S T N P T D A A V D L G
 405 GCC CCG CCA CCG CGC TGA GCT GCC GGG AGT GCG GCC ACA GGG TCC
 450 P A T A L S C R E C G H R V P
 495 CGC TCG GAC CGG TCT TCG CCT GCG AAG AGT GTT TCG GCC CCC TCG
 540 L G P V F A C E E C F G P L E
 585 AGA TCG CCT ACG ACT TCT CGG CCT ACG ACG CCG AAG AGC TGC GCA
 630 I A Y D F S A Y D A E E L R K
 AGC GGA TCG AAG CCG GCC CCG CGA ACA TCT GGC GCT ACG CCC CCC
 R I E A G P A N I W R Y A P L
 TGC TGC CCG TCC CGG CCG ACG TCG CGA CCA AGC CGA ACA TCA ACC
 L P V P A D V A T K P N I N P
 CCG GCT GGA CCA AGC TCG TCC AGG CCG ACA ACC TCG CCC GCG AGC
 G W T K L V Q A D N L A R E L
 TGG GCG TCA CCG GCG GCC TGT ACG TCA AGG ACG ACT CCG GCA ACC
 G V T G G L Y V K D D S G N P
 CCA CGC ACT CCT TCA AGG ACC GCG TCG TCG CCC AGG CCA TCG AGG
 T H S F K D R V V A Q A I E A
 CCG CCC GCG CCT TCG GCT TCA CCA CCC TGT CCT GCT CCT CCA CCG

24

675 A R A F G F T T L S C S S T G
GCA ACC TCG CCG GTG CCG TCG GCG CCG CCG CCG CCC GGG CCG GCT
720 N L A G A V G A A A A R A G F
TCC GCT CCT GCG TGT TCA TCC CGC ACG ACC TGG AGC AGG GCA AGG
765 R S C V F I P H D L E Q G K V
TCG TCA TGG CCG CCG TCT ACG GCG GTG AGC TGG TCG GCA TCG AGG
810 V M A A V Y G G E L V G I E G
GCA ACT ACG ACG ACG TGA ACC GCT TCT GCT CCG AGC TGA TCG GCG
855 N Y D D V N R F C S E L I G D
ACC CGG CCG GCG AGG GCT GGG GCT TCG TCA ACG TCA ACC TGC GGC
900 P A G E G W G F V N V N L R P
CGT ACT ACG CCG AGG GTT CCA AGA CCC TCG CCT ACG AGA TCT GCG
945 Y Y A E G S K T L A Y E I C E
AGC AGC TCG GCT GGC GGC TGC CCG ACC AGA TCG TCG TGC CGA TCG
990 Q L G W R L P D Q I V V P I A
CCT CCG GCT CCC AGC TGA CGA AGA TCG ACA AGG GGC TCA AGG AGC
1035 S G S Q L T K I D K G L K E L
TGA TCG AGC TGG GTC TGG TCG AGG ACC GGC CGT ACA AGA TCT TCG
1080 I E L G L V E D R P Y K I F G
GCG CGC AGG CCG AGG GCT GCT CGC CGG TCT CCA CGG CGT ACA AGG
1125 A Q A E G C S P V S T A Y K A
CCG GGC ACG ACG TGG TCC GCC CGC AGA AGC CGA ACA CCA TCG CCA
1170 G H D V V R P Q K P N T I A K
AGT CGC TGG CCA TCG GCA ACC CCG CCG ACG GCC CCT ACG TCC TCG
1215 S L A I G N P A D G P Y V L D
ACA TCG CCC GCC GCA CCG GCG GCG CCG TGG AGG ACG TGA CCG ACG
1260 I A R R T G G A V E D V T D E
AGC AGG TCG TGG ACG CGA TCA AGC TGC TCG CCC GTA CCG AGG GCA

214

1305 Q V V D A I K L L A R T E G I
TCT TCG CGG AGA CGG CGG GCG GCG TGA CGG TCG GCG TCA CCA GGA
1350 F A E T A G G V T V G V T R K
AGC TGA TCG AGA ACG GCG TCC TCG ACC CCT CGC TCA CCA CCG TCG
1395 L I E N G V L D P S L T T V V
TCC TGA ACA CCG GAG ACA GCC TGA AGA CCC TCG ACG CGG TGG CCG
1440 L N T G D S L K T L D A V A G
GCA TCG GTC TCA CCG CCA CCA TCC GCC CGA ACC TGG ACT CCT TCC
1485 I G L T A T I R P N L D S F R
GAG AGG CTG GCC TCG CAT GAG CGT GAC CGT TCG CAT CCC GAC CAT
1530 SD tpp1 M S V T V R I P T I
E A G L A *
CCT GCG CAC CTA CAC CGG CGG CAA GGC CGA AGT GAG CGC CGA CGG
1575 L R T Y T G G K A E V S A D G
GGC CAA CCT CGG GGA GGT CAT CTC CGA CCT GGA GAA GAA CCA CAC
1620 A N L G E V I S D L E K N H T
CGG CAT CGC CGC CCG CGT CCT GGA CGA CCA GGG CAA GCT GCG CCG
1665 G I A A R V L D D Q G K L R R
CTT CGT CAA CGT CTA CGT CAA CGA CGA CGA CGT CCG CTT CGA GCA
1710 F V N V Y V N D D D V R F E Q
GGG CCT CCA GAC GGC CAC CCC GGA CGG CGC GGG CGT CTC GAT CAT
1755 G L Q T A T P D G A G V S I I
CCC GGC GGT CGC CGG CGG CTG ATT CGC CGC GGA TAC ACC TGG TAG
1800 P A V A G G *
TGC GTA TTG CCC TCT CCG TGA GAG AAA CGG AGG GGG CAA TTC CAT
1845 
GTG GTT GAG CGC GGT AGA GTT GGG GAA CGC GCT CCC GAT CAA CAC
1890
AAC GGG AAC CGT TAA TTC CTG CCG CCC GCC CGA CAA GAA GCA GCC
1935

20

1980 AAA GTG CGA GCG TAT TTC GCG GCT TTT GTT CCC TTT GCG TGA CCC

2025 GAC TTG ACC CGA ATT CAG GCG AAT TCT CGC CAC ATT CCG GAC CGG

2070 GCG CGT CCA GAT TTC TCG TCC GAT TGA CCT GTT GCA GAC GGC AGT

2115 TGG ACA GAT ACA TTC AGC CGC GGT CGA CGC GTT CCG GCG CAC GCC

2160 CCC AGT CGT GAG GGG GCG AGG TCT GAC CCG GGT CCG CGA AGT GCG

2205 GAT CTG TGC AAG GGC CAG TAA TAG GGG AGT TAG GCA TGG CTC AGG

csp1 SD M A Q G

2250 GCA CCG TCA AGT GGT TCA ACG CGG AGA AGG GGT ACG GCT TCA TCG

T V K W F N A E K G Y G F I A

2295 CGG TCG ACG GTG GTG CGG ATG TTT TCG TCC ACT ACA GCG CGA TTC

V D G G A D V F V H Y S A I Q

2340 AGA TGG ACG GCT ACC GCA CCC TCG AAG AAG GCC AGC GGG TCG AGT

M D G Y R T L E E G Q R V E F

2385 TCG AGA TCT CGC AGG GTC AGA AGG GCC CGC AGG CCG ACA TGG TTC

E I S Q G Q K G P Q A D M V R

2430 GCC TCA GCG CCT GAG ACG CGC GGC CAC CGC AGC ACC CGG TCT TCA

L S A *

2475 TCC GAA GGG CCC GTA CCT CCA GGG GTA CGG GCC CTT CGG CCT GCC

2520 CGG ACG CCC GTC GTC CCG CTG TTC GCG GGT GGC TGA CCG GAC GGC

2565 CCG ATC CCC GAG AGG CGC TTG CAC TCG ACC ATG CCG AGT GCT AAT

2610 CAT TGG CGT TAG CAC TCT GAA GGT GAG AGT GAC AAC CAA CGA CCG

2655 GGT CGG TGA GGC CCG CAG GCC GGG TGG GGA AGG AAC CAC AAG GCC

GGC GAG CCG TCC GTC CCG GGC GCG GGC GCG GTC CGA AGG AAT CAC

206

2700

CCC CAG TCC TGG AGG GAC CAC TTC ACA TGG CCA AGA TCA TCG CGT
2745

groEL2 SD M A K I I A F

TCG ACG AGG AGG CGC GGC GCG GCC TCG AGC GCG GCA TGA ACC ACG
2790

D E E A R R G L E R G M N H V

TCG CGG ACG CCG TCA AGG TGA CGC TCG GCC CCA AGG GCC GCA ACG
2835

A D A V K V T L G P K G R N V

TCG TCC TCG AGA AGA AAT GGG GCG CCC CCA CGA TCA CCA ACG ATG
2880

V L E K K W G A P T I T N D G

GTG TCT CCA TCG CCA AGG AGA TCG AGC TCG AGG ACC CGT ACG AGA
2925

V S I A K E I E L E D P Y E K

AGA TCG GCG CCG AGC TGG TCA AGG AAG TCG CCA AGA AGA CGG ACG
2970

I G A E L V K E V A K K T D D

ACG TTG CCG GTG ACG GTA CGA CCA CCG CGA CCG TTC TCG CCC AGG
3015

V A G D G T T T A T V L A Q A

CCC TGG TCA GGG AAG GGC TGC GCA ACG TTG CGG CCG GCG CCA ACC
3060

L V R E G L R N V A A G A N P

CGA TGG CCC TGA AGC GCG GTA TCG AGA AGG CCG TCG AGG CGG TTT
3105

M A L K R G I E K A V E A V S

CCG CCG CCC TGC TCG AGC AGG CCA AGG ACG TCG AGA CCA AGG AGC
3150

A A L L E Q A K D V E T K E Q

AGA TCG CCT CCA CGG CCT CGA TCT CCG CCG CCG ACA CCC AGA TCG
3195

I A S T A S I S A A D T Q I G

GCG AGC TCA TCG CCG AGG CCA TGG ACA AGG TCG GCA AGG AAG GCG
3240

E L I A E A M D K V G K E G V

TCA TCA CCG TCG AGG AGT CCC AGA CCT TCG GTC TGG AGC TGG AGC
3285

I T V E E S Q T F G L E L E L

TCA CCG AGG GTA TGC GCT TCG ACA AGG GCT ACA TCT CGG CGT ACT

3330 T E G M R F D K G Y I S A Y F
 TCG CCA CCG ACA TGG AGC GTA TGG AGG CGT CGC TCG ACG ACC CGT
 3375 A T D M E R M E A S L D D P Y
 ACA TCC TGA TCG CCA ACT CCA AGA TCG GCA ACG TCA AGG ACC TGC
 3420 I L I A N S K I G N V K D L L
 TGC CGC TCC TGG AGA AGG TCA TGC AGT CGG GCA AGC CGC TGC TGA
 3465 P L L E K V M Q S G K P L L I
 TCA TCG CCG AGG ACG TCG AGG GCG AAG CCC TGT CGA CCC TGG TCG
 3510 I A E D V E G E A L S T L V V
 TCA ACA AGA TCC GCG GCA CCT TCA AGT CCG TCG CCG TCA AGG CTC
 3555 N K I R G T F K S V A V K A P
 CGG GCT TCG GCG ACC GCC GCA AGG CCA TGC TCG GCG ACA TCG CCA
 3600 G F G D R R K A M L G D I A I
 TCC TCA CGG GCG GCG AGG TCA TCT CCG AGG AGG TCG GCC TCA AGC
 3645 L T G G E V I S E E V G L K L
 TCG AGA ACG CCA CGC TGG ACC TGC TGG GCA GCG CGC GCA AGG TCG
 3690 E N A T L D L L G S A R K V V
 TCA TCA CCA AGG ACG AGA CCA CGA TCG TGG ACG GCG CCG GTT CGG
 3735 I T K D E T T I V D G A G S A
 CCG AAC AGG TTC AGG GCC GCG TCA ACC AGA TCC GCG CCG AGA TCG
 3780 E Q V Q G R V N Q I R A E I E
 AGA ACA GCG ACT CGG ACT ACG ACC GCG AGA AGC TCC AGG AGC GCC
 3825 N S D S D Y D R E K L Q E R L
 TGG CGA AGC TGG CCG GCG GCG TGG CCG TCA TCA AGG CCG GTG CCG
 3870 A K L A G G V A V I K A G A A
 CCA CGG AGG TCG AGC TCA AGG AGC GCA AGC ACC GCA TCG AGG ACG
 3915 T E V E L K E R K H R I E D A
 CCG TTC GCA ACG CGA AGG CGG CCG TCG AGG AGG GCA TCG TCG CCG

```

3960      V   R   N   A   K   A   A   V   E   E   G   I   V   A   G
      GTG GTG GCG TGG CCC TGC TCC AGG CCT CCC AGG TCT TCG AGA AGC
4005      G   G   V   A   L   L   Q   A   S   Q   V   F   E   K   L
      TGG AGC TGA CGG GTG ACG AGG CGA CCG GCG CCA ACG CCG TGA AGC
4050      E   L   T   G   D   E   A   T   G   A   N   A   V   K   L
      TCG CCC TGG AGG CCC CGC TGA AGC AGA TCG CCG TCA ACG GCG GTC
4095      A   L   E   A   P   L   K   Q   I   A   V   N   G   G   L
      TCG AGG GCG GCG TCG TCG TGG AGA AGG TCC GCA ACC TGA CCG TCG
4140      E   G   G   V   V   V   E   K   V   R   N   L   T   V   G
      GCC ACG GCC TGA ACG CCG CCA CCG GTG AGT ACG TCG ACA TGA TCG
4185      H   G   L   N   A   A   T   G   E   Y   V   D   M   I   A
      CCG AAG GCA TCA TCG ACC CGG CGA AGG TGA CCC GCT CTG CCC TGC
4230      E   G   I   I   D   P   A   K   V   T   R   S   A   L   Q
      AGA ACG CCG CCT CCA TCG CCG CGC TGT TCC TCA CCA CCG AGG CCG
4275      N   A   A   S   I   A   A   L   F   L   T   T   E   A   V
      TCA TCG CCG ACA AGC CCG AGA AGG CCG CTC CGG CGG GCG CCC CGG
4320      I   A   D   K   P   E   K   A   A   P   A   G   A   P   G
      GCG GCA TGC
4329      G   M

```

Figura 26: Secuencia nucleotídica de los genes *thr* sintetasa, *tpp1*, *csp1* y *groEL2* de *S. coelicolor* y estructura primaria de los polipéptidos codificados. Los sitios consenso de unión a ribosomas (SD) se muestran subrayados. Los asteriscos muestran los codon de terminación ATG. Se indican mediante flechas las secuencias de repetición invertida CIRCE (en negritas), motivo 5'-GCACTCN₉GAGTGC, ubicadas corriente arriba del gen *groEL2*. Las flechas vacías señalan la secuencia de repetición invertida que actuaría como terminador transcripcional corriente abajo de *csp1*. Las flechas de puntos indican las secuencias de repetición invertida en la zona intergénica entre *tpp1* y *csp1*.

