



**ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS DE TIPO EUCARIOTA DE
Myxococcus xanthus: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA PROTEÍNA
PksA (Mxan5696)**

**TESIS DOCTORAL
ALFREDO CASTAÑEDA GARCÍA**

**ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS DE TIPO EUCARIOTA DE
Myxococcus xanthus: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA PROTEÍNA
PksA (Mxan5696)**

Memoria presentada por el Licenciado Alfredo Castañeda García para
optar al título de Doctor en Biología
Granada, Noviembre de 2007

Alfredo Castañeda García



**ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS DE TIPO EUCARIOTA DE
Myxococcus xanthus: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA PROTEÍNA
PksA (Mxan5696)**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada bajo la dirección de los Doctores D. José Muñoz Dorado y Dña. Juana Pérez Torres

José Muñoz Dorado

Profesor Titular de la Universidad de Granada

Juana Pérez Torres

Profesora Titular de la Universidad de Granada



**ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS DE TIPO EUCARIOTA DE
Myxococcus xanthus: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA PROTEÍNA
PksA (Mxan5696)**

El desarrollo de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca del Plan de Formación de Profesorado Universitario (PFPU) concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia, así como a la concesión de una estancia corta en el Departamento de Genética de la Universidad de Murcia. Finalmente, la investigación llevada a cabo ha sido financiada gracias al proyecto BMC2003-02038.



ÍNDICE DE MATERIAS

A. INTRODUCCIÓN	1
I. Mixobacterias	3
I. 1. Características generales de las mixobacterias	3
I. 2. Ecología de las mixobacterias	4
I. 3. Taxonomía y filogenia	5
I. 4. Movilidad por deslizamiento en <i>M. xanthus</i>	6
I. 4. 1. Movilidad social	7
I. 4. 2. Movilidad aventurera	8
I. 4. 3. Regulación de la movilidad	9
I. 4. 4. Quimiotaxis	9
I. 5. Ciclo de vida de <i>M. xanthus</i>	10
I. 5. 1. Ciclo de vida vegetativo	10
I. 5. 2. Ciclo de desarrollo	11
i) Oscilaciones rítmicas	12
ii) Agregación: Formación de cuerpos fructificantes	13
iii) Esporulación	14
iv) Germinación	14
I. 5. 3. Inducción química de la esporulación	15
I. 6. Señalización celular durante el ciclo de desarrollo de <i>M. xanthus</i>	16
I. 6. 1. Señales implicadas en el ciclo de desarrollo de <i>M. xanthus</i>	16
i) Señal A	16
ii) Señal B	18
iii) Señal C	18
iv) Señal D	22
v) Señal E	22
I. 6. 2. Respuesta estricta	23
I. 7. Genoma de <i>M. xanthus</i>	24
II. Transducción de señales en bacterias	26
II. 1. Características generales de la señalización en bacterias	26
II. 2. Sistemas reguladores de dos componentes	27
II. 2. 1. Histidina quinasas	28
II. 2. 2. Reguladores de respuesta	28
II. 3. Descubrimiento, distribución y origen de las ePKs en bacterias	29

III. Quinasas de tipo eucariota (ePKs)	30
III. 1. Características básicas de las ePKs	30
III. 2. Estructura del núcleo catalítico quinasa	31
III. 2. 1. Lóbulo N-terminal del dominio catalítico	31
III. 2. 2. Lóbulo C-terminal del dominio catalítico	32
III. 3. Actividad catalítica de las ePKs	34
III. 4. Reconocimiento del sustrato por las ePKs	35
III. 4. 1. Elementos locales	35
III. 4. 2. Elementos distales	35
III. 5. Regulación de la actividad catalítica	36
III. 5. 1. Fosforilación	36
i) Fosforilación de la región de activación	36
ii) Fosforilación en regiones diferentes al segmento de activación	37
III. 5. 2. Regulación por segundos mensajeros	37
III. 5. 3. Regulación por proteínas reguladoras	38
III. 6. Transducción de señales por ePKs	38
III. 6. 1. Activación de quinasas receptoras	38
III. 6. 2. Rutas de señalización integradas por ePKs	39
III. 6. 3. Efectores modulados por ePKs	41
III. 6. 4. Interacciones proteicas en las rutas integradas ePKs	42
III. 7. Funciones de las ePKs en bacterias	43
III. 7. 1. Metabolismo	43
III. 7. 2. Movilidad	43
III. 7. 3. Diferenciación	44
III. 7. 4. Adaptación a condiciones de estrés	45
III. 7. 5. Patogénesis	45
III. 8. ePKs caracterizadas en <i>M. xanthus</i>	46
III. 8. 1. Pkn1	46
III. 8. 2. Pkn2	47
III. 8. 3. Pkn4	47
III. 8. 4. Pkn5 y Pkn6	48
III. 8. 5. Pkn8 y Pkn14	49
III. 8. 6. Pkn9	50
III. 8. 7. MasK	50
III. 8. 8. PknD1 y PknD2	51
IV. Fosfatasa de tipo eucariota	52
IV. 1. Características generales de las proteínas fosfatasa de tipo eucariota	52
IV. 2. Tipos de fosfatasa de tipo eucariota	53
IV. 2. 1. Fosfatasa PPP	53
IV. 2. 2. Fosfatasa PPM	53
IV. 2. 3. Fosfatasa PTP	53
IV. 3. Fosfatasa de tipo eucariota en <i>M. xanthus</i>: Pph1	

B. OBJETIVOS	55
I. Objetivos de este trabajo de investigación	57
C. MATERIAL Y MÉTODOS	59
I. Microorganismos	61
I. 1. Estirpes de <i>E. coli</i>	61
I. 2. Estirpes de <i>M. xanthus</i>	62
I. 3. Estirpes de <i>S. cerevisiae</i>	62
II. Medios de cultivo	62
II. 1. Medios de cultivo de <i>E. coli</i>	62
II. 1. 1. Tipos de medios de cultivo	62
II. 1. 2. Compuestos adicionados a los medios de cultivo de <i>E. coli</i>	63
II. 2. Medios de cultivo de <i>M. xanthus</i>	64
II. 2. 1. Medios de crecimiento vegetativo	64
II. 2. 2. Medios inductores del desarrollo	64
II. 2. 3. Compuestos adicionados a los medios de cultivo de <i>M. xanthus</i>	65
II. 3. Medios de cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	66
II. 3. 1. Tipos de medios de cultivo	66
III. Soluciones	67
III. 1. Tampones generales: lavado, resuspensión y lisis	67
III. 2. Electroforesis de ADN	67
III. 3. Southern blot	67
III. 4. Hibridación de ADN y detección con fosfatasa alcalina	67
III. 5. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE	68
III. 6. Purificación de proteínas y ensayo de actividad	68
III. 7. Western blot	68
III. 8. Determinación de actividad β-galactosidasa	68
IV. Vectores y oligonucleótidos	68
IV. 1. Vectores	68
IV. 2. Oligonucleótidos	70

V. Cultivo de microorganismos	72
V. 1. Cultivo de <i>E. coli</i>	72
V. 2. Cultivo de <i>M. xanthus</i>	72
V. 3 Cultivo de <i>S. cerevisiae</i>	73
VI. Manipulación del ADN	73
VI. 1. Purificación preparativa de ADN	73
VI. 1. 1. ADN cromosómico	73
i) Preparación de ADN cromosómico de <i>M. xanthus</i>	73
VI. 1. 2. ADN plasmídico	74
i) Preparación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	74
ii) Extracción de ADN plasmídico a partir de <i>S. cerevisiae</i>	74
VI. 2. Amplificación de ADN por PCR	75
VI. 3. Tratamiento enzimático del ADN	75
VI. 3. 1. Digestión del ADN	75
VI. 3. 2. Desfosforilación del ADN	76
VI. 3. 3. Unión enzimática de fragmentos de ADN	76
VI. 4. Secuenciación automática del ADN	77
VI. 5. Electroforesis de ADN	77
VI. 5. 1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	77
VI. 5. 2. Electroforesis de ADN en geles de acrilamida	78
VII. Manipulación del ARN	78
VII. 1. Purificación preparativa de ARN de <i>M. xanthus</i>	78
VII. 2. RT-PCR	79
VIII. Transferencia de ADN	79
VIII. 1. Transferencia de ADN a <i>M. xanthus</i>	79
VIII. 2. Transferencia de ADN a <i>E. coli</i>	80
VIII. 2. 1. Transformación de <i>E. coli</i>	80
VIII. 2. 2. Electroporación de <i>E. coli</i>	81
VIII. 3. Transferencia de ADN a <i>S. cerevisiae</i>	81

IX. Hibridación de ácidos nucleicos	82
IX. 1. Transferencia de ADN a filtros de <i>Hybond-N</i>⁺	82
IX. 1. 1. Transferencia de ADN a partir de colonias bacterianas (hibridación de colonias)	82
IX. 1. 2. Transferencia de ADN a partir de un gel de agarosa: Southern blot	82
IX. 2. Marcaje de la sonda de ADN con DIG (digoxigenina) dUTP	83
IX. 3. Hibridación de la membrana con la sonda marcada	84
IX. 4. Revelado mediante detección con fosfatasa alcalina	84
X. Técnicas para el estudio de proteínas	85
X. 1. Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE	85
X. 1. 1. Preparación y corrida de geles SDS-PAGE	85
X. 1. 2. Tinción de geles SDS-PAGE con azul Coomassie	86
X. 2. Expresión y purificación de proteínas	86
X. 2. 1. Inducción de proteínas recombinantes	86
X. 2. 2. Preparación de los extractos proteicos crudos	87
X. 2. 3. Separación de las fracciones celulares	87
X. 2. 4. Purificación y solubilización de cuerpos de inclusión	87
X. 2. 5. Purificación de cromatografía de afinidad	88
X. 2. 6. Renaturalización de las proteínas purificadas	88
X. 3. Detección de proteínas recombinantes	88
X. 3. 1. Transferencia de proteínas a membranas: Western blot	89
X. 3. 2. Inmunodetección	89
X. 4. Ensayo de la actividad de fosfotransferencia	90
XI. Sistema del doble híbrido de levadura	90
XI. 1. Construcción de una genoteca de expresión de <i>M. xanthus</i>	90
XI. 2. Detección de interacciones proteicas en el sistema del doble híbrido	92
XII. Determinación de actividad β-galactosidasa	93
XII. 1. Actividad β-galactosidasa de <i>M. xanthus</i>	93
XII. 1. 1. Determinación cualitativa	93
XII. 1. 2. Determinación cuantitativa	93
XII. 2. Actividad β-galactosidasa en <i>S. cerevisiae</i>	95

XIII. Caracterización de mutantes de delección en fase	96
XIII. 1. Crecimiento vegetativo	96
XIII. 2. Movilidad por deslizamiento	96
XIII. 3. Ciclo de desarrollo	96
XIII. 4. Esporulación	97
XIII. 5. Germinación	97
XIV. Bioinformática	98
D. RESULTADOS	99
I. Estudio del quinoma procariótico	101
I. 1. Análisis de las ePKs en procariotas	101
I. 2. Análisis de las ePKs en el grupo de las mixobacterias	103
I. 3. Características generales de las ePKs en mixobacterias	104
I. 4. Dominio catalítico de las ePKs en mixobacterias	105
I. 4. 1. Estudio de la secuencia del dominio catalítico	105
I. 4. 2. Actividad catalítica: especificidad	107
I. 4. 3. Regulación de la actividad catalítica	107
I. 5. Dominio regulador de las ePKs de mixobacterias	109
I. 6. Relación del quinoma con la expansión del genoma en las mixobacterias	114
I. 7. Sintenia en las regiones cromosómicas que cifran ePKs dentro del suborden <i>Cystobacterinae</i> de las mixobacterias	117
I. 8. Organización de los genes para ePKs en el genoma de <i>M. xanthus</i>	119
I. 9. Estudio del perfil de expresión de distintos genes que codifican ePKs de <i>M. xanthus</i>	121
II. Caracterización de la ePK PksA de <i>M. xanthus</i> (Mxan5696)	125
II. 1. Análisis de la secuencia de gen <i>pksA</i> (Mxan5696)	125
II. 2. Análisis de la secuencia de la quinasa PksA	127
II. 3. Estudio de la topología de la proteína PksA	128
II. 3. 1. Análisis de los dominios transmembrana	128
II. 3. 2. Construcción de la fusión <i>lacZ</i> tras el dominio transmembrana de la quinasa	130
II. 3. 3. Análisis cualitativo de la actividad β -galactosidasa	131
II. 3. 4. Análisis cuantitativo de la actividad β -galactosidasa	131
II. 4. Dominio catalítico de la quinasa PksA	132
II. 5. Plegamiento del dominio catalítico de la quinasa PksA	135

III. Análisis de la actividad catalítica de la quinasa PksA	136
III. 1. Expresión heteróloga de la proteína quinasa PksA	136
III. 2. Purificación de la quinasa PksA recombinante	139
III. 3. Análisis de la actividad catalítica de la quinasa PksA	140
IV. Estudio del perfil de expresión de la quinasa PksA	142
IV. 1. Análisis cuantitativo de la actividad β -galactosidasa de la fusión <i>lacZ</i> con el gen <i>pksA</i>	142
IV. 2. Análisis de la dependencia de la expresión de la quinasa PksA respecto al nivel de nutrientes en el medio	143
V. Estudio del operón del gen <i>pksA</i>	144
V. 1. Análisis del locus <i>pksA</i>	144
V. 2. Determinación de la coexpresión del gen <i>pksA</i> por RT-PCR	147
VI. Papel de la quinasa PksA en el ciclo de vida de <i>M. xanthus</i>	149
VI. 1. Construcción de una cepa portadora de una delección en fase del gen <i>pksA</i>	149
VI. 2. Análisis fenotípico del mutante de delección $\Delta pksA$	151
VI. 2. 1. Crecimiento vegetativo	151
VI. 2. 2. Desarrollo	151
i) Formación de cuerpos fructificantes	152
ii) Esporulación y germinación	153
VII. Papel de regulador PspA en el ciclo de vida de <i>M. xanthus</i>	154
VII. 1. Construcción de una cepa portadora de una delección en fase del gen <i>pspA</i>	155
VII. 2. Análisis fenotípico del mutante de delección $\Delta pspA$	156
VII. 2. 1. Crecimiento vegetativo	156
VII. 2. 2. Desarrollo	156
i) Formación de cuerpos fructificantes	157
ii) Esporulación y germinación	158
VIII. Expresión de marcadores del desarrollo	159
VIII. 1. Construcción de fusiones <i>lacZ</i> con los marcadores del desarrollo <i>fruA</i> , <i>mrpC</i> y <i>tps</i>	160
VIII. 2. Actividad β -galactosidasa de las fusiones <i>lacZ</i> con los marcadores <i>fruA</i> , <i>mrpC</i> y <i>tps</i> en el silvestre y los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$	161
VIII. 2. 1. Marcador <i>fruA</i>	161
VIII. 2. 2. Marcador <i>mrpC</i>	162
VIII. 2. 3. Marcador <i>tps</i>	163

IX. Efecto sobre la movilidad de las deleciones $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$	163
X. Efecto de agentes de estrés sobre el crecimiento de los mutantes de deleción $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$	167
X. 1. Crecimiento frente a compuestos que alteran componentes celulares bacterianos	167
X. 2. Estrés osmótico	168
X. 3. Estrés oxidativo	168
X. 3. 1. Crecimiento en presencia de agentes productores de estrés oxidativo	168
X. 3. 2. Efecto del estrés oxidativo sobre la expresión del operón <i>pksA</i>	170
X. 4. Estrés nutricional	170
X. 4. 1. Crecimiento ante agentes que inducen un estrés nutricional	170
X. 4. 2. Efecto del CCCP sobre el ciclo de desarrollo	172
X. 4. 3. Efecto del CCCP sobre la expresión de la quinasa PksA y el regulador PspA	173
XI. Identificación de proteínas que interactúan con la quinasa PksA	174
XI. 1. Interacción de la quinasa PksA con el regulador PspA en el sistema del doble híbrido de levadura	176
XI. 1. 1. Construcción de fusiones para la expresión de la proteína quinasa PksA como cebo y del regulador PspA como presa	176
XI. 1. 2. Estudio de la interacción PksA-PspA en el sistema del doble híbrido	177
XI. 2. Estudio de la interacción PspA-PilR en el sistema del doble híbrido de levadura	180
XI. 3. Rastreo de interacciones con la quinasa PksA en una genoteca de expresión de <i>M. xanthus</i>	181
XI. 3. 1. Obtención de una genoteca de expresión de ADN cromosómico de <i>M. xanthus</i>	181
XI. 3. 2. Búsqueda de proteínas que interactúan con la quinasa PksA a partir de la genoteca de expresión	182
XI. 3. 3. Secuenciación de los plásmidos presa contenidos en las cepas de levadura interaccionantes	184
XI. 4. Caracterización de la proteína Pfl (Mxan1834)	186
XI. 4. 1. Interacción de la proteína Pfl con la quinasa PksA	186
XI. 4. 2. Expresión del gen <i>pfl</i>	187
XI. 4. 3. Deleción del gen <i>pfl</i>	188
XI. 5. Caracterización de la proteína Znf (Mxan5813)	190
XI. 5. 1. Interacción de la proteína Znf con la quinasa PksA	190
XI. 5. 2. Expresión del gen <i>znf</i>	191
XI. 5. 3. Deleción del gen <i>znf</i>	192

E. DISCUSIÓN	195
I. ePKs en mixobacterias	197
I. 1. Relevancia de las ePKs en mixobacterias	197
I. 2. Características generales de las ePKs en mixobacterias	199
I. 3. Rutas de señalización integradas por ePKs en mixobacterias	200
II. Estudio de la ruta de transducción de señales PksA-PspA	204
II. 1. Caracterización de la quinasa PksA de <i>M. xanthus</i>	204
II. 2. El locus <i>pksA</i> : Caracterización del regulador PspA de <i>M. xanthus</i>	206
II. 3. Control del ciclo de vida de <i>M. xanthus</i> por la quinasa PksA y el regulador PspA	207
II. 3. 1. Control del ciclo de desarrollo por la quinasa PksA y el regulador PspA	207
II. 3. 2. Mecanismo de regulación del desarrollo	209
II. 3. 3. Modulación del desarrollo en función del nivel de nutrientes	210
II. 4. Control de la movilidad por la quinasa PksA y el regulador PspA	211
II. 5. Control de la respuesta al estrés oxidativo por la quinasa PksA y el regulador PspA	213
II. 6. Contacto de la quinasa PksA con el regulador PspA mediante interacción proteína-proteína	214
II. 7. Transducción de señales en la ruta PksA-PspA	215
II. 8. Integración de la ruta PksA-PspA en la red de señalización celular	217
F. CONCLUSIONES	219
G. BIBLIOGRAFÍA	223

ÍNDICE DE FIGURAS

A. INTRODUCCIÓN

Figura 1. Ciclo de vida de la mixobacteria <i>S. aurantiaca</i>	12
Figura 2. Modelo de la ruta de transducción de la señal C en <i>M. xanthus</i>	21
Figura 3. Transducción de señales en los sistemas reguladores de dos componentes	27
Figura 4. Motivos conservados en el dominio catalítico de las ePKs	30
Figura 5. Estructura tridimensional del dominio catalítico de la PKA	33
Figura 6. Ruta de señalización de las MAP quinasas	40

D. RESULTADOS

Bloque D.I.

Figura 7. Número de ePKs en procariotas en relación al tamaño de su genoma	101
Figura 8. Número de ePKs codificado por las bacterias de la subdivisión δ y ϵ de las Proteobacterias en relación al tamaño de su genoma	102
Figura 9. Número de ePKs codificadas por las diferentes especies de mixobacterias comparado con el encontrado en otros genomas de procariotas	103
Figura 10. Densidad de ePKs en procariotas	104
Figura 11. Conservación de los residuos esenciales para la actividad en las ePKs de mixobacterias	106
Figura 12. Regulación de la actividad en las ePKs de mixobacterias: quinasas RD y no RD	108
Figura 13. Fosforilación de la región de activación de las quinasas RD de <i>M. xanthus</i>	109
Figura 14. ePKs codificadas por el genoma de <i>M. xanthus</i>	112
Figura 15. Porcentaje de genoma dedicado a codificar ePKs en las mixobacterias secuenciadas	114
Figura 16. Tamaño de las ePKs codificadas por las mixobacterias	115
Figura 17. Duplicación de genes para ePKs en las especies del suborden <i>Cystobacterinae</i>	116
Figura 18. Sintenia en la región situada en torno al operón <i>pkn11-pkn7</i>	117
Figura 19. Sintenia en la región que contiene al gen <i>pkn3</i>	118
Figura 20. Sintenia en la región comprendida entre los genes <i>pknD1</i> y <i>pknD2</i>	118
Figura 21. Localización de los genes para ePKs en el genoma de <i>M. xanthus</i>	119
Figura 22. Disposición en el genoma de genes que cifran ePKs pertenecientes a un mismo operón	120
Figura 23. Disposición en el genoma de genes para ePKs asociados a genes para fosfatasa de tipo eucariota pertenecientes a los grupos PPP y PPM SpoIIE	120
Figura 24. Southern blot de la fusión <i>lacZ</i> con el gen <i>pksA</i> de <i>M. xanthus</i>	123
Figura 25. Actividad β -galactosidasa durante el crecimiento vegetativo (medio CTT) y el ciclo de desarrollo (medio CF) de las cepas portadoras de fusiones <i>lacZ</i> con diez genes para ePKs	124

Bloque D.II.	
Figura 26. Secuencia de codones del gen <i>pksA</i> completo	126
Figura 27. Organización estructural de la quinasa PksA de <i>M. xanthus</i>	128
Figura 28. Determinación de los dominios transmembrana en la quinasa PksA con el servidor TMHMM	128
Figura 29. Esquema de la fusiones en fase generadas por diferentes fragmentos del gen <i>pksA</i> con el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i>	129
Figura 30. Southern blot de la fusión <i>lacZ</i> Top TM de <i>M. xanthus</i>	130
Figura 31. Actividad β -galactosidasa de las cepas portadoras de fusiones <i>lacZ</i> con diferentes fragmentos del gen <i>pksA</i> . Organización estructural de la quinasa PksA	131
Figura 32. Secuencia de la proteína quinasa PksA (Mxan5696)	134
Figura 33. Modelado de la estructura tridimensional del dominio catalítico de la proteína quinasa PksA	135
Bloque D.III	
Figura 34. Western blot para la detección de la proteína PksA recombinante en las muestras de proteínas totales inducidas a 37°C y a 24°C	138
Figura 35. Western blot para determinar la localización de la proteína PksA recombinante en las distintas fracciones celulares aisladas a partir de la inducción a 37°C	139
Figura 36. Detección mediante Western blot de la proteína PksA recombinante purificada	140
Figura 37. Autofosforilación de la quinasa PksA	141
Bloque D.IV	
Figura 38. Actividad β -galactosidasa específica de la cepa <i>pksA lacZ</i> en medio sólido	142
Figura 39. Actividad β -galactosidasa específica de la cepa <i>pksA lacZ</i> en CTT líquido	143
Bloque D.V	
Figura 40. Organización genética del <i>locus pksA</i> con los genes que integran esta región	144
Figura 41. Sintenia en la organización del <i>locus pksA</i> en las mixobacterias <i>M. xanthus</i> y <i>S. aurantiaca</i>	146
Figura 42. Análisis mediante RT-PCR para confirmar la coexpresión del <i>locus pksA</i>	147
Figura 43. Productos de PCR obtenidos a partir de las reacciones de retrotranscripción para delimitar el operón en torno al <i>locus pksA</i>	148
Bloque D.VI	
Figura 44. Southern blot del mutante de delección $\Delta pksA$ de <i>M. xanthus</i>	151
Figura 45. Cuerpos fructificantes de la cepa silvestre wt y del mutante de delección $\Delta pksA$ de <i>M. xanthus</i> en medio CF	152
Figura 46. Recuento de esporas producidas por placa por la estirpe silvestre wt y el mutante de delección $\Delta pksA$ en medio CF y TPM	153

Bloque D.VII

- Figura 47.** Southern blot del mutante de delección $\Delta pspA$ de *M. xanthus* 156
- Figura 48.** Cuerpos fructificantes de la cepa silvestre wt y del mutante de delección $\Delta pspA$ de *M. xanthus* en medio CF 157
- Figura 49.** Cuerpos fructificantes de la cepa silvestre wt y del mutante de delección $\Delta pspA$ de *M. xanthus* en medio TPM 158
- Figura 50.** Recuento de esporas producidas por placa por la estirpe silvestre wt y el mutante de delección $\Delta pspA$ en medio CF y TPM 159

Bloque D.VIII

- Figura 51.** Southern blot de las fusiones *lacZ* con los genes *fruA*, *mrpC* y *tps* introducidas en el silvestre wt y los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ 161
- Figura 52.** Actividad β -galactosidasa específica de la fusión *lacZ* con el gen *fruA* en el silvestre wt, en el mutante $\Delta pksA$ y en el mutante $\Delta pspA$ durante el desarrollo en medio CF 162
- Figura 53.** Actividad β -galactosidasa específica de la fusión *lacZ* con el gen *mrpC* en el silvestre wt en el mutante $\Delta pksA$ y en el mutante $\Delta pspA$ durante el desarrollo en medio CF 162
- Figura 54.** Actividad β -galactosidasa específica de la fusión *lacZ* con el gen *tps* en el silvestre wt en el mutante $\Delta pksA$ y en el mutante $\Delta pspA$ durante el desarrollo en medio CF 163

Bloque D.IX

- Figura 55.** Movilidad de la estirpe silvestre wt, $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ de *M. xanthus* sobre placas de medio sólido CTT y CYE 164
- Figura 56.** Southern blot para la identificación del mutante de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ construidos a partir de la cepa DK1622 de *M. xanthus* 165
- Figura 57.** Movilidad de la cepa silvestre DK1622 y los mutantes de delección $DK\Delta pksA$ y $DK\Delta pspA$ de *M. xanthus* sobre medio CYE con 0.4% de agar y con 1.5% de agar 166

Bloque D.X

- Figura 58.** Curvas de crecimiento de la cepa silvestre wt, $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ de *M. xanthus* en presencia de KCl y sacarosa 168
- Figura 59.** Curva de crecimiento de la cepa silvestre wt, $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ de *M. xanthus* en presencia de peróxido de hidrógeno 169
- Figura 60.** Curvas de crecimiento de las cepas silvestre wt, $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ de *M. xanthus* en presencia de t-butilo hidroperóxido, nitrofurantoina, sulfato de cobre, paraquat, nitrito sódico y menadiona 169
- Figura 61.** Curva de crecimiento de la cepa silvestre wt, $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ de *M. xanthus* en presencia de cianuro 171
- Figura 62.** Curva de crecimiento de la cepa silvestre wt, $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ de *M. xanthus* en presencia de CCCP 171
- Figura 63.** Análisis fenotípico del ciclo de desarrollo de la cepa silvestre wt y de los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ de *M. xanthus* en medio CF sin CCCP (control) y con 0.3 mM de CCCP 173

Bloque D.XI

Figura 64. Sistema del doble híbrido de <i>S. cerevisiae</i>	175
Figura 65. Expresión de la quinasa PksA como cebo y del regulador PspA como presa en el sistema del doble híbrido	177
Figura 66. Análisis de la expresión de los marcadores nutricionales <i>HIS3</i> y <i>ADE2</i> sobre medio mínimo selectivo durante el estudio de la interacción PksA-PspA	178
Figura 67. Análisis cualitativo de la expresión del marcador enzimático <i>MEL1</i> sobre medio mínimo indicador con α -X-Gal durante el estudio de la interacción PksA-PspA	179
Figura 68. Análisis cuantitativo de la expresión del marcador enzimático <i>lacZ</i> durante el estudio de la interacción PksA-PspA	180
Figura 69. Crecimiento de las estirpes obtenidas tras el rastreo con la quinasa PksA como cebo en un medio indicador con α -X-Gal y en un medio selectivo carente de histidina y adenina	183
Figura 70. Análisis de la expresión de los marcadores nutricionales <i>HIS3</i> y <i>ADE2</i> sobre medio mínimo selectivo durante el estudio de la interacción PksA-Pfl	186
Figura 71. Análisis cuantitativo de la expresión del marcador enzimático <i>lacZ</i> durante el estudio de la interacción PksA-Pfl	187
Figura 72. Southern blot para la identificación de la cepa portadora de la fusión del gen <i>pfl</i> (Mxan1834) con el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i>	188
Figura 73. PCR para la identificación de la cepa mutante de delección en fase del gen <i>pfl</i> (Mxan1834)	189
Figura 74. Análisis de la expresión de los marcadores nutricionales <i>HIS3</i> y <i>ADE2</i> sobre medio mínimo selectivo durante el estudio de la interacción PksA-Znf	190
Figura 75. Análisis cuantitativo de la expresión del marcador enzimático <i>lacZ</i> durante el estudio de la interacción PksA-Znf	191
Figura 76. Southern blot para la identificación de la cepa portadora de la fusión del gen <i>znf</i> (Mxan5813) con el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i>	192
Figura 77. Southern blot para la identificación de la cepa mutante de delección en fase carente del gen <i>znf</i> (Mxan5813)	193

ÍNDICE DE TABLAS

A. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las mixobacterias	6
Tabla 2. Características principales de los genomas secuenciados dentro del grupo de las mixobacterias	24

C. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 3. Condiciones estándar para la amplificación por PCR	75
Tabla 4. Composición de los geles separador y concentrador empleados para la electroforesis SDS-PAGE	85
Tabla 5. Composición de las soluciones empleadas para la tinción de los geles de proteínas SDS-PAGE	86

D. RESULTADOS

Tabla 6. Organización de dominios funcionales en las ePKs de mixobacterias	110
Tabla 7. Porcentaje del genoma y tamaño de la secuencia destinada para codificar ePKs en las mixobacterias en comparación con el tamaño de los genomas bacterianos de menor tamaño	115
Tabla 8. Características principales de las ePKs analizadas mediante fusión <i>lacZ</i>	121
Tabla 9. Cepas de levadura aisladas durante el rastreo de la genoteca con la quinasa PksA como cebo	184

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
Ac	Anticuerpos
AD	Dominio de activación de GAL4
Ade	Adenina
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP	Fosfatasa alcalina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosina trifosfato
BCIP	Sal 4-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BD	Dominio de unión al ADN de GAL4
BSA	Seroalbúmina bovina
CaMK	Proteína quinasa dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina de eucariotas
CCCP	Carbonil cianida m-cloro fenil hidrazona
CD	Dominio catalítico de la quinasa PknD
CDK	Proteína quinasa dependiente de ciclinas de eucariotas (del inglés <i>cyclin-dependent kinase</i>)
CPTP	Fosfotirosina fosfatasas convencionales
CRP	Proteína receptora de AMPc (Proteína activadora por catabolito)
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIG dUTP	Desoxiuridina trifosfato unida a digoxigenina
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótido 5'-trifosfato
ddNTP	Didesoxirribonucleótidos 5' trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilén diamino tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico eucariota (del inglés <i>epidermal growth factor</i>)
EGTA	Ácido etilén glicol tetracético
ELKs	Proteínas similares a las quinasas de tipo eucariota (del inglés <i>ePKs like kinases</i>)
ePKs	Proteínas quinasas de tipo eucariota (del inglés <i>eukaryotic-type protein kinases</i>)
FHA	Dominio de unión a fosfotreonina (del inglés <i>forkhead-associated domain</i>)

FN	Fibronectina
GAF	Dominio de unión a GMPc/AMPC común a <u>G</u> MPC fosfodiesterasas, <u>a</u> denilato ciclasas y a la proteína <u>F</u> hlA
GDP	Guanosina difosfato
GGDEF	Dominio diguanilato ciclasa
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
HAMP	Dominio de dimerización común a <u>h</u> istidina quinasas, <u>a</u> denilato ciclasas y <u>p</u> roteínas portadores de grupos <u>m</u> etilo
His	Histidina
HTH	Motivo hélice-giro-hélice (del inglés <i>helix-turn-helix</i>)
IF	Factor de iniciación de la traducción
IPTG	Isopropiltiogalactósido
Leu	Leucina
LMWPTP	Fosfotirosina fosfatasas de bajo peso molecular
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
MAP	Proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés <i>mitogen-activated protein</i>)
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NBT	Cloruro de nitroazul tetrazolium
ONP	<i>o</i> -nitrofenol
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil-β-D-galactósido
PAS	Dominio sensor interno de oxígeno, del estado redox y la radiación luminosa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polietilenglicol
PFK	Fosfofructoquinasa
PKA	Proteína quinasa A dependiente de AMPc de eucariotas
PKc	Región intracelular de la quinasa PknD
PKC	Proteína quinasa C Ca^{2+} y fosfolípido dependiente de eucariotas
PKG	Proteína quinasa G dependiente de GMPc de eucariotas
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro
(p)ppGpp	Guanosina tetra (penta) fosfato
PPM	Proteínas fosfatasas dependientes de Mg^{2+} o Mn^{2+}
PPP	Fosfoproteínas fosfatasas
PTB	Motivo de unión a fosfoTyr (del inglés <i>phosphotyrosine binding</i>)
PTP	Fosfotirosina fosfatasas
PVDF	Difluoropolivinilideno
RD	Dominio regulador de la quinasa PknD
RIO	Proteínas de tipo ELKs (del inglés <i>right open reading frame</i>)
RT	Transcriptasa inversa o Retrotranscriptasa
RT-PCR	PCR a partir de un ADNc retrotranscrito (del inglés <i>Reverse Transcription-PCR</i>)

SDC	Méδιο mínimo de levaduras (del inglés <i>synthetic dextrose complete</i>)
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
SS	Dominio sensor de la quinasa PknD
Ser	Serina
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-etilenodiamino
TGFβ	Factor de crecimiento transformador β de eucariotas (en inglés <i>transforming growth factor</i>)
Thr	Treonina
TPR	Motivo de interacción proteína-proteína de tipo tetratricopéptido
Tris	Tris(hidroximetil)-amino metano
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UAS	Sitio de unión del activador Gal4 al ADN (del inglés <i>upstream activating sequence</i>)
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosido

A. INTRODUCCIÓN



A. INTRODUCCIÓN

I. Mixobacterias

I. 1. Características generales de las mixobacterias

Las mixobacterias son un grupo de bacterias Gram negativas, en su mayoría aerobias y móviles por deslizamiento, con forma de bacilo largo y delgado de dimensiones considerables (0.7-1.2 μm de ancho por 3-12 μm de largo). Estos microorganismos se caracterizan por la formación de unos agregados multicelulares macroscópicos, conocidos como cuerpos fructificantes, en respuesta al agotamiento de nutrientes en el medio. En el interior de los cuerpos, las células se diferencian en formas de resistencia conocidas como mixósporas, que sobreviven en el medio hasta germinar una vez que retornan las condiciones favorables para la bacteria. Este complejo ciclo de vida desarrollado por las mixobacterias es único dentro de los procariotas (Reichenbach, 2005).

Las mixobacterias presentan una pared celular de tipo Gram negativo, con una fina capa discontinua de peptidoglicano. El material genético se encuentra organizado en uno o varios nucleoides, mientras que en el citoplasma suelen aparecer cuerpos de inclusión como polifosfatos o polisacáridos de reserva. Entre los apéndices extracelulares, se diferencian pili de tipo IV polares y fibrillas polisacáridicas en contacto con la matriz extracelular, ambos necesarios para la movilidad por deslizamiento (Pelling *et al.*, 2005).

Estas bacterias presentan un metabolismo aerobio quimiorganotrofo, empleando para su crecimiento principalmente aminoácidos como fuente de energía y carbono (Bretscher y Kaiser, 1978). Estos aminoácidos se obtienen a partir de oligopéptidos liberados durante la hidrólisis de proteínas mediada por proteasas secretadas por la bacteria. Estas bacterias no suelen utilizar hidratos de carbono como monosacáridos o disacáridos como fuente de energía (Watson y Dworkin, 1968), aunque estos azúcares estimulan el crecimiento al ser empleados como fuente de carbono (Reichenbach, 2005). Un grupo minoritario de especies pertenecientes al género *Sorangium* son celulolíticas, metabolizando azúcares obtenidos a partir de la degradación de celulosa.

Las mixobacterias presentan una elevada capacidad para la producción de sustancias naturales con actividad biológica procedentes del metabolismo secundario, generando compuestos bioactivos muy potentes de enorme relevancia para su aplicación en la industria farmacéutica y agroquímica (Reichenbach y Höfle, 1993). Estas bacterias generan el 5% de los compuestos conocidos con actividad biológica de procedencia microbiana, en la mayoría de los casos, a partir de especies pertenecientes a los géneros *Sorangium*, *Myxococcus* y *Chondromyces* (Gerth *et al.*, 2003).

La mayoría de las sustancias sintetizadas por las mixobacterias son activas frente a hongos y bacterias (en torno al 54% y 29% del total de compuestos aislados). Entre estas sustancias, se encuentran antifúngicos como los sorafenos así como antibióticos como la mixovirescina, aunque también se han aislado otras sustancias como las epotilonas, con actividad antitumoral (Gerth *et al.*, 1982; Gerth *et al.*, 1994; Gerth *et al.*, 1996). El significado biológico para la síntesis de estos compuestos se encuentra en relación con la presión competitiva ejercida en el hábitat natural de las mixobacterias. Así, las mixobacterias celulolíticas como *Sorangium* suelen generar antifúngicos para competir con hongos degradadores de madera, mientras que las mixobacterias proteolíticas como

Myxococcus producen antibióticos frente a otras bacterias degradadoras de materia orgánica (Gerth *et al.*, 2003). Además, hay que tener en cuenta que las mixobacterias son microorganismos depredadores.

I. 2. Ecología de las mixobacterias

Las mixobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, de forma que es posible encontrarlas en casi cualquier hábitat (Reichenbach y Dworkin, 1992). Aparecen en todas las zonas climáticas, regiones de vegetación y altitud, pero en general la mayor riqueza en número de especies y densidad de población se encuentra en zonas de clima tropical y templado (Dawid, 2000). La enorme capacidad de las mixobacterias para desarrollar respuestas adaptativas a diferentes condiciones ambientales posibilita su crecimiento en una amplia diversidad de nichos ecológicos.

El hábitat principal de las mixobacterias es la zona superficial del suelo formando parte de la microbiota edáfica autóctona (Reichenbach, 1999; Dawid, 2000). A pesar de todo, estas bacterias representan un grupo minoritario desde un punto de vista cuantitativo dentro de la comunidad microbiana del suelo. El análisis de muestras edáficas mediante métodos de hibridación con sondas de ARN ribosómico (ARNr) 16S concluye que las mixobacterias constituyen menos del 1% de las bacterias presentes en este hábitat (Wu *et al.*, 2005). Sin embargo, el número exacto de mixobacterias en un hábitat particular resulta muy difícil de determinar debido a que estos microorganismos tienden a adherirse a las partículas y entre sí.

Las mixobacterias prefieren suelos ricos en materia orgánica y además se asocian principalmente con nichos que presentan una abundante comunidad microbiana, actuando como colonizadores secundarios. Se han encontrado mixobacterias en muchos tipos de suelos, siendo organismos muy comunes en aquellos que presentan pH neutro o algo alcalino (Dawid, 2000). En la microbiota del suelo, las mixobacterias actúan como microdepredadoras ejerciendo un papel regulador de las poblaciones microbianas edáficas. Para ello, las mixobacterias liberan enzimas hidrolíticas junto con antibióticos capaces de lisar a las bacterias situadas en su entorno.

Otro hábitat representativo para las mixobacterias es el material vegetal en descomposición, como la madera y la corteza en estado de putrefacción, así como los excrementos de animales herbívoros. Estos hábitats contienen abundantes restos de material vegetal parcialmente degradado, sobre los que se establecen de forma predominante mixobacterias celulolíticas. Sin embargo, no existe una dependencia total por este nicho, puesto que estas mismas especies aparecen igualmente representadas en el suelo (Lampky, 1971).

A pesar de que las mixobacterias no suelen ser microorganismos acuáticos, en ocasiones son capaces de sobrevivir e incluso crecer en ambientes acuáticos adecuados, tanto de agua dulce como de agua marina. De esta forma, las mixobacterias alcanzan con frecuencia las corrientes de agua tras ser lavadas a partir del suelo, sobreviviendo en este hábitat y siendo incluso empleadas como bioindicadores de la contaminación de ríos (Gräf y Pelka, 1979). De forma reciente, se han identificado mixobacterias que viven en ambientes marinos, pertenecientes al género *Plesiocystis* (Iizuka *et al.*, 2003), e incluso se han encontrado mixobacterias halófilas moderadas, encuadradas dentro del género *Haliangium* (Iizuka *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2005b).

Las mixobacterias son generalmente microorganismos mesófilos, con una temperatura óptima de crecimiento en torno a 30-34°C, en el caso de *M. xanthus*. Sin embargo, se han aislado cepas psicrófilas en la Antártida, que crecen de forma adecuada a 4°C, y de forma reciente, se han encontrado además cepas termófilas moderadas a partir de ambientes semiáridos (Gerth y Müller, 2005). Por otro lado, las mixobacterias se consideran organismos aerobios estrictos, aunque de forma excepcional, se han aislado varias especies pertenecientes al nuevo género *Anaeromyxobacter* a partir de suelos y sedimentos fluviales sometidos a condiciones anaerobias estrictas (Sanford *et al.*, 2002).

I. 3. Taxonomía y filogenia

La secuencia del ARNr 16S permite encuadrar a las mixobacterias dentro de la subdivisión delta de las proteobacterias. En esta línea filogenética, junto con las mixobacterias, aparecen especies que pertenecen al grupo de los *bdellovibrios* y las bacterias sulfatoreductoras. Las diferencias en la secuencia del ARNr sugieren que la subdivisión delta podría haberse originado hace 750 a 1100 millones de años, mientras que las mixobacterias aparecieron hace 650 a 800 millones de años (Shimkets, 1993).

De forma reciente, se ha completado la secuenciación del genoma de varias δ -proteobacterias, entre ellas el de *M. xanthus*. Al comparar su secuencia, se ha comprobado que las mixobacterias contienen un genoma con un tamaño comprendido entre los 9-13 Mb (a excepción de las especies pertenecientes al género *Anaeromyxobacter*, con un genoma en torno a las 5 Mb), lo que duplica e incluso en ocasiones triplica al de las bacterias sulfatoreductoras y *bdellovibrios*. Sin embargo, los genomas de todas las δ -proteobacterias comparten varias características comunes a esta línea filogenética.

Así, en las δ -proteobacterias destaca la presencia de un abundante complemento de proteínas de señalización, como reguladores dependientes de σ^{54} y sistemas de dos componentes. Además, suelen presentar numerosas proteínas asociadas a la secreción, así como múltiples sistemas de tipo chaperona, e igualmente son muy ricos en cierto tipo de proteínas, como lactamasas, proteínas de biosíntesis de diguanilato cíclico y receptores TonB. Finalmente, en relación a la síntesis proteica, en las δ -proteobacterias el conjunto de genes ribosómicos se sitúa en la región *ter*, y además contienen dos proteínas ribosómicas gigantes S1 y un complemento especial de ARNt sintetasas específico de este grupo (Karlín *et al.*, 2006).

Las mixobacterias se encuadran desde un punto de vista taxonómico dentro de un solo orden, *Myxococcales*, dividido a su vez en 3 subórdenes y 5 familias, de acuerdo con la propuesta del NCBI, siguiendo la 2ª edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. La bacteria *Myxococcus xanthus*, empleada como modelo para este grupo y objeto de este trabajo de investigación, pertenece a la familia *Myxococcaceae* dentro del suborden *Cystobacterineae* de las mixobacterias. En la Tabla 1, se muestra la clasificación taxonómica propuesta en la actualidad para el grupo de las mixobacterias.

ORDEN	SUBORDEN	FAMILIA	GÉNERO
<i>Myxococcales</i>	<i>Cystobacterineae</i>	<i>Myxococcaceae</i>	<i>Myxococcus</i> <i>Anaeromyxobacter</i> <i>Corallococcus</i> <i>Pyxidiococcus</i>
		<i>Cystobacteraceae</i>	<i>Archangium</i> <i>Cystobacter</i> <i>Hyalangium</i> <i>Melittangium</i> <i>Stigmatella</i>
	<i>Sorangineae</i>	<i>Polyangiaceae</i>	<i>Byssophaga</i> <i>Chondromyces</i> <i>Sorangium</i>
	<i>Nannocystineae</i>	<i>Nannocystaceae</i>	<i>Nannocystis</i> <i>Plesiocystis</i>
		<i>Haliangeaceae</i>	<i>Haliangium</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las mixobacterias

I. 4. Movilidad por deslizamiento en *M. xanthus*

Las mixobacterias son bacterias móviles por deslizamiento sobre un sustrato. El deslizamiento se define como el movimiento de una célula en la dirección de su eje axial sobre una superficie en ausencia de flagelos (Henrichsen, 1972). Este movimiento de las mixobacterias por deslizamiento se desarrolla a una velocidad variable, oscilando entre 1.5 y 6 $\mu\text{m}/\text{min}$, aunque en algunas ocasiones se han observado velocidades de hasta 20 $\mu\text{m}/\text{min}$. La velocidad de movimiento depende de la distancia entre células, siendo más veloz cuando las células se encuentran en contacto (a una distancia inferior al diámetro celular) en comparación con células aisladas (Spormann y Kaiser, 1995).

Durante el movimiento de las mixobacterias por deslizamiento, las bacterias se desplazan siguiendo un recorrido lineal, manteniendo una misma dirección a lo largo del tiempo. Sin embargo, debido a la elevada flexibilidad celular, a medida que la célula se desplaza, se produce una curvatura de la célula, lo que conduce a una desviación moderada en la ruta de desplazamiento que facilita los cambios direccionales. De forma periódica, las células se detienen momentáneamente, reanudando el movimiento en la misma dirección o bien en caso contrario, sufren una reversión en el sentido del desplazamiento, tras la conversión del extremo anterior de la célula en el posterior (Søgaard-Andersen, 2004). La frecuencia de reversión se encuentra regulada de forma estricta mediante sistemas de control quimiotácticos, para la adaptación del movimiento de la mixobacteria a las condiciones del entorno.

En el desarrollo, durante el proceso de agregación, las mixobacterias se desplazan por deslizamiento siguiendo movimientos dirigidos en una misma dirección, para la formación de los cuerpos fructificantes. Durante este movimiento, el sistema regulador de la reversión que controla la dirección de desplazamiento suprime los cambios de sentido en el movimiento en respuesta al intercambio de señales que tiene lugar entre las células, manteniendo así la misma dirección de deslizamiento de forma prolongada (Jelsbak y Søgaard-Andersen, 2002).

La bacteria *M. xanthus* presenta dos sistemas de movilidad por deslizamiento: movilidad A o aventurera y movilidad S o social (Hodgkin y Kaiser, 1979a; Hodgkin y Kaiser, 1979b). El sistema A es responsable del movimiento de las células individuales, mientras que el sistema S determina el movimiento de los grupos de células, por lo que requiere del contacto célula-célula, a diferencia del anterior. Estos dos sistemas de movilidad son independientes genéticamente, lo que posibilita la obtención de mutantes para cada tipo de movilidad. Así, mientras que los mutantes A⁻S⁻ son totalmente inmóviles, en el caso de los mutantes A⁻S⁺ o A⁺S⁻, las células mantienen la movilidad mediante el sistema que permanece sin alterar.

I. 4. 1. Movilidad social

La movilidad social permite el movimiento de grupos de células asociadas entre sí en estrecho contacto. Este sistema de movilidad depende de tres grupos principales de genes: *pil*, *eps-eas* y *tgl*. Este tipo de deslizamiento requiere la presencia de tres componentes celulares: pili de tipo IV, fibrillas de la matriz extracelular y lipopolisacárido o antígeno O (Youderian y Hartzell, 2006).

Los pili de tipo IV de *M. xanthus* son apéndices extracelulares polares formados por subunidades de pilina PilA, generada por proteólisis del extremo N-terminal de la prepilina de tipo IV (Strom y Lory, 1993). Los genes *pil* están organizados en un grupo constituido por 17 genes y codifican proteínas implicadas en la síntesis, procesamiento, transporte y ensamblaje de los constituyentes de los pili (Wall y Kaiser, 1999). El gen *tgl* genera una lipoproteína esencial para el ensamblaje de la secretina PilQ en la membrana externa durante la formación de los pili (Nudleman *et al.*, 2005). En este sentido, las mutaciones para cualquiera de estos genes producen una ausencia de pili de tipo IV, y por tanto, la pérdida de la movilidad social.

Las fibrillas son filamentos peritricos compuestos por proteínas y polisacáridos que recubren la superficie celular generando una matriz extracelular que interconecta las células (Behmlander y Dworkin, 1994). Estas fibrillas se encuentran implicadas en procesos de interacción y cohesión célula-célula, promoviendo el comportamiento social de *M. xanthus* durante la movilidad y el desarrollo. Asociada a la matriz se ha detectado una metaloproteasa, conocida como FibA, importante para la respuesta quimiotáctica durante el desarrollo (Kearns *et al.*, 2002). Los genes *eps* generan proteínas de la biosíntesis y transporte del exopolisacárido de las fibrillas junto con proteínas reguladoras (Lu *et al.*, 2005). Por tanto, las mutaciones que afectan a estos genes generan una ausencia de fibrillas que conducen a la pérdida de la movilidad social.

La movilidad social se desarrolla mediante extensión y retracción de los pili, para impulsar el deslizamiento de la bacteria. Para ello, en primer lugar, la célula extiende los pili a partir del polo delantero, hasta anclarse sobre las fibrillas de la matriz extracelular de una bacteria muy próxima. Entonces se produce la retracción inducida por los polisacáridos de la matriz extracelular de estos apéndices polares (Li *et al.*, 2003), propulsando el movimiento celular, al impulsar la progresión de la célula hacia delante (Søgaard-Andersen, 2004). La dependencia del contacto celular durante la movilidad social se debe a la interacción que se establece entre los pili y las fibrillas durante el movimiento.

La reversión periódica en la dirección de movimiento determina la desorganización de los pili de tipo IV en un polo y su reensamblaje en el otro polo. Durante este cambio, se ha visto que una proteína necesaria para la movilidad, FrzS, se localiza sobre el polo portador de los pili y se mueve siguiendo un patrón oscilante entre ambos polos, migrando a lo largo de un filamento que recorre al completo toda la célula. Por tanto, parece que la dinámica de esta proteína regula la polaridad del movimiento durante el deslizamiento (Mignot *et al.*, 2005; Huitema y Viollier, 2006).

I. 4. 2. Movilidad aventurera

La movilidad aventurera es la responsable del movimiento de células individuales aisladas. Este sistema de movilidad depende de varios grupos principales de genes, entre los que destacan los genes *agl*, *cgl* y *pgl*.

En *M. xanthus* se ha identificado la presencia de complejos porosos concentrados en los extremos celulares que parecen actuar a modo de secretores de mucílago para propulsar a la bacteria durante la movilidad aventurera, tal como ocurre en cianobacterias (Wolgemuth *et al.*, 2002; Hoiczky y Baumeister, 1998). Estos complejos constan de varias proteínas de transporte de biopolímeros de tipo Tol codificadas por varios genes *agl* (Youdarian *et al.*, 2003), que en otras bacterias Gram negativas forman parte de complejos de transporte a través de la membrana interna y externa (Llamas *et al.*, 2003). La síntesis del mucílago depende de varias enzimas biosintéticas de tipo glicosiltransferasa codificadas por genes *agl* y *pgl* (Yu y Kaiser, 2007).

La movilidad aventurera tiene lugar mediante extrusión de mucílago a partir de los complejos secretores situados en el polo posterior celular, generando un rastro durante el deslizamiento formado por varias líneas mucilaginosas paralelas (Wolgemuth *et al.*, 2002). Para ello, el mucílago es incorporado dentro de los inyectores, y aquí es donde se produce la dilatación por hidratación del polielectrolito necesaria para la secreción orientada del mucílago. La adherencia de este mucílago sobre el sustrato provee el soporte que permite el empuje de la célula hacia delante, una vez que continúa la liberación del mucílago, generando la fuerza necesaria para el movimiento celular (Søgaard-Andersen, 2004).

De forma muy reciente se ha descrito que la proteína AglZ, esencial para la movilidad aventurera, forma complejos de adhesión focal anclados al sustrato de forma transitoria a partir de la superficie de la bacteria. Estos complejos se ensamblan en el polo delantero, desde donde mantiene una posición fija respecto al sustrato a medida que la célula se desplaza hacia delante, por lo que progresivamente se desplazan a lo largo de toda la célula, colaborando para generar la fuerza necesaria para propulsar el deslizamiento de la célula. Finalmente, cuando se revierte la dirección de movimiento, estos complejos se relocalizan con rapidez en el polo delantero (Mignot *et al.*, 2007).

I. 4. 3. Regulación de la movilidad

Se ha conseguido identificar un único *locus* esencial, denominado *mgl*, para ambos sistemas de movilidad, cuya mutación suprime completamente la capacidad de deslizamiento en *M. xanthus* (Stephens y Kaiser, 1987). Los mutantes *mgl* en realidad se mueven mediante brascas sacudidas oscilantes sin desplazamiento neto, debido a que presentan una elevada tasa de reversión de movimiento, superior en más de diez veces respecto al silvestre (Spormann y Kaiser, 1999).

Este *locus* codifica dos proteínas, MglA, una GTPasa de tipo Ras, y MglB, una proteína de tipo calmodulina (Hartzell y Kaiser, 1991a; Hartzell y Kaiser, 1991b). MglA ejerce un papel clave en la regulación de la movilidad mediante el control de la reversión en la dirección de movimiento. En este sentido, MglA participa en esta ruta de señalización mediante el intercambio de GDP por GTP y su posterior hidrólisis por la actividad GTPasa, al igual que otras proteínas Ras (Hartzell y Kaiser, 1991a). Además, se ha demostrado que MglA interacciona con la quinasa MasK en esta ruta de señalización, como se detalla más adelante en esta Introducción (Thomasson *et al.*, 2002).

I. 4. 4. Quimiotaxias

La bacteria *M. xanthus* muestra respuestas quimiotácticas frente a ciertos compuestos. El comportamiento quimiotáctico se manifiesta por un cambio en la frecuencia de reversión del movimiento de las células, de manera que en ausencia de estímulo, las células cambian con frecuencia su dirección de movimiento. En cambio, en presencia de sustancias atrayentes o repelentes, las células de *M. xanthus* incrementan su periodo de reversión, lo que se traduce en un movimiento neto de acercamiento hacia la sustancia atrayente o alejamiento respecto al repelente. En general, los nutrientes actúan como atrayentes mientras que diversas sustancias nocivas tales como alcoholes o el dimetilsulfóxido (DMSO) funcionan como repelentes (Shi *et al.*, 1993).

En *M. xanthus*, se han identificado dos sistemas reguladores quimiotácticos, conocidos como Frizzy y Dif, muy similares al sistema Che de las bacterias entéricas (Shi *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1998). Ambos son esenciales para el desarrollo ya que la formación de cuerpos fructificantes depende de la actividad quimiosensora aportada por estas rutas de señalización. Sin embargo, estos sistemas quimiotácticos actúan de forma independiente, y de hecho desempeñan funciones celulares diferentes durante el ciclo de vida de la mixobacteria.

El sistema Dif consta de 5 proteínas quimiotácticas integradas dentro de una ruta de señalización que regula la movilidad social. Este sistema quimiosensor es el responsable de la organización de las células así como de la coordinación de los movimientos de las células dentro de un grupo social (Yang *et al.*, 1998). En relación con la movilidad social, el sistema Dif regula la biosíntesis de la matriz extracelular (Yang *et al.*, 2000; Black y Yang, 2004), dentro de una ruta controlada por los pili de tipo IV, que al actuar como sensores, estimulan esta cascada de señalización, promoviendo la producción de matriz extracelular necesaria para la movilidad social (Black *et al.*, 2006).

Durante el ciclo de desarrollo, las células se deslizan hasta ciertos puntos para originar los cuerpos fructificantes de manera que, probablemente, estas células han de responder a ciertos estímulos químicos para la agregación. Se ha demostrado que la fosfatidiletanolamina funciona como atrayente para las quimiotaxias (Kearns y Shimkets, 1998), de manera que la transducción de señales en respuesta a este fosfolípido depende igualmente del sistema Dif, en cooperación con los pili de tipo IV y la metaloproteasa FibA, promoviendo la agregación (Bonner *et al.*, 2005; Bonner *et al.*, 2006).

El sistema Frizzy está constituido por 6 proteínas quimiosensoras codificadas en un mismo operón, y que conforman una ruta de señalización reguladora de la reversión en la dirección de movimiento. De hecho, los mutantes *frz* presentan considerables alteraciones en la frecuencia de reversión durante el deslizamiento de la bacteria (Blackhart y Zusman, 1985a; Blackhart y Zusman, 1985b). Este sistema quimiosensor confiere a la célula la capacidad para dirigirse hacia los centros de agregación durante la formación de los cuerpos fructificantes, al reducir de forma drástica la frecuencia de reversión en respuesta al intercambio de señales celulares durante el desarrollo (Shi *et al.*, 2000).

El elemento central quimiosensor de sistema Frizzy es el receptor citoplasmático FrzCD, una proteína aceptora de grupos metilos que, en respuesta a una señal adecuada, contacta con FrzE modificando su estado de fosforilación (Bustamante *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Astling *et al.*, 2006). FrzE es una proteína de fusión con similitud con la histidina quinasa CheA y el regulador de respuesta CheY, capaz de interactuar con los componentes de la maquinaria de movilidad para regular la frecuencia de reversión durante el deslizamiento (Li *et al.*, 2005).

I. 5. Ciclo de vida de *M. xanthus*

El ciclo de vida de las mixobacterias es muy complejo, puesto que comprende dos fases distintas: un ciclo de vida vegetativo, en presencia de nutrientes en el medio, y un ciclo de desarrollo multicelular, que se desencadena ante la privación de nutrientes.

I. 5. 1. Ciclo de vida vegetativo

En el ciclo de vida vegetativo, la bacteria dispone de nutrientes en el medio y por tanto, utiliza estos sustratos para el propio crecimiento celular. Este crecimiento se manifiesta en la progresiva elongación de las células hasta que, finalmente, se produce la división celular mediante fisión binaria, incrementando el número de bacterias de la población microbiana. De esta forma, las mixobacterias crecen y se multiplican a expensas de los nutrientes del medio, de forma similar a lo que ocurre en el resto de bacterias.

Durante el crecimiento vegetativo, las células se mantienen unidas y se desplazan por deslizamiento de forma coordinada, formando agrupaciones denominadas enjambres, compuestas por varios miles de células asociadas entre sí. En estos enjambres, las mixobacterias se nutren de forma cooperativa al inducir la lisis de otros microorganismos como bacterias o levaduras, siguiendo un comportamiento conocido como microdepredación (Reichenbach y Dworkin, 1992; Reichenbach, 1993). La eficiencia de ataque de *M. xanthus* depende de la disponibilidad de la presa, y se incrementa cuando ésta se encuentra agrupada más densamente sobre un sustrato con mayor consistencia (Hillesland *et al.*, 2007).

En esta estrategia de nutrición cooperativa, las mixobacterias liberan un conjunto de enzimas hidrolíticas (proteasas, lipasas, glucanasas y nucleasas), que actúan destruyendo tanto a células vivas intactas como a células muertas y, además, son capaces de degradar polímeros complejos para generar nutrientes asimilables. La colaboración del enjambre completo en la secreción de exoenzimas potencia la capacidad degradativa de la mixobacterias, incrementando la eficiencia en la obtención de nutrientes (Rosenberg *et al.*, 1977).

A lo largo de la fase de crecimiento vegetativo, las mixobacterias desarrollan en ocasiones un movimiento característico a modo de ondulaciones rítmicas. Se ha demostrado que este patrón de movimiento corresponde a un comportamiento de predación, que permite consumir de forma eficiente los sustratos asequibles a la comunidad de mixobacterias. De hecho, este movimiento se induce en respuesta al contacto directo con otros microorganismos o grandes macromoléculas biopoliméricas. En cambio, su inhibición conlleva una reducción drástica de la capacidad depredadora (Berleman *et al.*, 2006).

I. 5. 2. Ciclo de desarrollo

El ciclo de desarrollo multicelular se induce ante el agotamiento de los nutrientes en el medio, en respuesta a la privación en el aporte de la fuente de carbono, nitrógeno o fósforo. Esta carencia de nutrientes constituye el estímulo inductor que desencadena los eventos necesarios que conducen hacia el ciclo de desarrollo. La progresión hacia el ciclo de desarrollo requiere, junto a una ausencia de nutrientes, la presencia de una elevada densidad celular para el intercambio de señales entre las células y un sustrato sólido para el movimiento de las células por deslizamiento (Kaiser, 1986).

En el ciclo de desarrollo, el agotamiento de los nutrientes en el medio actúa como señal para que el conjunto de células de un enjambre comience a moverse por deslizamiento hacia ciertos puntos denominados centros de agregación, en donde las células se apilan unas encima de otras. Estos centros de agregación, que en principio son dinámicos, se estabilizan y reclutan a células adicionales para generar montículos, que progresan hacia la formación de agregados multicelulares macroscópicos denominados cuerpos fructificantes. En el interior de los cuerpos fructificantes, las células vegetativas se diferencian en formas de resistencia denominadas mixósporas. Cuando se restablecen las condiciones adecuadas en el medio, en presencia de nutrientes, las mixósporas germinan generando células vegetativas que reanudan el ciclo vegetativo (Dworkin, 1996; Kaiser, 2004).

En la Figura 1 se muestra el ciclo de vida de la mixobacteria *Stigmatella aurantiaca*. En ella se diferencia una fase de crecimiento vegetativo, en donde la bacteria se multiplica empleando los nutrientes disponibles, junto con una etapa de desarrollo multicelular desencadenada ante la carencia de nutrientes en el medio. En el ciclo de desarrollo, las células se agregan generando cuerpos fructificantes rellenos de mixósporas de resistencia que germinan cuando retornan las condiciones favorables al medio para reiniciar el crecimiento vegetativo.

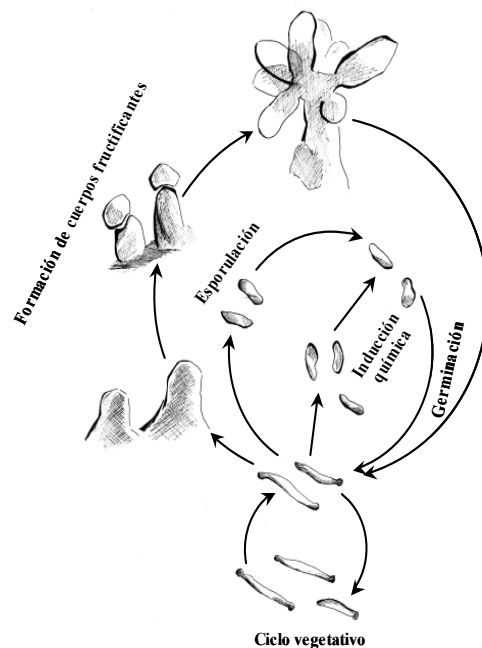


Figura 1. Ciclo de vida de la mixobacteria *Stigmatella aurantiaca*

En *M. xanthus*, este ciclo de desarrollo ha sido estudiado con detalle, de forma que es posible separar varios eventos diferenciados que ocurren de forma secuencial a medida que progresa el ciclo de desarrollo:

i) Oscilaciones rítmicas

El ciclo de desarrollo comienza con la aparición de una pauta de movimiento característica denominado *rippling*, definido por la presencia de oscilaciones celulares rítmicas que se traducen en la aparición de ondas móviles espaciadas de forma regular (Anderson y Vasiev, 2005). En cada ondulación, las células desarrollan un movimiento oscilatorio carente de desplazamiento neto, a la vez que contactan con las células de crestas vecinas, dando la apariencia de interpenetración entre ondulaciones próximas. Este patrón de movimiento normalmente precede al proceso de agregación, aunque se han descrito estirpes capaces de completar el desarrollo sin necesidad de generar estas ondulaciones rítmicas (Rhie y Shimkets, 1989; Berleman *et al.*, 2006).

Este movimiento periódico depende del sistema regulador Frizzy, puesto que genera un ciclo bioquímico oscilante de tipo asimétrico que funciona a modo de reloj interno para controlar el proceso de reversión en la dirección de movimiento. El contacto celular producido por la colisión entre ondulaciones adyacentes genera una señal que reajusta este reloj, induciendo una reversión del movimiento, a la vez que retarda la fase, de forma que la probabilidad de reversión se reduce justo tras la colisión y se incrementa con el tiempo, gracias a la asimetría de este ciclo. El resultado final es que las bacterias desarrollan un movimiento oscilatorio, que se reajusta de forma periódica mediante el contacto celular entre ondulaciones (Igoshin *et al.*, 2004; Sliusarenko *et al.*, 2006).

ii) Agregación: Formación de cuerpos fructificantes

La agregación tiene lugar mediante el desplazamiento orientado de las mixobacterias hacia puntos concretos conocidos como centros de agregación, en donde las células se concentran generando agrupaciones multicelulares macroscópicas denominadas cuerpos fructificantes, constituidas por cientos de miles de células asociadas entre sí. La formación de estas estructuras multicelulares requiere de la coordinación del conjunto de bacterias presentes, mediante el contacto estrecho entre las células y el intercambio de un complejo programa de señales intercelulares.

Los cuerpos fructificantes presentan una disposición variada según la especie, desde formas sencillas, a modo de simples montículos desnudos con forma redondeada y de consistencia blanda (*Myxococcus*) o dura (*Corallococcus*), hasta formas más complejas, en donde se diferencia un pedúnculo que soporta uno o varios esporangiolos (*Stigmatella* o *Chondromyces*), incluso, en ocasiones los esporangiolos se disponen directamente asociados al propio sustrato (*Sorangium*).

En *M. xanthus*, se ha descrito un modelo para el proceso de agregación y formación de los cuerpos fructificantes durante el desarrollo (Kaiser y Welch, 2004; Alber *et al.*, 2004; Kiskowski *et al.*, 2004; Sozinova *et al.*, 2005; Sozinova *et al.*, 2006).

La agregación comienza con la asociación de cientos de bacterias agrupadas sobre puntos concretos. Estas agrupaciones se generan por la colisión de grupos celulares organizados en disposición paralela, que se desplazan en orientaciones opuestas. Las células quedan entonces retenidas en el punto de colisión, incapaces de desplazarse al encontrarse rodeadas por otras células. Estas agrupaciones se rodean de bacterias en movimiento dispuestas en corrientes celulares constituidas por filas paralelas muy organizadas de células en contacto, estabilizadas mediante el intercambio de señales celulares.

Al aproximarse una corriente celular a una agrupación, ésta actúa como un obstáculo mecánico que fuerza a la corriente a desplazarse sobre o alrededor de cada agrupación. Por tanto, las agrupaciones constituyen los centros de agregación sobre los que comienzan a desplazarse células dispuestas en filas que giran en torno al agregado siguiendo una trayectoria circular, aportando células sobre la periferia del agregado. En un principio, el agregado presenta una forma elipsoidal, pero al incorporarse más células en movimiento, adquiere una forma esférica. Tras un tiempo, las células que formaban el núcleo de cada agregación comienzan a dispersarse penetrando dentro de las corrientes celulares periféricas.