Figura 27: Comparación de proteínas homólogas a TPP1. Comparación de la secuencia aminoacídica de la proteína TPP1 con tres secuencias de proteínas hipotéticas homólogas. AF, *Archaeoglobus fulgidus*; MT, *Mycobacterium tuberculosis*; S, *Synechocystis* sp. Las regiones en recuadro indican la presencia de aminoácidos idénticos. Los guiones indican la ausencia de aminoácido.

	M	A	X	G	T	V	K	W	F	N	S	E	K	G	F	G	F	I	A	V	Majority
										10										20	
1	M	A	Q	G	T	V	K	W	F	N	A	E	K	G	Y	G	F	I	A	V	CSP1.PRO
1	M	Q	T	G	T	V	K	W	F	N	S	E	K	G	F	G	F	I	E	V	CSPL.PRO
1	M	A	S	G	T	V	K	W	F	N	S	E	K	G	F	G	F	I	A	Q	SCOF.PRO
	D	G	G	X	-	D	V	F	V	H	Y	S	A	I	X	X	X	G	Y	R	Majority
											30									40	
21	D	G	G	A	-	D	V	F	V	H	Y	S	A	I	Q	M	D	G	Y	R	CSP1.PRO
21	E	G	G	D	-	D	I	F	V	H	F	S	A	I	E	G	E	G	F	K	CSPL.PRO
21	D	G	G	G	P	D	V	F	A	H	Y	S	N	I	N	A	Q	G	Y	R	SCOF.PRO
	T	L	X	E	G	Q	X	V	E	F	E	I	X	Q	G	Q	K	G	P	Q	Majority
											50									60	
40	T	L	E	E	G	Q	R	V	E	F	E	I	S	Q	G	Q	K	G	P	Q	CSP1.PRO
40	T	L	D	E	G	Q	S	V	E	F	E	I	V	E	G	Q	R	G	P	Q	CSPL.PRO
41	E	L	Q	E	G	Q	A	V	T	F	D	I	T	Q	G	Q	K	G	P	Q	SCOF.PRO
	A	E	X	V	T	-	X	A													Majority
60	A	D	M	V	R	L	S	A													CSP1.PRO
60	A	E	K	V	T	-	K	L													CSPL.PRO
61	A	E	N	I	T	-	P	A													SCOF.PRO

Figura 28: Comparación de proteínas homólogas a CSP1. Comparación de la secuencia aminoacídica de la proteína CSP1 de *S. coelicolor* con las secuencias de CSP de *L.monocitógenes* y SCOF. Las regiones en recuadro indican la presencia de aminoácidos idénticos. Los guiones indican ausencia de aminoácido.

Organización genética del fragmento clonado

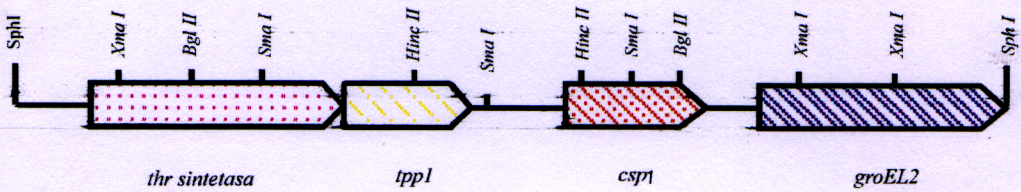


Figura 29: Organización genética del fragmento clonado. Se ven esquematizados los cuatro marcos de lectura secuenciados del fragmento *Sph I*. Los mismos están codificados en la misma cadena y en la misma dirección. Se muestran algunos sitios de restricción.

III.3.2.4.-Búsqueda de secuencias homólogas a los genes *thr* y *tpp1* en ADN cromosomal de *S. coelicolor* J 1501.

Con el fin de confirmar si existirían uno o más genes homólogos a aquellos encontrados en el fragmento *Sph* I clonado, se llevó a cabo un análisis por Southern blot del ADN cromosomal de *S. coelicolor* J1501, utilizándose como sondas fragmentos internos de los genes *thr* sintetasa y *tpp1*:

TS: un fragmento *Xho* I-*Msc* I de 816 pb interno al gen *thr*, obtenido del plásmido pP1.

TP: un fragmento *Nae* I-*Fsp* I de 233 pb interno al gen *tpp1*, obtenido del plásmido pP1.

En la Figura 30 se muestra la autoradiografía de la membrana hibridizada con la sonda TS. La sonda hibridizó con los fragmentos esperados deducidos de la secuencia. Sin embargo, las digestiones realizadas con *Xho* I, *Bgl* II y *Bam*H I/*Bgl* II muestran otras bandas adicionales que no se corresponden con el gen de la *thr* secuenciado, debido a que la sonda utilizada no posee sitios internos *Xho* I y *Bam*H I. En cambio, el fragmento TS tiene tres sitios para *Bgl* II; uno de los que se genera es de 135 pb el cual no se ve en este Southern blot. Entonces, los cortes *Xho* I, *Bgl* II y *Bam*H I/*Bgl* II demuestran que podría existir otro gen homólogo a la treonina sintetasa clonada en este trabajo.

El Southern blot realizado con la sonda TP mostró las bandas esperadas deducidas de la secuencia, lo cual demostró que el gen *tpp1* existe en copia única (dato no mostrado).

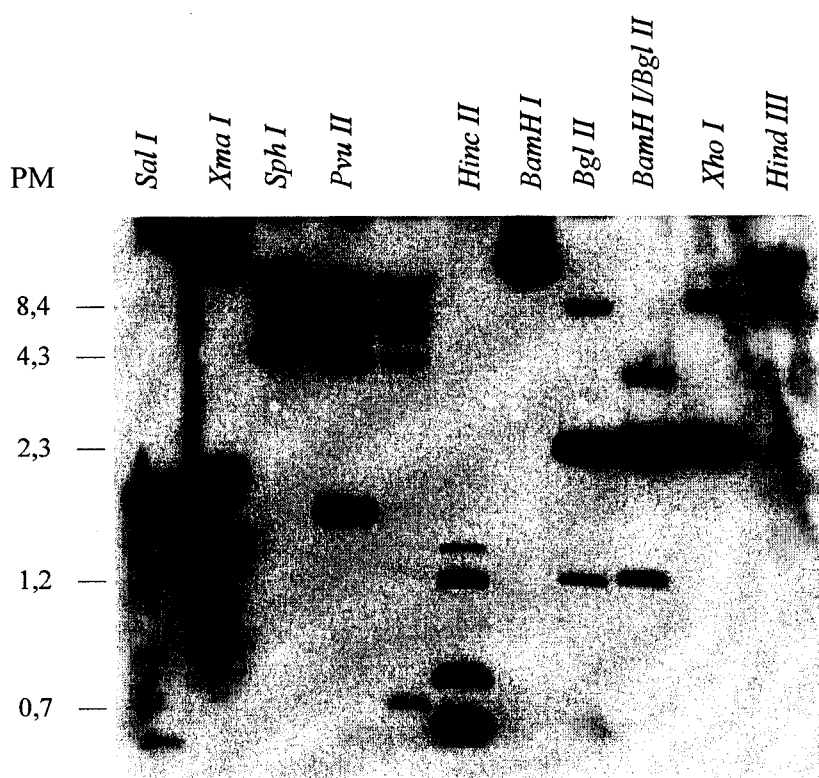


Figura 30: Análisis de Southern blot de ADN cromosomal de *S. coelicolor* usando la sonda TS. Muestras conteniendo 2 µg de ADN cromosomal de *S. coelicolor*, fueron digeridas con diferentes enzimas, transferidas a filtros de nylon y sujetas a hibridización (65°C, 5X SSC). La sonda TS, descrita en el texto, se marcó con [³²P]-dATP. PM, marcadores de peso molecular en kpb.

III.3.2.5.-Búsqueda de secuencias homólogas a *tpp1* en otras bacterias.

Con el objeto de determinar si el gen *tpp1* encontrado en *S. coelicolor* J1501 también estaba en otros actinomycetes, se decidió realizar un Southern blot con muestras provenientes de *S. lividans* TK24, *S. griseus*, *S. parvulus* y *Nocardia* NRRL 5646. ADN cromosomal de diferentes bacterias fueron digeridos con la enzima *Sma* I e hibridizados con la sonda proveniente de *M. tuberculosis*. Las señales obtenidas demostraron que todas las bacterias estudiadas poseen dicho gen (Figura 31).

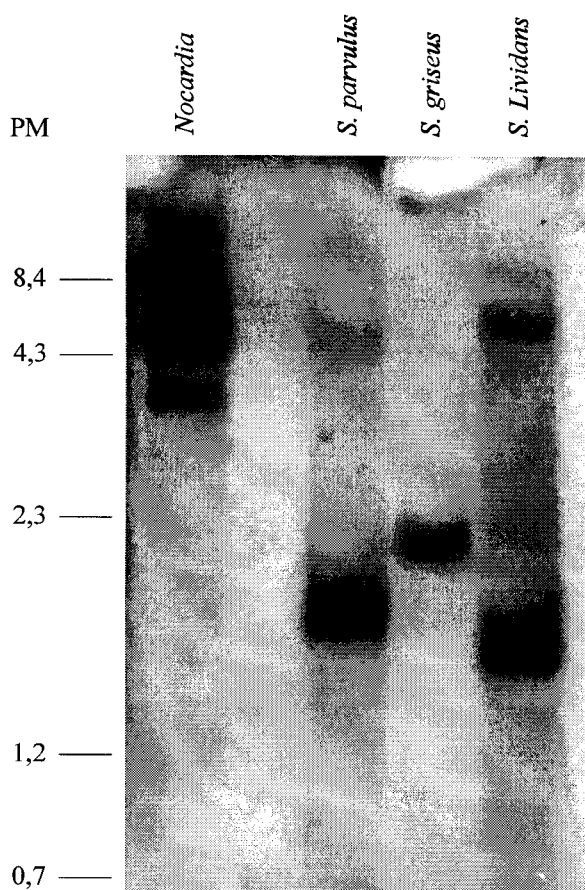


Figura 31: Southern blot de ADN cromosomal de diferentes bacterias. 2µg ADN cromosomal de provenientes de otras bacterias fueron digeridas con la enzima *Sma* I y luego tranferidos desde la agarosa a una membrana de nylon según lo descripto en Materiales y Métodos. Se muestra la autoradiografía. La sonda utilizada se marcó con [³²P]-dATP y fue el fragmento de *M. tuberculosis*. La hibridización se llevó a cabo a 60°C. PM, marcadores de peso molecular en kpb.

24

III.3.3.-Discusión:

En base a la secuencia amino terminal de la proteína de 9 kDa, se realizó una búsqueda de proteínas homólogas en el GeneBank. Se encontró una secuencia correspondiente a una proteína hipotética de función desconocida de 9,6 kDa de *Mycobacterium tuberculosis* y de *Synechocystis* sp. Con el uso de las técnicas de PCR, Southern y construcción de una minibiblioteca genómica, se llevó a cabo el clonado de un fragmento de ADN de *S. coelicolor* J1501 de 4.329 kpb. Este fragmento fue totalmente secuenciado y del análisis de dicha secuencia, se hallaron cuatro marcos abiertos de lectura codificados en la misma cadena (Figuras 26 y 29). El primero de ellos corresponde a un gen que codificaría una treonina sintetasa, *thr*, y se halla traduccionalmente acoplado al segundo marco de lectura. El análisis de este segundo *orf*, denominado *tpp1*, reveló que el mismo codifica para una proteína de 91 aminoácidos cuya secuencia amino terminal, deducida de la secuencia nucleotídica, era coincidente con la obtenida por degradación de Edman de la proteína de 9 kDa inducida por estrés al frío. Además, los datos obtenidos del espectrograma de la proteína 1 (Figura 23, Capítulo 2) confirmarían que la proteína purificada está codificada por el gen *tpp1* clonado, pues dicho ORF contiene dos péptidos internos de 1594 y 4117 Da que coinciden exactamente con los picos de 1595 y 4117 respectivamente, observados en el espectrograma de la Figura 23. La existencia de genes acoplados traduccionalmente es un fenómeno no poco común en *Streptomyces*. Por ejemplo, muchos genes que intervienen en la diferenciación morfológica y en la biosíntesis de antibióticos se encuentran acoplados [113].

Corriente abajo del gen *tpp1* no se han encontrado estructuras que pudieran funcionar como terminadores transcripcionales Rho independiente. En cambio, corriente abajo del gen *csp1* se encuentra una repetición invertida que es ciertamente un terminador transcripcional (Figura 26). Estos datos sugieren que los genes *thr*, *tpp1* y *csp1* podrían estar formando un operón. De ser esto cierto, debería estar también inducida por estrés hipotérmico la proteína Csp1. Sin embargo, por los análisis de los

espectrogramas, no se detectó ninguna proteína inducida que correspondiera al gen *csp1*. Queda por averiguar si la proteína de 8 kDa, que se detectó inducida en los estudios realizados con geles bidimensionales de tricina, es de la familia de las Csp. (ver III.2.2.4.). En *S. coelicolor*, hasta el momento, se conocen tres proteínas Csp que formarían una familia como en *E. coli* [94]: una de ellas, SCOF [108], sobre la cual no se ha realizado ningún tipo de estudio; la segunda, la Csp secuenciada en esta tesis y que tiene su mayor homología con la CspLb de *Listeria monocytogenes* (n° de acceso U90213) (Figura 28); la tercera, una Csp de la cual no se conoce su función y que fue recientemente clonada y secuenciada simultáneamente a la realización de este trabajo (C. Thompsom, comunicación personal). Si el gen *csp* secuenciado no forma parte de un operón como se propuso, no necesariamente debería responder al estrés por frío, sino que su inducción podría deberse a otras causas. Por ejemplo, CspA, CspB y CspG en *E. coli* son inducidas por estrés hipotérmico; en cambio, CspD se induce por privación nutricional [96]. La presencia en *S. coelicolor* de una familia de Csp tan extensa como en *E. coli* es todavía una incógnita que necesita ser resuelta. Los *Streptomyces* son bacterias del suelo que pueden sobrevivir a diversos cambios ambientales como temperatura, pH, osmolaridad, anoxia, etc. Entonces, si se especula que *E. coli* posee una gran variedad de proteínas Csp homólogas, como resultado de la adaptación a diferentes estrés, es de esperar que los *Streptomyces* también posean una familia Csp que le permitiría adaptarse a diferentes condiciones ambientales.

Finalmente, corriente abajo aparece el cuarto ORF que se encuentra incompleta. El análisis de su secuencia reveló que corresponde al gen *groEL2* [114]. En la mayoría de las especies de *Streptomyces* se han encontrado dos genes *groEL* que no son adyacentes en el cromosoma. *groEL1* se encuentra junto a *groES* en un mismo operón, no así *groEL2* [114] [115]. La presencia de un gen *groEL* más un operón *groSL* también se observó en otras especies *Mycobacterium* [116] [117]. En la región corriente arriba de *groEL2*, se localizaron dos secuencias de repetición invertida llamadas CIRCE (5'-GCACTCN₉GAGTGC-3') (Figura 26). Estas secuencias (IR), altamente conservadas, están presentes en muchos genes que responden al estrés térmico en especies Gram+.

Existe evidencia que estas secuencias favorecerían la represión de promotores de genes que codifican para chaperonas. Por ejemplo, en *Bacillus subtilis* se realizaron mutaciones puntuales en las IR que se encuentran corriente arriba del operón de *dnaK*, resultando en una alta expresión constitutiva [115]. En *Streptomyces coelicolor* se ha sugerido que las secuencias CIRCE son sitios de unión de proteínas regulatorias que modulan la transcripción de los genes *groES/EL* [114] [115]. El hecho de una proximidad física con genes de estrés por frío podría tener relación con una coregulación de los genes de estrés al frío y al calor.

La función de *tpp1* en el metabolismo y en el estrés al frío es una incógnita hasta el momento. Nada se sabe de la función de las proteínas homólogas a TPP1 en otras bacterias porque las secuencias provienen de una búsqueda exhaustiva en el banco de datos de los genomas secuenciados. Se ha demostrado en este trabajo, la existencia de secuencias homólogas a *tpp1* en otros actinomicetes. Es interesante el hecho de haber encontrado en una especie de Arquea y en una cianobacteria proteínas similares. La construcción de mutantes en *tpp1* contribuirá a dilucidar su rol fisiológico en el crecimiento y en el estrés al frío.

III.4- CAPÍTULO 4

III.4.-Capítulo 4: Caracterización de proteínas de fase estacionaria de *Streptomyces coelicolor* A3(2).

III.4.1.-Introducción

En el medio ambiente los microorganismos raramente encuentran condiciones favorables para su desarrollo. Más bien el crecimiento de las bacterias se caracteriza por la alternancia de períodos prolongados de hambreado con períodos cortos de rápido crecimiento.

El uso de medios sintéticos en el laboratorio no refleja exactamente lo que ocurre en la naturaleza, pero sí permiten simular los períodos de disponibilidad de nutrientes y los de hambreado, y definir así lo distintas fases de crecimiento: lag, logarítmica y estacionaria. Experimentalmente, un cultivo puede entrar en fase estacionaria debido a múltiples factores. Sin embargo, el agotamiento de uno de los nutrientes esenciales del medio es lo que ha motivado numerosos estudios dirigidos a conocer los mecanismos y proteínas que utilizan las células para sobrevivir a largos períodos de hambreado. Este conocimiento es de gran importancia para las bacterias del género *Streptomyces* ya sea desde el punto de vista básico como aplicado puesto que, en la fase estacionaria de crecimiento estas bacterias producen una gran variedad de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas (antibióticos, antitumorales, inmunosupresores, inmunoestimulantes, etc) [18] [19] y también numerosas exoenzimas de importancia industrial (celulasas, amylasas, proteasas, etc.) [21].

Teóricamente, la cesación del crecimiento por indisponibilidad de nutrientes puede ocurrir en cualquier momento del ciclo de crecimiento del microorganismo, lo que provocaría que muchos procesos celulares (replicación de ADN en particular), queden incompletos [5]. Las células, ante esta posibilidad, aseguran su sobrevivencia poniendo en marcha un programa ordenado de cambios hacia la fase estacionaria, de tal forma que el proceso no quede librado al azar. Así, las bacterias pueden quedar viables durante períodos prolongados de hambreado y retornar al ciclo exponencial de crecimiento en los períodos de bonanza.

Los géneros bacterianos *Escherichia*, *Salmonella* y *Vibrio* [5] no producen

células diferenciadas como resultado del hambreado, pero sí experimentan una transición que involucra cambios en la expresión génica, en la fisiología y en la morfología celular, dando como resultado una célula menos activa metabólicamente y más resistente [118] [119] [120]. Otros géneros bacterianos, tales como *Streptomyces* [4] y *Bacillus* [121] pueden diferenciarse dando estructuras altamente resistentes, esporas, cuando están sometidos a un estrés nutricional. Esta diferenciación requiere de múltiples y complejos cambios que, en el caso de los *Streptomyces* fueron comentados en la Introducción de esta Tesis.

Cuando *E. coli* está creciendo y un nutriente comienza a estar por debajo de cierto nivel, sin llegar al agotamiento, se induce una respuesta que es específica para cada clase de nutriente que se vuelve limitante [122]. Los sistemas involucrados (cAMP/CRP para la fuente de carbono, NtrB/NtrC/ σ^{54} para nitrógeno, o PhoR/PhoB para fósforo) controlan regulones cuyos productos permiten la toma con mayor afinidad y posterior metabolismo de cada clase de alimento cuando aún las fuentes están presentes a bajas concentraciones. Por el contrario, si en el medio un alimento esencial está totalmente agotado, las células entran en fase estacionaria, siendo esta respuesta totalmente diferente a la respuesta específica para cada nutriente mencionados anteriormente [122]. La fase estacionaria involucra también cambios drásticos en la fisiología y morfología celular: alteración en la composición de la membrana plasmática y diferencias en el superenrollamiento de ADN [123]; síntesis de sustancias de protección osmótica como la trehalosa [124], modificación del core de la ARN polimerasa [125] y formación de dímeros de los ribosomas 70S que cambian su valor de sedimentación a 100S [126].

Las células de *E. coli* cuando han sido hambreadas por depleción de la fuente de carbono, se vuelven además más resistentes a otros tipos de estrés tales como calor, oxidativo u osmótico, [127] [128] [129]. Por otro lado, cuando las células son expuestas a niveles subletales de H_2O_2 , calor o sal, el índice de muerte celular disminuye al ser dichas bacterias posteriormente sometidas a niveles letales de las mismas sustancias [130]. No obstante, la resistencia que produce el hambreado es aún más protector que la

preadaptación de las células en crecimiento. Esta resistencia que desarrollan las bacterias durante el hambreado requiere de las síntesis de proteínas nuevas. Como se dijo anteriormente, cada condición de hambreado conduce a la cesación del crecimiento y como resultado de ello, se inducen un grupo de proteínas características que dependen del nutriente faltante. A pesar de que en esta etapa la síntesis proteica se reduce globalmente [131] [132], un grupo de 30 a 50 proteínas es inducido en respuesta al estrés que produce el hambreado [132] [129]. Muchas de estas proteínas no son específicas a la falta de un nutriente específico pero son esenciales para mantener la longevidad de las células durante la fase estacionaria.[130] [132].

Groat y colaboradores, con el uso de la técnica de geles 2-D, han estudiado los cambios en los patrones proteicos al comienzo y durante la fase estacionaria. Los resultados obtenidos permitieron así comprender algunos eventos que ocurren en la célula en dichas condiciones de crecimiento. En el caso de *E. coli* se ha comprobado que las proteínas que se sintetizan al comienzo de la fase estacionaria están involucradas en el mantenimiento de la viabilidad durante períodos prologados de hambreado [132]. En otros estudios, en los cuales las células fueron tratadas con cloranfenicol durante los primeros momentos de la fase estacionaria, la viabilidad disminuyó [133]; en cambio, el mismo tratamiento realizado varias horas después no resultó en una apreciable disminución de la viabilidad celular en largos períodos de crecimiento. Además, existen mutantes de *E. coli* que crecen normalmente durante la fase logarítmica, pero fallan en sobrevivir durante la fase estacionaria [134] o de salir de esta fase y reiniciar el crecimiento [135].

En *Streptomyces* poco se sabe acerca de la síntesis de proteínas durante el hambreado después del crecimiento post-exponencial, cuyas actividades podrían estar relacionadas con el mantenimiento de la viabilidad celular durante largos períodos de incubación. El estudio de los cambios metabólicos que ocurren durante la fase estacionaria de los *Streptomyces* es de gran interés desde el punto de vista aplicado, debido a que estos microorganismos producen un vasto repertorio de metabolitos secundarios en esta fase [19]. Como punto de partida, se decidió utilizar la metodología

de geles 2-D, para caracterizar los perfiles proteicos de *S. coelicolor* en diferentes fases de crecimiento en medio líquido mínimo. Esta técnica tiene antecedentes exitosos para este tipo de estudios en *Streptomyces* [49] [46] y en otros microorganismos [136] [137] [138]. Otro de los objetivos planteados fue el de purificar proteínas de fase estacionaria, usando la misma metodología, para realizar su secuencia amino terminal y así contar con información que facilitará el clonado de los genes por genética reversa. La obtención de mutantes en dichos genes permitirá comprender la fisiología de *S. coelicolor* en estadios tardíos de su desarrollo.

III.4.2.-Resultados-

III.4.2.1.-Determinación de la viabilidad de *S. coelicolor* durante prolongados períodos de crecimiento.

Con el fin de determinar la viabilidad de *S. coelicolor* en cultivos muy viejos en medio mínimo líquido MG, se analizaron diversos parámetros. La producción de antibióticos es una función característica de fase estacionaria y es un indicador de la actividad metabólica en células que se encuentran en la fase estacionaria de crecimiento. Para tal fin se trabajó con la cepa CH1 que es isogénica a YU105 pero que, a diferencia de esta, produce el antibiótico actinorodina (color azul). Un cultivo de 500 ml de medio MG fue inoculado directamente con esporos de la cepa CH1. Para el seguimiento de la producción de actinorodina se tomaron alícuotas a tiempo 0, 43, 66, 112, 408 y 648 hs luego de realizado el inóculo y se hicieron las mediciones espectrométricas a 608 nm, según lo descrito en Materiales y Métodos. En la Figura 32 se muestra la curva de producción de actinorodina para dicha cepa y los extractos medidos. Otra manera de demostrar la viabilidad celular entre las 408 y 648 hs, fue realizar repiques en medio MG nuevo. De esta manera se comprobó que los cultivos eran capaces de reiniciar el normal crecimiento. También se realizaron observaciones microscópicas de los últimos puntos y pudo comprobarse la existencia de micelio nuevo en crecimiento (datos no mostrados). Con estas observaciones se concluyó que en cultivos muy viejos y en condiciones de extremo hambre, *S. coelicolor* aún mantiene su viabilidad. Esto

último también está sustentado en que marcaciones realizadas con [35S]-metionina en alícuotas del cultivo a las 408 y 648 hs muestran síntesis *de novo* (dato no mostrado).