Este proceso origina un cuerpo fructificante dinámico inmaduro formado por un núcleo central con una baja densidad celular, constituido por células inmóviles dispuestas de forma aleatoria, rodeado por una región periférica formada por filas de células muy organizadas en estrecho contacto y que se desplazan siguiendo una trayectoria circular. Al progresar el desarrollo, el cuerpo fructificante madura convirtiéndose en una estructura estática, en cuyo interior los bacilos vegetativos se diferencian en mixóporas esféricas de resistencia (Sager y Kaiser, 1993). Tan sólo los bacilos contenidos dentro del cuerpo reciben las señales adecuadas para esporular, permaneciendo un conjunto de bacilos vegetativos periféricos en torno al cuerpo para proteger a las mixóporas frente a la depredación y colonización por otros microorganismos (O'Connor y Zusman, 1991).

Durante la formación de los cuerpos fructificantes, tan sólo una porción minoritaria de la población inicial sobrevive en forma de mixósporas de resistencia, mientras que la mayoría de células muere mediante autólisis, principalmente al inicio del proceso de agregación (Zhang *et al.*, 2005a). Este proceso tiene lugar por la acción de autocidas celulares, como ácidos grasos o glucosamina, que actúan induciendo la lisis celular en *M. xanthus*. Esta muerte celular programada representa un suicidio altruista que proporciona nutrientes necesarios para la supervivencia y diferenciación del resto de células durante el desarrollo (Zhang *et al.*, 2005a).

iii) Esporulación

La esporulación tiene lugar por la diferenciación de las células vegetativas contenidas en el interior de los cuerpos fructificantes a formas de resistencia denominadas mixósporas. Estas células diferenciadas refringentes son quiescentes desde el punto de vista metabólico, y a la vez son resistentes a determinados factores medioambientales, como la desecación, el calor moderado, la radiación o la sonicación. La conversión de las células vegetativas a mixósporas conlleva cambios en la forma celular, a veces suaves, en el caso de las esporas cilíndricas similares a los bacilos vegetativos, pero en otras ocasiones drásticos, como ocurre durante la diferenciación de los bacilos vegetativos en esporas ovoides o casi esféricas en *M. xanthus*.

Las mixósporas se caracterizan por la presencia de una gruesa cubierta protectora constituida por proteínas y polisacáridos (White, 1993). La proteína principal de la cubierta es la proteína S, una proteína con similitud con la calmodulina que presenta dos dominios de unión a Ca^{2+} . La proteína S se sintetiza de forma temprana en el desarrollo y se secreta para alcanzar la superficie de la mixóspora (Inouye *et al.*, 1979). Junto a ella, se han identificado varias proteínas estructurales de la spora, como la proteína C, la proteína U o las proteínas MspA, MspB y MspC (Inouye *et al.*, 1979; Teintze *et al.*, 1985; McCleary *et al.*, 1991; Dahl *et al.*, 2007). Las mixósporas contienen dos copias cromosómicas completas para asegurar la viabilidad celular durante la germinación. La replicación del material genético tiene lugar durante la agregación, de forma que al culminar esta fase existe un punto de control que verifica la integridad cromosómica antes de progresar hacia la esporulación (Tzeng y Singer, 2005; Tzeng *et al.*, 2006).

iv) Germinación

Al retornar las condiciones favorables en presencia de nutrientes en el medio, las mixósporas germinan tras producirse la ruptura de la cubierta protectora, emergiendo bacilos vegetativos que comienzan a crecer y dividirse de nuevo, reanudando el ciclo de crecimiento vegetativo. Al permanecer las mixósporas dentro de los cuerpos fructificantes, tras la germinación, el crecimiento vegetativo se reinicia a partir de una población celular, lo que a su vez favorece la supervivencia de las mixobacterias mediante nutrición cooperativa. La germinación de las mixósporas requiere de diversos factores entre los que se encuentran serina proteasas y Ca^{2+} (Otani *et al.*, 1995). De hecho, se ha propuesto que algún tipo de serina proteasa dependiente de Ca^{2+} es la responsable de la degradación de proteínas en la spora durante la germinación, como ocurre en *Bacillus megaterium* (Loshon y Setlow, 1982).

Las mixósporas germinan siguiendo un proceso secuencial, que comienza con la adquisición de susceptibilidad frente a agentes externos, seguido por la pérdida de la refringencia y que culmina con el cambio en la forma celular (Elias y Murillo, 1991). La ruptura de la cubierta de la espora se produce de forma temprana durante la germinación, con la degradación de la proteína S de la cubierta (Otani *et al.*, 1995). En el interior de cada mixóspora, ambas copias cromosómicas se sitúan en extremos opuestos, presentando una polarización que facilita el reparto de los cromosomas replicados durante la división celular que tiene lugar justo tras la germinación (Tzeng y Singer, 2005).

I. 5. 3. Inducción química de la esporulación

La esporulación puede ser inducida por la presencia de ciertos compuestos químicos, denominados inductores químicos de la esporulación, como glicerol, etilenglicol o el DMSO (Dworkin y Gibson 1964; Komano *et al.*, 1980). Estas sustancias químicas desencadenan una rápida conversión de los bacilos vegetativos en mixósporas de forma sincrónica con una elevada eficiencia, aún en presencia de nutrientes. Este tipo de mixósporas presentan ciertas diferencias que las hace menos resistentes, como una cubierta más delgada carente de las proteínas S y C, y además, contienen tan sólo un único cromosoma sin replicar, su tasa respiratoria es más elevada y no contienen gránulos en su interior (Hanson y Dworkin, 1974; Rosenbluh y Rosenberg, 1989b; McCleary *et al.*, 1991; Otani *et al.*, 1998; Tzeng y Singer, 2005).

La inducción química de la esporulación se produce por la alteración en el recambio del peptidoglicano de la pared generado por estos agentes químicos, de forma que el bloqueo de la síntesis o ensamblaje del peptidoglicano induce la esporulación en *M. xanthus*. De hecho, durante esta conversión, la presencia de glicerol activa a la enzima β -lactamasa implicada en el recambio de peptidoglicano de pared, y de igual forma, agentes que inducen esta enzima como antibióticos inhibidores de la síntesis del peptidoglicano promueven igualmente el proceso de esporulación. Estos resultados sugieren que la inducción química de la esporulación constituye una respuesta de defensa frente a agentes que dañan las cubiertas bacterianas, amenazando la supervivencia celular (O'Connor y Zusman, 1997; O'Connor y Zusman, 1999).

La inducción química de la esporulación tan sólo desarrolla de forma parcial el programa genético activado durante el proceso de esporulación en el desarrollo. De hecho, mutantes incapaces de esporular en el desarrollo pueden ser inducidos a esporular por adición de agentes químicos, lo que refleja la diferencia entre ambos sucesos (Hagen *et al.*, 1978; LaRossa *et al.*, 1983). Estos eventos confluyen en un *locus* cuya expresión se ajusta al momento de cambio de forma celular y cuya mutación inhibe de forma simultánea ambos procesos de esporulación, al bloquear el cambio en la morfología celular (Licking *et al.*, 2000).

I. 6. Señalización celular durante el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*

Durante el ciclo de desarrollo, las mixobacterias desarrollan un complejo mecanismo de intercambio de señales extracelulares mediado por diferentes factores de señalización, necesarios para la coordinación de las células durante los distintos eventos que conforman el ciclo de desarrollo. Se han identificado cinco tipos diferentes de señales, denominadas señal A, B, C, D y E, a partir de la obtención de distintos grupos de mutantes defectivos para cada una de estas señales, designados en cada caso como mutantes *asg*, *bsg*, *csg*, *dsg* y *esg* (Hagen *et al.*, 1978; Downard *et al.*, 1993, Kaiser y Kroos, 1993). Todos ellos son incapaces de completar el ciclo de desarrollo por sí mismos, pero se recuperan mediante complementación al adicionar células silvestres o mutantes para cualquiera de las otras señales.

En el ciclo de desarrollo, la comunicación entre células mediada por el intercambio programado de estas señales determina la expresión secuencial de un conjunto de genes regulados de forma específica durante el desarrollo (Kroos *et al.*, 1986; Kroos y Kaiser, 1987). De hecho, el rastreo de marcadores genéticos de este proceso ha permitido identificar múltiples genes cuya expresión se induce durante el desarrollo (Kroos *et al.*, 1986). El estudio del efecto de las mutaciones que afectan a las distintas señales intracelulares sobre la expresión de estos genes ha permitido establecer la dependencia total o parcial de cada uno de estos genes respecto a las distintas señales intercelulares (Kroos y Kaiser, 1984; Kroos *et al.*, 1986; Kuspa *et al.*, 1986).

El análisis del perfil de expresión del conjunto de marcadores del desarrollo en los diferentes mutantes de señalización permite deducir la progresión de las señales a lo largo del ciclo de desarrollo. Se ha comprobado que no existe una secuencia lineal de intercambio de señales, ya que genes del desarrollo controlados por distintas señales pueden expresarse al mismo tiempo, y de igual forma, genes dependientes de una misma señal en ocasiones se expresan en momentos muy diferentes (Kaiser y Kroos, 1993). A partir de este análisis, se ha establecido que las señales A y B comienzan a actuar desde el inicio del desarrollo, justo tras detectar la carencia de nutrientes, mientras que las señales D y E lo hacen a partir de las 4 horas y finalmente, la señal C ejerce su efecto tras 12 horas en ausencia de nutrientes.

I. 6. 1. Señales implicadas en el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*

i) Señal A

La señal A está constituida por una mezcla específica de aminoácidos y péptidos generados mediante proteólisis, a partir de la actividad de un conjunto de enzimas proteasas secretadas por la mixobacteria. Las proteasas liberadas al medio por la bacteria actúan hidrolizando las proteínas presentes en el exterior generando péptidos y finalmente aminoácidos (Kuspa *et al.*, 1992a; Kuspa *et al.*, 1992b; Plamann *et al.*, 1992). El análisis de la actividad de los diferentes aminoácidos durante la transmisión de la señal A ha permitido identificar aquellos que poseen una actividad más elevada dentro del conjunto que conforma la señal A: tirosina, prolina, triptofano, fenilalanina, leucina e isoleucina (Shimkets, 1999).

En el ciclo de desarrollo, la señal A actúa como un sistema sensor de *quorum*, que sirve para evaluar la cantidad de células presentes justo tras detectar el agotamiento de los nutrientes en el medio (Kaplan y Plamann, 1996). Este sistema indicador de la densidad celular se basa en la relación proporcional que se establece entre la concentración extracelular de la señal A y la cantidad de células presentes, garantizando que las células sólo progresen hacia el ciclo de desarrollo si se alcanza una densidad adecuada, suficiente para generar una concentración mínima de aminoácidos en el medio capaz de actuar como señal A (Kaiser y Kroos, 1993; Shimkets, 1999).

El análisis genético de la señal A revela que la producción de esta señal depende de un conjunto de cinco genes denominados genes *asg*, puesto que los mutantes defectivos para la señal A se encuentran afectados en alguno de estos genes. Los genes *asg* codifican un conjunto de proteínas integradas dentro de una misma vía de transducción de señales que regula la expresión de los genes asociados a la síntesis de la señal A. En esta ruta de señalización, AsgA y AsgD son proteínas híbridas de señalización, con un dominio histidina quinasa con actividad autocatalítica en la región C-terminal (Li y Plamann, 1996), junto con un dominio regulador de respuesta en la región N-terminal (Plamann *et al.*, 1995; Cho y Zusman, 1999a). AsgB es un regulador transcripcional con un dominio de unión al ADN de tipo hélice-giro-hélice (HTH) en la región C-terminal, similar a la región 4 del factor σ^{70} que reconoce la región -35 en promotores procarióticos (Plamann *et al.*, 1994), mientras que AsgC es el factor σ principal de la ARN-polimerasa, necesario para la unión al promotor durante la iniciación de la transcripción (Davis *et al.*, 1995). Por último, AsgE es una proteína aminohidrolasa situada en la membrana plasmática (Garza *et al.*, 2000).

Se ha propuesto un modelo funcional para esta ruta de señalización necesaria para la generación de la señal A (Dworkin, 1996). El agotamiento de los nutrientes es captado por una proteína sensora y transmitido hasta la histidina quinasa AsgA, estimulando su autofosforilación. A partir de aquí, la señal es transferida desde AsgA a lo largo de una o varias proteínas mediante fosforilación, hasta alcanzar al regulador transcripcional AsgB. En este proceso, AsgD colabora en la transmisión de la señal mediada por fosfotransferencia a lo largo de la cascada de proteínas (Cho y Zusman, 1999a). Finalmente, la proteína AsgB fosforilada actúa como un activador transcripcional sobre promotores reconocidos por el factor sigma AsgC de la ARN-polimerasa, desencadenando la expresión de los genes necesarios para la generación de la señal A. Los genes diana regulados por esta ruta probablemente corresponden a genes que codifican para las propias proteasas extracelulares. De hecho, la aminohidrolasa AsgE se ha considerado una posible diana para este sistema de señalización (Garza *et al.*, 2000).

La respuesta a la señal A viene mediada por el sistema regulador de dos componentes SasS/SasR, que conforman una ruta de transducción de señales responsable de detectar la presencia de la señal A extracelular y activar la expresión de los genes dependientes de ella. Los mutantes para los genes *sas* presentan un fenotipo similar a los mutantes *asg*, a pesar de tener niveles de señal A normales, debido a la incapacidad de responder frente a esta señal. La proteína SasS es una histidina quinasa de membrana capaz de fosforilar a la proteína SasR, tras detectar la presencia de la señal A en el periplasma (Yang y Kaplan, 1997). SasR, un regulador de respuesta de tipo NtrC (Gorski y Kaiser, 1998; Guo *et al.*, 2000), al activarse induce la expresión de los genes dependientes de la señal A, portadores de un promotor dependiente de σ^{54} como $\Omega 4521$ (Keseler y Kaiser, 1995), que a su vez se encuentran reprimidos por la proteína SasN durante el crecimiento vegetativo (Xu *et al.*, 1998).

ii) Señal B

La señal B es esencial para el inicio del desarrollo en *M. xanthus*, al igual que la señal A, puesto que los genes cuya expresión depende del desarrollo tan sólo se expresan con normalidad ante la presencia de una señal B adecuada (Kroos y Kaiser, 1987). Los mutantes carentes de esta señal se encuentran bloqueados desde el inicio del ciclo, puesto que son defectivos para la agregación, no forman cuerpos fructificantes y no esporulan (Kroos y Kaiser, 1987). Sin embargo, no se conoce la naturaleza de la señal B, de forma que hasta ahora no ha sido posible determinar la identidad de este factor de señalización.

Los mutantes del desarrollo incapaces de generar la señal B se encuentran afectados en un único *locus* denominado *bsgA* (Gill *et al.*, 1993). Este gen codifica para una proteasa de tipo Lon esencial para el desarrollo denominada LonD. En *Escherichia coli*, ante la escasez de nutrientes, la proteína Lon reconoce y degrada proteínas ribosómicas en presencia de un aporte de polifosfato (Kuroda *et al.*, 2001). En *M. xanthus*, se ha comprobado que la proteína BsgA tiene actividad proteolítica dependiente de ATP (Gill *et al.*, 1993), esencial para la liberación de aminoácidos intracelulares necesarios para la biosíntesis de nuevas proteínas durante el desarrollo (Gottesman y Maurizi, 2001). Además, esta proteasa es necesaria para el procesamiento del activador MrpC, necesario para activar la expresión del regulador del desarrollo FruA de la señal C durante el desarrollo (Nariya e Inouye, 2006).

A partir de los mutantes *bsg* carentes de señal B, se ha tratado de obtener mutaciones supresoras de los defectos exhibidos por esta estirpe durante el desarrollo. Estas mutaciones se han localizado sobre dos genes diferentes, *spdR* (Hager *et al.*, 2001) y *bcsA* (Cusick *et al.*, 2002), cuyos productos se asocian con dos rutas de señalización diferentes e independientes entre sí, relacionadas con la señal B. En el primer caso, se ha identificado un sistema regulador de dos componentes, constituido por la histidina quinasa SpdS y el regulador de respuesta de tipo NtrC, SpdR. Esta ruta regula de forma negativa la expresión de los genes del desarrollo dependientes de la señal B, ejerciendo un efecto represor suprimido por la proteasa LonD en presencia de señal B (Hager *et al.*, 2001). En el otro sistema participa la proteína BcsA, una enzima monooxigenasa dependiente de flavina que igualmente parece actuar como un represor sobre el desarrollo (Cusick *et al.*, 2002; Cusick y Gill, 2005).

iii) Señal C

La señal C se encuentra asociada a la superficie celular (Shimkets y Rafiee, 1990), a diferencia de lo que ocurre con la señal A. Las bacterias presentan sobre su membrana el factor C, de ahí que la transmisión de esta señal requiera de un contacto directo entre células para ejercer su efecto, actuando sólo si las bacterias se encuentran densamente empaquetadas y alineadas de forma regular (Kim y Kaiser, 1990a). Los mutantes del desarrollo para la producción de la señal C se encuentran afectados en un único *locus* genético denominado *csgA* (Shimkets y Asher, 1988). La pérdida del gen *csgA* bloquea la producción de la señal C en respuesta al agotamiento de nutrientes por lo que los mutantes *csg* no se agregan ni esporulan.

En la señal C, el gen *csgA* codifica una proteína de 25 kDa que muestra homología con enzimas de tipo alcohol deshidrogenasa de cadena corta, con un dominio de unión a NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida y adenina) en el extremo amino junto con un dominio catalítico deshidrogenasa en la región carboxilo (Baker, 1994; Lee *et al.*, 1995). La proteína CsgA completa (p25) es procesada mediante proteólisis para generar un polipéptido de 17 kDa, que ha perdido la región amino con el sitio de unión al NAD⁺ por la acción de una serina proteasa asociada a la superficie celular (Lobedanz y Søgaard-Andersen, 2003).

Se ha demostrado que la proteína CsgA procesada (p17) es la forma de la proteína biológicamente activa, actuando como auténtica señal C. De hecho, mediante bioensayo se ha comprobado que la actividad específica como señal C de la forma proteica p17 es muy superior respecto a la forma p25. La activación selectiva mediante proteólisis de la proteína CsgA en la superficie celular asegura que la señalización mediada por la señal C se dirija hacia otras células en contacto y no hacia sí misma (Lobedanz y Søgaard-Andersen, 2003).

Los niveles crecientes de señal C durante el desarrollo regulan la secuencia de eventos que tienen lugar a medida que progresa el ciclo de desarrollo, coordinando los procesos de ondulación rítmica, agregación y esporulación. Se ha demostrado que conforme avanza el proceso de desarrollo, se requieren concentraciones crecientes del factor C, de forma que bajas concentraciones inducen oscilaciones rítmicas, concentraciones intermedias se asocian con agregación para la formación de cuerpos fructificantes y altas concentraciones desencadenan la esporulación en *M. xanthus* (Kim y Kaiser, 1991; Li *et al.*, 1992; Kruse *et al.*, 2001).

De hecho, la propia señal C controla de forma positiva la expresión del gen *csgA*, lo que determina que el número de moléculas de señal C crezca de forma progresiva a lo largo del desarrollo (Kim y Kaiser, 1990b). Este incremento depende de un circuito de retroalimentación mediado por el sistema ActA/ActB, codificado por el operón *act* (Gronewold y Kaiser, 2001). En esta ruta de señalización, la presencia de señal C estimula a la proteína reguladora de respuesta ActA, que a su vez activa al regulador dependiente de σ^{54} ActB, para potenciar la expresión del operón *act* desde un promotor dependiente de σ^{54} (Gronewold y Kaiser, 2007). Los productos generados a partir del operón *act* estimulan a su vez la expresión del gen *csgA* a medida que progresa el desarrollo, a la vez que controlan el tiempo de expresión de este gen durante esta etapa del ciclo de vida de *M. xanthus* (Gronewold y Kaiser, 2001).

La ruta de transducción de señales en respuesta a la señal C es muy compleja y depende de múltiples sistemas de señalización. Un elemento central dentro de estas vías de señalización es la proteína FruA, un regulador de respuesta de tipo FixJ con un motivo HTH de unión al ADN, cuya actividad transcripcional se encuentra regulada mediante fosforilación en respuesta a la señal C, mediada por una histidina quinasa sensora no conocida. La delección de *fruA* da lugar a mutantes con agregación anormal, incapaces de formar cuerpos ni de esporular. La expresión del gen *fruA* es totalmente dependiente del desarrollo y se encuentra controlada por las señales A y E, pero no por la señal C (Ogawa *et al.*, 1996; Ellehaug *et al.*, 1998).

La regulación de la expresión de FruA depende del regulador transcripcional MrpC, un activador de la familia CRP que contiene un dominio de unión a nucleótidos cíclicos seguido por un dominio HTH de unión al ADN. La expresión de *mrpC* se induce a partir del sistema de dos componentes dependiente de σ^{54} MrpA/MrpB, tras ser estimulado por la señal A y la respuesta estricta (Sun y Shi, 2001a; Sun y Shi, 2001b). Al comenzar el desarrollo, la proteína MrpC es procesada mediante el corte del extremo N-terminal por la proteasa LonD de la señal B, dando lugar a la forma activa MrpC2, capaz de unirse al promotor de *fruA* para activar su expresión, a la vez que regula de forma positiva su propia expresión (Nariya e Inouye, 2006). En cambio, durante el crecimiento vegetativo, MrpC es fosforilado por la cascada de Ser/Thr quinasas Pkn8/Pkn14, inhibiendo la expresión del gen *fruA* (Nariya e Inouye, 2005b).

El regulador de respuesta FruA actúa como un factor transcripcional que controla la expresión de un conjunto de genes inducidos de forma selectiva durante el desarrollo. Entre ellos, aparecen genes que se expresan de forma independiente a la señal C como *tps* o *dofA* (Ueki e Inouye, 2006), mientras que otros, como *devRS*, son totalmente dependientes de esta señal. Para explicar esta discordancia, se ha propuesto que inicialmente FruA es fosforilada de forma minoritaria por la histidina quinasa sin activar, lo que permite la expresión de los genes que no requieren señal C. En cambio, al progresar el desarrollo, la presencia de señal C incrementa los niveles de FruA fosforilada, al estimular la actividad de la histidina quinasa sobre el regulador y es entonces cuando se expresan los genes que dependen de la señal C (Horiuchi *et al.*, 2002; Ueki e Inouye, 2006).

La proteína FruA regula la actividad del sistema quimiosensor Frz, para controlar el movimiento por deslizamiento durante la agregación celular, en respuesta a la señal C. Para ello, la proteína FrzCD es metilada de forma progresiva durante el desarrollo ante la presencia de FruA fosforilada, lo que le permite interactuar con FrzE para disminuir la frecuencia de reversión en el movimiento y por tanto, promover los desplazamientos prolongados necesarios durante la formación de los cuerpos fructificantes (Søgaard-Andersen y Kaiser, 1996; Jelsbak y Søgaard-Andersen, 1999). Se ha propuesto que la metilación de FrzCD, dependiente de FruA, podría deberse a que este regulador podría actuar estimulando la expresión de alguna metilasa, como FrzF (Ueki e Inouye, 2006).

La proteína FruA controla la expresión del operón *dev*, formado por cinco genes en donde al menos los tres últimos, *devTRS* son esenciales para la esporulación (Kroos *et al.*, 1990; Thöny-Meyer y Kaiser, 1993; Boysen *et al.*, 2002). Además, se han encontrado genes asociados al proceso de esporulación cuya expresión depende a su vez del sistema *dev* (Licking *et al.*, 2000). Este operón se induce en presencia de FruA fosforilada y del regulador de tipo LysR, LadA y se autorregula de forma negativa por DevS (Viswanathan *et al.*, 2007a; Viswanathan *et al.*, 2007b). La expresión del sistema *dev* requiere de elevadas concentraciones de señal C, alcanzadas tan sólo en el interior de los cuerpos fructificantes (Ellehaug *et al.*, 1998; Julien *et al.*, 2000). Un producto de este sistema, la proteína DevT, estimula a su vez la síntesis del regulador FruA durante el desarrollo (Boysen *et al.*, 2002).

Se ha propuesto un modelo global para la ruta de transducción de la señal C: ante el agotamiento de nutrientes, la señal C es percibida por una proteína sensora de tipo histidina quinasa no conocida, que a su vez activa al regulador de respuesta FruA mediante fosforilación. La señalización dependiente de la señal C se ramifica a partir de FruA en dos rutas distintas: el sistema *frz*, que controla la agregación y fructificación y el sistema *dev* que determina la esporulación (Bonner y Shimkets, 2001).

Al inicio del desarrollo, con bajos niveles de señal C, la proteína FruA poco fosforilada tan sólo es capaz de activar la ruta de señalización *frz* que conduce a la agregación celular. En un principio, se producen reversiones periódicas en la dirección de deslizamiento generando ondulaciones rítmicas, pero a medida que se incrementa la señal C, la frecuencia de reversión descende y las bacterias comienzan a moverse en la misma dirección. Entonces, las células se disponen en cadenas, estableciendo contactos célula-célula e intercambiando niveles de señal C crecientes, que evitan la reversión del movimiento durante el proceso de agregación (Søgaard-Andersen y Kaiser, 1996; Jelsbak y Søgaard-Andersen, 2002). A medida que las células se agregan dentro del cuerpo, se incrementa los niveles de señal C por contacto entre las bacterias, a la vez que el sistema regulador mediado por las proteínas Act potencia la producción de la señal C. Una vez que se alcanzan altos niveles de la señal C, la proteína FruA adquiere un elevado nivel de fosforilación, consiguiendo activar la vía de señalización *dev* necesaria para que se desencadene la esporulación (Kaplan, 2003).

En la Figura 2 se detalla el modelo completo para la producción de la señal C, así como la ruta de respuesta ante la detección de esta señal, junto con los circuitos de retroalimentación positiva que generan los niveles crecientes de señal C a medida que progresa el desarrollo. En esta ruta de señalización, el regulador FruA estimula la agregación y posteriormente la esporulación, en función de los niveles de señal C recibidos por la célula.

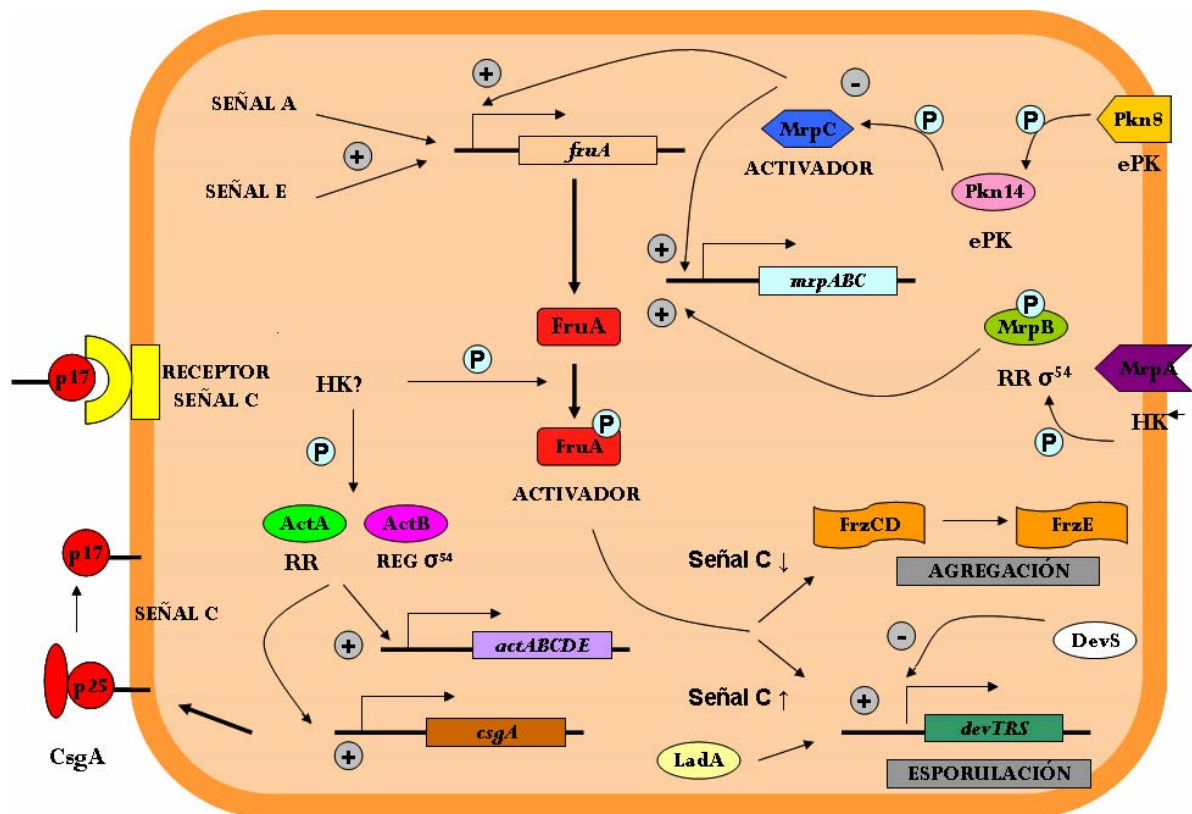


Figura 2. Modelo de la ruta de transducción de la señal C en *M. xanthus*. Clave: ePK, quinasa de tipo eucariota; HK, histidina quinasa; RR, regulador de respuesta, REG, regulador transcripcional.

iv) Señal D

La identidad de la señal D es desconocida, aunque se ha visto que mezclas de ácidos grasos, incluyendo la autocida AMI, funcionan de forma adecuada durante la complementación en ausencia de esta señal (Rosenbluh y Rosenberg, 1989a). La señal D es necesaria en una etapa postrera del desarrollo, puesto que su ausencia bloquea la expresión de los genes tardíos del mismo. Los mutantes carentes de señal D provienen de la alteración de un único *locus* denominada *dsgA*. Los mutantes de inserción sobre *dsgA* son letales, pero mutantes puntuales presentan un ciclo de desarrollo parcialmente interrumpido, en donde apenas se agregan y la esporulación se reduce y se retrasa de forma importante (Cheng y Kaiser, 1989a).

El gen *dsgA* codifica para el factor IF3 de inicio de la traducción de *M. xanthus*, que se identifica con la proteína InfC (Cheng *et al.*, 1994; Kalman *et al.*, 1994). InfC es una proteína asociada al ribosoma, esencial para la síntesis proteica durante el crecimiento y el desarrollo de *M. xanthus*, de manera que su actividad es necesaria para completar la formación de proteínas que tiene lugar en el desarrollo (Cheng y Kaiser, 1989b). Los mutantes puntuales para *dsgA* parecen retener cierta actividad de InfC, pero resulta insuficiente para completar la síntesis de proteínas del desarrollo (Cheng y Kaiser, 1989a).

v) Señal E

La señal E parece estar constituida por uno o varios ácidos grasos de tipo ramificados, liberados a partir de los componentes fosfolipídicos presentes en la membrana bacteriana (Downard y Toal, 1995). De hecho, se ha visto que *M. xanthus* es capaz de aceptar ácidos grasos a partir de fosfolípidos provenientes de una suspensión (Kearns y Shimkets, 2001), lo que implica que estos ácidos grasos puedan ser transferidos entre células por contacto. Los mutantes en el desarrollo para la señal E se encuentran afectados en un único *locus* denominado *esg*, cuya alteración bloquea el desarrollo en una fase muy temprana. Esta estirpe sólo conserva la mitad del contenido en ácidos grasos iso-ramificados, aunque esta deficiencia se recupera en presencia de altos niveles de ácidos grasos saturados e insaturados en el medio (Toal *et al.*, 1995).

Los genes *esg* codifican para las subunidades proteicas E1 α y E1 β de la deshidrogenasa de cetoácidos ramificados de *M. xanthus*, una enzima que cataliza la conversión de leucina en isovaleril-CoA, precursor de la síntesis de ácidos grasos ramificados, así como de la biosíntesis de policétidos (Downard *et al.*, 1993; Toal *et al.*, 1995; Mahmud *et al.*, 2002). Por tanto, la enzima deshidrogenasa de cetoácidos ramificados parece estar implicada en la síntesis de un componente lipídico de membrana esencial para la señalización durante el desarrollo, en concordancia con la elevada proporción de ácidos grasos iso-ramificados presentes en la membrana de las mixobacterias (Ware y Dworkin, 1973).

I. 6. 2. Respuesta estricta

La señal que desencadena el inicio del ciclo de desarrollo en *M. xanthus* proviene del agotamiento de nutrientes en el medio. El mecanismo sensor que detecta esta privación de nutrientes es la respuesta estricta, que actúa deteniendo el crecimiento celular para conducir a la bacteria hacia el ciclo de desarrollo, promoviendo la señalización celular que coordina este proceso (Manoil y Kaiser, 1980a; Manoil y Kaiser, 1980b).

Los aminoácidos suponen la principal fuente de carbono, nitrógeno y energía para la mixobacteria y por tanto, la limitación en el aporte de aminoácidos tiene un papel clave para iniciar el desarrollo (Dworkin, 1963). La carencia de aminoácidos activa la respuesta estricta, al detener la síntesis proteica debido a la incapacidad del ribosoma para leer un codón que carece de su respectivo ARNt cargado. Entonces, la proteína RelA se asocia al ribosoma y comienza a sintetizar nucleótidos altamente fosforilados, de tipo guanósina tetra y penta fosfato (p)ppGpp, que actúan como alarma (Singer y Kaiser, 1995).

La respuesta estricta es necesaria para el inicio del desarrollo multicelular en *M. xanthus*, puesto que estimula la expresión de un conjunto de genes específicos necesarios para este proceso (Singer y Kaiser, 1995). De hecho, los mutantes para *relA* son incapaces de expresar ninguno de los genes dependientes del desarrollo ante la privación de nutrientes (Harris *et al.*, 1998). En este sentido, se ha demostrado que la acumulación de (p)ppGpp por la respuesta estricta, induce la producción tanto de la señal A como de la señal C, esenciales para el inicio del desarrollo, actuando como un sistema sensor que ante la limitación de nutrientes promueve la progresión hacia el ciclo de desarrollo.

El desarrollo multicelular requiere la formación de un abundante conjunto de proteínas específicas de este proceso, por lo que es necesario mantener la capacidad de síntesis de proteínas durante el desarrollo. La respuesta estricta facilita la disponibilidad de aminoácidos, al potenciar su biosíntesis y promover su liberación mediante proteólisis regulada. Se ha comprobado que la presencia de (p)ppGpp reprime la síntesis de proteínas ribosómicas y de ARN estables como ARNr y ARNt pero activa la expresión de genes para la biosíntesis de aminoácidos (Gottesman y Maurizi, 2001; Jain *et al.*, 2006).

Ante la limitación de nutrientes, *M. xanthus* presenta dos respuestas alternativas, por un lado mantener un crecimiento vegetativo reducido, adecuado a los nutrientes restantes presentes en el medio, o bien progresar hacia el desarrollo. Ambos procesos implican la muerte de una elevada proporción de bacterias, de hecho, tan sólo entre un 0.1-10% de células sobreviven al diferenciarse en mixósporas. La alternativa adecuada depende en cada caso del nivel de nutrientes en el medio, de forma que las células deben iniciar el desarrollo antes de que se agote totalmente cualquier nutriente esencial (Kaiser, 2004).

La decisión entre ambas opciones depende de la respuesta estricta, que actúa ejerciendo un control sobre el nivel celular de dos proteínas reguladoras esenciales, SocE y CsgA. La proteína SocE mantiene el crecimiento vegetativo, al inhibir la respuesta estricta y por tanto, está presente de forma predominante en células en crecimiento. De hecho, la expresión de SocE se inhibe al iniciarse el desarrollo, debido al efecto represor ejercido por la respuesta estricta. En cambio, la proteína CsgA promueve el ciclo de desarrollo, tratando de prolongar en el tiempo la respuesta estricta. En este sentido, esta proteína se acumula a partir del inicio del desarrollo ya que su expresión se ve estimulada por la respuesta estricta (Crawford y Shimkets, 2000a, Crawford y Shimkets, 2000b).

I. 7. Genoma de *M. xanthus*

El genoma completo de *M. xanthus* DK1622 ha sido secuenciado recientemente (Goldman *et al.*, 2006) y se encuentra disponible en la base de datos de TIGR y en PubMed. De igual forma, se ha completado la secuenciación de otras tres mixobacterias, *Sorangium cellulosum* So ce56 y *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C y *Anaeromyxobacter sp.* Fw109-5, y además en este momento se está llevando a cabo la secuenciación de *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 y *Plesiocystis pacifica* SIR-1, cuyo genoma se encuentra disponible en forma de fragmentos genómicos o contigs. En la Tabla 2 se detallan las características principales del genoma de cada una de estas especies de mixobacterias.

El análisis del tamaño del genoma de estas bacterias indica que las especies de este grupo poseen los genomas de mayores dimensiones entre los procariontes, con un tamaño comprendido entre los 9.1-13.0 Mb (a excepción de las especies de *Anaeromyxobacter*, con 5.0-5.3 Mb). De forma comparativa, el tamaño promedio del genoma de las especies de mixobacterias duplica ampliamente al de *E. coli* (Blattner *et al.*, 1997). Se ha sugerido que las bacterias con genomas de mayores dimensiones poseen elevadas capacidades adaptativas a ambientes muy variables (Lynch y Conery, 2003; Konstantinidis y Tiedje, 2004).

Durante el estudio detallado de la secuencia del genoma de las diferentes especies de mixobacterias se ha comprobado que en todos los casos el contenido en G+C es muy elevado, comprendido entre el 67-74%. El número de genes definidos en cada caso oscila entre los 4346 de *A. dehalogenans* y los 9367 en *S. cellulosum*, en concordancia con el tamaño del genoma de cada especie, mientras que la porción de cromosoma destinada a codificar estos genes se sitúa en todos los casos entre el 85-90% del tamaño total de genoma. En la Tabla 2, se detallan las características básicas de los genomas de las especies de mixobacterias secuenciadas hasta el momento.

Especie	Suborden	Tamaño (Mb)	CDS	% GC	% codificante	Estatus
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C	<i>Cystobacterinae</i>	5.01	4346	74	90	completo
<i>Aneromyxobacter sp.</i> Fw109-5	<i>Cystobacterinae</i>	5.27	4562	73	89	completo
<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	<i>Cystobacterinae</i>	9.14	7331	68	90	completo
<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	<i>Cystobacterinae</i>	10.27	8543	67	85	579 contigs
<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1	<i>Nannocystineae</i>	10.59	8450	70	89	237 contigs
<i>Sorangium cellulosum</i> So ce56	<i>Soranginae</i>	13.03	9367	71	86	completo

Tabla 2. Características principales de los genomas secuenciados dentro del grupo de las mixobacterias

La expansión en el tamaño del genoma específica del grupo de las mixobacterias se ha originado mediante un mecanismo de duplicación y divergencia génica desde un progenitor ancestral, proporcionando el material necesario para la adquisición de nuevas funciones génicas (Pushker *et al.*, 2004; Gevers *et al.*, 2004). De hecho, se ha comprobado que más del 15% del total de genes se han duplicado de forma específica en las mixobacterias. Entre el conjunto de 1500 genes duplicados en *M. xanthus*, se han amplificado selectivamente de forma predominante los genes relacionados con la comunicación intercelular, la transducción de señales y el control de la expresión génica (Goldman *et al.*, 2006).

El genoma de *M. xanthus* contiene un único cromosoma bacteriano formado por 7331 genes putativos que ocupan más del 90% del genoma (Goldman *et al.*, 2006). El análisis de la secuencia de estos genes indica que una elevada proporción de ellos, en torno al 20%, se expresan a niveles muy elevados, como es propio de bacterias de crecimiento rápido que requieren de un metabolismo muy activo (Karlin *et al.*, 2006). Entre ellos, junto a genes asociados al metabolismo energético, la transcripción y la traducción, aparecen numerosos genes que codifican proteínas de señalización así como enzimas degradativas.

M. xanthus es capaz de detectar una amplia variedad de señales en el ambiente que le rodea, generando respuestas adaptativas adecuadas, y además posee un complejo sistema de intercambio de señales necesario para la coordinación de las células a lo largo del ciclo de vida de la bacteria. Por tanto, las rutas de señalización en este microorganismo se encuentran muy desarrolladas, apareciendo un enorme número de genes que codifican para proteínas de señalización en el genoma de *M. xanthus*, como activadores dependientes de σ^{54} , sistemas de dos componentes y Ser/Thr/Tyr quinasas (Goldman *et al.*, 2006). Debido al predominio de las rutas reguladoras de tipo multicomponente en esta bacteria, la proporción de genes para reguladores transcripcionales de un único componente se encuentra sensiblemente reducida, en un número inferior a la mitad de lo esperado en relación al tamaño del genoma de *M. xanthus*.

Entre los reguladores dependientes de σ^{54} , se han identificado un total de 53 activadores, de ellos al menos la mitad son específicos dentro del grupo de las mixobacterias y en muchos casos se expresan a niveles considerables (Karlin *et al.*, 2006; Goldman *et al.*, 2006). Muchos de estos reguladores parecen participar dentro de rutas de señalización implicadas en la detección de cambios medioambientales. Estos factores transcripcionales son claves para el desarrollo, puesto que muchos genes se inducen durante este período a partir de promotores dependientes de σ^{54} , en presencia de la proteína activadora adecuada. De hecho, la mutación de algunos de estos reguladores bloquea el desarrollo e incluso se ha comprobado que la supresión del factor σ^{54} es letal para *M. xanthus*, a diferencia de lo que ocurre en otros microorganismos (Jakobsen *et al.*, 2004; Jelsbak *et al.*, 2005; Kroos *et al.*, 2005).

Los sistemas reguladores de dos componentes se encuentran ampliamente representados, con 133 histidina quinasas junto con 139 reguladores de respuesta, así como 36 quinasas híbridas, de los cuales más de la mitad son igualmente propias del grupo de las mixobacterias (Karlin *et al.*, 2006; Goldman *et al.*, 2006). Las rutas de señalización formadas por las parejas de histidina quinasa con su correspondiente regulador de respuesta participan en la detección de una amplia diversidad de señales, tanto intracelulares como extracelulares, lo que explica la extensa variedad de dominios sensores diferentes que aparecen en estas histidina quinasas, como los dominios GAF, PAS o HAMP.

II. Transducción de señales en bacterias

II. 1. Características generales de la señalización en bacterias

Las bacterias con frecuencia se enfrentan a cambios notables en las condiciones de vida existentes en el entorno que les rodea. Por ello, disponen de numerosos sistemas de señalización, esenciales para que las bacterias sean capaces de generar respuestas adaptativas diversas frente a estímulos ambientales específicos. La abundancia de estas proteínas de señalización en procariotas ha sido subestimada durante mucho tiempo debido a que las bacterias disponen de un conjunto distintivo de componentes de señalización, diferente del empleado por los eucariotas (Gao *et al.*, 2007).

El análisis de los genomas microbianos secuenciados indica que los microorganismos sometidos a condiciones variables dentro de su entorno, como las bacterias que viven en el suelo o en un medio acuático, presentan sistemas de señalización mucho más diversos y complejos. Igualmente, poseen un número considerable de rutas sensoras aquellos microorganismos que poseen formas de vida adaptadas a diferentes ambientes, como ocurre en muchas bacterias patógenas facultativas. Sin embargo, aquellos que viven adaptados a un nicho estable, como les sucede a los microorganismos patógenos intracelulares obligados, con frecuencia contienen sistemas de señalización escasos y bastante primitivos (Konstantinidis y Tiedje, 2004; Galperin, 2005).

El recuento del número total de componentes de señalización en una especie bacteriana respecto al tamaño de su genoma, permite valorar el potencial adaptativo de este organismo al ambiente (Galperin, 2005). Las bacterias con un índice más elevado corresponden en todos los casos a bacterias propias de medios edáficos o acuáticos, con formas de vida muy versátiles, capaces de emplear sustratos muy diversos y con una movilidad muy activa. En ocasiones, la complejidad de las redes de señalización varía ampliamente entre organismos muy próximos, debido a la adquisición o pérdida de genes para proteínas de señalización a lo largo de la evolución durante la adaptación de la bacteria a un nicho ecológico específico.

Los mecanismos de transducción de señales en bacterias son muy diversos, oscilando desde sistemas reguladores formados por una única proteína, hasta cascadas de señalización integradas por múltiples proteínas. Sin embargo, las rutas más comunes en procariotas son los sistemas reguladores de dos componentes, que constan de dos proteínas de señalización conservadas, una histidina quinasa y su correspondiente regulador de respuesta, relacionados entre sí mediante fosfotransferencia (Hoch, 2000; Stock *et al.*, 2000; Kim y Forst, 2001; West y Stock, 2001). En bacterias, también son frecuentes los sistemas basados en la producción de segundos mensajeros, que constan de enzimas de tipo adenilato y guanilato ciclasa junto con fosfodiesterasas, implicadas en el control de la síntesis y degradación de nucleótidos cíclicos (Baker y Kelly, 2004; Jenal y Malone, 2006; Linder, 2006).

Las rutas de señalización más sencillas son aquellas que constan de una única proteína reguladora capaz de acoplar de forma directa una región sensora a otra efectora. Estos sistemas con un solo componente son activadores o represores transcripcionales, capaces de regular la expresión génica mediante un dominio de unión al ADN estimulado en respuesta a una señal percibida por el propio regulador (Ulrich *et al.*, 2005).

Sin embargo, con frecuencia, tal como ocurre en los sistemas de dos componentes, la región sensora y efectora se sitúa en proteínas diferentes y por tanto, es necesario transmitir la señal mediante fosfotransferencia. Las proteínas de señalización propias de estas rutas de transducción de señales son modulares, combinando motivos de diferente naturaleza en una misma proteína. De esta forma, todas ellas disponen de una amplia variedad de dominios sensores y efectores, pero comparten motivos de fosfotransferencia conservados, lo que facilita la interacción entre diferentes rutas (Hellingwerf, 2005).

A través de estas rutas de señalización, las bacterias detectan las condiciones del medio que les rodea, pero además, también son capaces de sentir las condiciones existentes en el interior celular (Galperin, 2004). De hecho, una porción considerable de las proteínas de señalización situadas en el citoplasma, junto con algunas ancladas a la membrana, corresponden a sensores intracelulares (Mascher *et al.*, 2006). Sin embargo, la mayoría de los componentes de señalización identificados en bacterias (en torno al 60%) corresponden a proteínas receptoras integradas en la membrana, que actúan de forma predominante como sensores frente al ambiente externo (Galperin, 2005).

II. 2. Sistemas reguladores de dos componentes

El mecanismo más extendido de transducción de señales en bacterias corresponde con los sistemas reguladores de dos componentes. Estas rutas de señalización formadas por una histidina quinasa junto con su correspondiente regulador de respuesta, generan respuestas adaptativas de forma rápida y sencilla mediante un proceso que normalmente implica un único evento de fosfotransferencia entre ambas proteínas. Estas rutas se emplean para la regulación de una amplia variedad de funciones celulares, que incluyen el metabolismo, la movilidad por quimiotaxias, el transporte de nutrientes, la adaptación a agentes de estrés, la virulencia, la diferenciación y el desarrollo (Bekker *et al.*, 2006).

Como se aprecia en la Figura 3, la transducción de señales en un sistema de dos componentes típico tiene lugar una vez que el sensor, la histidina quinasa homodimérica situada en la membrana, se activa en respuesta a un estímulo extracelular adecuado, y se autofosforila sobre un residuo de histidina conservado en la propia proteína. A partir de aquí, el grupo fosforilo es transferido en un único paso desde la histidina quinasa hasta el regulador de respuesta, con la fosforilación de un residuo de aspártico conservado en la proteína efectora. La regulación del estado de fosforilación del regulador de respuesta controla la actividad de esta proteína, y por tanto, determina la respuesta frente al estímulo inductor (Hoch, 2000; Stock *et al.*, 2000; Kim y Forst, 2001; West y Stock, 2001).

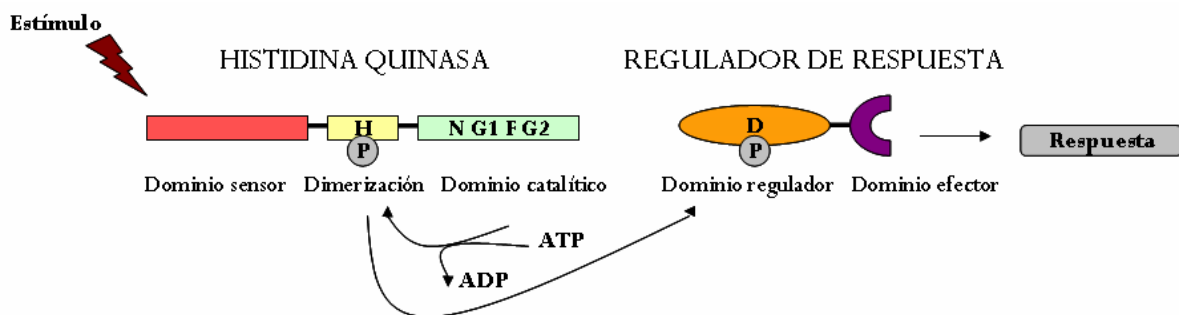


Figura 3. Transducción de señales en los sistemas reguladores de dos componentes.

II. 2. 1. Histidina quinasas

Las histidina quinasas son una amplia familia de proteínas de señalización capaces de catalizar la fosforilación de residuos de histidina a partir de ATP. En su mayoría, son proteínas homodiméricas de membrana, que constan de una región N-terminal sensora expuesta hacia el periplasma junto con una región C-terminal catalítica orientada hacia el citoplasma. En las histidina quinasas, el dominio sensor presenta una secuencia variable capaz de detectar estímulos ambientales muy diversos (Mascher *et al.*, 2006), mientras que el núcleo catalítico de la quinasa, esencial para la actividad de la enzima, se mantiene muy conservado dentro de los diferentes miembros de esta familia de proteínas. Las histidina quinasas se dividen en once subfamilias en base a la secuencia de la región que conforma el núcleo catalítico de esta enzima (Wolanin *et al.*, 2002; Khorchid e Ikura, 2006).

La región catalítica de las histidina quinasas consta de dos regiones proteicas, el dominio de fosforilación/dimerización y el dominio catalítico. La primera región contiene un motivo, denominado caja H, con el residuo de histidina aceptor y además, favorece los contactos proteicos necesarios para la dimerización de la proteína. El dominio catalítico presenta cuatro motivos conservados, designados como cajas N, G1, F y G2, implicados en la unión al nucleótido ATP y en la fosfotransferencia hasta el residuo aceptor de histidina. La autofosforilación de las histidina quinasas tiene lugar en *trans*, de forma que una subunidad fosforila a la subunidad opuesta en el complejo homodimérico (Wolanin *et al.*, 2002; Khorchid e Ikura, 2006).

II. 2. 2. Reguladores de respuesta

Los reguladores de respuesta conforman un grupo de proteínas efectoras que catalizan la transferencia del grupo fosfato desde la histidina quinasa hasta un residuo de aspártico presente en la propia proteína. Normalmente, los reguladores de respuesta contienen un dominio regulador N-terminal conservado, con el residuo de aspártico aceptor, asociado a un dominio efector C-terminal mucho más variable. La actividad del regulador de respuesta depende de la fosforilación de la región reguladora, ya que este proceso induce un cambio conformacional en la proteína capaz de modificar la actividad de la región efectora. De esta forma, el dominio regulador desfosforilado inhibe al dominio efector, mientras que la fosforilación suprime esta inhibición, estimulando la actividad del regulador de respuesta (Gao *et al.*, 2007; Galperin, 2006).

Los reguladores de respuesta controlan las actividades celulares frente al estímulo percibido. Para ello, en muchas ocasiones, actúan como factores transcripcionales que controlan la expresión génica mediante dominios efectores de unión al ADN de tipo HTH, que activan o reprimen la transcripción de uno o varios genes diana. En ocasiones, se han encontrado dominios efectores con actividad enzimática de tipo metilesterasa, ciclasa o fosfodiesterasa, mientras que otros casos presentan motivos de interacción proteína-proteína, como ocurre en CheY durante la quimiotaxia, todos ellos capaces de regular las funciones celulares sin alterar la expresión génica (Gao *et al.*, 2007; Galperin, 2006).

II. 3. Descubrimiento, distribución y origen de las ePKs en bacterias

Mientras que en bacterias las rutas de transducción de señales predominantes se basan en la presencia de histidina quininas, como ocurre en los sistemas reguladores de dos componentes, en eucariotas la señalización depende de cascadas de fosforilación de proteínas catalizadas por serina/treonina/tirosina quininas. Ambas familias de proteínas presentan una especificidad de sustrato diferente condicionada por la ausencia de similitud de secuencia entre los miembros de estos dos grupos (Zhang, 1996). Durante mucho tiempo, se consideró que las quininas que fosforilan sobre residuos de serina, treonina o tirosina se encontraban confinadas de forma exclusiva a organismos eucariotas, por lo que este tipo de enzimas se denominaron proteínas quininas de tipo eucariota (ePKs).

Posteriormente, mediante estudios bioquímicos se identificaron proteínas fosforiladas en residuos de serina, treonina y tirosina en bacterias y arqueas, lo que sugería la existencia de este tipo de enzimas en procariotas (Skorko, 1984; Cozzone, 1988). Finalmente, se descubrió la presencia de una ePK en la bacteria *M. xanthus*, confirmando así la existencia de Ser/Thr quininas en procariotas (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991). A partir de aquí, se han descrito y caracterizado muchas otras proteínas quininas de este tipo en distintos microorganismos, tanto en bacterias como en arqueas, que participan en rutas de señalización implicadas en el control de diversas funciones celulares, como el metabolismo celular, la movilidad, el desarrollo, la diferenciación, la virulencia o la respuesta al estrés.

Con la llegada de la era de la genómica, se ha comprobado mediante el análisis de los genomas bacterianos secuenciados que las ePKs son muy comunes entre los procariotas, de forma que una amplia diversidad de bacterias contienen este tipo de proteínas (Kennelly, 2002). El estudio de la secuencia completa de 125 genomas de bacterias y arqueas ha permitido identificar en estos microorganismos un total de 600 ePKs (Krupa y Srinivasan, 2005). Sin embargo, la presencia de ePKs en bacterias suele ser en general bastante reducida, y de hecho, en todos los genomas secuenciados el número de histidina quininas supera de forma notable al de Ser/Thr y Tyr quininas (Krupa y Srinivasan, 2005).

A pesar de ello, el contenido en ePKs de muchas bacterias es bastante considerable, de forma que las rutas de señalización basadas en este tipo de quininas parecen tener una relevancia notable para la transducción de señales en estos microorganismos. Entre las bacterias que presentan un elevado número de quininas se encuentran, junto a las mixobacterias, especies de los géneros *Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Pirellula*, *Deinococcus*, *Gloeobacter*, *Anabaena*, *Nostoc* o *Synechocystis* (Krupa y Srinivasan, 2005).

La coexistencia de la familia de Ser/Thr y Tyr quininas tanto en procariotas como en eucariotas viene a plantear el origen evolutivo de este tipo de proteínas. Los dendrogramas obtenidos a partir de su secuencia fijan el origen de esta superfamilia de quininas en el antecesor universal, antes de la divergencia evolutiva entre eucariotas y procariotas, desde donde pasaron a las distintas líneas filogenéticas derivadas del antecesor universal (Leonard *et al.*, 1998).

III. Quinasas de tipo eucariota (ePKs)

III. 1. Características básicas de las ePKs

Las enzimas que conforman la familia de proteínas ePKs está formada por un conjunto de Ser/Thr y Tyr quinasas, cuyo denominador común es la presencia de una región compartida por todos los miembros de este grupo, sobre la que reside la actividad de fosforilación de las proteínas, conocida como dominio catalítico quinasa. Esta región homóloga, formada por unos 250 a 300 aminoácidos, se mantiene muy conservada en todos los miembros de este grupo de proteínas, tanto en bacterias como en eucariotas. La expresión de quinasas truncadas ha permitido definir la región necesaria para la actividad a la proteína, delimitando al dominio catalítico (Hanks y Hunter, 1995).

El alineamiento de la secuencia del dominio catalítico de diferentes quinasas permite identificar la presencia de varios motivos conservados reseñados en la Figura 4. De esta forma, en el dominio catalítico se ha establecido la presencia de once subdominios proteicos, denominados mediante números romanos del I al XI (Taylor *et al.*, 1993; Hanks y Hunter, 1995). Cada subdominio consta de una secuencia corta de 5-20 residuos muy conservados, separados por segmentos de secuencia variable. Dentro de estas regiones tan sólo unos pocos residuos son constantes o casi invariables, correspondiendo a aquéllos que se localizan en regiones de la enzima que participan de forma directa en el proceso de fosforilación (Hanks, 2003).

El dominio catalítico de las ePKs presenta cierta similitud de secuencia con diferentes familias de proteínas, como las quinasas RIO, ABC1, aminoglicósido quinasas o colina quinasas, entre otras. Los miembros de esta superfamilia de proteínas similares a las quinasas de tipo eucariota (ELKs) mantienen un plegamiento similar junto con un mecanismo catalítico análogo, a pesar de la elevada divergencia en su secuencia. Esta variabilidad les confiere una enorme plasticidad funcional para actuar sobre una amplia diversidad de sustratos, adquiriendo una considerable relevancia en la regulación de múltiples actividades celulares (Leonard *et al.*, 1998; Kannan *et al.*, 2007).

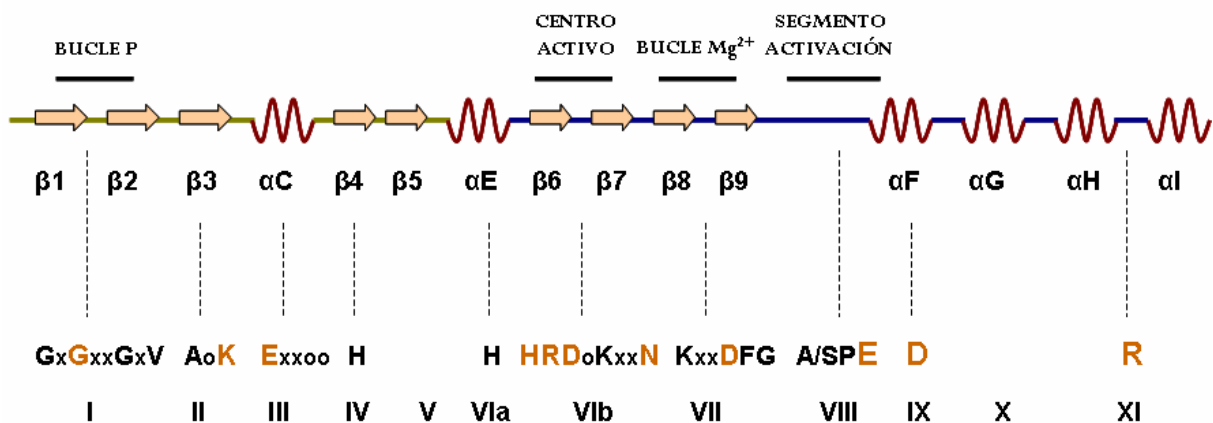


Figura 4. Motivos conservados en el dominio catalítico de las ePKs. Se muestra la secuencia y posición de los once subdominios que conforman esa región, destacando en marrón los residuos constantes o casi invariables, necesarios para la actividad enzimática. El lóbulo N-terminal (verde) contiene los subdominios I-IV y conecta a través de la región bisagra (subdominio V) con el lóbulo C-terminal (azul), con los subdominios VIa-IX.

III. 2. Estructura del núcleo catalítico quinasa

El análisis mediante cristalografía de rayos X de la estructura tridimensional del dominio catalítico de las ePKs, reveló la existencia de un plegamiento muy conservado compartido por todas las proteínas quinasas resueltas hasta el momento. El modelo estructural de referencia lo constituye la proteína quinasa dependiente de AMPc de eucariotas, denominada proteína quinasa A (PKA), cuya estructura tridimensional se muestra en la Figura 5 (Knighton *et al.*, 1991; Akamine *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005). Para una revisión detallada, ver Shi *et al.*, 1998; Huse y Kuriyan, 2002; Adams, 2001; Krupa *et al.*, 2004, Kannan y Neuwald, 2005, Kornev *et al.*, 2006.

El dominio catalítico de las ePKs presenta un plegamiento de tipo bilobular, en donde se puede diferenciar una región N-terminal más pequeña, separada mediante un corto segmento bisagra respecto a la región C-terminal de mayor tamaño, dejando entre ambos lóbulos una profunda cavidad proteica, en donde se sitúa el centro activo con el sitio de unión al sustrato y al ATP. En bacterias, las ePKs cristalizadas, como la quinasa PknB de *Mycobacterium tuberculosis*, presentan un plegamiento que mantiene una similitud estructural muy marcada con las Ser/Thr quinasas de eucariotas, por lo que parece que la estructura de esta familia de proteínas se conserva de forma universal (Ortiz-Lombardía *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2003).

III. 2. 1. Lóbulo N-terminal del dominio catalítico

El lóbulo N-terminal está formado por los subdominios I-IV y se pliega de forma predominante a base de láminas β antiparalelas, con un total de cinco láminas β asociadas entre sí mediante interacciones hidrofóbicas, junto con una única hélice α muy prominente denominada hélice α_C . Esta región proteica interviene principalmente en la unión al nucleótido ATP.

La unión al ATP se produce mediante una cavidad apolar formada por varios residuos hidrofóbicos encargados de alojar el anillo de adenina. Entre los diversos residuos apolares que delimitan este hueco se sitúan la valina del subdominio I y la alanina conservada del subdominio II. En esta región, un elemento muy característico es la presencia de un giro proteico muy flexible denominado bucle P, que conecta las láminas β_1 y β_2 del dominio catalítico. Este segmento, formado por una secuencia conservada rica en glicinas del subdominio I (residuos 50-55 en PKA), se une al ATP mediante la formación de puentes de hidrógeno con los grupos fosfato β y γ del nucleótido, actuando a modo de cubierta para posicionar de forma correcta los grupos fosfato del ATP.

En la unión a este nucleótido, un residuo clave es la lisina (K72) totalmente conservada característica del subdominio II, situada en el centro de la lámina β_3 del dominio catalítico. Este aminoácido es esencial para la actividad catalítica de la enzima, puesto que su sustitución conduce a una pérdida de la capacidad de fosfotransferencia (Iyer *et al.*, 2005). La importancia de este residuo reside en el contacto polar que establece con los grupos fosfato α y β del ATP, necesario para que adquieran una orientación adecuada durante la catálisis. En el centro de la larga hélice α_C , un residuo de glutámico (E91) casi invariable del subdominio III estabiliza y posiciona de forma correcta a esta lisina, mediante la formación de un par iónico entre ambos aminoácidos en la forma activa de la enzima, cuya integridad es de enorme importancia para la actividad catalítica de la proteína.

III. 2. 2. Lóbulo C-terminal del dominio catalítico

El lóbulo C-terminal, con los subdominio VI-XI, está constituido por varias hélices α largas junto con algunas láminas β muy cortas. Esta región proteica participa de forma predominante en la catálisis, la regulación de la actividad catalítica de la proteína y la unión al sustrato aceptor.

El sitio activo de la enzima se sitúa en una región proteica dispuesta en forma de giro, denominado bucle catalítico, situado entre las láminas β_6 y β_7 del dominio catalítico. El centro catalítico se caracteriza por la presencia de un triplete de residuos muy conservados, el motivo HRD (residuos 164-166 en PKA), perteneciente al subdominio VIb, entre los que destaca la presencia de un residuo esencial de aspártico (D166), presente en todas las proteína quinasas caracterizadas, incluidas las quinasas atípicas (Kannan y Neuwald, 2005). Este aminoácido, conocido como base catalítica, promueve la transferencia del grupo fosfato desde el ATP hasta el residuo aceptor de serina/treonina o tirosina, interaccionando de forma específica con el aceptor durante la reacción (Adams, 2003). La carencia de este residuo en las quinasas “no D”, al igual que ocurre con las quinasas “no K” sin la lisina del subdominio II, son enzimas inactivas carentes de actividad catalítica (Boudeau *et al.*, 2006).

La conformación del bucle catalítico del sitio activo se mantiene a partir de la formación de un puente de hidrógeno entre el residuo de aspártico catalítico con una asparragina próxima (N171), que orienta de forma adecuada a la base catalítica para llevar a cabo la fosfotransferencia. Un residuo estructural clave en esta región es la histidina de la triada HRD, que conecta el sitio activo con el motivo DFG de unión a Mg^{2+} , al unirse tanto al aspártico como a la fenilalanina de este triplete. Por último, la arginina del motivo HRD es clave para la unión del sitio activo con el segmento de activación, estabilizando la conformación de esta región tras la fosforilación de la misma (Krupa *et al.*, 2004). Su presencia permite diferenciar entre quinasas de tipo RD, cuya actividad se regula mediante fosforilación del segmento de activación, respecto a las no RD que al carecer de este residuo de arginina no se fosforilan sobre esta región.

Muy cerca del centro activo se sitúa un triplete de residuos muy conservados, el motivo DFG (residuos 184-186 en PKA) del subdominio VII. Esta triada origina un giro proteico denominado bucle de unión a Mg^{2+} , flanqueado por las láminas β_8 y β_9 del dominio catalítico. El motivo DFG se localiza muy próximo al segmento de activación de la proteína, de manera que los cambios conformacionales inducidos por la fosforilación del segmento de activación producen una alteración notable en su disposición estructural. En el bucle de unión a magnesio, el residuo de aspártico se encarga de unir dos cationes de Mg^{2+} , en colaboración con la asparragina (N171) del centro catalítico, estableciendo contactos polares con los grupos fosfato β y γ del ATP de forma directa o a través de los cationes de Mg^{2+} coordinados. Por último, en el motivo DFG, el residuo de fenilalanina mantiene contactos hidrofóbicos con la hélice α_C del lóbulo amino y con el sitio activo, por lo que parece ser responsable del correcto posicionamiento de la triada DFG en la proteína.

La región de activación, situada justo a continuación del motivo DFG, entre los subdominios VII y VIII, constituye un segmento proteico implicado en la regulación de la actividad catalítica de la proteína mediante fosforilación. Esta región, compuesta por una secuencia de unos 20-30 aminoácidos, genera un tramo proteico desordenado muy flexible

situado espacialmente justo en frente del centro activo de la enzima. La fosforilación de uno o varios residuos conservados de serina/treonina o tirosina presentes en su secuencia conduce a un cambio conformacional en esta región que estimula la actividad catalítica del sitio activo de la enzima (Nolen *et al.*, 2004).

Además, en el segmento de activación se localiza el sitio de unión al sustrato, de manera que varios residuos próximos al aminoácido aceptor en el sustrato interaccionan con diferentes residuos de la región de activación durante el reconocimiento del sustrato. Se ha visto que la secuencia del segmento de activación difiere de forma marcada entre distintas quinasas para la unión a su sustrato específico, pero se mantienen ciertas similitudes dentro de las quinasas pertenecientes a un mismo grupo. Finalmente, tras esta región, se sitúa otro triplete de aminoácidos igualmente conservado, el motivo APE (residuos 206-208), perteneciente al subdominio VIII, cuyo glutámico (E208) se une mediante un enlace iónico a un residuo igualmente muy conservado de arginina (R280) del subdominio XI para estabilizar la región C-terminal del dominio catalítico.

En la Figura 5, se muestra la estructura tridimensional del dominio catalítico de la PKA.