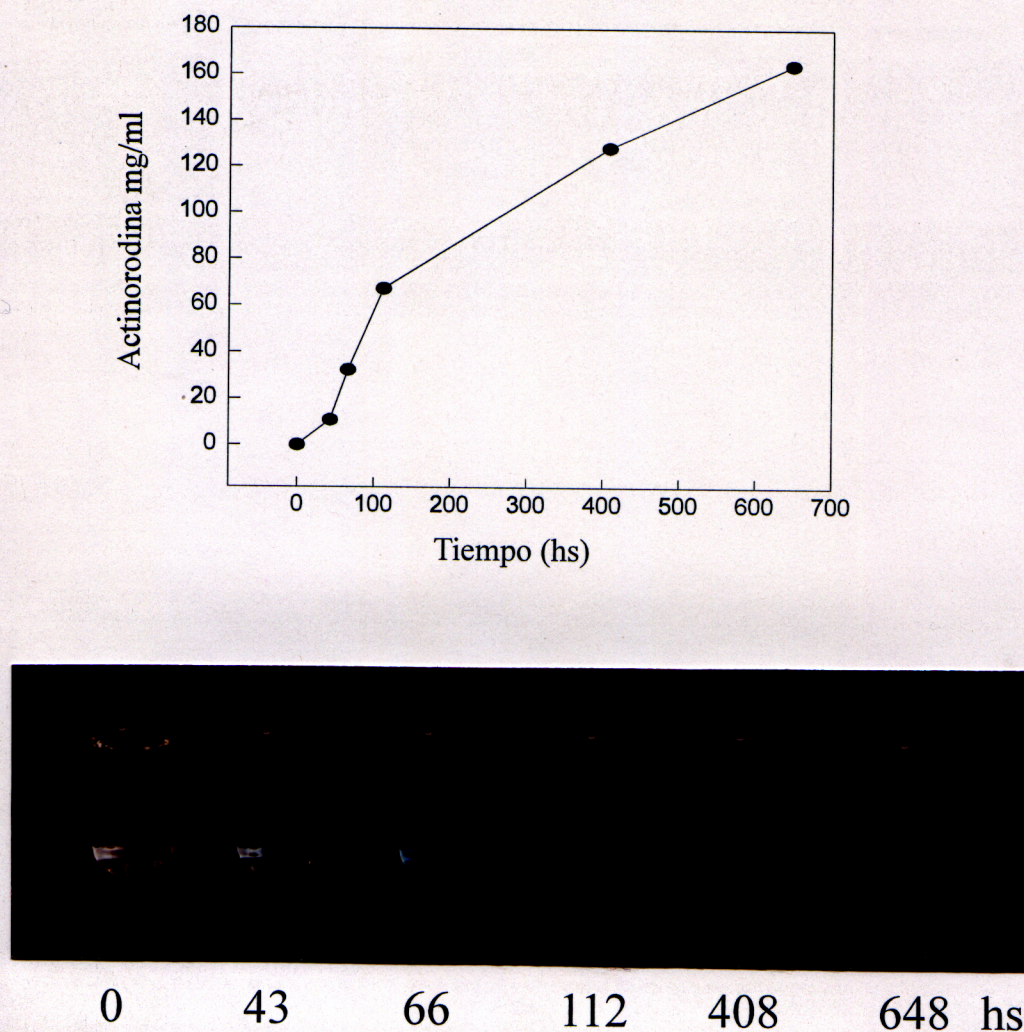


Figura 32: Producción de actinorodina en cultivos de *S. coelicolor* CH1. Un cultivo de *S. coelicolor* CH1 fue crecido en medio MG durante más de 25 días. Alícuotas de 1 ml fueron tomadas en diferentes momentos del crecimiento, tratadas con 1 ml de NaOH 1M y centrifugadas. Los sobrenadantes fueron leídos en un espectrofotómetro a 608 nm. 1DO= 120 μ g/ml de actinorodina.

III.4.2.2.-Análisis de los perfiles proteicos en diferentes fases del crecimiento.

Los geles de poliacrilamida 2-D se utilizaron para estudiar el perfil proteico (evaluados por tinción de Coomassie), de la cepa de *S. coelicolor* YU105 (no produce antibióticos) en medio MG en varios puntos de la curva de crecimiento. Para ello se partió de un cultivo en medio MG inoculado directamente con esporas de la cepa YU105 y se creció a 30°C durante más de 500 hs. Se tomaron alícuotas a las 17, 72, 240 y 510 hs y las mismas fueron procesadas según lo descrito en Materiales y Métodos. 100 µg de proteína de cada extracto fueron sometidas a IEF seguida de SDS-PAGE. En la Figura 33 se muestran los perfiles proteicos de cultivos creciendo exponencialmente (A, 17 hs) o en fases estacionaria temprana y tardía (B, 72 hs y C, 240 hs respectivamente). Como puede observarse del análisis de esta figura, el perfil de proteína no cambia sustancialmente durante estas tres fases de crecimiento. No obstante, por simple inspección visual, se encontraron que muchas proteínas variaban significativamente su concentración relativa a lo largo del desarrollo. Esto permitió comparar y definir el estado estacionario de 34 polipéptidos a través del crecimiento. Ver Figura 33 A, B y C y Tabla II.

Debido a que nuestro interés estaba focalizado principalmente en proteínas que se sintetizan preferencialmente durante la fase estacionaria, de los 34 polipéptidos analizados se seleccionaron aquellos que tenían un incremento en su velocidad de síntesis (dato no mostrado) durante los últimos estados de crecimiento y luego se dividieron en dos grupos. Grupo I: incluye aquellas proteínas que incrementan su concentración relativa y su velocidad de síntesis entre las fases exponencial y estacionaria temprana (proteínas 1, 7, 8, 21, 22, 23, 24, 27, 28, 29 y 30, Figura 33 A y B). Grupo II: incluye aquellas proteínas que incrementan su concentración relativa y su velocidad de síntesis entre las fases estacionaria temprana y tardía (proteínas 1, 4, 8, 12, 13, 15, 25, 26, 31 y 32, Figura 33 B y C).

En la Figura 34 se comparan los niveles estacionarios de las proteínas (A) con el perfil de las proteínas sintetizadas *de novo* (B) de un cultivo de 501 hs de la cepa YU105. El perfil proteico del cultivo de 501 hs fue claramente diferente a los perfiles de

las distintas fases de crecimiento mostrados en la Figura 33 A, B y C. Sin embargo, el perfil de la síntesis *de novo* de proteínas que se muestra en la figura 34 B, es similar al obtenido en la fase logarítmica de crecimiento (dato no mostrado). Esto sugiere que la síntesis en este punto podría reflejar un nuevo crecimiento de algunos organismos luego de una autólisis parcial del cultivo [8], lo que estaría de acuerdo con las observaciones microscópicas realizadas en los cultivos de fase estacionaria tardía. Resultados similares han sido descriptos para *Mycobacterium tuberculosis* [137].

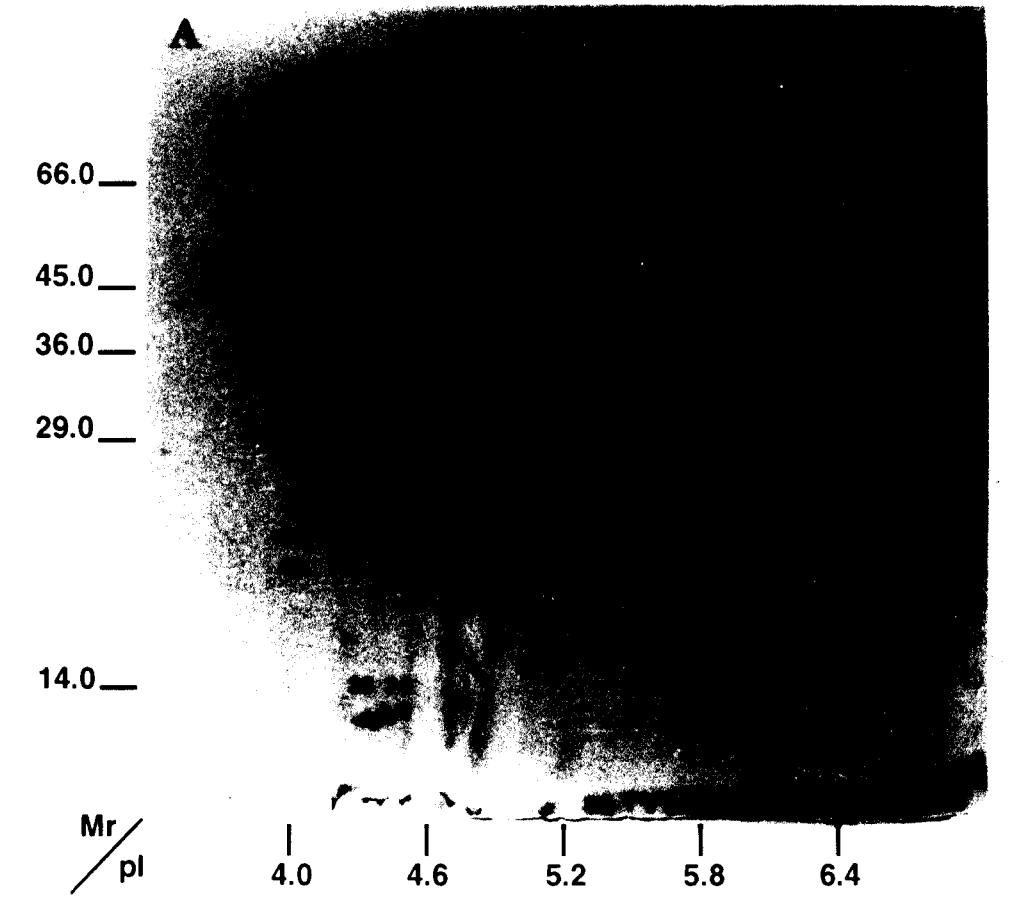
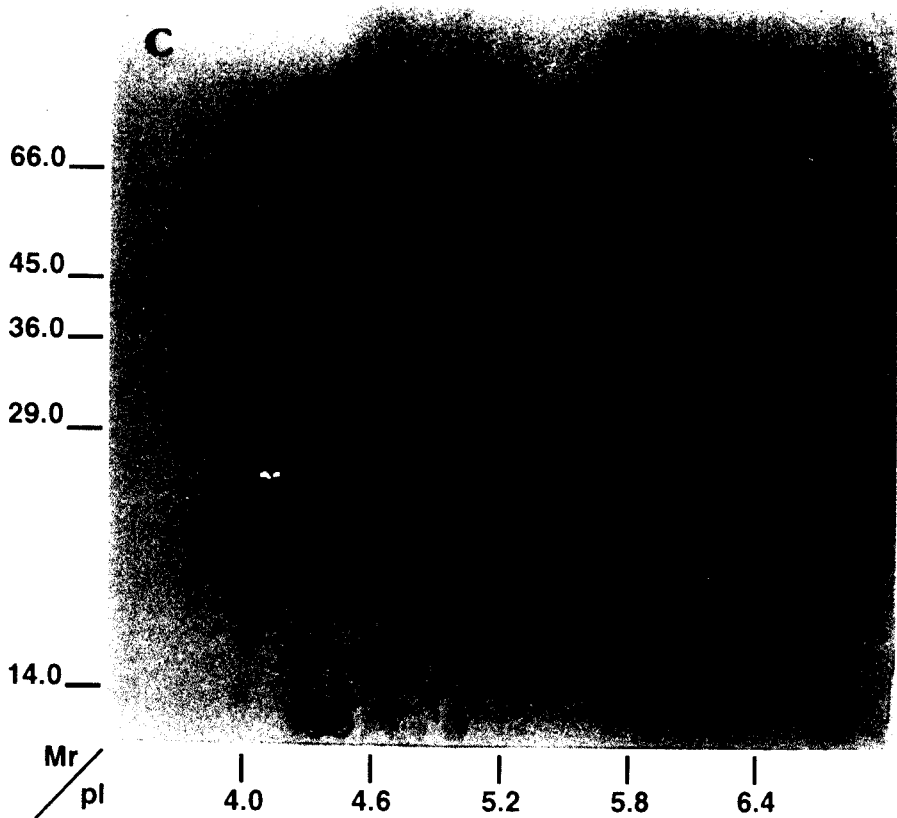
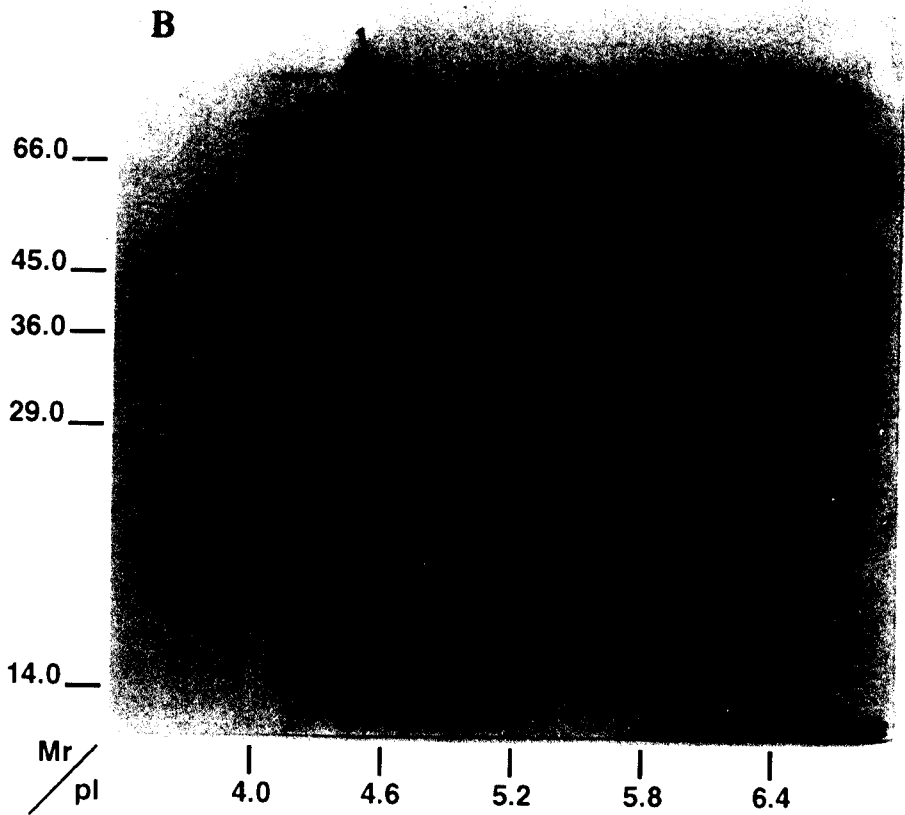