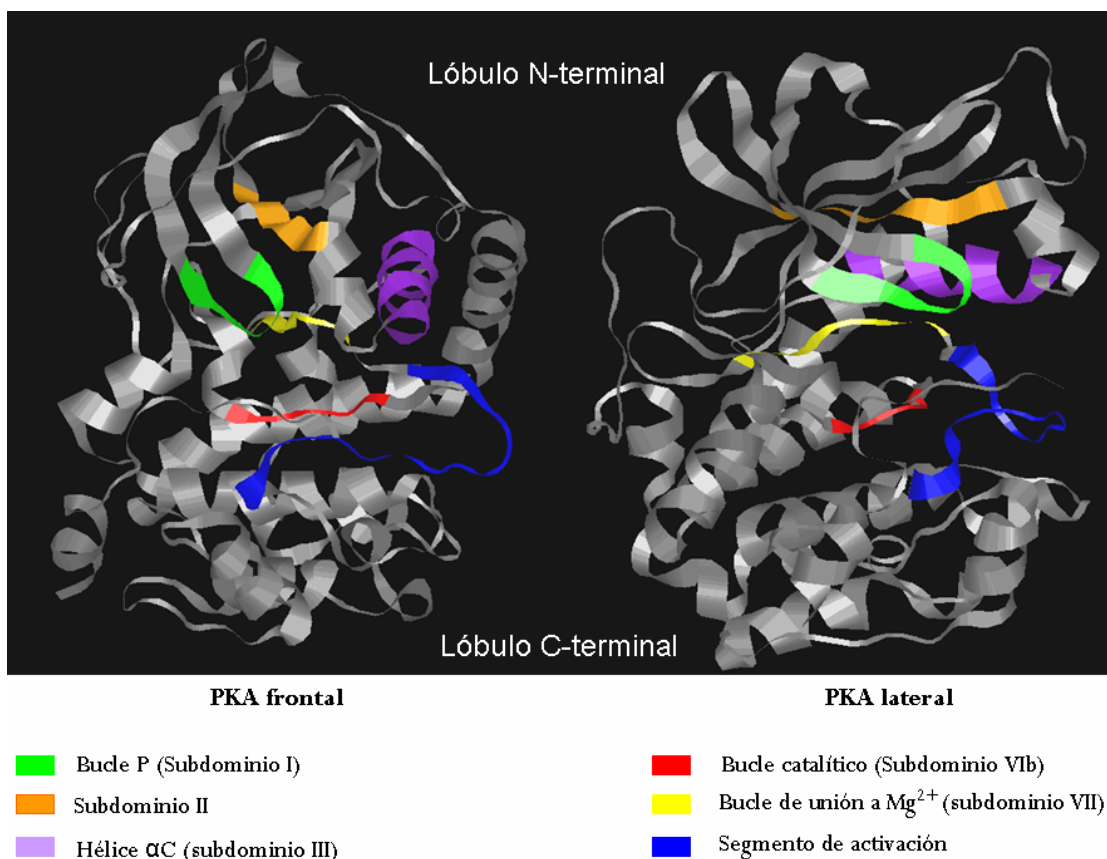


Figura 5. Estructura tridimensional del dominio catalítico de la PKA. Ambas imágenes corresponden a la quinasa girada 90° en sentido horizontal. La cavidad entre ambos lóbulos con el sitio activo de la enzima, delimitada por las regiones implicadas en la catálisis de la reacción indicadas en la figura, corresponden con el sitio de unión al sustrato aceptor y al nucleótido ATP.

III. 3. Actividad catalítica de las ePKs

Las ePKs catalizan la fosforilación de residuos de Ser/Thr o Tyr mediante la transferencia en un sólo paso del grupo fosfato en γ del ATP hasta el residuo aceptor. La catálisis de la reacción depende de la presencia de un residuo de aspártico catalítico en el centro activo de la quinasa (motivo HRD del subdominio VIb). Este residuo facilita la transferencia del grupo fosforilo, al interaccionar mediante un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo portado por el aceptor, que entonces, adquiere la orientación adecuada para acceder al grupo fosfato γ del ATP. La captación de un protón a partir del grupo hidroxilo del aceptor por este aspártico, que actúa como base catalítica, incrementa la capacidad de ataque sobre el grupo fosfato del ATP por parte del residuo de Ser/Thr o Tyr (Skamnaki *et al.*, 1999; Adams, 2001).

Se han identificado tres residuos esenciales para la catálisis en las ePKs, que corresponden con la lisina del subdominio II (AoK, en donde “o” corresponde con un aminoácido apolar), el aspártico catalítico del sitio activo en el subdominio VIb (HRD) y el aspártico del subdominio VII (DFG). La carencia de cualquiera de estos residuos requeridos para la actividad conlleva la pérdida de la capacidad de fosforilación, como sucede en las pseudoquinasas. Este tipo de enzimas son frecuentes dentro del quinoma de diversos organismos, como en humanos, ratón o en levaduras. A pesar de carecer de actividad, las pseudoquinasas mantienen funciones reguladoras importantes, controlando la actividad de otras quinastas activas, o bien, actuando a modo de proteínas de andamiaje para la formación de complejos de señalización durante la transducción de señales (Boudeau *et al.*, 2006).

Las ePKs se diferencian en dos grandes grupos de enzimas, a partir de la especificidad de sustrato desarrollada por la proteína durante la reacción de fosforilación. En eucariotas, el grupo predominante lo conforman las proteínas Ser/Thr quinastas, que fosforilan residuos polares sin carga de serina y/o treonina, mientras que las proteínas Tyr quinastas tan sólo lo hacen sobre residuos aromáticos de tirosina. En general, las Ser/Thr quinastas son mucho más abundantes que las Tyr quinastas, un grupo evolutivamente más avanzado, ausente en eucariotas inferiores como las levaduras (Manning *et al.*, 2002a). Finalmente, existe un grupo minoritario de quinastas con especificidad dual, capaces de actuar tanto sobre residuos de serina/treonina como de tirosina en la proteína sustrato (Taylor *et al.*, 1995).

Ambos tipos de proteínas comparten un dominio catalítico muy similar desde el punto de vista estructural, pero con ciertas diferencias en su secuencia, sobre todo centradas en torno al centro catalítico, que se traduce en diferentes interacciones entre residuos. Así, en las Ser/Thr quinastas, el aminoácido fosforilado en la región de activación establece contactos múltiples con varios residuos cargados positivamente, entre ellos con la arginina del bucle catalítico y con la región α C, a diferencia de lo que ocurre en las Tyr quinastas. Además, en las Ser/Thr quinastas, la lisina terminal del bucle catalítico (HRDoK), ausente en la Tyr quinastas, contacta con un residuo de treonina conservado perteneciente al motivo GTP del subdominio VIII (Krupa *et al.*, 2004).

III. 4. Reconocimiento del sustrato por las ePKs

Las ePKs se unen de forma selectiva sobre su sustrato para promover su fosforilación. En muchas ocasiones, la unión al sustrato actúa como un efector alostérico para la quinasa, colaborando en la estabilización de la conformación activa de la enzima (Bose *et al.*, 2006). La unión de una quinasa sobre el sustrato normalmente depende de dos componentes principales: contacto entre elementos locales del centro activo con el péptido aceptor del sustrato e interacción mediada por elementos distales de la enzima y el sustrato, a través de módulos proteicos alejados respecto a las regiones implicadas en la reacción.

III. 4. 1. Elementos locales

La capacidad de fosforilación de una ePK sobre su sustrato depende de forma esencial del tipo de residuo aceptor presente en el sitio de fosforilación del sustrato, conocido como sitio P, ocupado por una serina o treonina en los sustratos para las Ser/Thr quinastas o bien tirosina, en el caso de las Tyr quinastas. En este proceso, es clave el reconocimiento de los residuos locales que rodean al sitio de fosforilación en el sustrato, que delimitan secuencias diana específicas para cada quinasa (Kobe *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005).

El estudio de la eficiencia de fosforilación de una quinasa sobre un conjunto de variantes peptídicas aleatorias en torno a un residuo de serina/treonina o tirosina permite definir la secuencia consenso óptima para su fosforilación (Johnson y Hunter, 2005). En general, suelen ser secuencias cortas, donde tan sólo entre uno a cuatro residuos situados hacia la región amino y/o carboxilo respecto al sitio aceptor influyen de forma considerable la eficiencia de fosforilación. Esta especificidad se debe al establecimiento de una amplia red de contactos selectivos de estos residuos que flanquean al punto de fosforilación en el sustrato con los residuos que ocupan el sitio de reconocimiento en el dominio catalítico de la quinasa (Johnson *et al.*, 1998; Bose *et al.*, 2006). Cada enzima posee su propia secuencia diana, aunque esta secuencia mantiene ciertas similitudes en las quinastas pertenecientes a un mismo grupo e incluso en ocasiones se observa cierto solapamiento entre diferentes quinastas (Kobe *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005).

III. 4. 2. Elementos distales

El contacto de una quinasa sobre su sustrato en ocasiones se ve facilitada por la presencia de una secuencia de unión alejada del sitio de fosforilación capaz de ser reconocida mediante reclutamiento por un sitio de anclaje distante al centro activo en la quinasa. Esta región esencial puede situarse dentro del propio dominio catalítico o bien en la región reguladora de la proteína (Kobe *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005), de hecho, diferentes segmentos de la quinasa son potencialmente capaces de participar en la unión al sustrato, puesto que la localización de esta región de unión al sustrato difiere en las distintas quinastas. Para que la interacción de la enzima con el sustrato sea adecuada, en cada caso, la posición espacial del sitio de anclaje respecto al centro activo viene determinada por la distancia entre las secuencias reconocidas en el sustrato. La presencia de determinantes de unión adicionales amplía la superficie de contacto entre estas proteínas, incrementando la eficacia de reconocimiento y fosforilación del sustrato, a la vez que contribuye a la especificidad de la quinasa por su sustrato (Holland y Cooper, 1999; Biondi y Nebreda, 2003).

III. 5. Regulación de la actividad catalítica

El plegamiento del dominio catalítico compartido por todas las quinasas de tipo eucariota se caracteriza por presentar un cambio reversible entre dos conformaciones extremas, denominadas estado activo de alta actividad y estado inactivo de baja actividad. La conversión entre estas formas proteicas durante el proceso de activación de la quinasa se asocia con cambios estructurales en la proteína, que pasa desde una conformación abierta a una cerrada por aproximación entre los lóbulos proteicos del dominio catalítico, adquiriendo una disposición adecuada para la unión al sustrato y la catálisis. Este proceso implica una reorganización estructural que afecta a varias regiones tanto del lóbulo N-terminal como del lóbulo C-terminal. (Johnson *et al.*, 1996; Huse y Kuriyan, 2002).

La transición entre estos dos estados funcionales tiene lugar mediante distintos mecanismos, como fosforilación, unión a segundos mensajeros o interacción con otro motivo proteico de la propia quinasa o de alguna otra proteína reguladora. En ocasiones, una misma quinasa se encuentra sujeta a varios mecanismos reguladores diferentes.

III. 5. 1. Fosforilación

i) Fosforilación de la región de activación

El mecanismo más común empleado por las ePKs para la regulación de la actividad catalítica de estas enzimas es la fosforilación del segmento de activación del dominio catalítico (Nolen *et al.*, 2004). De hecho, casi todas las quinasas RD, aquellas que poseen un residuo de arginina justo al lado del aspártico catalítico en el centro activo, se activan mediante fosforilación de esta región. Puesto que en bacterias la mayoría de ePKs son de tipo RD, este sistema de regulación también es el más frecuente entre los miembros de esta familia en procariotas (Krupa y Srinivasan, 2005).

En la región de activación, formada por una secuencia de 20-30 aminoácidos, aparecen varios residuos conservados de serina o treonina en las Ser/Thr quinasas o bien de Tyr en el caso de las Tyr quinasas. El segmento de activación altera de forma considerable su conformación en respuesta a la fosforilación de estos residuos conservados, durante la transición hacia la conformación activa (Huse y Kuriyan, 2002). En la forma inactiva sin fosforilar, esta región cubre el centro activo bloqueando la unión del sustrato, pero la fosforilación del segmento de activación permite a esta región adquirir una disposición extendida y abierta que facilita el acceso al sustrato a la vez que potencia la actividad catalítica del centro activo (Iyer *et al.*, 2005).

Las principales regiones proteicas que modifican su disposición estructural en respuesta a la fosforilación de la región de activación son, además del propio segmento de activación, la hélice α C en el lóbulo N-terminal junto con el bucle catalítico y el motivo DFG en el lóbulo C-terminal de la enzima (Kornev *et al.*, 2006). Durante el proceso de activación, el residuo fosforilado establece interacciones electrostáticas esenciales con varios residuos conservados de carácter básico, conocidos como residuos de contacto. Entre estos residuos aparece la arginina R165 del bucle catalítico en el subdominio VIb, así como la lisina K189 que precede al motivo DFG del subdominio VII y un par de residuos básicos situados en el extremo de la hélice α C (Krupa *et al.*, 2004).

La reorganización estructural más profunda tiene lugar en el motivo DFG, que adquiere una disposición a modo de giro proteico estabilizada por un puente de hidrógeno entre los residuos de aspártico y glicina del triplete, posicionando así este motivo hacia el sitio activo. Este triplete se une al bucle catalítico para dirigir al aspártico catalítico hacia el sustrato aceptor, y a la región α C para desplazar a esta hélice hacia el centro activo, lo que favorece la correcta formación del par iónico entre la lisina esencial del subdominio II y el glutámico del subdominio III, en el lóbulo N-terminal (Huse y Kuriyan, 2002; Kornev *et al.*, 2006).

Las ePKs de bacterias se autofosforilan de forma mayoritaria para potenciar su actividad catalítica. Se ha comprobado que todas las quinasas de tipo RD caracterizadas en bacterias se fosforilan sobre la región de activación. En varias proteínas de *M. tuberculosis*, entre ellas la PknB, se ha identificado en este segmento un par de residuos de treonina fosforilados, ambos necesarios para que la proteína adquiriera la máxima actividad (Boitel *et al.*, 2003; Duran *et al.*, 2005), mientras que en la PrkC de *Bacillus subtilis* aparecen un total de cuatro residuos aceptores de treonina (Madec *et al.*, 2003).

ii) Fosforilación en regiones diferentes al segmento de activación

En muchas quinasas, la fosforilación sobre una región reguladora diferente al segmento de activación ejerce un control sobre la actividad catalítica de la enzima. A diferencia del caso anterior en donde la actividad se ve siempre estimulada, este tipo de fosforilación puede tener distinto efecto en función de la posición del sitio aceptor. En ocasiones, la fosforilación del segmento regulador estimula la actividad catalítica, como ocurre tras la fosforilación sobre residuos de serina y treonina en el extremo N-terminal de la quinasa TGF β de tipo 1 en eucariotas (Shi y Massagué, 2003; Ten Dijke y Hill, 2004). Otras veces, se inhibe, como sucede tras la fosforilación de una tirosina C-terminal en la quinasa Src, también en eucariotas (Pellicena y Miller, 2002).

Entre las ePKs de bacterias, en la PrkC de *B. subtilis* se ha detectado la fosforilación de un residuo de serina situado en el dominio catalítico lejos del centro activo cuya fosforilación es esencial para activar a la quinasa (Madec *et al.*, 2003). Otras muchas quinasas de bacterias se fosforilan sobre la región reguladora intracelular próxima a la membrana posiblemente para reclutar a otras proteínas de señalización, pero en este caso, este proceso no afecta a la actividad de la quinasa (Duran *et al.*, 2005).

III. 5. 2. Regulación por segundos mensajeros

La unión de segundos mensajeros que actúan como ligando sobre el sitio alostérico estimula la actividad catalítica en ciertas proteínas quinasas dependientes de este tipo de compuestos. Entre los segundos mensajeros identificados, aparecen con frecuencia nucleótidos cíclicos como AMPc o GMPc, así como iones Ca^{2+} o derivados lipídicos como el diacilglicerol (DAG), entre otros. Se han descrito múltiples quinasas en eucariotas reguladas por segundos mensajeros, como la quinasa PKA dependiente de AMPc, la quinasa PKG por GMPc, la quinasa PKC por Ca^{2+} y DAG o la quinasa CaMK dependiente de Ca^{2+} calmodulina, pero hasta ahora no se han identificado en bacterias (Schenk y Snaar-Jagalska, 1999).

III. 5. 3. Regulación por proteínas reguladoras

La unión de proteínas reguladoras sobre el dominio catalítico de la quinasa ejerce un efecto modulador de la actividad catalítica de la enzima en respuesta a esta interacción proteica. La asociación de la proteína reguladora altera la conformación de la quinasa, potenciando o bloqueando la actividad catalítica de la quinasa y/o la capacidad de unión al sustrato, según se trate de una proteína activadora o inhibidora (Shi *et al.*, 2006). En eucariotas, la presencia de proteínas moduladoras de la actividad es muy común, como sucede en la PKA, inactivada por la unión a subunidades inhibidoras en ausencia de AMPc (Kim *et al.*, 2005) o en las quinasas CDK, que se activan tras reconocer a ciclinas durante el ciclo celular (Malumbres y Barbacid, 2005). En bacterias, se han identificado algunas proteínas reguladoras, como la proteína KapB en *M. xanthus* o KbpA en *S. coelicolor*, que se unen a las quinasas Pkn4 (Nariya e Inouye, 2005a) y AfsK (Umeyama y Horinouchi, 2001), respectivamente, para inhibir su actividad.

III. 6. Transducción de señales por ePKs

III. 6. 1. Activación de quinasas receptoras

Las células son capaces de percibir el ambiente que le rodea mediante receptores de membrana de diversa naturaleza, poseedores de una sensibilidad selectiva frente a diferentes estímulos provenientes del entorno. Al interactuar con un estímulo adecuado, estos sensores sufren un cambio conformacional que transmite la señal hasta el interior celular, en donde activan una cascada de señalización. Entre los componentes de señalización que suelen actuar como receptores de membrana destacan las ePKs (Hendrickson, 2006).

Estas proteínas presentan una región sensora extracelular de unión a un ligando específico que, al contactar con el receptor, estimula la actividad del dominio catalítico situado hacia el citoplasma. Ambas regiones se encuentran separadas por un segmento apolar inserto en la membrana, que mantiene a la proteína integrada en este compartimento. Estos sensores de membrana pueden presentar un dominio catalítico con actividad Ser/Thr quinasa, como ocurre en los receptores de tipo TGF β de eucariotas (Ten Dijke y Hill, 2004) o bien con actividad Tyr quinasa, tal como sucede en los receptores para factores de crecimiento en eucariotas (Ward *et al.*, 2007). En ocasiones, el receptor de membrana carece de actividad, pero se encuentra acoplado con quinasas citoplasmáticas, como ocurre en los receptores asociados a las Jak quinasas de eucariotas (Haan *et al.*, 2006).

Las quinasas receptoras de membrana se activan por la unión del ligando a la región sensora, lo que desencadena un cambio conformacional en la proteína que es transmitido a través de la membrana hasta alcanzar al dominio catalítico. La alteración en la disposición estructural del receptor estimula la actividad del dominio catalítico de la quinasa, que entonces se autofosforila sobre la región citoplasmática de la proteína. El sitio principal para la autofosforilación del receptor es el segmento de activación del dominio catalítico, que al actuar como receptor incrementa la actividad catalítica de la enzima, facilitando la fosforilación del sustrato por la quinasa activada. En muchas ocasiones, se fosforilan también otros motivos de la proteína, generando sitios de unión al sustrato o bien para proteínas reguladoras portadores de motivos de reconocimiento de fosfoaminoácidos (Hendrickson, 2006).

En el proceso de activación de estas proteínas receptoras se suele producir una dimerización de la quinasa mediante la interacción entre los dominios sensores de ambos monómeros, estimulada por la unión del ligando sobre uno o los dos monómeros. En ocasiones, el mismo ligando contacta de forma simultánea con los dos monómeros, sirviendo de enlace entre ambos. De igual forma, el ligando también se puede unir a un receptor ya en forma dimérica, como ocurre en el receptor de insulina de eucariotas, dando lugar a un cambio conformacional intramolecular en la proteína (Ferguson, 2004; Li y Hristova, 2006; Ward *et al.*, 2007). La dimerización mediada por la asociación entre las regiones sensoras, en respuesta a la unión del ligando, conduce a una aproximación entre las regiones citoplasmáticas de ambos monómeros, estableciendo contactos que estabilizan esta interacción. Esta asociación permite que los dominios catalíticos de ambos monómeros se fosforilen de forma cruzada, estimulando la actividad de la quinasa (Hendrickson, 2006).

III. 6. 2. Rutas de señalización integradas por ePKs

Las quinasas sensoras de membrana, estimuladas mediante autofosforilación, producen la activación de rutas de transducción de señales integradas por diversas proteínas de señalización celular organizadas en forma de cascadas de proteínas que interactúan entre sí. Estos receptores, en ocasiones, inician una ruta de señalización que permanece a nivel de la propia membrana, pero con frecuencia la activación de la quinasa suele estimular vías de señalización citoplasmáticas. Se han descrito distintos mecanismos para la activación de las distintas rutas de transducción de señales a partir de quinasas sensoras de membrana (Schenk y Snaar-Jagalska, 1999; Lewin, 2003):

i) La quinasa se une a una proteína que actúa como sustrato, por lo que es fosforilada por el receptor activado sobre una secuencia diana específica, modificando su actividad. La naturaleza del sustrato es muy variable según la quinasa, incluyendo desde proteínas estructurales a proteínas enzimáticas así como reguladores transcripcionales, entre otros. En muchas ocasiones, el sustrato es otra quinasa cuya actividad se encuentra regulada por fosforilación dando lugar a una cascada de quinasas activadas de forma jerárquica mediante fosforilación.

ii) La quinasa se enlaza con una proteína cuya actividad se encuentra regulada mediante la interacción con el receptor activado. Este proceso sólo depende del contacto entre ambas proteínas, puesto que la proteína diana no es fosforilada por la quinasa sino tan sólo estimulada gracias a su anclaje sobre el receptor activado. Sin embargo, la interacción entre ambas proteínas depende de la fosforilación previa de la quinasa receptora.

iii) La quinasa se asocia a proteínas adaptadoras o acopladoras que facilitan el anclaje de otras proteínas sobre el receptor activado, para conectarlo con distintas proteínas de señalización incapaces de interactuar por sí mismas. El ensamblaje de estos complejos a través de proteínas intermediarias permite ampliar el rango de proteínas accesibles a cada quinasa. Las proteínas asociadas al receptor a través de adaptadores suelen constituir sustratos fosforilados por la quinasa tras su unión al complejo, aunque en algunas ocasiones, la interacción proteica es suficiente para estimular la actividad de la proteína sin necesidad de fosforilación.

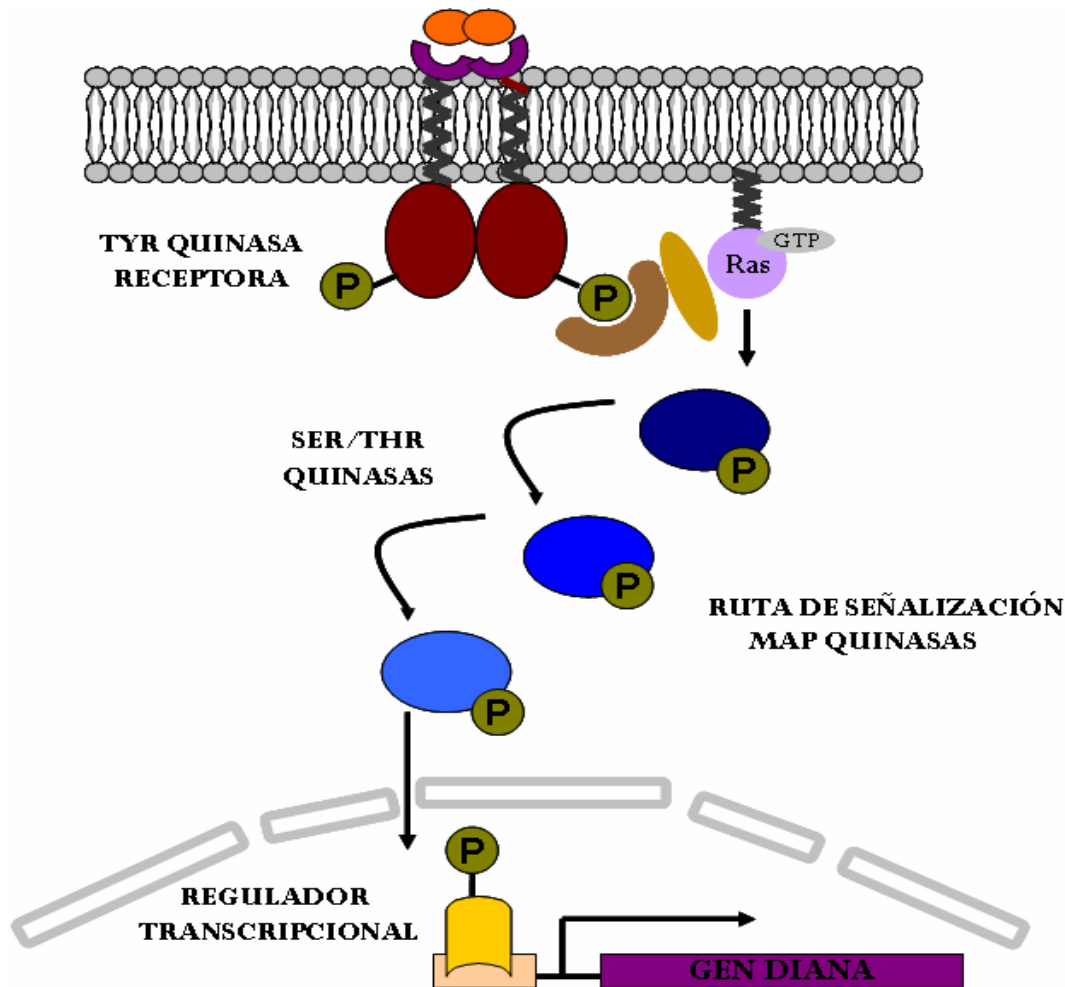


Figura 6. Ruta de señalización de las MAP quinasas. Esta ruta puede ser activada por proteínas G receptoras o bien como se muestra en la figura por Tyr quinasas sensoras, que se activan en respuesta a la presencia de factores de crecimiento extracelulares. La estimulación de esta cascada de Ser/Thr quinasas a partir del receptor depende de la participación de proteínas adaptadoras acopladas a Ras GTPasas.

Como se muestra en la Figura 6, las rutas de señalización integradas por ePKs como las MAP quinasas de eucariotas suelen constar de varias Ser/Thr quinasas que interactúan entre sí dentro de la cascada, de forma que cada componente activa al siguiente durante la señalización mediante un proceso de fosforilación (Schwartz y Madhani, 2004). A medida que se sucede esta cascada, la señal se amplifica de forma progresiva conforme es transmitida entre los diferentes componentes integrados dentro de la ruta. Finalmente, la última quinasa actúa sobre una proteína efectora, en muchos casos un regulador transcripcional, cuya actividad se encuentra controlada mediante fosforilación (Edmunds y Mahadevan, 2004). La intensidad de activación de una ruta concreta influye a su vez el tipo de respuesta desencadenada, de forma que la intensidad y duración del estímulo es clave de cara a generar una respuesta diferencial en la célula. Así, la activación transitoria de la ruta de las MAP quinasas induce la proliferación celular, mientras que si se prolonga su estimulación se desencadena la diferenciación celular (Marshall, 1995)

Las rutas de señalización integradas por ePKs en muchas ocasiones no tienen lugar de forma lineal sino que, con frecuencia, se produce un proceso de divergencia, en donde una quinasa actúa sobre varios componentes pertenecientes a diferentes vías de señalización. Esta ramificación permite generar una respuesta múltiple ante un mismo estímulo a través de distintas rutas reguladoras estimuladas por una misma quinasa, como ocurre en los receptores EGF (Jorissen *et al.*, 2003). También es frecuente la existencia de fenómenos de convergencia, en donde una misma ruta integrada de ePKs puede ser activada en respuesta a diferentes señales, capaces de estimular a proteínas receptoras distintas. Como consecuencia, se inducen varias vías de señalización que finalmente confluyen en una misma ruta reguladora, capaz de producir una respuesta similar frente a diferentes estímulos, como ocurre en la MAP quinasa (Cashin *et al.*, 2006).

No se conoce demasiado el funcionamiento de las rutas de señalización de ePKs de bacterias. De forma reciente, se ha caracterizado la primera cascada de ePKs en procariotas formada por una pareja de Ser/Thr quinasa, la Pkn8 y la Pkn14 de *M. xanthus* (Nariya y Inouye, 2005b). En esta ruta de señalización en respuesta a un estímulo adecuado, el receptor de membrana Pkn8 activado por autofosforilación cataliza la fosforilación de la Pkn14 citoplasmática. Esta quinasa a su vez inhibe mediante fosforilación al regulador MrpC, un factor transcripcional esencial para la expresión del gen *fruA* durante el desarrollo en *M. xanthus* (ver A.III.8.5).

También se han descrito en bacterias varias rutas de señalización integradas por ePKs que actúan de forma directa sobre un efector cuya actividad se encuentra regulada por fosforilación. Un caso paradigmático es la regulación de la virulencia en *M. tuberculosis* por la ruta constituida por la Ser/Thr quinasa PknH y el regulador transcripcional EmbR. Ante una señal apropiada, la PknH situada en la membrana se activa mediante autofosforilación, facilitando la unión de EmbR mediante un motivo FHA (*forkhead-associated domain*) de unión a fosfotreonina en el receptor. Una vez formado este complejo, la PknH activa a EmbR mediante fosforilación para inducir la expresión de enzimas de tipo arabinosil transferasas a partir del operón *embCAB*, necesarias para la biosíntesis de componentes de la pared celular importantes para la patógenesis en esta bacteria (Molle *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2006a; Sharma *et al.*, 2006b).

III. 6. 3. Efectores modulados por ePKs

Las proteínas reguladas por ePKs son muy variadas, predominando entre ellas la presencia de proteínas que se unen al ADN y funcionan como factores transcripcionales, cuya actividad depende de su estado de fosforilación. Junto a estos reguladores génicos, también es frecuente la presencia como sustratos de proteínas enzimáticas, transportadores e incluso, proteínas estructurales. Todos ellos son fosforilados bien directamente por una quinasa receptora o a través de una cascada de quinasa, activada en respuesta a un estímulo apropiado.

La incorporación de un grupo fosforilo sobre un sustrato altera de forma considerable el plegamiento proteico, y por tanto, es el responsable del cambio en la actividad funcional de la proteína, mediada por una transición conformacional desde la forma inactiva a la activa (o al contrario) en respuesta a la fosforilación (Johnson y Barford, 1993; Kennelly, 2002). Esta modificación es reversible, de forma que el grupo fosforilo incorporado sobre un sustrato por una quinasa puede ser eliminado por una proteína

fosfatasa. Por tanto, el nivel de fosforilación del efector depende en todo momento del equilibrio que se establece entre ambos tipos de enzimas. Esta versatilidad permite un mecanismo de regulación de la actividad de tipo on/off en respuesta a la fosforilación/desfosforilación de la proteína (Bray, 1995).

La capacidad de muchas quinasas y fosfatasa de actuar sobre diferentes proteínas determina la creación de redes de señalización, en donde los efectores regulados mediante fosforilación/desfosforilación actúan a modo de nodos de integración conectados entre sí, capaces de integrar múltiples señales para coordinar de forma conjunta un amplio espectro de procesos celulares y conseguir así una adaptación adecuada frente a los estímulos recibidos. En este sentido, en algunas ocasiones, el efector se encuentra regulado mediante multifosforilación, lo que permite el control por quinasas pertenecientes a diferentes rutas de transducción de señales, que a su vez pueden tener un efecto sinérgico o antagónico, según los casos (Cohen, 2000).

III. 6. 4. Interacciones proteicas en las rutas integradas por ePKs

Las ePKs contienen con frecuencia diversos motivos de interacción proteína-proteína, que dirigen el contacto de la quinasa con otras proteínas de señalización. Durante la transducción de señales, estos dominios conectan a la quinasa con los componentes situados por encima y por debajo de ella dentro de una misma cascada de fosforilación. De igual forma, favorecen la asociación de la quinasa con proteínas reguladoras de la actividad, que modulan la transmisión de la señal a lo largo de la ruta. Finalmente, los motivos de interacción proteína-proteína cooperan en la formación de complejos de señalización formados por varias proteínas asociadas que incluyen igualmente ePKs (Mayer, 2006).

Los motivos de interacción más destacados son aquellos que median la unión sobre secuencias diana portadoras de residuos susceptibles de fosforilación, como serina, treonina o tirosina. En este caso, el contacto entre ambas proteínas se establece sólo si la secuencia aceptora se encuentra fosforilada por acción de una Ser/Thr o Tyr quinasa y se interrumpe tras su desfosforilación. El control del nivel de fosforilación de la secuencia diana permite reajustar en cada momento el contacto entre ambas proteínas en respuesta a las señales presentes en ese instante. Este mecanismo dependiente de fosforilación ha sido explotado ampliamente por las ePKs. De hecho, en muchas ocasiones la activación de una quinasa por autofosforilación genera sitios de unión reconocidos por proteínas que portan dominios de unión a fosfoaminoácidos. Al anclarse sobre estas regiones se activan favoreciendo la transmisión de la señal a través de una cascada de señalización (Hunter, 2000).

Los dominios de unión a fosfoaminoácidos presentan una elevada especificidad, puesto que cada motivo reconoce a un tipo de secuencia de unión particular, en función de la naturaleza de los aminoácidos que acompañan al residuo fosforilado. Las proteínas que integran las rutas de quinasas, en muchas ocasiones, portan varios dominios de unión a secuencias fosforiladas con la finalidad de incrementar la afinidad de unión a una fosfoproteína o para facilitar la unión a diferentes fosfoproteínas, portadoras de una secuencia aceptora similar. A la vez, un mismo receptor puede contener distintos sitios de unión fosforilados, lo que le permite contactar con distintas proteínas, y en muchos casos genera diferentes puntos de unión útiles para el anclaje de una misma proteína (Bhattacharyya *et al.*, 2006).