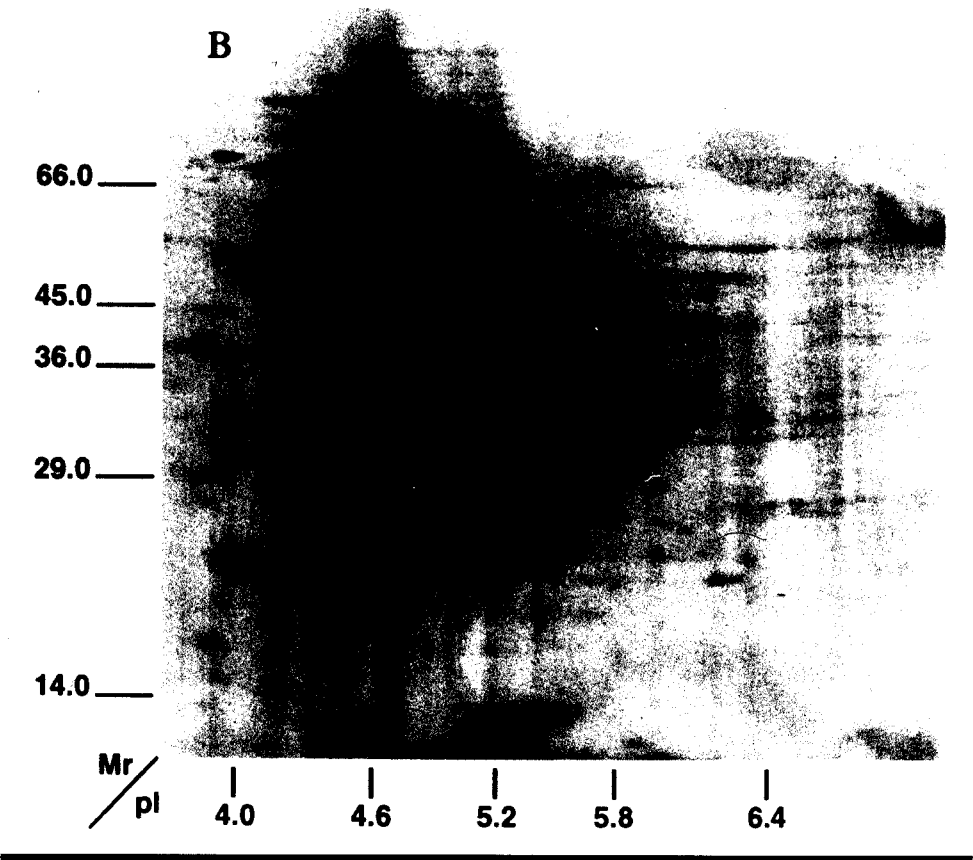
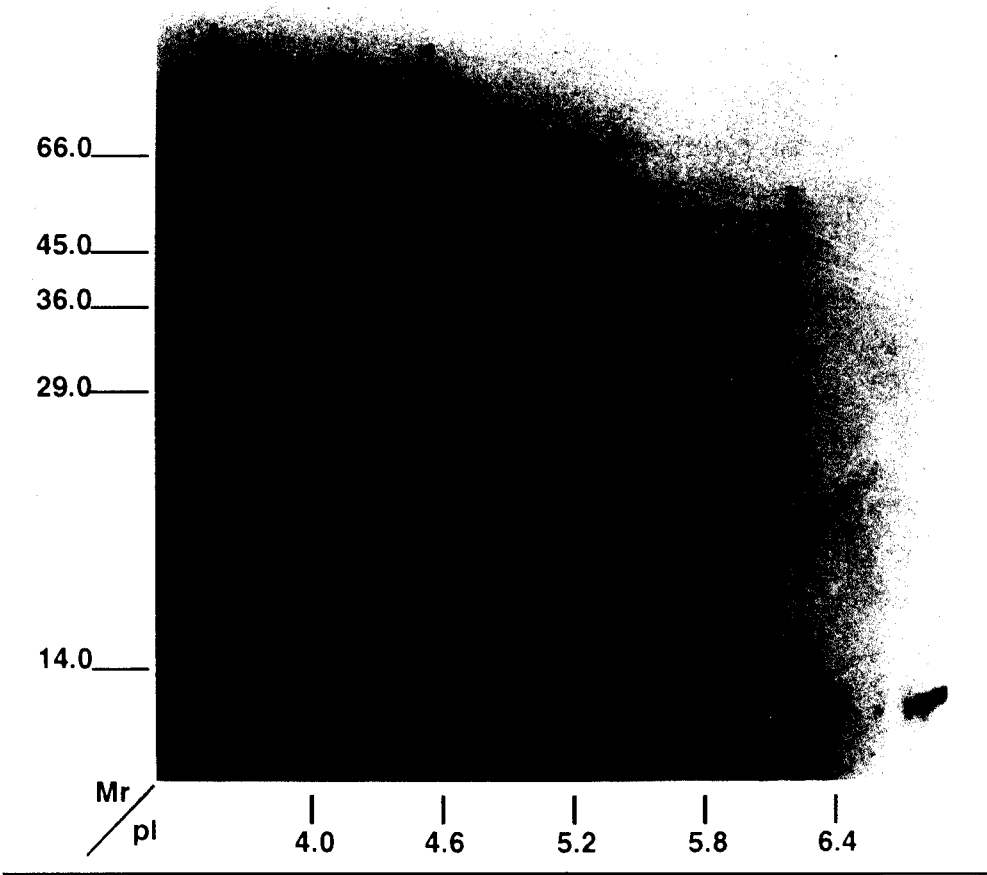
Figura 33: Perfiles proteicos en diferentes fases de crecimiento de *S. coelicolor* YU105. Un cultivo en medio mínimo líquido MG de *S. coelicolor* YU105 fue crecido a 30°C durante más de 500 hs. Alícuotas del cultivo tomadas en fase logarítmica (17 hs, A), fase estacionaria temprana (72 hs, B) y fase estacionaria tardía (240 hs, C) fueron procesadas según lo descrito en el texto. 100 µg de proteína de cada extracto fueron sometidas a IEF seguida de SDS-PAGE. A, B y C muestran los patrones proteicos teñidos con azul brillante de Coomassie. En esta figura puede apreciarse cuantitativamente un incremento o disminución de la concentración proteica de los diferentes polipéptidos estudiados durante el hambreado. Los símbolos Δ, ∇ y O indican aumento, disminución o no variación de una proteína en particular con respecto a lo observado en el punto anterior, respectivamente. Sobre el margen izquierdo se indican los pesos moleculares (Mr) en kDa. En el margen inferior, se indican los puntos isoeléctricos (pI).



Proteína	PM (kDa)	Comp A-B	Comp B-C
1	97.4	Δ	Δ
2	71.6	▽	O
3	69.6	O	▽
4	61.0	O	Δ
5	57.9	O	O
6	52.6	O	O
7	47.9	Δ	O
8	45.8	Δ	Δ
9	43.8	O	▽
10	41.1	O	O
11	44.8	Δ	O
12	41.9	O	Δ
13	42.9	O	Δ
14	37.7	O	O
15	40.2	O	Δ
16	35.5	O	▽
17	34.8	▽	O
18	34.8	Δ	▽
19	38.5	▽	Δ
20	35.5	Δ	O
21	40.2	Δ	▽
22	27.5	Δ	O
23	27.5	Δ	▽
24	25.0	Δ	O
25	21.2	O	Δ
26	22.0	O	Δ
27	21.2	Δ	O
28	22.0	Δ	O
29	22.0	Δ	O
30	21.6	Δ	Δ
31	20.8	O	Δ
32	19.7	O	Δ
33	12.1	▽	O
34	12.1	▽	O

Tabla II: Comparación de los niveles estacionarios de 34 proteínas de *S. coelicolor* YU105 durante el desarrollo. En la primera columna se indican los números de las proteínas que se corresponden con las indicadas en la Figura 28 A, B y C. En la tercera columna se comparan los niveles estacionarios entre las fases exponencial y estacionaria temprana (A-B). En la cuarta columna se comparan los niveles estacionarios de los polipéptidos entre las fases estacionaria temprana y tardía (B-C). Δ, ▽ y O, indican aumento, disminución o no variación de los niveles estacionarios de proteínas, respectivamente.

Figura 34: Comparación entre los niveles estacionarios (A) y la síntesis de *nov*o (B) de proteínas de cultivos en fase estacionaria tardía de *S. coelicolor* YU105. 100 µg de proteínas de una alícuota tomada a las 501 hs y que fue marcada con [³⁵S]-metionina como se describe en Materiales y Métodos, fue sometida a IEF seguida de SDS-PAGE. El gel fue teñido y secado antes de la autoradiografía. La flechas indican los polipéptidos 22, 25 y 26, cuyas secuencias mostraron homología con proteínas conocidas. A, gel teñido con azul brillante de Coomassie y B, su autoradiografía. Sobre el margen izquierdo, se indican los pesos moleculares (Mr) en kDa. En el margen inferior, se indican los puntos isoeléctricos (pI).



III.4.2.3.-Identificación de proteínas de *S. coelicolor* reguladas en diferentes fases de crecimiento.

Con el objeto de identificar algunas de las proteínas que se sintetizan o se acumulan sustancialmente en los estadios tardíos de crecimiento de *S. coelicolor*, se purificaron y determinaron la secuencia amino terminal de 6 proteínas (8, 13, 15, 22, 25 y 26) que mostraban estas características (Figura 34). Para ello se tomó el extracto correspondiente a 240 hs de cultivo de *S. coelicolor* YU105 y se lo sometió a IEF seguido de SDS-PAGE y luego el gel fue electrotransferido a una membrana de PVDF. Finalmente, la membrana fue teñida con azul brillante de Coomassie y las proteínas 8, 13, 15, 22, 25 y 26 fueron recortadas y enviadas para el análisis de su secuencia amino terminal (Tabla III). Las secuencias amino-terminal de las tres primeras proteínas analizadas (8, 13 y 15) no mostraron homología con ninguna otra secuencia en la base de datos. Sin embargo, los primeros 13 residuos amino acidicos del polipéptido 22 mostraron un 100 % de homología con una proteína codificada en un plásmido de *Alcaligenes* sp y que confiere resistencia al telurito [139]. Los primeros 10 aminoácidos de los polipéptidos 25 y 26 difieren solamente en el primer aminoácido, y ambas secuencias son a su vez idénticas al extremo amino-terminal de la superóxido dismutasa Fe/Zn dependiente (FeZnSOD) de *S. coelicolor* [140].

Polipéptido	Secuencia	Función	Referencia
8	PDIDVVVAR	Desconocida	
13	DEPADGYD	Desconocida	
15	KDTXEFIKGQ	Desconocida	
22	SVSLSKGGNVSLSK	Resistencia al telurito	[Jobling, 1988 #199]
25	GVYTLPELPYD	SOD	[Kim, 1996 #2]
26	AVYTLPELPYD	SOD	[Kim, 1996 #2]

Tabla III: Secuencia N-terminal de proteínas purificadas a partir de geles 2-D. El extracto proteico preparado a partir de la muestra de 240 hs del cultivo de *S. coelicolor* YU105, fue sometido a IEF seguido de SDS-PAGE. El gel fue electrotransferido a una membrana de PVDF y teñido con azul brillante de Coomassie. Las proteínas 8, 13, 15, 22, 25 y 26 fueron secuenciadas en por el método de degradación de Edman. En esta Tabla se muestran las secuencias N.terminal y la posible función de las 6 proteínas cuya expresión incrementa durante la fase estacionaria de crecimiento.

III.4.2.4.-Medición de la actividad superóxido dismutasa a lo largo del crecimiento.