Se han identificado diferentes motivos de unión a residuos fosforilados en serina/treonina y tirosina típicos de eucariotas (Yaffe y Elia, 2001; Yaffe, 2002). En bacterias, un dominio muy frecuente es el FHA, que reconoce residuos de fosfotreonina para la interacción con Ser/Thr quinasas fosforiladas (Pallen *et al.*, 2002; Hammet *et al.*, 2003; Krupa y Srinivasan, 2005). En las rutas de señalización de tipo eucariota de bacterias, la unión del sustrato sobre la quinasa activada en ocasiones depende de la interacción mediada por un dominio FHA, como ocurre en diferentes quinasas de *M. tuberculosis* (Molle *et al.*, 2003; Molle *et al.*, 2004; Villarino *et al.*, 2005).

III. 7. Funciones de las ePKs en bacterias

III. 7. 1. Metabolismo

Las ePKs participan en la regulación del metabolismo primario y secundario en bacterias. Así, en *M. xanthus*, la Pkn4 controla la biosíntesis y degradación del polisacárido de reserva glucógeno mediante la regulación por fosforilación de la actividad de la enzima glucolítica fosfofructoquinasa (PFK) (ver A.III.8.3).

La cianobacteria *Nostoc sp.* PCC 7120 activa el proceso de fijación de nitrógeno ante la carencia de una fuente de nitrógeno combinado como amonio o nitrato. En esta bacteria, existe una estricta regulación del metabolismo del nitrógeno que implica la participación de varias ePKs, entre las que se encuentran las proteínas PknE, PknD y HstK. La actividad de todas ellas estimula la capacidad de fijación de nitrógeno por la bacteria para crecer en ausencia de una fuente combinada de nitrógeno (Zhang *et al.*, 1998; Zhang y Libs, 1998; Phalip *et al.*, 2001).

En el actinomiceto *Streptomyces coelicolor*, la síntesis de antibióticos propios del metabolismo secundario como actinorodina y undecilprodigiosina depende de la Ser/Thr quinasa AsfK. Esta proteína fosforila al regulador AsfR, necesario para la expresión de otro factor transcripcional, AsfS, responsable de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de estos antibióticos (Lee *et al.*, 2002; Umeyama *et al.*, 2002; Horinouchi, 2003; Tomono *et al.*, 2006).

III. 7. 2. Movilidad

Las ePKs participan en el control de la movilidad por deslizamiento, dependiente de la presencia de pili de tipo IV tanto en mixobacterias como en cianobacterias. En *M. xanthus*, la quinasa MasK interacciona con el regulador MglA para controlar la movilidad social en este microorganismo (ver A.III.8.7).

En la cianobacteria unicelular *Synechocystis sp.* PCC 6803 se han identificado tres ePKs, SpkA, SpkB y Srl1443, esenciales para la movilidad por deslizamiento en respuesta a la presencia de luz. SpkA regula la expresión de varios genes *pil*, necesarios para la biosíntesis de los pili de tipo IV (Panichkin *et al.*, 2006), mientras que la quinasa Srl1443 es necesaria para la modificación postraduccional de la pilina durante su ensamblaje (Kim *et al.*, 2004). En cambio, SpkB no ejerce su regulación a nivel de los pili, ya que el mutante para esta quinasa conserva estos apéndices, a diferencia de los anteriores (Kamei *et al.*, 2002).

III. 7. 3. Diferenciación

En *M. xanthus*, el agotamiento de nutrientes en el medio induce la progresión de la bacteria hacia el ciclo de desarrollo. En el control del desarrollo multicelular en esta mixobacteria participan varias ePKs dentro de rutas de señalización que regulan los distintos eventos que conforman este proceso (ver A.III.8). De hecho, la acción de inhibidores específicos frente a este tipo de proteínas bloquea completamente el ciclo de desarrollo en condiciones de privación de nutrientes, pero no afecta al crecimiento vegetativo de esta bacteria (Jain e Inouye, 1998).

Los actinomicetes presentan un complejo proceso de diferenciación morfológica, con la formación de una red de filamentos ramificados conocido como micelio, de donde surgen filamentos aéreos productores de esporas. En el control de este proceso intervienen ePKs, puesto que la presencia de inhibidores para estas enzimas bloquean la esporulación y el metabolismo secundario en estas bacterias (Neu y Wright, 2001). En este sentido, en *Streptomyces griseus*, se ha comprobado que la quinasa AsfK es esencial para la formación del micelio aéreo así como para la esporulación en presencia de glucosa (Umeyama *et al.*, 1999). Junto a la anterior, se ha descrito otra quinasa, Pkg2 de *Streptomyces granaticolor*, que controla la morfología de las hifas aéreas, puesto que su carencia conduce a una considerable degeneración miceliar (Nadvornik *et al.*, 1998).

La diferenciación de heteroquistes, células fijadoras de nitrógenos poseedoras de una cubierta protectora capaz de impedir la difusión de oxígeno en la cianobacteria filamentosa *Nostoc sp.* PCC 7120, se induce frente a la ausencia de un aporte combinado de nitrógeno (Wolk, 1996). En la regulación de este proceso de diferenciación celular participan varias ePKs. Así, la PknA es necesaria para la formación de los heteroquistes, puesto que su carencia reduce de forma considerable la proporción de células diferenciadas (Zhang, 1993), mientras que HepS es esencial para la maduración de los heteroquistes (Lechno-Yossef, 2006). Esta quinasa favorece el depósito de los polisacáridos en la cubierta al activar la expresión de genes *hgl* y *pol* necesarios para la síntesis y exporte de estos polisacáridos así como de los genes *nif*, implicados en la fijación de nitrógeno (Lechno-Yossef, 2006).

La formación de endosporas en *Bacillus subtilis* frente a condiciones adversas requiere de un complejo sistema de intercambio de señales entre la célula madre y la pre-espora. Durante este proceso de diferenciación, tras la fase II de esporulación, ejerce su acción la quinasa PrkC, que participa en el control del proceso de esporulación. La carencia de esta proteína reduce de forma considerable la eficiencia de diferenciación, disminuye la supervivencia durante la fase estacionaria y reduce la capacidad de formación de biopelículas en esta bacteria (Gaidenko *et al.*, 2002; Madec *et al.*, 2002).

La generación de biopelículas en *Streptococcus mutans*, un agente patógeno causante de caries, es esencial para la colonización de la cavidad oral. La proteína quinasa PknB estimula la capacidad de formación de biopelículas, puesto que su carencia ocasiona defectos considerables en la densidad y disposición de las comunidades microbianas generadas por esta bacteria sobre una superficie. Además, esta proteína interviene en la tolerancia a medios ácidos y en adquisición de competencia genética, todos ellos determinantes importantes para la adaptación a la cavidad oral (Hussain *et al.*, 2006).

III. 7. 4. Adaptación a condiciones de estrés

Se han identificado diferentes ePKs implicadas en la defensa frente a agentes de estrés celular, como el estrés oxidativo. Así, en el actinomiceto *Streptomyces toyocaensis*, la quinasa StoPK-1 es esencial para la respuesta frente al estrés oxidativo, ya que su carencia incrementa la sensibilidad de esta bacteria frente a agentes productores de especies reactivas del oxígeno, sufriendo alteraciones en la morfología miceliar (Neu *et al.*, 2002).

En el caso de la cianobacteria *Nostoc sp.* PCC 7120, la quinasa Pkn22 es necesaria para la respuesta frente a la carencia de hierro (Xu *et al.*, 2003). La ausencia de hierro genera estrés oxidativo en este organismo fotosintético, debido a la saturación de la capacidad de transferencia electrónica entre los componentes fotosintéticos (Latifi *et al.*, 2005). En estas condiciones, se induce de forma considerable la expresión de esta quinasa (Xu *et al.*, 2003), que entonces activa la expresión de *isiA*, cuyo producto, CP43', se asocia con la disipación del exceso de energía lumínica para reducir la producción de derivados reactivos del oxígeno (Cadoret *et al.*, 2004).

III. 7. 5. Patogénesis

En varios microorganismos patógenos se han identificado ePKs esenciales para la virulencia bacteriana, cuya carencia conduce a la pérdida total de la capacidad patógena de la bacteria sobre el hospedador. Estas quinastas colaboran con la patogénesis bacteriana como determinantes de virulencia en ciertas etapas de la infección microbiana, facilitando la colonización, supervivencia y/o citotoxicidad de la bacteria.

La bacteria *M. tuberculosis* induce en el hospedador una respuesta inmune que atrae a macrófagos activados capaces de fagocitar a este patógeno. Sin embargo, en su interior la bacteria sobrevive gracias a que dispone de un sistema de señalización de tipo eucariota capaz de modular el tráfico intracelular de la célula hospedadora. Para ello, las micobacterias secretan la quinasa PknG, que bloquea la unión de los lisosomas celulares con el endosoma que contiene al microorganismo, evitando su degradación por acción de las enzimas hidrolíticas celulares (Walburger *et al.*, 2004). Otra quinasa de *M. tuberculosis*, la PknH, incrementa la virulencia de este patógeno al favorecer la expresión de enzimas para la biosíntesis de lipoarabinomano, un componente inmunomodulador de la pared que permite a la bacteria escapar a la respuesta inmune del hospedador (Molle *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2006a; Sharma *et al.*, 2006b).

Las especies patógenas de *Yersinia* se adhieren a la superficie de células hospedadoras eucariotas sobre la que inyectan un conjunto de proteínas de virulencia, conocidas como Yops, empleando para ello un sistema de secreción de tipo III (Cornelis, 2002). Entre ellas se encuentra una ePK, la proteína YpkA (Galyov *et al.*, 1993), que actúa destruyendo el citoesqueleto de actina de la célula diana (Juris *et al.*, 2000; Nejedlik *et al.*, 2004; Wiley *et al.*, 2006). Para ello, la quinasa activada unida a actina estimula la fosforilación de proteínas reguladoras del citoesqueleto (Juris *et al.*, 2000). Además, YpkA se une a GTPasas pequeñas como RhoA y Rac, bloqueando la activación de estas proteínas esenciales para el ensamblaje del citoesqueleto (Dukuzumuremyi *et al.*, 2000). La desaparición de la red de microfilamentos de actina produce una retracción celular, a la vez que bloquea la movilidad y la fagocitosis en macrófagos, neutralizando la respuesta frente a la bacteria (Hakansson *et al.*, 1996).

En *Streptococcus agalactiae*, un estreptococo del grupo B, la quinasa Stk1 es esencial para la patogenicidad (Rajagopal *et al.*, 2003), puesto que su carencia atenúa la virulencia de esta bacteria, reduciendo su supervivencia en sangre e incrementando la sensibilidad frente al ataque de fagocitos (Rajagopal *et al.*, 2006). Stk1 regula la expresión de dos citotoxinas a través de la interacción con el sistema de dos componentes CovR/CovS, ejerciendo un efecto represor sobre el factor CAMP a la vez que induce la expresión de la β -hemolisina/citolisina (Rajagopal *et al.*, 2006). Esta citotoxina es necesaria para la progresión de la infección, ya que estimula la invasión celular, facilita la evasión frente a fagocitos e induce la respuesta inflamatoria en el hospedador (Nizet, 2002).

En *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista, se ha identificado una quinasa denominada PpkA, necesaria para la virulencia de este microorganismo (Wang *et al.*, 1998). Durante la infección en un hospedador adecuado, la expresión de la quinasa se induce de forma específica, actuando como un determinante esencial para la colonización del hospedador por la bacteria (Wang *et al.*, 1996). PpkA regula el ensamblaje y la secreción de proteínas por el sistema de secreción de tipo IV, al actuar sobre la proteína Fha1, un componente de andamiaje clave para la formación de este complejo. La liberación de proteínas mediante este sistema de secreción de tipo IV es esencial para la patogénesis bacteriana durante la infección (Mougous *et al.*, 2007).

III. 8. ePKs caracterizadas en *M. xanthus*

A partir del descubrimiento de ePKs en la bacteria *M. xanthus* (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991), se ha tratado de identificar el conjunto de quinasas presentes en esta mixobacteria. Se ha comprobado que *M. xanthus* posee una amplia familia de ePKs formada por al menos 18 proteínas: Pkn1 - Pkn14 (Inouye *et al.*, 2000), MasK (Thomasson *et al.*, 2002), PknD1-PknD2 (Stein *et al.*, 2006) y KinS.

III. 8. 1. Pkn1

La Pkn1 es la primera ePK descrita en una bacteria (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991). La identificación de esta quinasa de *M. xanthus* representa un hito dentro de la señalización celular, al demostrar la presencia de proteínas quinasas hasta entonces características de organismos eucariotas en procariotas. La Pkn1 consta de 693 residuos, con un dominio catalítico N-terminal, capaz de mediar su autofosforilación sobre residuos de serina y treonina, seguido por un dominio regulador C-terminal sin similitud con otras proteínas. En *M. xanthus*, la Pkn1 se expresa únicamente durante el ciclo de desarrollo, incrementando su expresión de forma marcada justo antes del comienzo del proceso de esporulación, hasta alcanzar un máximo de expresión a las 50 h del desarrollo, coincidiendo con la diferenciación de las mixósporas.

La delección del gen *pkn1* en *M. xanthus* produce un desarrollo prematuro de la stirpe mutante, con un adelanto de 4-8 h en el proceso de fructificación y esporulación, dando lugar a cuerpos fructificantes más pequeños y menos compactos que los de la bacteria silvestre. Esta diferenciación prematura conduce a un descenso en la producción de esporas, generando tan sólo un 35% de las mixósporas producidas por la bacteria silvestre. Estos resultados indican que la Pkn1 es necesaria para que *M. xanthus* complete su ciclo de desarrollo con normalidad, ejerciendo un papel clave para conseguir una adecuada diferenciación celular durante el desarrollo (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991).

III. 8. 2. Pkn2

La Pkn2 es una Ser/Thr quinasa que consta de 830 aminoácidos, con un dominio catalítico N-terminal capaz de autofosforilarse en residuos de serina y treonina, separado por un segmento transmembrana de un dominio sensor C-terminal expuesto hacia el periplasma (Udo *et al.*, 1996). Se trata de la primera ePK localizada en la membrana descrita en bacterias, con una disposición similar a las quinasas receptoras de eucariotas (Udo *et al.*, 1995).

La expresión de la Pkn2 en *E. coli* ha permitido identificar dos sustratos para esta quinasa, la β -lactamasa y la proteína HU. La β -lactamasa es una enzima asociada al peptidoglicano de la pared, cuya fosforilación sobre residuos de treonina por la Pkn2 bloquea su secreción a través de la membrana plasmática (Udo *et al.*, 1995). La proteína HU es una proteína de unión al ADN similar a histonas, formada por dos subunidades, HU α y HU β . Ambos componentes son fosforilados por la Pkn2 en residuos de treonina, bloqueando así la capacidad de unión de HU al ADN (Udo *et al.*, 2000).

En *M. xanthus*, esta quinasa se expresa tan sólo durante el crecimiento vegetativo, alcanzando su máximo de expresión justo al comienzo de la fase estacionaria. Sin embargo, el mutante de delección para *pkn2* no presenta diferencias en el crecimiento vegetativo respecto al silvestre, mientras que en el desarrollo manifiesta una agregación prematura, generando cuerpos fructificantes poco compactos que presentan una producción de esporas reducida al 30-50 % en relación al silvestre (Udo *et al.*, 1995). En cambio, la sobreexpresión de esta quinasa produce un marcado retraso en la agregación y fructificación durante el desarrollo, aunque igualmente tiene lugar una reducción equivalente en la producción de esporas (Udo *et al.*, 1996). Por tanto, la Pkn2 actúa como un represor del proceso de desarrollo, ejerciendo como un regulador tanto de la fructificación como de la esporulación (Udo *et al.*, 1995; Udo *et al.*, 1996).

III. 8. 3. Pkn4

La Pkn4 es una Ser/Thr quinasa que presenta 643 residuos, con un dominio catalítico N-terminal seguido por un dominio regulador C-terminal sin similitud aparente con otras proteínas. Se trata de una proteína asociada a la membrana que expone tanto el dominio catalítico como el dominio regulador hacia el citoplasma (Nariya e Inouye, 2003). Esta quinasa se autofosforila en residuos de serina y treonina pertenecientes tanto al dominio catalítico como al dominio regulador de la proteína (Nariya e Inouye, 2002).

El gen *pkn4* se sitúa justo por debajo del gen que codifica la enzima fosfofructoquinasa (PFK) de *M. xanthus*, formando un operón (Nariya e Inouye, 2003). La PFK es una enzima glucolítica que cataliza la fosforilación de la fructosa 6-fosfato con ATP para generar fructosa 1,6-bisfosfato (Evans *et al.*, 1981). La regulación de esta enzima en bacterias se debe a la unión de efectores alostéricos (Li *et al.*, 1999), mientras que en eucariotas existe además un mecanismo de regulación mediante fosforilación de la enzima (Foe y Kemp, 1982). En *M. xanthus* se ha comprobado que la Pkn4 activa a la enzima PFK mediante la fosforilación del residuo de Thr-226 situado en el sitio alostérico de la proteína. Para ello, es necesaria la asociación de la región reguladora de la Pkn4 con la enzima, facilitando el acceso del dominio catalítico a su sustrato. De hecho, el inhibidor alostérico fosfoenolpiruvato bloquea esta fosforilación impidiendo el contacto de la enzima con la Pkn4 (Nariya e Inouye, 2002).

La Pkn4 se asocia con tres proteínas moduladoras, denominadas MkapA, MkapB y MkapC, portadoras de distintos motivos de interacción proteína-proteína capaces de contactar con la quinasa. La región reconocida por estos reguladores es diferente, así, mientras que MkapA se une principalmente al dominio catalítico de la Pkn4, MkapB y MkapC reconocen de forma selectiva al dominio regulador. La proteína MkapB inhibe la fosforilación de la PFK por la Pkn4, una vez que se ancla de forma estable al dominio regulador de la Pkn4 tras ser fosforilada por la propia quinasa, impidiendo la unión con la PFK (Nariya e Inouye, 2005a).

En *M. xanthus*, la proteína Pkn4 junto con la PFK se encuentran implicadas en el metabolismo del glucógeno, un polímero de glucosa empleado como reserva de energía y carbono por muchas bacterias frente a la limitación de nutrientes (Preiss y Romeo, 1989). En esta bacteria, el glucógeno se almacena durante la fase estacionaria así como al comienzo del desarrollo mediante gluconeogénesis, para ser utilizado principalmente durante el proceso de esporulación mediante glucólisis. Se ha demostrado que este aporte energético es esencial para conseguir una eficiente producción de esporas durante el ciclo de desarrollo (Nariya e Inouye, 2003).

La Pkn4 junto con la PFK son esenciales para el consumo del glucógeno de reserva durante el desarrollo (Nariya e Inouye, 2003), mientras que el modulador MkapB promueve la acumulación de glucógeno al inicio del desarrollo (Nariya e Inouye, 2005a). Una estirpe mutante para *pfk-pkn4* acumula más glucógeno que la cepa silvestre, a diferencia del mutante para *mkapB*, pero es incapaz de consumirlo a medida que progresa el desarrollo, lo que se traduce en un bajo rendimiento de producción de esporas. La fosforilación catalizada por la Pkn4 es clave en la utilización del glucógeno, puesto que la mutación del residuo de treonina fosforilable en la PFK genera un fenotipo similar a la estirpe mutante para *pfk-pkn4* (Nariya e Inouye, 2003).

III. 8. 4. Pkn5 y Pkn6

La Pkn5 es una Ser/Thr quinasa soluble que consta de 380 residuos, en su mayoría pertenecientes al dominio catalítico de la proteína. La Pkn6 es otra Ser/Thr quinasa, localizada en la membrana mediante un segmento hidrofóbico, que separa el dominio catalítico N-terminal intracelular respecto al sensor C-terminal situado hacia el periplasma. Se ha comprobado que mientras que la Pkn5 se autofosforila sobre serina, la Pkn6 lo hace sobre residuos tanto de serina como de treonina (Zhang *et al.*, 1996).

En el genoma, los genes *pkn5* y *pkn6* se disponen adyacentes entre sí pero en orientación divergente, separados por un corto segmento de ADN. Ambos genes comparten una misma región promotora, con el solapamiento de las cajas -10 y -35 de *pkn5* con las cajas -35 y -10 de *pkn6* dentro del promotor, lo que sugiere una regulación coordinada en la expresión de ambos genes. En *M. xanthus*, ambas quinasas apenas se encuentran presentes durante el crecimiento vegetativo, incrementando de forma considerable su expresión al comienzo del desarrollo. En el caso de *pkn5*, su expresión se eleva de forma rápida hasta alcanzar un máximo a las 24 h del desarrollo, para entonces retornar al nivel basal. Sin embargo, *pkn6* presenta un aumento moderado de su expresión durante las primeras 24 h del desarrollo, seguido por un incremento drástico en las siguientes 70 h (Zhang *et al.*, 1996).

El análisis del fenotipo del mutante de delección para *pkn5* indica un desarrollo prematuro de esta cepa, con un adelanto de 8-10 h en los procesos de fructificación y esporulación respecto al silvestre. Por el contrario, el mutante de delección para *pkn6* presenta un claro retraso en el desarrollo, con un retardo en torno a 12 h en relación al silvestre. Por tanto, la Pkn5 y la Pkn6 desempeñan un papel regulador recíproco en el control del ciclo de desarrollo de *M. xanthus*, de forma que la Pkn5 se encarga de reprimir su inicio en presencia de nutrientes, mientras que la Pkn6 estimula la progresión hacia el desarrollo en condiciones de inanición (Zhang *et al.*, 1996).

III. 8. 5. Pkn8 y Pkn14

La Pkn8 es una Ser/Thr quinasa de membrana constituida por 1049 aminoácidos, que cuenta con un dominio catalítico N-terminal junto con un dominio regulador C-terminal portador de una región TPR. Ambas regiones se sitúan expuestas hacia el citoplasma, separadas entre sí por dos segmentos transmembrana sucesivos. La proteína Pkn8 se autofosforila en residuos de treonina (Nariya e Inouye, 2005b).

La Pkn14 es otra Ser/Thr quinasa de tipo eucariota, formada por tan sólo 408 aminoácidos ocupados casi en su totalidad por el dominio catalítico de la proteína, quedando un dominio regulador C-terminal muy corto constituido por 41 residuos. Se trata de una quinasa citoplasmática capaz de oligomerizar en tetrámeros, enlazados entre sí a través de la región C-terminal. La proteína Pkn14 se autofosforila sobre residuos tanto de serina como de treonina (Nariya e Inouye, 2005b).

Las proteínas Pkn8 y Pkn14 se encuentran relacionadas entre sí a nivel funcional, ya que participan en una misma ruta de señalización celular, formando una cascada de ePKs en *M. xanthus*. Ambos componentes del sistema interactúan entre sí mediante fosforilación, de forma que en respuesta a una señal adecuada, la quinasa receptora Pkn8 fosforila sobre residuos de treonina a la Pkn14 soluble (Nariya e Inouye, 2005b). En esta ruta, ambas quinasas contactan a través de sus propios dominios reguladores para facilitar la fosforilación, siendo para ello necesario que la quinasa sustrato se encuentre en forma tetramérica. La Pkn14 activada a su vez fosforila la región N-terminal del regulador MrpC, portadora de dos residuos aceptores de treonina (Nariya e Inouye, 2005b; Nariya e Inouye, 2006).

La proteína MrpC es un activador transcripcional de la familia CRP, que contiene un dominio de unión a nucleótidos cíclicos seguido por un dominio HTH de unión al ADN (Sun y Shi, 2001a; Sun y Shi, 2001b). Este regulador, cuando no se encuentra fosforilado, se une al promotor del gen *fruA*, estimulando su expresión durante el desarrollo (Ueki e Inouye, 2003). La proteína FruA constituye un factor transcripcional esencial para la agregación, fructificación y esporulación durante el ciclo de desarrollo. De igual manera, MrpC es capaz de unirse sobre su propio promotor para estimular de forma positiva su propia expresión (Sun y Shi, 2001a; Sun y Shi, 2001b; Nariya e Inouye, 2006).

Durante el crecimiento vegetativo, la ruta de ePKs Pkn8-Pkn14 reprime la expresión de los genes *mrpC* y *fruA*, evitando el inicio del ciclo de desarrollo. Para ello, la Pkn14 inhibe la actividad transcripcional de MrpC mediante fosforilación, ya que la afinidad de unión de este regulador al ADN se reduce de forma notable tras su fosforilación por la cascada de quinasas (Nariya e Inouye, 2006). De hecho, las estirpes mutantes $\Delta pkn8$ y

Δpkn14 presentan niveles de expresión de MrpC y FruA notablemente más elevados respecto a la cepa silvestre, y como consecuencia, presentan una progresión prematura de los distintos eventos del desarrollo (Nariya e Inouye, 2005b).

En el ciclo de desarrollo, el regulador MrpC es procesado mediante proteólisis del extremo N-terminal por acción de la proteasa LonD, dando lugar a la forma MrpC2, carente de residuos susceptibles de fosforilación. La forma MrpC2 es un activador transcripcional mucho más potente que la proteína nativa, puesto que la afinidad de unión al ADN de MrpC2 sobre la región promotora de *mrpC* y *fruA* supera de cuatro a ocho veces la exhibida por la proteína sin procesar. La acumulación de MrpC2 durante el desarrollo incrementa la expresión de los genes *mrpC* y *fruA*, promoviendo la progresión del ciclo de desarrollo, una vez que la ruta de quinasas Pkn8-Pkn14 es incapaz de fosforilar a MrpC2, al carecer del extremo N-terminal (Nariya e Inouye, 2006).

III. 8. 6. Pkn9

La Pkn9 es una Ser/Thr quinasa de membrana, formada por 589 aminoácidos, con un dominio catalítico N-terminal intracelular, capaz de mediar su autofosforilación en serina y treonina, seguido por un segmento transmembrana para dejar a la región C-terminal hacia el periplasma. Este segmento sensor presenta varias repeticiones en tándem, aunque su secuencia carece de similitud con ninguna otra proteína (Hanlon *et al.*, 1997).

En *M. xanthus*, esta quinasa se expresa de forma moderada durante la fase de crecimiento exponencial, pero su expresión se incrementa de forma apreciable tanto durante la fase estacionaria como al comienzo del desarrollo. El mutante de delección para *pkn9* muestra un retraso de unas 24 h en el proceso de fructificación respecto a la estirpe silvestre, generando cuerpos fructificantes poco compactos incapaces de madurar, mientras que el rendimiento en la producción de esporas se reduce hasta en un 40% en comparación con el silvestre. La delección de *pkn9* reduce la expresión de cuatro proteínas de membrana denominadas KREP9-(1-4), por lo que la actividad de la Pkn9 parece regular la expresión de estas proteínas (Hanlon *et al.*, 1997).

III. 8. 7. MasK

La proteína MasK es una Tyr quinasa de membrana que consta de 646 aminoácidos, con un dominio catalítico N-terminal junto con un dominio regulador C-terminal sin similitud aparente con otras proteínas. En el dominio catalítico de la proteína, MasK contiene un sitio activo específico de quinasas que reconocen tirosina, y de hecho se ha comprobado que MasK se autofosforila sobre residuos de esta naturaleza (Thomasson *et al.*, 2002).

La MasK interacciona a través de su dominio regulador con el modulador de la movilidad MglA (Thomasson *et al.*, 2002). Como se ha comentado anteriormente, MglA es una GTPasa de la familia Ras necesaria para coordinar tanto la movilidad social como la movilidad aventurera, ejerciendo un ajuste en la reversión de la dirección de movimiento en ambos sistemas (Hartzell y Kaiser, 1991a; Hartzell y Kaiser, 1991b). En el genoma, el gen *masK* que codifica esta quinasa, se sitúa muy próximo respecto al operón *mglAB*.

A partir de un mutante inmóvil generado mediante mutación puntual en el gen *mglA*, se han obtenido revertientes móviles portadores de una mutación supresora localizada en el gen *mask*. Esta mutación restaura la interacción entre ambas proteínas aunque tan sólo se recupera parcialmente la movilidad. Así, el revertiente sólo se desplaza mediante el sistema de movilidad social, pero es defectivo para la movilidad aventurera, por lo que MasK tan sólo es esencial para la movilidad social de *M. xanthus*. Estos resultados sugieren la presencia de una ruta de señalización en donde la actividad catalítica de la quinasa MasK se estimula en respuesta a algún tipo de señal, a la vez que contacta con el regulador MglA en función de su estado de fosforilación, para establecer una regulación sobre la movilidad social en *M. xanthus* (Thomasson *et al.*, 2002).

III. 8. 8. PknD1 y PknD2

La PknD1 es una Ser/Thr quinasa soluble constituida por 473 aminoácidos, con un dominio catalítico N-terminal de tipo RD junto con una región C-terminal sin similitud aparente con otras proteínas (Stein *et al.*, 2006). El análisis *in vitro* de la actividad catalítica de la proteína indica que PknD1 se autofosforila sobre residuos de treonina (Stein *et al.*, 2006). La PknD2, otra Ser/Thr quinasa soluble, se compone de 1337 aminoácidos, con un dominio catalítico N-terminal de tipo no RD junto con cuatro repeticiones TPR en la región C-terminal. Se ha confirmado la actividad catalítica de esta quinasa *in vivo* (Stein *et al.*, 2006), pero no se ha detectado autofosforilación de PknD2 en los ensayos *in vitro*, al igual que ocurre en otras quinasas no RD (Johnson *et al.*, 1996; Dardick y Ronald, 2006).

En el genoma, los genes que codifican estas quinasas flanquean a un *locus* denominado *espAB*, aunque ambos se transcriben de forma divergente respecto a este operón (Stein *et al.*, 2006). Este *locus* se encuentra implicado en la regulación de la progresión de los distintos eventos que conforman el desarrollo. EspA es una histidina quinasa sensora, con dos dominios PAS y un dominio FHA, mientras que EspB es un transportador de oligopéptidos situado en la membrana (Cho y Zusman, 1999b). Tanto la PknD1 como la PknD2 son capaces de interactuar con EspA durante el desarrollo, formando complejos proteicos estables. En esta unión, es importante reflejar que EspA porta un dominio FHA de unión a fosfotreonina, mientras que al menos la quinasa PknD1 se autofosforila sobre treonina, facilitando la interacción entre ambas proteínas (Stein *et al.*, 2006).

Ambas quinasas se expresan tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el desarrollo a niveles constantes, a diferencia de *espA*, cuya expresión se incrementa de forma drástica durante el desarrollo (Cho y Zusman, 1999b). Los mutantes sencillos para *pknD1* y *pknD2* presentan un fenotipo similar al mutante para *espB*, generando agrupaciones translúcidas inmaduras durante el desarrollo con una producción de esporas sensiblemente reducida respecto a la cepa silvestre (Cho y Zusman, 1999b; Stein *et al.*, 2006). En cambio, los mutantes dobles *espA-pknD1* y *espA-pknD2* generan cuerpos fructificantes maduros, de forma similar al mutante sencillo para *espA*, pero mantienen una producción de esporas igualmente muy reducida como ocurre en los mutantes sencillos para *pknD1* y *pknD2* (Stein *et al.*, 2006).

IV. Fosfatasas de tipo eucariota

IV. 1. Características generales de las proteínas fosfatasas de tipo eucariota

Las proteínas fosfatasas de tipo eucariota catalizan la desfosforilación de sustratos proteicos mediante la eliminación del grupo fosfato incorporado a residuos de serina, treonina o tirosina de la proteína sustrato. Estas enzimas suelen presentar una elevada actividad junto con una amplia especificidad de sustrato, actuando sobre un extenso conjunto de proteínas, lo que explica la presencia de un número reducido de este tipo de enzimas en los distintos organismos, en comparación con las ePKs (Bhaduri y Sowdhamini, 2005). A pesar de ello, estas proteínas se asocian con frecuencia con distintas subunidades proteicas reguladoras para controlar la actividad de la enzima o dirigir al dominio catalítico hacia un sustrato particular o una localización celular concreta, confiriendo una amplia versatilidad funcional a estas enzimas (Gallego y Virshup, 2005).

Las fosfatasas de tipo eucariota ejercen un papel contrario respecto a las Ser/Thr y Tyr quinasas, catalizando la desfosforilación de los sustratos previamente fosforilados por una ePK. De esta forma, el nivel de fosforilación del sustrato depende en todo momento del equilibrio entre la actividad de ambas enzimas, que actúan por parejas sobre una misma proteína con efectos contrapuestos. Incluso, en muchas ocasiones, la fosfatasa contacta directamente con la quinasa para modular su actividad mediante desfosforilación. El efecto regulador ejercido por estas proteínas sobre la señalización se pone de manifiesto de forma clara en la fosfatasa de tipo eucariota Mstp de *M. tuberculosis*. Esta proteína controla la ruta PknH-EmrB desfosforilando no sólo al regulador transcripcional sino también a la quinasa para inactivarla (Sharma *et al.*, 2006a).

Las proteínas fosfatasas de tipo eucariota son mucho más diversas que las Ser/Thr y Tyr quinasas, diferenciándose tres grupos principales de enzimas: fosfoproteína fosfatasas (PPP), proteínas fosfatasas dependientes de Mg^{2+} o Mn^{2+} (PPM) y fosfotirosina fosfatasas (PTP). Entre estas últimas, aparecen dos subtipos, conocidas como fosfatasas PTP convencionales (CPTP) y fosfatasas PTP de bajo peso molecular (LMWPTP). Mientras que los miembros de cada grupo conservan un plegamiento proteico muy similar, las diferentes clases de fosfatasas se distinguen entre sí desde un punto de vista estructural y funcional (Barford, 1996; Barford *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 1998).

Estas enzimas presentan una elevada especificidad en relación al tipo de residuo que desfosforilan en el sustrato, de forma que mientras las PPP y PPM actúan como Ser/Thr fosfatasas, las PTP constituyen Tyr fosfatasas. Entre estas últimas, existe un reducido grupo de enzimas capaces de desfosforilar los tres tipos de fosfoaminoácidos, por lo que se conocen como fosfatasas de especificidad dual. Existen diferencias en el mecanismo catalítico durante la reacción de desfosforilación. Así, las Ser/Thr fosfatasas desfosforilan al sustrato mediante una reacción en un único paso tras la activación de una molécula de agua por un átomo metálico unido a la enzima. En cambio, las Tyr fosfatasas catalizan la desfosforilación a través de una reacción que implica dos pasos sucesivos, con la formación de un intermediario enzimático de tipo cisteinil-fosfato (Barford, 1996; Barford *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 1998).