La actividad SOD a través del crecimiento fue estudiada en cultivos de *S. coelicolor* YU105 crecidos en medio líquido mínimo MG. Para ello se realizaron extractos celulares a partir de muestras tomadas a las 20 (fase logarítmica), 35, 54, 78, 98 y 240 hs (fase estacionaria temprana y tardía) de cultivo y fueron tratadas según lo descrito en Materiales y Métodos. Los extractos proteicos fueron sometidos luego a electroforesis no desnaturizante en gel de poliacrilamida al 9 %. Las bandas con actividad SOD se visualizaron por tinción negativa [70]. Con este método se detectaron dos bandas con actividad SOD, las cuales eran correspondientes a las NiSOD y FeZnSOD descriptas recientemente por Kim y colaboradores [140] (Figura 35). A pesar de que hay un incremento evidente en los niveles de ambas SOD cuando los cultivos alcanzan la fase estacionaria de crecimiento, los perfiles de expresión de ambas enzimas fueron diferentes. La actividad de la NiSOD estuvo presente en los extractos desde la fase logarítmica y alcanzó su máxima actividad entre las 54 y 78 hs (fase estacionaria temprana); la actividad FeZnSOD en cambio, se detectó a partir de las 54 hs de crecimiento, y su nivel continuó en aumento durante toda la fase estacionaria. En la muestra correspondiente a 240 hs se detectó una tercera banda de actividad. Esta banda podría ser un producto de degradación estable y aún activo de la enzima NiSOD. Esta especulación está basada en las siguientes consideraciones: 1) en la muestra de 240 hs la banda correspondiente a la enzima nativa NiSOD ha desaparecido casi totalmente, probablemente como resultado de la falta de expresión de su gen y a la degradación de la proteína nativa y 2) una degradación parcial del polipéptido nativo podría producir un cambio en la carga neta de la proteína y por lo tanto un cambio en la movilidad en un gel nativo. Tampoco se debería excluir la posibilidad de que esta tercera banda fuera un agregado de la FeZnSOD o una nueva actividad SOD que se expresara exclusivamente en la fase estacionaria tardía.

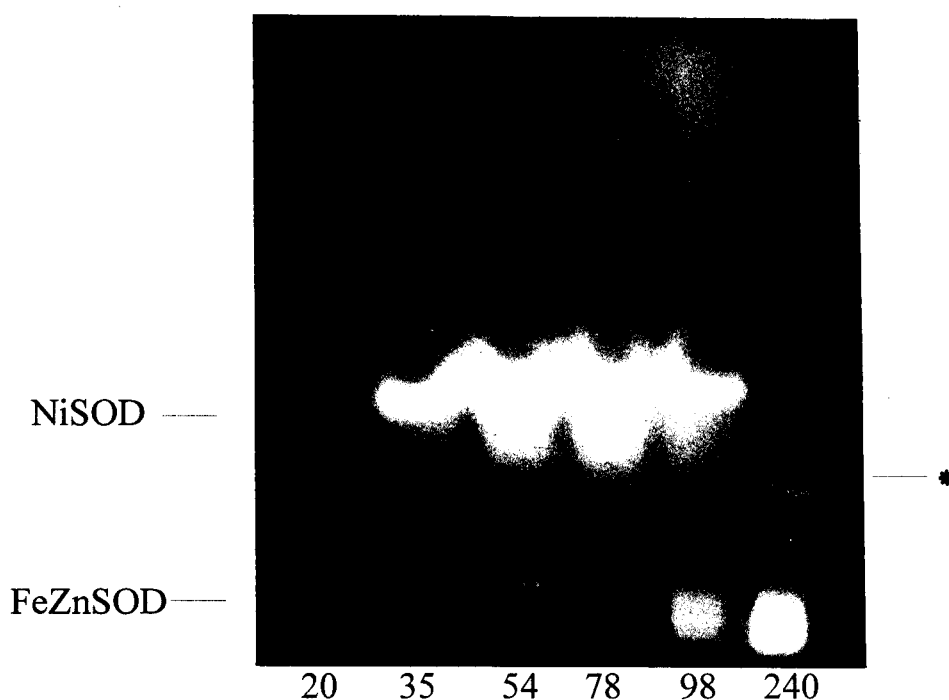


Figura 35: Perfiles de la actividad SOD a lo largo del crecimiento de *S. coelicolor* YU105. A partir de un cultivo de *S. coelicolor* YU105 crecido en medio mínimo MG, se tomaron alícuotas en fase logarítmica (20 hs) y fases estacionaria temprana y tardía (25, 54, 78, 98 y 240 hs). 50 µg de proteína de cada extracto se sometieron a electroforesis nativa PAGE en un gel al 9 % de poliacrilamida y luego se determinó la actividad SOD. La preparación de los extractos y tinción para la actividad enzimática se describen en Materiales y Métodos. Margen izquierdo: se indican las bandas correspondientes a las superóxido dismutasas NiSOD y FeZnSOD. Margen inferior: tiempo en hs en los cuales se tomaron las alícuotas del cultivo. * indica una banda con actividad SOD no caracterizada previamente y cuyo origen se discute en el texto.

III.4.3.-Discusión.

Uno de los objetivos planteados en este proyecto fue el de caracterizar proteínas de fase estacionaria de *S. coelicolor* A3(2), utilizando la técnica de geles bidimensionales. Para tal fin se realizó un seguimiento de los perfiles proteicos desde la fase exponencial a la estacionaria tardía de cultivos de *S. coelicolor* YU105 creciendo en medio mínimo MG. Por inspección visual de los geles bidimensionales teñidos con azul brillante de Coomassie se estudiaron 34 polipéptidos cuyos estados estacionarios variaban significativamente a lo largo del crecimiento. A fin de identificar algunas de las proteínas cuya síntesis era regulada en las diferentes fases del crecimiento de *S. coelicolor*, se purificaron y determinaron la secuencia amino terminal de 6 polipéptidos cuya concentración relativa aumentaba notablemente durante la fase estacionaria de crecimiento. De las 6 proteínas purificadas y analizadas, tres proteínas (8, 13 y 15) no mostraron homología con ninguna otra conocida. Por el contrario, la proteína 22 mostró una homología de 100% en sus 13 primeros residuos con una proteína que confiere resistencia al telurito en *Alcaligenes* sp [139]. En *E. coli*, como en otros microorganismos, existen genes que confieren resistencia a telurito ya sea en el cromosoma o en plásmidos [141] [142]. En el caso de *S. coelicolor* la resistencia está codificada en el cromosoma ya que la cepa utilizada en este estudio es libre de plásmido [56]. Finalmente, los polipéptidos 25 y 26 corresponden a la superóxido dismutasa que contiene Fe y Zn como cofactores. En los primeros 10 aminoácidos ambas secuencias difieren solamente en un aminoácido. Recientemente se han clonado y secuenciado los genes *sodF* que codifica para la FeZnSOD [143] y *sodN* que codifica para la NiSOD [144]. Es decir que *S. coelicolor* posee dos SOD, la níquel (NiSOD) y hierro/zinc (FeZnSOD) dependientes [140]. Usando geles nativos se determinaron las actividades de las SOD en diferentes fases de crecimiento. Ambas actividades alcanzaron su máximo nivel después del crecimiento post-exponencial. La NiSOD alcanzó su máximo durante la fase estacionaria temprana mientras que, la FeZn SOD, lo hizo durante la fase estacionaria tardía (Figura 35).

En los organismos aeróbicos el metabolismo oxidativo, la exposición a ciertos

agentes químicos y la radiación producen especies reactivas del oxígeno tales como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. Por ello es que los organismos han desarrollado sistemas de reparación y defensa para proteger las células del daño que producen estos compuestos altamente reactivos [145]. La SOD es considerada una de las enzimas claves que protegen a las células de este estrés. De acuerdo a esto, se encontró que la actividad SOD se incrementa con el estrés oxidativo en muchos organismos [146] [147]. Los datos presentados muestran que la expresión de la Ni y FeZnSOD dependen de la fase de crecimiento (Figura 35). Un comportamiento similar de estas enzimas se observó en otro medio mínimo (dato no mostrado), sugiriendo que la regulación de esta enzima en diferentes fases no está relacionada con el hambre producido por depleción de nutrientes específicos, sino que responde a un mecanismo regulatorio general. Kim y col. [143] [144] recientemente han estudiado la expresión y regulación de *sodF* y *sodN* y ellos concluyen que la expresión de las dos SOD en esta bacteria se ve afectada drásticamente por la presencia de Ni y de agentes quelantes. El Ni, que actúa a nivel transcripcional, aumenta o disminuye la síntesis de NiSOD y FeZnSOD, respectivamente. Cuando el Ni es depletado, la NiSOD no se expresa y la expresión de FeZnSOD se incrementa para compensar la pérdida de la NiSOD. Esto último sugiere que las dos enzimas tienen roles en común, al menos protegiendo las células contra agentes oxidantes como se ha demostrado en *S. lividans* TK24 [143]. Queda por dilucidar aún el rol específico de cada SOD en la defensa contra el estrés oxidativo y en la fase estacionaria en *S. coelicolor*.

La regulación de la resistencia a metales pesados está mediada por represores y activadores específicos [142]. No obstante, el sistema *soxRS*, que controla la expresión del regulón al estrés oxidativo, ha sido involucrado en la respuesta a metales pesados y a solventes orgánicos en *E. coli* [148]. Por eso, si se encontrara un homólogo a *soxRS* en *S. coelicolor*, podría proponerse una regulación similar para los genes *sod* y de resistencia al telurito.

Finalmente, *S. coelicolor* es viable en cultivos que fueron mantenidos durante más de 25 días. Seguramente la generación de mutantes en los genes cuyas proteínas

fueron secuenciadas en su extremo amino terminal, será de gran valor para entender más la fisiología de esta bacteria en los estadios tardíos de su desarrollo.

IV- CONCLUSIONES

IV.-Conclusiones.

IV.1.-Se determinó que 12°C es la temperatura óptima para realizar el estudio de inducción de proteínas de estrés al frío en *S. coelicolor*.

IV.2.-El estrés por frío induce y reprime la expresión de 69 y 80 proteínas respectivamente. Muchas de ellas también se inducen o reprimen en la fase de transición.

IV.3.-En las condiciones de reproducibilidad del ciclo de crecimiento de *S. coelicolor* creciendo a 30°C en medio mínimo líquido MG, se determinaron los 4 estadios de desarrollo: a) la primera fase de crecimiento rápido (CR1) finaliza a las 45 hs de iniciado el cultivo, b) la fase de transición (T) abarca 4-6 hs, c) la segunda fase de crecimiento rápido (CR2) dura 10 hs y d) la fase estacionaria (S) comienza aproximadamente a las 80 hs de iniciado el cultivo.

IV.4.-Se identificó, purificó y secuenció el extremo amino terminal de una proteína de 9 kDa que es fuertemente inducida a 8°C y 12°C. El estudio de la expresión de esta proteína, usando geles bidimensionales de tricina, demostró que la misma tendría un rol importante tanto en el estrés fisiológico como en el hipotérmico. Esta conclusión se basa en que la misma se induce a 12°C en distintas fases del crecimiento; en cambio, esta proteína se induce espontáneamente a 30°C en el punto más crítico de la fase de transición.

IV.5.-Del análisis de la espectrometría de masa y de la secuencia amino terminal de la proteína de 9 kDa se deduce que es una nueva proteína de estrés al frío.

IV.6.- Se determinó que otra proteína ácida y de bajo peso molecular, corresponde a una Csp (SCOF) y que dicha proteína, no manifiesta variación en su expresión durante

el desarrollo y tampoco inducción en las condiciones estudiadas de estrés hipotérmico.

IV.7.-El gen de la proteína de 9 kDa, *tpp1*, es un homólogo a un ORF que codifica para una proteína hipotética de 9,6 kDa de *M. tuberculosis*.

IV.8.-El fragmento de ADN cromosomal de *S. coelicolor* J 1501 secuenciado, mostró 4 ORF codificados en la misma cadena y en la misma dirección. Uno de ellos mostró gran homología con una treonina sintetasa, *thr*. El mismo se halla acoplado traduccionalmente al gen *tpp1*. Corriente abajo se encuentra un ORF que codifica una Csp homóloga, entre otras, a una Csp de *Listeria monocitogenes*. Finalmente, se encuentra el gen *groEL2*.

IV.9.-En *S. coelicolor* existe una única copia del gen *tpp1* y posiblemente un segundo gen para la treonina sintetasa.

IV.10.-En otros actinomicetes estudiados se encontró el gen *tpp1*. Una búsqueda en los bancos de datos de otros organismos, cuyos genomas han sido secuenciados enteramente, reveló que un homólogo a *tpp1* se encontraría en *Synechocystis* sp y en *Archaeoglobus fulgidus*.

IV.11.-A partir de un cultivo de *S. coelicolor* crecido YU105 hasta la fase estacionaria tardía, se purificaron y determinaron los extremos amino terminal de algunas proteínas. De ellas, una mostró 100% de homología con un polipéptido que confiere resistencia al telurito. La otra, corresponde a la superóxido dismutasa que contiene Fe y Zn como cofactores (FeZnSOD).

IV.12.-Las actividades de las dos SOD de *S. coelicolor* (NiSOD y FeZnSOD), medidas en geles nativos, alcanzaron su máximo nivel después del crecimiento post-exponencial. Mientras la NiSOD lo hizo durante la fase estacionaria temprana, la FeZnSOD lo

alcanzó durante la fase estacionaria tardía.

IV.13.-Cultivos de *S. coelicolor* CHI, crecidos durante más de 25 días, fueron monitoreados a través de la mediciones del antibiótico actinorodina y de la incorporación de marca con [³⁵S]-metionina. Los resultados obtenidos, y la comprobación de que las bacterias reasumieron normalmente su crecimiento, después de repiques en medio fresco, demostraron que *S. coelicolor* mantiene su viabilidad aún en cultivos que se encuentran en fase estacionaria tardía.

V- RESUMEN

V.-Resumen

Las bacterias del género *Streptomyces* presentan un complejo mecanismo de diferenciación morfológica: el mismo se inicia cuando el micelio sustrato comienza a autolisarse y de él emergen hifas aéreas multinucleadas, que darán lugar al micelio aéreo. Estas hifas aéreas continuarán con la diferenciación morfológica (enrollamiento, tabicación, etc.) para dar finalmente numerosas esporas uninucleadas. En medio líquido muchas especies de *Streptomyces* no esporulan, sin embargo aún mantienen la capacidad de diferenciarse fisiológicamente, dando lugar a la producción de una gama muy amplia de metabolitos secundarios (antibióticos, antihelmínticos, antifúngicos, etc.).

En medios de cultivos líquidos, ya sean mínimos o ricos, *S. coelicolor* muestra una curva de crecimiento de tipo bifásica con cuatro fases claramente diferenciables: una primera fase de crecimiento logarítmico (CR1), luego una fase de transición (T) que antecede a una segunda fase de crecimiento logarítmico (CR2), y por último una fase estacionaria (S).

Uno de los objetivos de la presente Tesis fue estudiar la expresión génica de cultivos de *S. coelicolor* J1501 crecidos en medio mínimo líquido MG, en los distintos estadios de crecimiento y en especial durante la fase de transición a 30°C y en condiciones de estrés al frío (cultivos sometidos a 12°C). Para ello se realizaron pulsos con [³⁵S]-metionina/cisteína para estudiar la síntesis de *ново* de proteínas. Las muestras posteriormente se analizaron mediante electroforesis bidimensional en geles SDS-PAGE y de tricina.

Se llevó a cabo, por medio de geles bidimensionales de tricina, la purificación y secuenciación amino terminal de una proteína de 9 kDa. Esta proteína se encontró que era fuertemente inducida a 12°C en distintos estadios del crecimiento como así también en el punto más importante de la fase de transición a 30°C. Estudios realizados a esta proteína utilizando la técnica de espectrometría de masa, junto al dato de la secuencia amino terminal, confirmaron que el polipéptido de 9 kDa se trata de una proteína de

estrés al frío no mostrada previamente y que tendría un rol importante tanto en el estrés fisiológico como en el hipotérmico. Otras proteínas de bajo peso molecular y ácidas también se purificaron (a partir de un cultivo inducido a 12°C) y analizaron de forma similar a la de 9 kDa. Una de ellas correspondió a SCOF (una homóloga a CspA de *E. coli*) que no mostró variación en su expresión durante el desarrollo y tampoco inducción en las condiciones estudiadas por estrés hipotérmico.

A partir de la secuencia amino terminal de la proteína de 9 kDa, cuyo gen se denominó *tpp1*, se clonó un fragmento de ADN de *S. coelicolor* J1501 de 4,329 kpb. Su secuencia evidenció la presencia de 4 ORF codificados en la misma cadena y dirección. Uno de ellos es el que codifica para una treonina sintetasa, *thr*, y que se halla traducionalmente acoplado al gen *tpp1*. Corriente abajo se encuentra un ORF que codifica una Csp y finalmente, el gen *groEL2*.

El gen *tpp1* existe en copia única en *S. coelicolor* J1501. Una búsqueda en el banco de datos mostró que existen homólogos a *tpp1* en *Synechocystis* sp, *Mycobacterium tuberculosis*, *Archaeoglobus fulgidus*, como así también en otros actinomicetes analizados en este trabajo.

Otros de los objetivos de esta Tesis fue analizar los cambios en los perfiles proteicos, desde la fase exponencial a la estacionaria tardía, de un cultivo de *S. coelicolor*. La idea principal fue la de caracterizar y purificar proteínas que se sintetizan específica y/o predominantemente durante la fase estacionaria de crecimiento y que pudieran jugar un rol importante en el mantenimiento de la viabilidad de los cultivos durante prolongados períodos de tiempo. Para ello se realizaron geles bidimensionales SDS-PAGE a fin de estudiar la composición proteica (utilizando tinción de Coomassie) de un cultivo de *S. coelicolor* YU105 crecidos en medio MG, en diversos estadíos de su crecimiento. A partir de los geles bidimensionales se purificaron y secuenciaron los extremos amino terminal de seis proteínas. Dos de ellas coincidieron con la secuencia

amino terminal de la superóxido dismutasa que contiene Fe y Zn como cofactores. Una tercera secuencia coincidió en un 100% con una proteína de *Alcaligenes* sp que confiere resistencia al telurito. Las actividades de la NiSOD y FeZnSOD fueron determinadas usando geles nativos de poliacrilamida. Ambas enzimas alcanzaron su máximo nivel después del crecimiento post-exponencial: la NiSOD durante la fase estacionaria temprana y la FeZnSOD durante la fase estacionaria tardía. Finalmente, a través de la medición de la producción de actinorodina de la cepa CHI y de la incorporación de marca en las proteínas se comprobó que *S. coelicolor* mantiene la viabilidad durante largos períodos.

VI- BIBLIOGRAFÍA

VI.-BIBLIOGRAFÍA

1. Korn-Wendisch, F. and H. Kutzner, The family Streptomycetaceae., in The Prokaryotes., A. Balows, et al., Editors. 1997, Springer-Verlag.
2. Hinnebusch, J. and K. Tilly, Linear plasmids and chromosomes in bacteria. Mol. Microbiol., 1993, 10(5): p. 917-922.
3. Chater, K., Genetics of differentiation in Streptomyces. Annu. Rev. Microbiol., 1993, 47: p. 685-713.
4. Chater, K., Taking a genetic scalpel to the Streptomyces colony. Microbiology., 1998, 144: p. 1465-1478.
5. Kolter, R., The Stationary Phase of The Bacterial Life Cycle. Annu. Rev. Microbiol., 1993, 47: p. 855-874.
6. Chater, K., Morphological and physiological differentiation in Streptomyces., in Microbial Development, R. Losick and I. Shapiro, Editors. 1984, Cold Spring Harbor: N. Y. p. 89-115.
7. Allan, E. and J. Prosser, Mycelial growth and branching of Streptomyces coelicolor A(3)2 on solid medium. J. Gen. Microbiol., 1983, 129: p. 2029-2036.
8. Yarmolinsky, M., Programmed cell death in bacterial populations. Science, 1995, 267: p. 836-837.
9. Allan, E. and J. Prosser, A kinetic study of the colony growth of Streptomyces coelicolor A(3)2 and J802 on solid medium. J. Gen. Microbiol., 1985, 131(10): p. 2521-2532.
10. Braña, A., et al., Glycogen and trehalose accumulation during colony development in Streptomyces antibioticus. J. Gen Microbiol., 1986, 132: p. 1319-1326.
11. Narayana, N. and A. Kornberg, Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase Escherichia coli. J. Bacteriol., 1996, 178: p. 1394-1400.
12. Granozzi, C., et al., A breakdown in macromolecular synthesis preceding

- differentiation in *S. coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.*, 1990, 136: p. 713-716.
13. Chater, K., Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Trends Genet.*, 1989, 5: p. 372-377.
14. Guijarro, J., et al., Promoter determining the timing and spatial localization of transcription of a cloned *Streptomyces coelicolor* gene encoding a spore-associated polypeptide. *J. Bacteriol.*, 1988, 170: p. 1895-1901.
15. Ensign, J., Formation, properties and germination of actinomycete spores. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1978, 32: p. 185-219.
16. Kendrick, K. and J. Ensign, Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *J. Bacteriol.*, 1983, 155: p. 357-366.
17. Berdy, J., Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv. Appl. Microbiol.*, 1974, 18: p. 309-406.
18. Demain, A. Why do microorganisms produce antimicrobials? in *Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends*. 1995.
19. Stone, M. and D. Williams, On the evolution of functional secondary metabolites (natural products). *Mol. Microbiol.*, 1992, 6: p. 29-34.
20. Vining, L., Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1990, 44: p. 395-427.
21. McCarthy, A. and S. Williams, Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment. *Gene*, 1992, 115: p. 189-192.
22. Hopwood, D. and K. Chater, Antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*, in *Genetics of bacterial diversity*, D. Hopwood and K. Chater, Editors, 1989, Academic Press: London, p. 129-150.
23. Pernodet, J., et al., Resistance to spiramycin in *Streptomyces ambofaciens*, the producer organism, involves at least two different mechanisms. *J. Gen. Microbiol.*, 1993, 139: p. 1003-1011.
24. Matin, A., et al., Genetic basis of starvation survival in nondifferentiating

- bacteria. Annu. Rev. Microbiol.*, 1989, 43: p. 293-316.
25. Bibb, M., The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiol.*, 1996, 142: p. 1335-1334.
26. Redenbach, M., et al., A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.*, 1996, 21(1): p. 77-96.
27. Stackebrandt, E. and C. Woese, Towards a phylogeny of the actinomycetes and related organisms. *Curr. Microbiol.*, 1981, 5: p. 197-202.
28. Kieser, H., T. Kieser, and D. Hopwood, A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *J. Bacteriol.*, 1992, 174: p. 5496-5507.
29. Birch, A., A. Hausler, and R. Hutter, Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp. *J. Bacteriol.*, 1990, 172(8): p. 4138-4142.
30. Hornemann, U., et al., Spectinomycin resistance and associated DNA amplification in *Streptomyces achromogenes* subsp. *rubradiris*. *J. Bacteriol.*, 1987, 170: p. 4634-4651.
31. Kinashi, H., M. Shimaji, and A. Sakai, Gigant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes. *Nature*, 1987, 328: p. 454-456.
32. Bibb, M., R. Freeman, and D. Hopwood, Physical and genetical characterisation of second sex factor, SCP2, for *S. coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.*, 1977, 154: p. 155-156.
33. Wright, L. and D. Hopwood, Identification of antibiotic determined by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.*, 1976, 95: p. 96-106.
34. Tomich, P. and Y. Yagi, The utility of *Streptomyces* as hosts for gene cloning. *Genetic Engineering.*, 1990, 12: p. 53-72.
35. Vögtli, M. and S. Cohen, The chromosomal integration site for the *Streptomyces* plasmid SLPI is a functional tARN Tyr gene essential for cell viability. *Mol. Microbiol.*, 1992, 6(201): p. 3041-3050.

36. Kendall, K. and S. Cohen, Complete nucleotide sequence of, the *S. lividans* plasmid pIJ101 and correlation of the sequence with genetic properties. *J. Bacteriol.*, 1988. 170: p. 4634-4651.
37. Bruton, C., E. Guthrie, and K. Chater, Phage vectors that allow monitoring of transcription of secondary metabolism genes in *Streptomyces*. *Biotechnology*, 1991. 9: p. 652-656.
38. Willey, J., R. Schwedock, and K. Losick, Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Genes. Devel.*, 1993. 75: p. 895-903.
39. Pope, M., B. Green, and J. Westpheling, The bald mutants of *Streptomyces coelicolor* are defective in the regulation of carbon utilization, morphogenesis and cell-cell signaling. *Mol. Microbiol.*, 1996. 19: p. 747-756.
40. Leskiw, B., M. Bibb, and K. Chater, The use of rare codon specifically during development? *Mol. Microbiol.*, 1991. 5: p. 2861-2867.
41. Wright, F. and M. Bibb, Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* denome. *Gene.*, 1992. 113: p. 55-65.
42. Gramajo, H., E. Takano, and M. Bibb, Stationary-phase production of the antibiotic actinorhodin in *S. coelicolor* es transcriptionally regulated. *Mol. Microbiol.*, 1993. 7: p. 837-845.
43. Willey, J., et al., Extracellular complementation of a developmental mutation implicates a small sporulation protein in aerial mycelium formation by *S. coelicolor*. *Cell.*, 1991. 65: p. 641-650.
44. Davis, N. and K. Chater, The *Streptomyces coelicolor* *whiB* gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation. *Mol. Gen. Genet.*, 1992. 232: p. 351-358.
45. Davis, N. and K. Chate, Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide antibiotics. *Mol. Microbiol.*, 1990. 4: p. 1679-1691.

46. Holt, T., et al., Global changes in gene expression related to antibiotic synthesis in *Streptomyces higroscopicus*. *Mol. Microbiol.*, 1992, 6(8): p. 969-980.
47. Dary, A., et al., Large genomic rearrangement of the instable region in *S. ambofaciens* are associated with major changes in global gene expression. *Mol. Microbiol.*, 1993, 10(4): p. 759-769.
48. Servant, P. and P. Mazodier, Characterization of *Streptomyces albus* 18-kD heat shock-responsive protein. *J. Bacteriol.*, 1995, 177(11): p. 2998-3003.
49. Vohradský, J., X. Li, and C. Thompson, Identification of procaryotic developmental stages by statistical analyses of two-dimensional gel patterns. *Electrophoresis*, 1997, 18: p. 1418-1428.
50. Salah-Bey, K., V. Blanc, and C. Thompson, Stress-activated expression of a *Streptomyces pristinaespiralis* multidrug resistance gene (*ptr*) in various *Streptomyces* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 1995, 17: p. 1001-1012.
51. Puglia, A., J. Vohradsky, and C. Thompson, Developmental control of the heat-shock stress regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.*, 1995, 17(4): p. 737-746.
52. Blanco, G., et al., Synthesis of ribosomal proteins during growth of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.*, 1994, 12(3): p. 375-385.
53. VanBogelen, R. and F. Neidhardt, Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87: p. 5589-5593.
54. Hecker, M., W. Schumann, and U. Völker, Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 1996, 19: p. 417-428.
55. Zhou, Y., et al., Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor 32. *J. Bacteriol.*, 1988, 170: p. 3640-3649.
56. Yu, T. and D. Hopwood, Ectopic expression of the *Streptomyces coelicolor* *WhiE* genes for polyketide spore pigment synthesis and their interaction with the *act* genes for actinorhodin biosynthesis. *Microbiol.*, 1995, 141: p. 2779-

2791.