IV. 2. Tipos de fosfatasas de tipo eucariota

IV. 2. 1. Fosfatasas PPP

Las proteínas PPP integran un abundante grupo de Ser/Thr fosfatasas, que a su vez se puede dividir en fosfatasas de tipo PP1, PP2A y PP2B (calcineurina) (Barford *et al.*, 1998). En estas enzimas, el sitio activo del dominio catalítico contiene un centro metálico formado por dos iones divalentes de Fe^{2+} y Mn^{2+} o Zn^{2+} . El dominio catalítico de las fosfatasas PPP comprende 220 aminoácidos y se caracteriza por la presencia de tres motivos proteicos conservados espaciados entre sí, que participan principalmente en la coordinación de ambos metales al centro activo así como en la catálisis de la reacción (Egloff *et al.*, 1995). El análisis de los genomas bacterianos secuenciados indica que las fosfatasas de tipo PPP son el grupo predominante de enzimas con actividad O-fosfatasa en procariontes. Este tipo de enzimas se encuentran presentes en un número considerable en los distintos microorganismos y se distribuyen de forma uniforme en las distintas líneas filogenéticas de procariontes (Badhuri y Sowdhamini, 2005).

IV. 2. 2. Fosfatasas PPM

Las proteínas PPM constituyen un amplio grupo de metaloenzimas con actividad Ser/Thr fosfatasa, que incluye a las fosfatasas de tipo PP2C y las fosfatasas similares a SpoIIE (Barford *et al.*, 1998). Estas proteínas comparten un dominio catalítico con un centro activo formado por un centro metálico con dos iones de Mg^{2+} o Mn^{2+} . En el dominio catalítico de las fosfatasas PPM, que contiene en torno a 290 aminoácidos, aparecen once motivos proteicos conservados entre los que se encuentran varios residuos muy constantes, en su mayoría implicados en la coordinación de ambos cationes en el centro activo (Das *et al.*, 1996). Este dominio fosfatasa se asocia con regiones reguladoras de la actividad enzimática, situadas hacia la región amino o carboxilo en la proteína. Las fosfatasas de tipo PPM se encuentran presentes en bacterias pero no en arqueas (salvo una excepción), aunque su presencia suele ser minoritaria. En muchas ocasiones, estas fosfatasas se encuentran implicadas en la respuesta a diversos agentes de estrés ambiental (Delumeau *et al.*, 2004).

IV. 2. 3. Fosfatasas PTP

Las proteínas PTP conforman un grupo complejo de Tyr fosfatasas, encuadradas a su vez dentro de tres subfamilias de proteínas, entre las que se encuentran las CPTP, las LMWPTP y las fosfatasas duales (Barford *et al.*, 1998). Se trata de proteínas que han sufrido un proceso de convergencia evolutiva, puesto que aunque difieren entre sí tanto en su secuencia como en el plegamiento espacial, todas ellas comparten un centro activo conservado con el motivo Cx_5R , en donde los residuos implicados en la catálisis mantienen una configuración espacial similar (Zhang, 2003). En el dominio catalítico de las fosfatasas PTP, el residuo catalítico de cisteína acepta al grupo fosfato a partir del sustrato fosforilado en tirosina, generando un intermediario estabilizado gracias a la interacción del grupo fosfato con la arginina conservada del sitio activo. La incorporación de una molécula de agua hidroliza este complejo cisteinil-fosfato, con lo que se elimina el grupo fosfato como fosfato inorgánico (Zhang, 2003).

IV. 3. Fosfatasa de tipo eucariota en *M. xanthus*: Pph1

La fosfatasa de tipo eucariota Pph1 es una enzima de tipo PP2C, y por tanto, pertenece a la familia de fosfatasa PPM. Esta proteína desfosforila de forma predominante a residuos de fosfotreonina en el sustrato, aunque también de forma minoritaria actúa sobre residuos fosforilados en serina. En *M. xanthus*, la Pph1 se expresa tanto durante el crecimiento vegetativo como en el ciclo de desarrollo, alcanzando al comienzo de la fase de agregación los niveles de expresión más elevados (Treuner-Lange *et al.*, 2001).

Mediante el sistema de dos híbridos de levadura, se ha visto que la fosfatasa Pph1 interacciona con el extremo C-terminal de la proteína FrzZ, perteneciente al sistema regulador de la movilidad Frz de *M. xanthus*. Durante la transducción de señales, la proteína FrzZ, homóloga a CheY de *E. coli*, genera la señal que activa al sistema Frz de *M. xanthus* para controlar el movimiento celular. Por todo ello, el mutante $\Delta pph1$ presenta defectos en la movilidad celular, con una reducción del 10-30% en la capacidad de desplazamiento respecto a la estirpe silvestre. Este efecto se debe a que esta cepa es defectiva para la metilación de FrzCD así como en el control de la reversión celular, y además se encuentra afectada en el transporte y ensamblaje de los pili. Durante el desarrollo, el mutante *pph1* es defectivo para la agregación, generando cuerpos fructificantes anormales que producen un número reducido de mixósporas con escasa viabilidad (Treuner-Lange *et al.*, 2001).

Además, la fosfatasa Pph1 interacciona mediante el sistema del doble híbrido con la Ser/Thr quinasa Pkn5. El contacto entre ambas proteínas refleja la relación funcional entre estas proteínas de señalización dentro de una misma ruta de regulación. Así, se ha propuesto que Pph1 y Pkn5 podrían controlar el nivel de fosforilación sobre un mismo sustrato(s), o incluso, que la Pph1 sería capaz de desfosforilar a la quinasa, previamente activada mediante autofosforilación (Treuner-Lange *et al.*, 2001).

B. OBJETIVOS



B. OBJETIVOS

I. Objetivos de este trabajo de investigación

Las mixobacterias como *M. xanthus* llevan a cabo un complejo ciclo de vida único entre los procariotas, con una fase de crecimiento vegetativo en donde la bacteria se multiplica empleando los nutrientes disponibles, junto con una etapa de desarrollo multicelular inducida por el agotamiento de nutrientes en el medio. La regulación de este ciclo de vida requiere de la detección por parte de las células de las condiciones ambientales y nutricionales del medio así como del intercambio de señales entre ellas. Ambos elementos son esenciales para conseguir que las células actúen de forma coordinada en función de los estímulos recibidos por ellas, adaptando las actividades celulares a las condiciones impuestas por el medio.

La secuenciación del genoma de estas bacterias ha revelado la existencia de un elevado número de proteínas de señalización en este tipo de microorganismos, esenciales para integrar el conjunto de señales recibidas desde el medio ambiente. Junto a los sistemas reguladores de dos componentes, basados en quinasas en histidina, se ha detectado una proporción considerable de ePKs, que fosforilan sobre residuos de serina/treonina y tirosina. Este tipo de proteínas normalmente participan dentro de la transducción de señales en forma de cascadas de proteínas reguladas mediante fosforilación. De hecho, se ha comprobado la destacada relevancia de esta tipo de proteínas en las redes de señalización que controlan el desarrollo multicelular en *M. xanthus*, participando en la modulación del ciclo de vida de esta bacteria en respuesta a las condiciones del medio.

De acuerdo con estos postulados, para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se propuso profundizar en el conocimiento del papel desempeñado por las ePKs en las mixobacterias mediante dos enfoques: el análisis de este tipo de proteínas en mixobacterias dentro del marco del estudio global del quinoma procariota y la caracterización de una de estas quinasas, la proteína PksA. Para el desarrollo de ambos campos de investigación se propusieron los siguientes objetivos:

1. Identificación del conjunto de ePKs codificadas por las diferentes especies de mixobacterias cuyos genomas han sido secuenciados.
2. Análisis bioinformático de la secuencia de las ePKs detectadas en mixobacterias.
3. Caracterización de la quinasa PksA de *M. xanthus* a nivel estructural y enzimático.
4. Determinación del perfil de expresión de la quinasa PksA
5. Análisis del *locus pksA* y determinación de los genes coexpresados dentro de un mismo operón.
6. Obtención del mutante de delección en fase carente de la quinasa PksA y estudio del papel de esta proteína en el ciclo de vida de la bacteria *M. xanthus*.

-
7. Caracterización del efecto de la delección de la quinasa sobre la movilidad de la bacteria *M. xanthus* y sobre el crecimiento de la bacteria en presencia de diferentes agentes inductores de estrés celular.
 8. Determinación de la ruta de señalización en la que participa la quinasa PksA mediante la identificación de proteínas capaces de interactuar con ella utilizando el sistema del doble híbrido de levadura.

C. MATERIAL Y MÉTODOS



C. MATERIAL Y MÉTODOS

I. Microorganismos

I. 1. Estirpes de *E. coli*

En el desarrollo de este trabajo se han utilizado las siguientes cepas de *E. coli*:

JM109 (Yanish-Perron *et al.*, 1985)

La cepa JM109 ha sido empleada para realizar transformaciones y electroporaciones en *E. coli*, como hospedador durante la clonación de fragmentos de ADN así como durante la amplificación de vectores plasmídicos. Esta estirpe es deficiente en el sistema de restricción y de recombinación, favoreciendo la estabilidad de los plásmidos incorporados a esta bacteria. Además, presenta una delección del gen *lacZ* que permite la selección de clones por α -complementación.

Genotipo: *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi* $\Delta(lac-proAB)$ F' [*traD36 proAB+ lacIq lacZ* Δ M15]

DH10B (Gibco BRL)

La cepa DH10B se ha utilizado como hospedador capaz de albergar de forma permanente el conjunto de vectores plasmídicos que conforman la genoteca de *M. xanthus* generada para el rastreo de interacciones proteicas. Esta estirpe tiene características similares a la anterior facilitando así la estabilidad de los plásmidos de la genoteca incorporados a la bacteria mediante electroporación.

Genotipo: F⁻ *mcrA* $\Delta(mrr hsdRMS mcrBC)$ Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ *lacX74 endA1 recA1 deoR* $\Delta(ara, leu)$ 7697 *araD139 galU galK nupG rpsL*

BL21 (DE3) (Studier y Moffatt, 1986)

La cepa BL21 (DE3) ha sido utilizada para la expresión heteróloga de genes clonados bajo el control de un promotor de T7 en vectores de expresión de la serie pET. Esta estirpe posee una copia del gen de la polimerasa del fago T7 ubicado bajo el control del promotor *lacUV5*. En presencia del inductor IPTG (isopropiltiogalactósido), el promotor *lacUV5* activa la expresión del gen de la ARN polimerasa de T7, que a su vez transcribe aquellos genes situados bajo el control de un promotor de T7.

Genotipo: F⁻ *ompT hsdS_b (r^{b-} m^{b-}) gal dcm* (DE3)

I. 2. Estirpes de *M. xanthus*

DZF1 y DK1622 (Morrison y Zusman, 1979; Kaiser, 1979)

La cepa DZF1 ha sido empleada como mixobacteria silvestre, al ser capaz de completar el ciclo de desarrollo con normalidad, a pesar de presentar una mutación *pilQ1* sobre los pili de tipo IV que afecta de forma leve a la movilidad social. Esta modificación facilita su manipulación, puesto que impide la agregación de la bacteria en medio líquido y por tanto, en general, las estirpes de *M. xanthus* obtenidas durante este estudio derivan de esta cepa de partida. Tan sólo se ha empleado la cepa salvaje DK1622, carente de esta mutación, para el análisis de la movilidad en la mixobacteria.

I. 3. Estirpes de *S. cerevisiae*

AH109 (James *et al.*, 1996)

La cepa AH109 es una estirpe derivada de la cepa PJ69-2A a la que se la ha incorporado el gen *lacZ*. Esta levadura ha sido utilizada en el sistema de dos híbridos de levadura para el rastreo de interacciones proteína-proteína. Para ello dispone de cuatro marcadores nutricionales, *TRP1* y *LEU2*, empleados para seleccionar la incorporación de los plásmidos cebo y presa, y *ADE2* e *HIS3* para la selección de las estirpes interaccionantes. Además, dispone de un sistema de detección fenotípica necesario para validar las interacciones, basado en la expresión de las enzimas α y β -galactosidasa, codificadas respectivamente por los genes *MEL1* y *lacZ*.

Genotipo: *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*, *MEL1*

II. Medios de cultivo

II. 1. Medios de cultivo de *E. coli*

II. 1. 1. Tipos de medios de cultivo

Medio LB (Luria-Bertani) (Miller, 1972)

Componentes	Concentración
Bacto-Triptona	1 %
Extracto de levadura	0.5 %
NaCl	1 %
Bacto-Agar (sólido)	1.5 %
Ajustar pH a 7.2	

Medio líquido SOC (Sambrook y Russel, 2001)

Componentes	Concentración
Bacto-Triptona	2 %
Extracto de levadura	0.5 %
NaCl	0.05 %
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
Tras la esterilización, añadir:	
Glucosa	20 mM

II. 1. 2. Compuestos adicionados a los medios de cultivo de *E. coli*

Ampicilina

El antibiótico ampicilina (Sigma) se añadió a una concentración de 50 µg/ml para obtener el medio LB+Amp. La presencia de este antibiótico permite seleccionar las bacterias portadoras de plásmidos con el gen β-lactamasa, por lo que se ha empleado durante el proceso de clonación de fragmentos de ADN en vectores que poseen un marcador de resistencia a ampicilina.

Kanamicina

El antibiótico kanamicina (Sigma) se incorporó a una concentración final de 25 µg/ml para generar el medio LB+Kan. En este caso, sobre este medio tan sólo crecen las bacterias que contienen plásmidos con resistencia a kanamicina, de manera que en este caso se ha utilizado para la clonación de fragmentos de ADN sobre vectores que portan un marcador de resistencia a este antibiótico.

5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactopiranosido (X-gal)

El X-gal (Biosynth AG) es un sustrato de la enzima β-galactosidasa que al ser degradado genera un producto de color azulado. Este compuesto se añadió al medio LB a una concentración de 40 µg/ml y se empleó para la selección de clones blanco/azul por α-complementación durante la clonación de fragmentos de ADN en vectores que portan el gen *lacZ*. La expresión de este gen se ve interrumpida por la inserción de un segmento de ADN en el sitio de clonación, diferenciando así entre aquellas bacterias que han incorporado el fragmento (colonias blancas) de aquellas otras que no lo han adquirido (colonias azules).

IPTG

El IPTG es un compuesto inductor de la expresión de genes situados bajo el control de promotores de tipo *lac*, por lo que se ha adicionado al medio LB a una concentración de 0.5 mM a 2 mM para activar la síntesis de proteína recombinante en sistemas de expresión heterólogos dependientes de este agente.

II. 2. Medios de cultivo de *M. xanthus*

II. 2. 1. Medios de crecimiento vegetativo

Medio CTT (Hodgkin y Kaiser, 1977)

Componentes	Concentración
Bacto-Casitone	1 %
MgSO ₄ · (7 H ₂ O)	0.2 %
Tris-HCl pH 7.6	10 mM
Tampón fosfato pH 7.6	1 mM
Bacto-Agar (sólido)	1.5 %

El medio CTT se ha preparado tanto en forma de CTT líquido sin agar, como CTT blando con 0.8% de agar o bien, como CTT sólido con 1.5% de agar.

Medio CYE (Campos *et al.*, 1978)

Componentes	Concentración
Bacto-Casitone	1 %
Extracto de levadura	0.5 %
MgSO ₄ · (7 H ₂ O)	0.1 %
Bacto-Agar (sólido)	1.5 %

II. 2. 2. Medios inductores del desarrollo

Medio CF (Hagen *et al.*, 1978)

Componentes	Concentración
Bacto-Casitone	0.015 %
Piruvato sódico	0.1 %
Citrato sódico	0.2 %
Tris-HCl pH 7.6	10 mM
Tampón fosfato pH 7.6	1 mM
MgSO ₄ · (7 H ₂ O)	8 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.02 %
Bacto-Agar	1.5 %

Medio TPM (Bretscher y Kaiser, 1978)

Componentes	Concentración
Tris-HCl pH 7.6	10 mM
Tampón fosfato pH 7.6	1 mM
MgSO ₄ · (7 H ₂ O)	5 mM
Bacto-Agar	1.5 %

II. 2. 3. Compuestos adicionados a los medios de cultivo de *M. xanthus*

Agentes químicos de estrés

El efecto de diversos estímulos estresantes sobre el crecimiento de *M. xanthus* se realizó mediante la adición al medio CTT de una serie de compuestos químicos dentro de un rango de concentración adecuado para cada agente. Entre las sustancias ensayadas en este trabajo se encuentran el CCCP, H₂O₂, tert-butilo hidroperóxido, paraquat, nitrofurantoína, menadiona, nitrito sódico, cloruro potásico, sacarosa, etanol, SDS, sulfato de cobre, bleomicina y EGTA. Estos agentes fueron adicionados ya filtrados tras la esterilización del medio en el autoclave.

Kanamicina

El antibiótico kanamicina (Sigma) se añadió a una concentración de 40 µg/ml al medio CTT tanto para el aislamiento de cepas portadoras de fusiones *lacZ*, como para la obtención de intermediarios merodiploides durante el proceso de delección de un gen diana. Las estirpes portadoras de estas construcciones se originaron por integración en el genoma de plásmidos que confieren resistencia a kanamicina, introducidos de forma previa a la mixobacteria mediante electroporación.

Galactosa

La galactosa (Fluka) al 1% en medio CTT ha sido empleada durante la selección de cepas portadoras de delecciones en fase, puesto que estas bacterias carentes del gen diana pierden igualmente mediante recombinación el gen *galk* que codifica para la enzima galactoquinasa, responsable de la susceptibilidad a la galactosa. De esta forma, la presencia de este azúcar en el medio inhibe el crecimiento del intermediario merodiploide por transformación de la galactosa en un análogo no metabolizable, a la vez que permite el crecimiento diferencial de las bacterias portadoras de la delección, carentes de *galk*.

5-bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactopiranosido (X-gal)

El X-gal (Biosynth AG) ha sido adicionado a estos medios de cultivo a una concentración de 40-100 µg/ml, para efectuar un análisis cualitativo de la actividad β-galactosidasa de las cepas portadoras de fusiones *lacZ* durante el crecimiento vegetativo y el desarrollo.

II. 3. Medios de cultivo de *S. cerevisiae*

II. 3. 1. Tipos de medios de cultivo

Medio rico YPDA (Ausubel *et al.*, 1988)

Componentes	Concentración
Bacto-Peptona	2 %
Extracto de levadura	1 %
Bacto-Agar (sólido)	2 %
Ajustar pH a 5.8	
Tras la esterilización, añadir:	
Glucosa	2 %
Adenina	0.003 %

Medio mínimo SDC (*Synthetic Dextrose Complete*) (Kaiser *et al.*, 1994)

Componentes	Concentración
Bacto-Agar	2 %
Ajustar pH a 5.8	
Tras la esterilización, añadir:	
Glucosa	2 %
Base de nitrógeno con (NH ₄) ₂ SO ₄ 20x	5 %
Solución SDC 20x	5 %

En ocasiones, se ha adicionado al medio SDC el compuesto α -X-Gal, un sustrato de la enzima α -galactosidasa. La utilización de este compuesto genera igualmente un producto de tonalidad azulada que permite valorar de forma cualitativa la actividad α -galactosidasa de las estirpes de levadura analizadas.

La base de nitrógeno con sulfato de amonio 20x consta de 3.8 g de la base de nitrógeno para levaduras y 5 g de sulfato de amonio por cada 100 ml de solución. Se esteriliza por filtración y se guarda protegido de la luz. La solución SDC 20x es una mezcla concentrada de un conjunto de aminoácidos y bases nitrogenadas, necesarios para el crecimiento de la levadura. Las soluciones SDC-suplemento(s) 20x carecen de uno o varios de estos componentes, confiriendo al medio mínimo un carácter selectivo. La solución SDC 20x completa consta, por cada 100 ml, de los siguientes componentes: 40 mg de adenina, arginina, histidina, metionina, triptófano y uracilo; 60 mg de isoleucina, leucina, lisina y tirosina; 100 mg de fenilalanina; 300 mg de valina; y 400 mg de treonina.

III. Soluciones

III. 1. Tampones generales: lavado, resuspensión y lisis

Tampón TM	10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM MgSO ₄
Tampón TPM	10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 5 mM MgSO ₄ , 1mM KH ₂ PO ₄ – K ₂ HPO ₄
Tampón TE	10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA (pH8)
Tampón STET (levaduras)	50 mM Tris-HCl (pH8), 50 mM EDTA, 8% sacarosa, 5% Tritón X-100

III. 2. Electroforesis de ADN

TAE 1x	40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA (pH 8.0)
TBE 0.5x	45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA (pH 8.0)
Tampón de carga 5x	0.25% (p/v) azul de bromofenol, 0.25% (p/v) xileno cianol, 30% glicerol

III. 3. Southern blot

Sol. despurinación	0.25 N HCl
Sol. desnaturalización	1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH
Sol. neutralización	3 M acetato sódico (pH 5.5)
Sol. neutralización colonias	0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 1.5 M NaCl
SSC 20x	3 M NaCl, 0.3 M citrato sódico (pH 7.0)

III. 4. Hibridación de ADN y detección con fosfatasa alcalina

Tampón maleico	150 mM NaCl, 100 mM ácido maleico (pH 7.5)
Sol. hibridación	50% formamida, 5x SSC, 1% bloqueo, 0.1% N-laurilsarcosina, 0.02% SDS
Sol. equilibrado I	2x SSC, 0.1% SDS
Sol. equilibrado II	0.1 x SSC, 0.1% SDS
Sol. lavado	3% Tween 20 en tampón maleico
Sol. bloqueo	1g reactivo de bloqueo en 100 ml de tampón maleico
Sol. detección	0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl ₂ , (pH 9.5)

III. 5. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Tampón de carrera	25 mM Tris, 0.192 M glicina, 0.1% (p/v) SDS
Tampón de carga 2x	50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM DTT, 2% (p/v) SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% (v/v) glicerol

III. 6. Purificación de proteínas y ensayo de actividad

Tampón fosfato 1x	80 mM Na ₂ HPO ₄ · (2 H ₂ O), 80 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O, 4M NaCl
Sol. renaturalización	30 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10 % (v/v) glicerol y 0.1% (v/v) Tritón-X
Tampón de fosforilación	50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM Cl ₂ Mg, 10 mM Cl ₂ Mn, 1 mM DTT

III. 7. Western blot

Sol. transferencia	0.025 M Tris-HCl, 0.15 M glicina, 20% metanol (pH 8.1-8.4)
TBST 1x	20 mM Tris-HCl, 140 mM ClNa (pH 7.5), 0.1% (v/v) Tween-20
TBS 1x	20 mM Tris-HCl, 140 mM ClNa (pH 7.5)
PBS 1x	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2mM KH ₂ PO ₄ (pH 7.4)

III. 8. Determinación de actividad β -galactosidasa

Tampón Z	0.1 M Na ₂ HPO ₄ , 0.01 M KCl, 0.001 MgSO ₄ , 0.05 M β -mercaptoetanol
Solución de lisis levaduras	0.1 M Tris-HCl (pH8), 1mM ditioneitol, 20% glicerol

IV. Vectores y oligonucleótidos

IV. 1. Vectores

pKY481 (Cho y Zusman, 1999a)

El plásmido pKY481 es un vector de 8.3 kb empleado para la construcción de fusiones traduccionales entre el gen *lacZ* de *E. coli* con un gen diana cuyo perfil de expresión se desea conocer. Junto con un origen de replicación *colE1* y un marcador de resistencia a kanamicina, este plásmido contiene los genes *lacZY* sin promotor. Tras la integración del vector en el cromosoma, la expresión de la enzima β -galactosidasa se sitúa bajo el control del promotor que regula la expresión del gen fusionado en fase con el gen *lacZ*. De esta forma, mediante esta fusión traduccional se ha determinado el nivel de expresión de las quinasas analizadas a lo largo del ciclo de vida de *M. xanthus*.

pBJ113 (Julien *et al.*, 2000)

El plásmido pBJ113 es un vector de 5.0 kb derivado de pUC118, utilizado para la obtención de mutantes de delección en fase de los genes de la quinasa PksA y del regulador PspA. Este vector dispone de dos marcadores de selección procedentes del sistema KG para el aislamiento de cepas portadoras de la delección, el gen *galK* (galactosa quinasa), que confiere sensibilidad a la galactosa y un gen de resistencia a kanamicina. Para llevar a cabo este proceso, en este plásmido se clonaron en fase dos fragmentos de ADN que delimitan al gen diana e incluyen los codones iniciales y finales del propio gen. A partir de este plásmido portador de la delección, fue posible eliminar la casi totalidad de la región codificante de los genes diana conservando la pauta de lectura, evitando así el efecto polar de estas mutaciones.

pET-28a (+) (Novagen)

El plásmido pET-28a es un vector de 5.3 kb destinado a la sobreexpresión de la proteína quinasa en la bacteria *E. coli*. En este vector, con un marcador de resistencia a kanamicina, la expresión de la quinasa deriva de un promotor dependiente de la ARN polimerasa del fago T7 y se activa en presencia del inductor IPTG. Mediante este sistema de expresión se alcanza un elevado rendimiento de síntesis proteica, gracias a las señales de transcripción y traducción aportadas por el vector. Además, el producto generado presenta una cola de 6 residuos de histidina en el extremo C-terminal, facilitando la purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad en columnas con níquel.

pGBKT7 (Clontech)

El plásmido pGBKT7 es un vector de 7.3 kb, utilizado para la expresión de proteínas fusionadas al dominio de unión al ADN del regulador GAL4 en el sistema del doble híbrido de levadura, a partir del promotor constitutivo del gen alcohol deshidrogenasa *ADHI*. Durante el rastreo de interacciones proteicas, este plásmido se ha utilizado para la expresión del “cebo”, la proteína quinasa de tipo eucariota PksA. Junto con un origen de replicación autónomo, el vector porta un marcador de resistencia a kanamicina para la selección en *E. coli*, así como un marcador nutricional *TRP1* empleado en *S. cerevisiae*.

pGADT7 (Clontech)

El plásmido pGADT7 es un vector de 8.0 kb, empleado en la expresión de proteínas unidas al dominio de activación de la transcripción del regulador GAL4, a partir del promotor constitutivo del gen alcohol deshidrogenasa *ADHI* en el sistema del doble híbrido de levadura. La proteína de fusión es exportada al núcleo de la levadura gracias a la presencia de una señal de localización nuclear SV40 añadida al dominio de activación. En este caso, este plásmido se ha utilizado para la expresión de la proteína “presa” durante la interacción por parejas. Al igual que el vector anterior, dispone de un origen de replicación autónomo, pero porta un marcador de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli* así como un marcador nutricional *LEU2* para *S. cerevisiae*.

La serie de plásmidos pGAD C1, pGAD C2 y pGAD C3 (James *et al.*, 1996) son similares a este vector pero portan las dianas del sitio de clonación en una pauta de lectura diferente, para la clonación de fragmentos en distinta fase de lectura. Estos vectores han sido empleados para la construcción de una genoteca de expresión a partir del genoma de *M. xanthus* durante el rastreo de interacciones proteína-proteína en el sistema del doble híbrido.

IV. 2. Oligonucleótidos

En esta sección, se detallan los cebadores utilizados durante este trabajo en las reacciones de amplificación por PCR. En cada caso, se indica la secuencia de cada pareja de cebadores, destacando en **negrita** y subrayado la diana para cada enzima de restricción.

Fusión *lacZ* con el gen *pksA*

PksA LacZ SmaF **GCTCCCGGGT**GCTGCCATCGTCTGGTG
PksA LacZ BamR **GAGCGGATCCAAGCCGCTCGCGGAACTG**

Topología de la proteína PksA

PksA TopTM SmaF **GGATCCCGGGCTCCATGCCGACGGTGTCTC**
PksA TopTM BamR **GCTGGGATCCTCCAGGGGCACCAACTGCGT**

Producción de la proteína PksA en el vector pET-28a

PksA Pro NcoF **CCCCATGGCG**ACCACTCAACCGAAGCGG
PksA Pro XhoR **CTTCTCGAGACGGCAGCGGGCTCCCGCTT**

Coexpresión del locus *pksA* por RT-PCR

End RTR **ACACCTGCCC**GTTGCCACCG
Pkn RTF **TGAAGGTGGATGGCCGGGTG**
Pkn RTR **ACTTCAGCTTCAGGGT**GAGC
Lpr RTF **ACGCCGAGGACGCTGCGAAG**
Lpr RTR **TTGCCAGCGTCCTTCAGGTC**
Psp RTF **ATGAACGCCATCCGCGAGGC**
Psp RTR **TTCACCAGCTCGTTGGCCTG**

Mutante de delección $\Delta pksA$

Brazo 5' del gen *pksA*

PksA Mut EcoF **TTCGAATTCAAGCCC**GACAGTTTCTTCTCC
PksA Mut XbaR **CTTCTAGACGGGATGGGCTGCCGCTTCGG**

Brazo 3' del gen *pksA*

PksA Mut XbaF **GCGTCTAGAGGCAATGAGCCGGCCACCGCG**
PksA Mut HinR **CTTAAGCTTGGCGTGTCCCGCCACGGCGTC**

Mutante de delección $\Delta pspA$

Brazo 5' del gen *pspA*

PspA Mut EcoF **ACCGAATTCAACCCACGCTCGCCTGCCGC**
PspA Mut BamR **TCCGGATCCTCGATGGAGGAGACGAAG**

Brazo 3' del gen *pspA*

PspA Mut BamF **CCCGGATCCGGTGTCCGAGGTGGGCAGC**
PspA Mut HinR **CAGAAGCTTGTCACCCACAGCCCCACCAC**

Marcadores del desarrollo

Fusión *lacZ* con el gen *fruA*

FruA LacZ XhoF GACCTCGAGCACCGTCCAGTACAGCCACTG
FruA LacZ BamR GTTGGATCCATGCGAAGGCCCCCCAGCCGT

Fusión *lacZ* con el gen *mrpC*

MrpC LacZ KpnF CGAGGTACCCTACCAACGCCTCAAGGTCAT
MrpC LacZ BamR AAAGGATCCATGGCATAACTCCTGGGAAGG

Fusión *lacZ* con el gen *tpsA*

TpsA LacZ XhoF CCCTCGAGCCCCCTGCACTGGGCCAACC
TpsA LacZ BamR TGGGATCCATTGCAGTGCTCCTCCGTTG

Interacciones proteicas en el sistema del doble híbrido de levadura

Expresión de la región citoplasmática PKc como cebo

PksA PKc Hib EcoF CACGAATTCATGACGACCACTCAACCGAAG
PksA PKc Hib XhoR GAACTCGAGCTACCTGGGAATGGGCGCTCG

Expresión del dominio catalítico CD como cebo

PksA CD Hib EcoF CACGAATTCATGACGACCACTCAACCGAAG
PksA CD Hib SalR CCTGTCGACTGAAGATGGTGTGCTGCTGGTGA

Expresión del dominio regulador RD como cebo

PksA RD Hib EcoF ACCGAATTCAGCCGCAAGGACCTGGCGCAG
PksA RD Hib XhoR GAACTCGAGCTACCTGGGAATGGGCGCTCG

Expresión del dominio sensor SS como cebo

PksA SS Hib EcoF TACGAATTCGTGGACCTGCAGGGCGTGCCC
PksA SS Hib SalR GGGGTCGACGCTAACGGCAGCGCGGCTGCC

Expresión de la proteína PspA como presa

PspA Hib EcoF ACCGAATTCATGTGGCAACGATTCAAGAGA
PspA Hib BamR CAAGGATCCCTACTCGACGCCGACCTTCT

Expresión de la proteína PilR como cebo

PilR Hib EcoF GTTGAATTCATGACATCCGTACAGGGAGGA
PilR Hib BamR TCGGGATCCCTACGCATCCGAAGCGCTCCC

Secuenciación de los insertos detectados durante el rastreo de la genoteca

pGAD SecF TAACTATCTATTCGATGATGA

Caracterización de Znf (Mxan5813)

Fusión *lacZ* con el gen *znf* y amplificación del brazo 5' para la delección del gen *znf*

Znf MutLacZ KpnF TCGAGGTACCGGGTGAGCGAGGCCATGTCTG
Znf MutLacZ BamR GCACGGATCCCACTTGACGATCATTTCAGCA

Amplificación del brazo 3' para la delección del gen *znf*

Znf Mut BamF CGGCGGATCCCGCCCCCGGACGGAGTGAG
Znf Mut HindR CCATAAGCTTCGGCGAGCAGCCGGGTGGCC

Caracterización de Pfl (Mxan1834)

Fusión *lacZ* con el gen *pfl* y amplificación del brazo 5' para la delección del gen *pfl*

Pfl MutLacZ KpnF CGTCCTGGGTACCGGCCGTG
Pfl MutLacZ BamR AGTGGATCCTCGGCGGTGATTTCGTG

Amplificación del brazo 3' para la delección del gen *pfl*

Pfl Mut BamF CCAGGATCCGCCAGTACGTCCTGACACC
Pfl Mut HindR AGGAAGCTTGTGTCAGTGCCGATAACCAT

Transferencia de ambos brazos al plásmido pKY-*oar*

Pfl MutLacZ KpnF CGTCCTGGGTACCGGCCGTG
Pfl Mut KpnR AGGGGTACCGTGTCAGTGCCGATAACCAT

V. Cultivo de microorganismos

V. 1. Cultivo de *E. coli*

El crecimiento de *E. coli* se llevó a cabo en todos los casos a partir de medio rico LB. Durante el cultivo en medio líquido, tras inocular con una única colonia bacteriana el medio LB líquido, los tubos se incubaron a 37°C con 225-250 rpm de agitación. Para el cultivo en medio sólido, la bacteria se sembró en estría o con espátula de Driglasky sobre una placa de LB sólido con 1.5% de agar y se incubó en la estufa a 37°C durante una noche. En ambos casos, si las cepas cultivadas son resistentes a ampicilina o kanamicina, se adicionó al medio el antibiótico correspondiente.