57. Khosla, C., S. Ebert-Khosla, and D. Hopwood, Targeted gene replacements in a *Streptomyces* polyketide synthase gene cluster: role for the acyl carrier proteins. *J. Bacteriol.*, 1992, 175: p. 2197-2204.
58. Hopwood, D., et al., Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. 1985, Norwich: John Innes Foundation.
59. Bullock, W., J. Fernandez, and J. Short, XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *E. coli* strain with beta galactosidase selection. *Bio Techniques*, 1987, 5: p. 376-377.
60. Yanisch-Perron, C., J. Vieria, and J. Messing, Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 1985, 33: p. 103-119.
61. Doull, J. and L. Vining, Culture conditions promoting dispersed growth and biphasic production of actinorhodin in shaken cultures of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS*, 1989, 65: p. 265-268.
62. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis, Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, ed. n. edn. 1989, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
63. Lowry, O., et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193: p. 265-275.
64. Bradford, M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: p. 248-25.
65. O' Farrell, P., High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 1975, 250(10): p. 4007-4021.
66. Garrels, J., Two-dimensional Gel Electrophoresis and Computer Analysis of Proteins Synthesized by Clonal Dell Lines. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254(16): p. 7961-7977.
67. Schägger, H. and G. Jagow, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide

- gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem., 1987, 166: p. 368-379.
68. Matsudaira, P., Sequence from Picomole Quantities of Proteins Electroblotted onto Polyvinylidene Difluoride Membranes. J. Biol. Chem., 1987, 262(21): p. 10035-10038.
69. Patterson, S. and R. Aebersold, Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. Electrophoresis, 1995, 16: p. 1791-1814.
70. Steinman, H., Bacteriocuprein superoxide dismutases in pseudomonas. J. Bacteriol., 1985, 162: p. 1255-1260.
71. Feinberg, A. and B. Vogelstein, A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. Anal. Biochem., 1984, 137: p. 266-267.
72. Yura, T., H. Nagai, and H. Mori, Regulation of the heat-shock response in bacteria. Annu. Rev. Microbiol., 1993, 47: p. 321-350.
73. VanBogelen, R., P. Kelley, and F. Neidhardt, Differential induction of heat shock, SOS, and oxidative stress regulons and accumulation of nucleotides in Escherichia coli. J. Bacteriol., 1987, 169: p. 26-32.
74. Kreuger, J. and G. Walker, groEL and dnaK genes of Escherichia coli are induced by UV irradiation and nalidixic acid in an htpR⁺-dependent fashion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81: p. 1499-1503.
75. Grossman, A., et al., Stringent response in Escherichia coli induces expression of heat shock proteins. J. Mol. Biol., 1985, 186: p. 357-365.
76. Jones, P., R. VanBogelen, and F. Neidhardt, Induction of proteins in response to low temperature in Escherichia coli. J. Bacteriol., 1987, 169(5): p. 2092-2095.
77. Jones, P. and M. Inouye, The cold-shock response-a hot topic. Mol. Microbiol., 1994, 11(5): p. 811-818.
78. Schnier, J., The synthesis of heat-shock proteins after a decrease in

- translational capacity in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol., 1987, 133: p. 3151-3158.
79. Lemaux, P., et al., Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *Escherichia coli* following temperature shifts. Cell., 1978, 13: p. 427-434.
80. Jones(c), P., et al., Function of a relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 1992, 174(12): p. 3903-3914.
81. Panoff, J., et al., Differentiation between cold shock proteins and cold acclimation proteins in a mesophilic gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* JH2-2. J. Bacteriol., 1997, 179(13): p. 4451-4454.
82. Berger, F., P. Normand, and P. Potier, *capA*, a *cspA*-like gene that encodes a cold acclimation protein in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55. J. Bacteriol., 1997, 179(18): p. 5670-5676.
83. Wu, L. and N. Welker, Temperature-induced protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* NUB36. J. Bacteriol., 1991, 173: p. 4889-4892.
84. Michel, V., et al., The cold shock response of the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fragi* involves four low-molecular-mass nucleic acid-binding proteins. J. Bacteriol., 1997, 179(23): p. 7331-7342.
85. Julseth, C. and W. Inniss, Induction of protein synthesis in response to cold shock in the psychrotrophic yeast *Trichosporon pullans*. Can. J. Microbiol., 1990, 36: p. 519-524.
86. Salerno, G. and H. Pontis, Raffinose synthesis in *Chorella vulgaris* cultures after a cold shock. Plant. Physiol., 1988, 89: p. 648-651.
87. Tiku, P., et al., Cold-induced expression of 9- desaturase in carp by transcriptional and post translational mechanisms. Science, 1996, 271: p. 815-818.
88. Phan-Thanh, L. and T. Gormon, Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis, 1995, 16: p. 444-450.
89. McGovern, V. and J. Oliver, Induction of cold-responsive proteins in *Vibrio*

- vulnificus*. *J. Bacteriol.*, 1995. 177(14): p. 4131-4133.
90. Panoff, L., et al., The cold-shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.*, 1994. 29: p. 213-216.
91. Graumann, O., et al., Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 1996. 178(15): p. 4611-4619.
92. Jones(b), P., et al., Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *E.coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996. 93: p. 76-80.
93. Goldstein, J., N. Pollitt, and M. Inouye, Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990. 87: p. 283-287.
94. Lee, S., et al., Family of the major cold-shock protein, CspA(CA7.4), of *E.coli*, whose members show a high sequence similarity with the eukaryotic Y-box binding proteins. *Mol. Microbiol.*, 1994. 11: p. 833-839.
95. Nakashima, K., et al., A novel member of the cspA family of genes that is induced by cold shock in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1996. 178: p. 2994-2997.
96. Yamanaka, K., L. Fang, and M. Inouye, The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol. Microbiol.*, 1998. 27(2): p. 247-255.
97. Mayr, B., et al., Identification and purification of a family of dimeric mayor cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201. *J. Bacteriol.*, 1996. 178: p. 2916-2925.
98. Graumann, P., et al., A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol. Microbiol.*, 1997. 25(4): p. 741-756.
99. Francis, K., C. Rees, and G. Stewart, EMBL/DDBJ accession no. X91789. 1995.
100. Law, R. and K. Bej, EMBL/CCBJ accesson no. L23115. 1993.
101. Av-Gay, Y., Y. Aharonowitz, and G. Cohen, *Streptomyces* contain a 7.0 kDa

- cold shock like protein. Nucleic Acids Research*, 1992. 20(20): p. 5478.
102. Bae, W., P. Jones, and M. Inouye. *CspA, the major cold shock protein of Escherichia coli, negatively regulates its own gene expression. J. Bacteriol.*, 1997, 179(22): p. 7081-7088.
103. Jiang, W., Y. Hou, and M. Inouye. *CspA, the mayor cold shock protein of Escherichia coli, is a RNA chaperone. J. Biol. Chem.*, 1997, 272: p. 196-202.
104. Jones(d), P., et al., *DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in E. coli. J. Bacteriol.*, 1992, 174: p. 5798-5802.
105. Jones(a), P. and M. Inouye. *RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. Mol. Microbiol.*, 1996, 21(6): p. 1207-1218.
106. Graumann, P. and M. Marahiel. *Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. Arch. Microbiol.*, 1996, 166: p. 293-300.
107. Bouvet, P. and A. Wolffe. *A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within Xenopus oocytes. Cell*, 1994, 77: p. 931-941.
108. Aharonowitz, Y., *Molecular Microbiology and Biotechnilogy.*, 1995.
109. Cole, S., R. Brosch, and B. Barrel. *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature*, 1998, 393(6685): p. 537-544.
110. Strohl, W., *Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. Nucleic Acids Res.*, 1992, 20(5): p. 961-974.
111. Kaneko, T., et al., *Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. DNA Res.*, 1996, 3(3): p. 109-136.
112. Klenk, H., et al., *The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon Archaeoglobus fulgidus. Nature.*, 1997, 390(6658): p. 364-370.
113. Martin, J. and P. Liras. *Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. Annu. Rev.*

- Microbiol.*, 1989, 43: p. 173-206.
114. Duchêne(a), A., et al., Characterization of two groEL genes in Streptomyces coelicolor A3(2). *Gene.*, 1994, 144: p. 97-101.
115. Dûchene(b), A., C. Thompson, and P. Mazodier, Transcriptional analysis of groEL genes in Streptomyces coelicolor A3(2). *Mol. Gen. Genet.*, 1994, 245: p. 61-68.
116. Rinke de Wit, T., et al., Mycobacteria contain two groEL like genes: the second Mycobacterium leprae groEL gene is arranged in an operon with groES. *Mol. Microbiol.*, 1992, 6: p. 1995-2007.
117. Cole, S., R. Brosch, and B. Barrel, Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, 1998, 393: p. 537-544.
118. Amirón, M., et al., A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved Escherichia coli. *Gen. and Devel.*, 1992, 6: p. 2646-2654.
119. Baker, R., F. Singleton, and M. Hood, Effects of nutrient deprivation on Vibrio cholerae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1983, 46: p. 930-940.
120. Cronan, J., Phospholipid alterations during growth of Escherichia coli. *J. Bacteriol.*, 1968, 95: p. 2054-2061.
121. Grossman, A., Integration of developmental signals and the initiation of sporulation in Bacillus subtilis. *Cell.*, 1991, 65: p. 5-8.
122. Hengge-Aronis, R., Survival of Hunger and Stress: The Role of rpoS in Early Stationary Phase Gene Regulation in E.coli. *Cell*, 1993, 72: p. 165-168.
123. Siegele, D. and R. Kolter, Life after log. *J. Bacteriol.*, 1992, 174: p. 345-348.
124. Hengge-Aronis, R., et al., Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by rpoS and are involved in stationary phase thermotolerance in E. coli. *J. Bacteriol.*, 1991, 173: p. 7918-7924.
125. Ishihama, A., Genetic strategies of bacteria for stationary- phase survival. *Actinomycetologica.*, 1995, 9: p. 236-243.

126. Wada, A., et al., Structure and probable genetic location of a "ribosome modulation factor" associated with 100S ribosomes in stationary-phase *E. coli* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1990, 87; p. 2657-2661.
127. Jenkins, D., S. Chaisson, and A. Matin, Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1990, 172; p. 2779-2781.
128. Jenkins, D., J. Schultz, and A. Matin, Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 1988, 170(9); p. 3910-3914.
129. Lange, R. and R. Hengge-Aronis, Identification of a central regulator of stationary phase gene expression in *E. coli*. *Mol. Microbiol.*, 1991, 5; p. 49-59.
130. Matin, A., The molecular basis of carbon -starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 1991, 5; p. 3-10.
131. Davis, B., M. Luger, and P. Tai, Role of ribosome degradation in the death of starved *E. coli* cells. *J. bacteriol.*, 1986, 166; p. 439-445.
132. Groat, R., et al., Starvation proteins in *E. coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J. Bacteriol.*, 1986, 168; p. 486-493.
133. Reeve, C., P. Amy, and A. Matin, Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 1985, 160; p. 1041-1046.
134. Tormo, A., M. Almiron, and R. Kolter, *surA*, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. *J. Bacteriol.*, 1990, 172; p. 4339-4347.
135. Siegele, D. and R. Kolter, Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant defective in resuming growth after starvation. *Gen. & Devel.*, 1993, 7; p. 2629-2640.
136. Laurent-Winter, C., P. Lejeune, and A. Danchin, The *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS is one of the first proteins to be synthesized after a nutritional upshift. *Res. Microbiol.*, 1995, 146; p. 5-16.
137. Yuan, Y., D. Crane, and B. Ill, Stationary Phase-Associated Protein

- Expression in *Micobacterium tuberculosis*: Function of the Mycobacterial alfa-Crystallin Homolog. J. Bacteriol., 1996. 178(15): p. 4484-4492.
138. Maillet, I., et al., Rapid identification of yeast proteins on two-dimensional gels. J. Biol. Chem., 1995. 271(17): p. 10263-10270.
139. Jobling, M. and D. Ritchie, The nucleotide sequence of a plasmid determinant for resistance to tellurium anions. Gene., 1988. 66: p. 245-258.
140. Kim, E., et al., Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*., in FEBS. 1996. p. 178-185.
141. How, Y. and D. Taylor, Incidence of tellurite resistance determinants among plasmids of different incompatibility groups. Plasmid, 1994. 32: p. 306-311.
142. Silver, S. and L. Phung, Bacterial heavy metal resistance: New surprises. Annu. Rev. Microbiol., 1996. 50: p. 753-789.
143. Kim, E., et al., Expression and regulation of the *sodF* gene encoding iron- and zinc-containing superoxide dismutase in *Streptomyces coelicolor* Müller. J. Bacteriol., 1998. 180(8): p. 2014-2020.
144. Kim, E., et al., Transcriptional and post-transcriptional regulation by nickel of *sodN* gene encoding nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces coelicolor* Müller. Mol. Microbiol., 1998. 27(1): p. 187-195.
145. Farr, S. and T. Kogoma, Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Microbiol. Rev., 1991. 55: p. 561-585.
146. Stortz, G., et al., Bacterial defenses against oxidative stress. TIG, 1990. 6(11): p. 363-368.
147. Gregory, E. and I. Fridovich, Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. J. Bacteriol., 1973. 114: p. 543-548.
148. Hidalgo, E., H. Ding, and B. Dimple, Redox signal transduction via iron-sulfur cluster in the SoxR transcription activator. TIBS., 1997. 22: p. 207-210.