V. 2. Cultivo de *M. xanthus*

El cultivo de *M. xanthus* en condiciones de crecimiento vegetativo se realizó empleando medio de cultivo CTT o CYE, ambos ricos en nutrientes. Para el cultivo de la bacteria en medio líquido, los tubos de CTT inoculados con la bacteria se incubaron a 30°C con 300 rpm de agitación. Para llevar a cabo el cultivo de la bacteria en medio sólido, se sembró en gotas, en estría o en sobrecapa sobre una placa de CTT o CYE sólido con 1.5% de agar y se incubó a 30°C en la estufa. En el caso de estirpes resistentes a kanamicina, el medio se suplementó con este antibiótico.

El cultivo de *M. xanthus* para la inducción del ciclo de desarrollo se ha llevado a cabo en dos medios de cultivo pobres en nutrientes, CF y TPM. Para ello, la bacteria se inoculó concentrada a DO_{600} de 15 en gotas de 10-20 μ l de volumen sobre la superficie de estos medios y se incubaron a 30°C en una estufa. En estos medios inductores del desarrollo, la bacteria se agrega generando cuerpos fructificantes con mixósporas de resistencia. La diferencia en el contenido nutritivo entre ambos medios condiciona la progresión de la mixobacteria hacia el ciclo de desarrollo. Así, mientras que en TPM la ausencia total de nutrientes orgánicos dispara de forma inmediata el desarrollo, en CF la bacteria dispone de una cantidad limitada de nutrientes suficiente para permitir varias etapas de división celular, retrasando la inducción del ciclo de desarrollo.

V. 3. Cultivo de *S. cerevisiae*

El cultivo de la levadura AH109 de *S. cerevisiae* se ha llevado a cabo en medio rico YPDA, mientras que para el crecimiento de las estirpes portadoras de plásmidos del sistema del doble híbrido de levadura, se ha empleado medio mínimo SDC sin el marcador nutricional correspondiente. Para el cultivo en medio líquido, los tubos de YPDA o medio mínimo SDC inoculados con la levadura se incubaron a 30°C con 225-250 rpm de agitación. En el caso de medio sólido, la levadura se sembró en gotas o en estría sobre una placa de medio YPDA o sobre medio mínimo SDC carente de uno o varios nutrientes, y se incubó en la estufa a 30°C de dos a diez días, dependiendo del grado de selección ejercido por el medio sobre la levadura.

VI. Manipulación del ADN

VI. 1. Purificación preparativa de ADN

VI. 1. 1. ADN cromosómico

i) Preparación de ADN cromosómico de *M. xanthus*

La purificación de ADN cromosómico a partir de las distintas cepas de *M. xanthus* proporciona una preparación de material genético necesaria para proceder a la digestión y análisis de cada una de estas muestras mediante Southern blot, confirmando de esta forma la identidad de los presuntos positivos aislados durante la obtención de mutantes de delección en fase o de fusiones *lacZ*. Este procedimiento se emplea igualmente para la obtención del material genético de partida para la construcción de una genoteca a partir del cromosoma de la bacteria *M. xanthus*. El aislamiento de ADN cromosómico a partir de esta mixobacteria se consiguió mediante la utilización del kit de purificación de ADN genómico de Promega.

En este sistema de extracción de ADN cromosómico, a partir de 1 ml de cultivo crecido en CTT líquido a una DO_{600} de 1, se rompieron las células sedimentadas por centrifugación con la solución de lisis proporcionada por el kit. Entonces, se procedió a la separación y purificación del ADN cromosómico, tras degradar el ARN con RNasa y eliminar las proteínas mediante precipitación, obteniendo una suspensión con el ADN genómico. El material genético obtenido se precipitó con isopropanol y fue lavado con etanol al 70%, para finalmente ser resuspendido en un volumen adecuado.

VI. 1. 2. ADN plasmídico

i) Preparación de ADN plasmídico de *E. coli*

La purificación de ADN plasmídico de *E. coli* se ha llevado a cabo con la finalidad de proceder al análisis de los plásmidos portados por los diferentes transformantes obtenidos durante el proceso de clonación, tratando de identificar entre ellos la construcción genética deseada. En el aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala se ha seguido el procedimiento propuesto por el kit de purificación de plásmidos *High Pure Plasmid Isolation Kit* de Roche.

En este proceso de extracción de ADN plasmídico, se recogieron las células crecidas a partir de LB sólido con antibiótico y se lisaron en un medio fuertemente alcalino para desnaturalizar el ADN genómico sin afectar al plásmido, neutralizando el medio al transcurrir 5 min. El material genético cromosómico precipitó y se eliminó al sedimentar por centrifugación, mientras que el ADN plasmídico permaneció soluble. Finalmente, el plásmido se purificó en una columna rellena con resina capaz de unirse a él de forma selectiva y se recuperó a partir de ella tras proceder a la elución del plásmido en condiciones adecuadas.

ii) Extracción de ADN plasmídico a partir de *S. cerevisiae*

La recuperación de ADN plasmídico de *S. cerevisiae* permite obtener los plásmidos contenidos en las cepas de levadura aisladas durante el rastreo con el sistema del doble híbrido de levadura. A partir de estas preparaciones, es posible proceder al análisis de las interacciones proteicas detectadas tras la secuenciación del plásmido aislado en cada caso. La extracción de ADN plasmídico a partir de levadura se ha llevado a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Robzyk y Kassir en 1992.

En este proceso de purificación de ADN plasmídico, en primer lugar, se recogieron las células de levadura mediante centrifugación a 5000 g durante 5 min a 4°C, a partir de un cultivo crecido durante una noche. La lisis de las levaduras se llevó a cabo una vez que las células se resuspendieron en 200 µl de STET y se sometieron a agitación vigorosa en el vortex durante 5 min con 0.2 g de bolas de vidrio de 0.45 mm, calentando finalmente las muestras a 100°C durante 3 min. El extracto de levadura resultante se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4°C, para eliminar los restos celulares de la muestra depositados en el sedimento.

A partir del sobrenadante, se eliminó el ADN cromosómico contaminante de la preparación mediante precipitación, tras incorporar 50 µl de 7.5 M de acetato amónico e incubar la muestra durante 1 h a -20°C. Por último, tras centrifugar en las condiciones anteriores, se recuperó el sobrenadante con el ADN plasmídico y se precipitó con etanol, resuspendiendo el precipitado en 20 µl de agua. A partir de esta preparación, se han empleado 10 µl de solución para transformar células competentes de la bacteria *E. coli* mediante choque térmico.

VI. 2. Amplificación de ADN por PCR

La amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa permite la producción de un elevado número de copias de una secuencia concreta, generadas por una ADN polimerasa termoestable a partir de un par de cebadores que flanquean la región de ADN molde a amplificar.

En la reacción de PCR, se ha empleado 15-30 ng de ADN molde que contiene la secuencia a amplificar, en forma de ADN cromosómico o plasmídico, junto con 100 pmoles de cada uno de los cebadores que delimitan esta secuencia. A partir de este sustrato cebado, se incorporaron a la reacción 2.5 unidades de la enzima Taq polimerasa, en presencia de tampón de la polimerasa y 1 mM de MgCl₂, junto con una mezcla de 0.2 mM de cada uno de los dNTPs. Por último, se le añadió DMSO a una concentración final del 10%, completando con agua MilliQ hasta un volumen final de reacción de 100 µl.

La reacción de PCR se ha llevado a cabo tras someter las muestras a 30 ciclos de amplificación en un termociclador MJ Mini de Bio-Rad. Cada ciclo está integrado por tres etapas secuenciales: desnaturalización del ADN molde, hibridación de los cebadores y elongación del sustrato cebado por la polimerasa por incorporación de los dNTPs. En cada reacción, la temperatura de hibridación se determina en función de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores. Por último, tras la amplificación, los productos de PCR se purificaron con el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* de Roche. A continuación, en la Tabla 3 se presentan las condiciones estándar para el desarrollo de una reacción de PCR:

FASE	CICLOS	CONDICIONES
DES NATURALIZACIÓN	1 ciclo	94° 10 min
AMPLIFICACIÓN -Desnaturalización -Hibridación -Elongación	30 ciclos	94° 1 min 45-65° 1 min 72° 2 min
ELONGACIÓN	1 ciclo	72° 12 min

Tabla 3. Condiciones estándar para la amplificación por PCR

VI. 3. Tratamiento enzimático del ADN

VI. 3. 1. Digestión del ADN

La digestión del ADN con endonucleasas de restricción de tipo II (Roche) rompen el material genético por secuencias diana específicas de tipo palindrómico. Estas enzimas cortan dentro de la secuencia que reconocen, generando extremos similares en cada caso, de tipo protuberante o romo. Los fragmentos digeridos con una misma enzima presentan extremos compatibles, lo que facilita la unión de ambas secuencias entre sí a través de estos extremos cohesivos.

La digestión sencilla del ADN con una única enzima de restricción se ha realizado mediante una reacción que incorpora 5-10 unidades de endonucleasa por cada microgramo de ADN sustrato, en el tampón adecuado para la enzima, suministrado por la casa comercial correspondiente. La digestión del ADN con dos enzimas de restricción distintas se ha llevado a cabo de forma simultánea en un tampón compatible para la actividad de ambas enzimas. Ante la imposibilidad de realizar la reacción de forma conjunta por incompatibilidad entre ambas, se ha digerido de forma secuencial con cada enzima, procediendo a precipitar y lavar el material genético entre ambas digestiones. En cualquier caso, cada reacción se incubó durante 2 h a la temperatura óptima de la enzima en un volumen final de 100 μ l, hasta completar la digestión.

VI. 3. 2. Desfosforilación del ADN

El tratamiento del ADN con fosfatasa alcalina de camarón (Fermentas) produce la hidrólisis de los grupos fosfato de los extremos 5' de los vectores de clonación digeridos con una única enzima de restricción, impidiendo su recircularización. La desfosforilación del ADN se ha llevado a cabo añadiendo al vector digerido 1 μ l de fosfatasa alcalina en tampón SAP suministrado por la casa comercial, incubando la reacción durante 10 min a 37°C, para posteriormente inactivar la enzima con calor a 65°C durante 20 min en un baño previamente calentado.

VI. 3. 3. Unión enzimática de fragmentos de ADN

La ligación de fragmentos de ADN catalizada por la enzima ADN ligasa procedente del bacteriófago T4 (Roche) une de forma covalente, mediante enlace fosfodiéster, los extremos compatibles de diferentes segmentos de ADN bicatenarios. Esta unión se puede establecer entre extremos protuberantes complementarios entre sí o bien entre extremos romos. Este proceso ha sido utilizado para la clonación de un fragmento de ADN en un vector, ambos digeridos con las mismas enzimas de restricción y que por tanto, disponen de extremos compatibles capaces de enlazarse entre sí a través de una reacción catalizada por la enzima ADN ligasa.

La ligación enzimática del ADN se ha llevado a cabo mediante una reacción que incorpora 20 ng de vector junto con 40 ng de fragmento a clonar, siguiendo una relación molar 1:2 para favorecer los choques intermoleculares entre ambos sustratos. A esta mezcla se le añadió 1 unidad de ADN ligasa de T4 en presencia de tampón de la ligasa, que contiene Mg^{2+} y ATP, necesarios para la actividad de la enzima. La incubación de la reacción se realizó a 16°C durante toda la noche en un volumen final de 20 μ l.

La mezcla de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* mediante transformación o electroporación, sembrando las células sobre un medio selectivo con el antibiótico correspondiente. El análisis de restricción de las preparaciones plasmídicas obtenidas, procedentes de las distintas colonias capaces de crecer sobre este medio selectivo, permitió seleccionar aquellos transformantes que portaban el vector con el inserto adecuado en cada caso.

VI. 4. Secuenciación automática del ADN

La secuenciación de fragmentos de ADN amplificados por PCR o clonados en un vector se ha realizado en el servicio técnico del departamento de Genética de la Universidad de Granada. Durante este procedimiento, se ha seguido el método de terminación de la síntesis de la cadena de ADN con didesoxiribonucleótidos (ddNTPs) marcados con fluorescencia, utilizando un protocolo adaptado a partir del procedimiento descrito por Sanger *et al.* (1977).

Para cada reacción de secuenciación, se han empleado de 250 a 500 ng de ADN puro como molde junto con unos 5 pmoles de cebador, en un volumen final de 20 μ l. La enzima empleada para la síntesis de ADN a partir del sustrato cebado ha sido la polimerasa termoestable Amplitaq FS, que es capaz de incorporar de forma eficiente los ddNTPs terminadores marcados con fluorescencia *BigDye*TM, suministrados a partir del kit de secuenciación de Perkin Elmer Biosystems. La reacción se lleva a cabo durante 25 a 50 ciclos de síntesis en el termociclador *PE 9600* de Perkin Elmer. El equipo empleado para el análisis de las muestras ha sido el secuenciador *ABI 373 XL Stretch DNA sequencer* de Applied Biosystems.

VI. 5. Electroforesis de ADN

La separación de fragmentos de ADN en función de su tamaño se ha conseguido mediante la aplicación de una técnica electroforética basada en la migración diferencial de estas moléculas durante el desplazamiento a través de una matriz polimérica por la acción de un campo eléctrico. Durante este estudio, se han realizado dos tipos de electroforesis de ADN diferentes, en gel de agarosa y en gel de poliacrilamida.

VI. 5. 1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa ha sido utilizada para la separación de fragmentos de ADN con un tamaño comprendido dentro de un rango establecido entre 0.5 kb hasta 25 kb. Este tipo de electroforesis se ha empleado de forma rutinaria como procedimiento analítico para comprobar la presencia de los fragmentos de ADN generados, bien como productos de la PCR, por digestión con enzimas de restricción o tras la purificación de ADN plasmídico o cromosómico.

En este tipo de electroforesis de ADN, se han utilizado geles que contiene una concentración de agarosa de 0.7%, preparada en tampón TAE 1x (ver C.III), con un grado de reticulación adecuado para conseguir una elevada resolución separativa. Antes de cargar las muestras en el gel, se les adicionó tampón de carga (ver C.III), con la finalidad de aportar densidad a la muestra e incorporar un colorante que permita seguir el curso de la electroforesis. El gel de agarosa se corrió a 100 voltios (V constante) durante unos 30 min en un sistema de electroforesis horizontal de tipo *Mupid-2* de Cosmo Bio Co. Ltd, relleno de tampón de electroforesis TAE 1x .

La tinción de los geles de agarosa se ha realizado con una solución de 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio preparada en TAE 1x durante 10 min. Este compuesto se intercala en el ADN, permitiendo la visualización de las distintas bandas electroforéticas gracias a la emisión de fluorescencia al ser excitado con luz ultravioleta. El tamaño de los fragmentos se

estimó por comparación con un marcador de peso molecular procedente del ADN del fago λ digerido con la enzima *HindIII* (*Molecular Weight Marker II* de Roche). La intensidad de luz emitida por el ADN teñido permite calcular la concentración de ADN contenida en cada banda electroforética por comparación con el estándar.

La electroforesis de ADN en gel de agarosa también se ha empleado como método preparativo para el aislamiento de fragmentos puros de ADN a partir de una mezcla compleja de material genético. Para ello, tras la separación de los fragmentos en un gel de agarosa, se procedió a recortar la porción de gel que contenía la banda de interés y a partir de ahí, se extrajo el fragmento de ADN incluido en el gel mediante electroelución. De esta forma, la pieza de gel se introdujo en una membrana de diálisis con TBE 0.5x (ver C.III) y se sometió a un campo eléctrico de 100 voltios durante 60 min en un tanque de electroforesis horizontal *Mupid-2*, relleno con tampón de electroforesis TBE 0.5x y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, el fragmento de ADN transferido a la solución se purificó con el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* de Roche.

VI. 5. 2. Electroforesis de ADN en geles de acrilamida

La electroforesis en geles de acrilamida ha sido empleada para la detección de fragmentos de ADN de tamaño inferior a 0.5 kb. Para ello, se han utilizado geles de acrilamida: bisacrilamida (29:1) al 5% en tampón TBE 0.5x. Tras polimerizar, el gel se corrió a 100 voltios (V constante) durante 30-60 min en un tanque de electroforesis vertical que contenía TBE 0.5x. La tinción de los geles de poli(acrilamida) se realizó igualmente con bromuro de etidio, como en el caso de los geles de agarosa. El tamaño de los fragmentos se determinó tomando como referencia el marcador de peso molecular *Molecular Weight Marker VIII* de Roche.

VII. Manipulación del ARN

VII. 1. Purificación preparativa de ARN de *M. xanthus*

La obtención de una preparación de ARN celular, a partir de la purificación de una muestra de ARN total de *M. xanthus*, ha permitido llevar a cabo el análisis de coexpresión de la quinasa dentro de una unidad transcripcional mediante la técnica de RT-PCR. El aislamiento del ARN total de *M. xanthus* se realizó con ayuda del kit de purificación de ARN *High Pure RNA Isolation* de Roche. El ARN celular es degradado con facilidad en presencia de RNasas contaminantes, por lo que tanto el material como las soluciones utilizadas durante el aislamiento del ARN fueron tratadas de forma previa con un inhibidor de RNasas, el dietilpírocarbonato (DEPC) al 0.1% (v/v).

Para extraer el ARN celular, la estirpe silvestre de la bacteria *M. xanthus* se cultivó en medio CTT líquido hasta alcanzar una DO_{600} de 1, se recogieron las células mediante sedimentación por centrifugación de 3 ml de cultivo a 10000 g durante 10 min a temperatura ambiente y se lavaron con tampón TM (ver C.III). El precipitado celular obtenido se lisó en un medio fuertemente desnaturante en presencia de sales de guanidinio y Tritón X-100, y entonces se procedió a degradar el ADN genómico contaminante con DNasa libre de RNasas. Finalmente, el ARN celular se purificó en una columna que contenía una matriz capaz de unir el ARN de forma selectiva, y se eluyó en un volumen de 50 μ l con agua libre de RNasas.

VII. 2. RT-PCR

La técnica de RT-PCR permite generar un ADN complementario (ADNc) de doble cadena a partir de un ARNm molde, gracias a la actividad de la enzima transcriptasa inversa o reversa (RT). Este proceso implica la síntesis de una cadena de ADN, por elongación de un cebador reverso unido al ARNm molde, mediante la actividad polimerasa dependiente de ARN de la enzima RT. En una segunda etapa, se lleva a cabo la síntesis de la otra cadena de ADN a partir de la cadena de ADN recién sintetizada, gracias a la actividad polimerasa dependiente de ADN de la enzima RT, dando lugar a una copia del ADNc de doble cadena que puede ser amplificado por PCR.

En la reacción de retrotranscripción, se mezclaron 5 μ l de ARN purificado con 2 pmol del cebador reverso y 0.5 mM de cada uno de los dNTPs. Esta mezcla se calentó a 65°C durante 5 min y se enfrió otros 5 min en hielo. Transcurrido este tiempo, se añadió el tampón de la enzima RT 1x y DTT a 10 mM y se volvió a calentar a 42°C durante 2 min. Finalmente, se incorporó 1 μ l de la enzima SuperScript II RNasa H Reverse Transcriptase de Invitrogen y se incubó la reacción a 42°C durante 50 min. Una vez obtenido el ADNc, la enzima se inactivó por calentamiento de la muestra a 70°C durante 15 min. Posteriormente, la amplificación por PCR se llevó a cabo empleando los cebadores adecuados a partir de 2 μ l de ADNc molde, procedente de la reacción de retrotranscripción, siguiendo el protocolo descrito en la sección “Amplificación de ADN por PCR” (ver C.VI.2).

VIII. Transferencia de ADN

VIII. 1. Transferencia de ADN a *M. xanthus*

La transferencia de ADN a *M. xanthus* se realizó siguiendo la técnica de electroporación descrito por Kashefi y Hartzell, 1995. Este proceso consiste en la aplicación de un pulso eléctrico a elevado voltaje sobre células electrocompetentes de *M. xanthus*, para así generar poros sobre las cubiertas celulares que facilitan la captación del ADN extracelular por la bacteria.

Las células electrocompetentes de *M. xanthus* se prepararon a partir de la muestra obtenida por centrifugación de 1.5 ml de cultivo crecido a una $DO_{600} = 0.5-0.6$ en medio líquido CTT a 10000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. El precipitado celular se lavó dos veces con 1 ml de agua MilliQ estéril, y a continuación las bacterias se resuspendieron en 50 μ l de agua y se dispersaron mediante agitación con el vortex durante 1 min. Finalmente, se obtuvo una suspensión concentrada de células electrocompetentes de la bacteria *M. xanthus* a una densidad celular en torno a 1.5×10^{10} células/ml.

En el proceso de electroporación, se añadió 1 μ g de la muestra de ADN plasmídico dializada a la preparación de células electrocompetentes. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 1 mm de ancho de Bio-Rad y se sometió a un pulso eléctrico (0.65kV, 200 Ω y 25 μ F) con el electroporador GenePulser Xcell de Bio-Rad durante 5-10 mseg, para promover la captación del plásmido por la bacteria. Justo después de aplicar la descarga eléctrica, se añadió 1 ml de CTT líquido a la cubeta, se mezcló de forma adecuada y el contenido se transfirió a un tubo con 1.5 ml de CTT líquido. Las células fueron cultivadas durante 6 a 8 h a 30°C y 300 rpm de agitación para permitir la expresión del marcador presente en el ADN incorporado.

Por último, distintos volúmenes celulares se mezclaron con 4.5 ml de CTT blando y se sembraron sobre medio sólido CTT con kanamicina, incubando las placas a 30°C hasta la aparición de colonias. Una vez introducido el plásmido en *M. xanthus*, éste se integra mediante recombinación homóloga en el cromosoma, puesto que el vector es incapaz de replicarse de forma autónoma en la mixobacteria.

VIII. 2. Transferencia de ADN a *E. coli*

La transferencia de ADN a células de *E. coli* permite incorporar a esta bacteria las construcciones genéticas obtenidas como resultado de la inserción de un fragmento de ADN sobre un vector apropiado durante el proceso de clonación. La captación de ADN exógeno por células de *E. coli* se realiza mediante dos procedimientos distintos, la transformación por choque térmico y la electroporación. Al recibir el plásmido a partir de una mezcla de ligación, la bacteria adquiere la capacidad de crecer en un medio selectivo con antibiótico, de forma que el análisis posterior de los clones obtenidos sobre este medio permitirá identificar la presencia de aquellos transformantes que contienen el plásmido con el inserto adecuado en su interior.

VIII. 2. 1. Transformación de *E. coli*

La transformación de *E. coli* tiene lugar sometiendo a células competentes de esta bacteria a un choque térmico que permite al ADN extracelular atravesar las cubiertas celulares. Puesto que las células de *E. coli* no captan ADN libre de forma natural, previamente se preparan células competentes mediante el tratamiento de esta bacteria con CaCl₂, con el objetivo de permeabilizar la pared bacteriana para facilitar la incorporación de ADN del medio extracelular.

La preparación de células competentes tiene lugar a partir de un cultivo de *E. coli* en fase exponencial de crecimiento (DO₆₀₀ = 0.5-1). En primer lugar, las células se recogieron por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 1 volumen de 10 mM MgSO₄, permaneciendo la suspensión durante 15 min en hielo, antes de ser centrifugadas de nuevo en las mismas condiciones. En ese momento, las células se incubaron con 0.5 volúmenes de 50 mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl (pH 8) durante otros 15 min en hielo. Finalmente, las células recuperadas por centrifugación se resuspendieron en 0.05 volúmenes de 50 mM CaCl₂, 10mM Tris-HCl (pH 8) y 20% glicerol, y se repartieron en alícuotas de 100 µl que se conservaron a -80°C hasta ser utilizadas.

En el proceso de transformación, se mezclaron 50 µl de células competentes de *E. coli* con 1-10 ng de ADN plasmídico, manteniendo la preparación durante 30 min en hielo. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico a una temperatura de 42°C durante 2 min en un baño y entonces, se añadió 0.5 ml de SOC líquido. En este medio de cultivo, las células se incubaron 1 h a 37°C con 200 rpm de agitación para que las bacterias recuperaran la actividad metabólica, comenzando a expresar el carácter de resistencia al antibiótico conferido por el plásmido. Por último, las células se sembraron en medio sólido LB suplementado con el antibiótico adecuado y se incubaron a 37°C durante una noche, hasta la aparición de transformantes sobre este medio selectivo.

VIII. 2. 2. Electroporación de *E. coli*

La electroporación de *E. coli* tiene lugar sometiendo a células electrocompetentes de esta bacteria a una descarga eléctrica de elevado voltaje durante un breve espacio de tiempo. Este proceso tiene una elevada eficiencia de captación de ADN en comparación con la transformación, obteniendo un gran número de transformantes.

La preparación de células electrocompetentes se ha llevado a cabo a partir de un cultivo de *E. coli* en fase exponencial de crecimiento ($DO_{600} = 0.5-1$), mediante el lavado sucesivo de las células con agua MilliQ estéril helada, para eliminar las sales de la suspensión celular. Tras cada proceso de lavado, las células fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 15 min a 4°C y finalmente, se resuspendieron en 0.002 volúmenes de glicerol estéril al 10% (p/v), permaneciendo conservadas a -80°C en alícuotas de 100 μ l.

En el proceso de electroporación, se mezclaron 50 μ l de células de *E. coli* electrocompetentes con 1 μ g de ADN plasmídico dializado. La mezcla obtenida se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm de ancho de Bio-Rad y se aplicó un pulso eléctrico (2.5 kV, 129 Ω) durante 5-10 mseg en el electroporador GenePulser Xcell de Bio-Rad, para que las células incorporaran el plásmido. Tras la descarga eléctrica, se añadió 1 ml de LB líquido, se recrecieron las células durante 1 h a 37°C con 200 rpm de agitación y se sembraron finalmente sobre medio sólido LB suplementado con el antibiótico adecuado, incubando las placas a 37°C durante una noche.

VIII. 3. Transferencia de ADN a *S. cerevisiae*

La transferencia de ADN a la levadura *S. cerevisiae* durante el rastreo e identificación de proteínas capaces de contactar con la quinasa PksA en el sistema del doble híbrido de levadura, conlleva la incorporación a una misma estirpe de los plásmidos cebo y presa necesarios para el análisis de interacción proteína-proteína. Durante este estudio se ha empleado la técnica de transformación de células competentes de levadura con acetato de litio (LiAc) por choque térmico como sistema de transferencia de ADN exógeno.

La preparación de células competentes de levadura se realizó tomando como muestra de partida un cultivo de *S. cerevisiae* crecido hasta una DO_{600} de 0.5 a 0.7. Las células se recogieron por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min a 4°C y se lavaron con 0.5 volúmenes de agua estéril, de forma que tras eliminar toda el agua posible, las células se resuspendieron en 0.05 volúmenes de 1x LiAc-TE-agua (1v/1v/8v) recién preparado y se mantuvieron en hielo hasta ser empleadas.

Durante la transformación, se mezclaron 50 μ l de células competentes de levadura con 1 μ g de ADN plasmídico, en presencia de 50 μ g de ADN portador de arenque (BD Biosciences) desnaturalizado, recién hervido durante 10 min. A esta mezcla, se le incorporaron 300 μ l de 1x LiAc-TE-PEG (polietilenglicol) (1v/1v/8v) recién preparado y se incubaron con agitación a 200 rpm durante 30 min a una temperatura de 30°C. Por último, a cada muestra se le añadió DMSO al 10% y se sometió a un choque térmico a una temperatura de 42°C durante 10 min en un baño, transfiriendo posteriormente las muestras a hielo durante otros 10 min adicionales. Una vez completada la transferencia, las células se sembraron en placas de medio mínimo adecuado para seleccionar la incorporación del plásmido y se incubaron a 30°C durante 48 h hasta la aparición de colonias de levadura.

IX. Hibridación de ácidos nucleicos

Esta técnica ha sido empleada para la detección de secuencias de ADN específicas, mediante la unión de sondas marcadas a fragmentos de ADN genómico complementarios fijados sobre un soporte sólido. Este método permite determinar la organización de los genes en el genoma de una estirpe bacteriana concreta mediante el mapeo de los sitios de restricción situados en torno a los fragmentos de ADN genómico detectados. De igual forma, se ha utilizado para detectar la presencia de determinados genes en el rastreo de una población formada por distintas cepas bacterianas mediante la técnica de hibridación de colonias. La ejecución de esta técnica requiere varios pasos: transferencia del ADN a un filtro, marcaje de la sonda de ADN con DIG dUTP, hibridación con la sonda marcada y revelado para la detección de las bandas específicas.

IX. 1. Transferencia del ADN a filtros de *Hybond-N⁺*

La transferencia del ADN a un soporte sólido es necesaria para la fijación de los fragmentos de ADN desnaturalizados a una posición concreta que permita relacionar una señal positiva durante la hibridación con un fragmento de ADN concreto. La disposición del ADN de partida determina el requerimiento de distintos métodos de transferencia:

IX. 1. 1. Transferencia de ADN a partir de colonias bacterianas (hibridación de colonias)

La hibridación de colonias ha sido utilizada en el rastreo de un elevado número de colonias de *E. coli* obtenidas por transformación durante la clonación de un fragmento de ADN, con el objetivo de determinar aquellas colonias que contenían la secuencia de ADN deseada. En este método, las colonias se siembran sobre un filtro cuadrulado circular de *Hybond-N⁺* situado sobre una placa de medio sólido LB suplementada con el antibiótico adecuado, y en paralelo se pican en el mismo orden sobre una placa madre. En ambos casos, se obtuvieron colonias tras incubar las placas a 37°C durante una noche, reservando la placa madre en frío a 4°C para la posterior recuperación de las colonias positivas detectadas.

El filtro portador de las colonias fue tratado dos veces con solución de desnaturalización de ADN (ver C.III) durante 3 min para llevar a cabo la lisis celular así como la separación de las cadenas de ADN. Un vez que se completa la desnaturalización, el filtro se trata dos veces durante 5 min con solución de neutralización de ADN para hibridación de colonias (ver C.III). Para el desarrollo de este procedimiento, el filtro se coloca sobre papel de Whatman 3MM humedecido con cada una de las soluciones, sin agitación y a temperatura ambiente. Por último, la membrana se sumerge en 2x SSC (ver C.III), se seca y se calienta a 80°C durante 2 h para la fijación del ADN.

IX. 1. 2. Transferencia de ADN a partir de un gel de agarosa: Southern blot

El Southern blot se realizó siguiendo la técnica descrita por Southern (1975) basada en la transferencia de ADN desnaturalizado desde un gel de agarosa a una membrana. En esta técnica, el ADN cromosómico se digirió con una endonucleasa de restricción adecuada generando una mezcla de fragmentos de ADN de distinto tamaño. Estos fragmentos de restricción se separaron mediante electroforesis en un gel preparativo de agarosa al 0.7% corrido a bajo voltaje para optimizar la eficiencia de separación. Seguidamente, el gel fue teñido con bromuro de etidio, identificando la posición de los pesos moleculares del estándar con una regla calibrada para su comparación con las bandas detectadas en el filtro.

A continuación, los fragmentos de material genético a transferir fueron desnaturalizados en el propio gel para que, al alcanzar el filtro, se encontraran accesibles a la sonda en forma monocatenaria. Para ello, de forma previa, el gel se sumergió 3 min en 200 ml de solución de despurinación, fragmentando el ADN mediante despurinación parcial con ácido diluido. Tras lavar con agua MilliQ, el gel fue tratado dos veces con 200 ml de solución de desnaturalización durante 15 min, dando lugar a una ruptura alcalina de la doble hélice, originando dos cadenas de ADN monocatenarias. Entonces, tras otro lavado con agua MilliQ, el gel se sumergió en 200 ml de solución de neutralización durante 30 min para recuperar el pH de forma rápida impidiendo la renaturalización del ADN. La composición de todas las soluciones empleadas para la transferencia se muestran en la sección C.III. Trascorrida esta incubación, el gel se enjuagó con agua MilliQ y se transfirió a 2x SSC.

La transferencia del ADN desde el gel de agarosa a la membrana de *Hybond-N⁺* se realizó por capilaridad. Para ello, el gel se colocó sobre tres papeles de filtro Whatman 3MM humedecidos en 20x SSC en contacto con un tampón compuesto por solución de transferencia 20x SSC contenida en una bandeja. Sobre el gel se situó en contacto directo la membrana previamente sumergida en 2x SSC. Encima de la membrana, se situaron otros tres papeles de filtro Whatman 3MM empapados en 2x SSC y por último se depositó una pila de servilletas de papel secas comprimidas por un peso, renovadas de forma periódica a medida que quedaron empapadas con la solución de transferencia.

La transferencia del ADN desnaturalizado se produjo por el flujo capilar de la solución de transferencia, impulsada por la acción absorbente de la pila de papeles secos que arrastra los fragmentos de ADN desde el gel hasta el filtro, en donde quedan retenidos ocupando la misma posición que presentaban en el gel. Este proceso se prolongó durante una noche con la finalidad de completar la transferencia del material genético, y entonces, se procedió al lavado del filtro con 200 ml de 2x SSC durante 10 min en agitación. Por último, tras secar la membrana, se fijó el ADN al filtro mediante el calentamiento de la membrana a 80°C durante 2 h.

IX. 2. Marcaje de la sonda de ADN con DIG (digoxigenina) dUTP

El marcaje de la sonda tiene lugar una vez que el fragmento de ADN a marcar, en forma desnaturalizada, es empleado como molde por la polimerasa de Klenow, sintetizando la cadena complementaria a partir de los hexanucleótidos unidos de forma aleatoria al molde. Esta polimerasa rellena los huecos a partir de la mezcla de dNTPs con el DIG-11-dUTP, de manera que incorpora este nucleótido marcado con digoxigenina cada 20-25 dNTPs en el ADN sintetizado.

El marcaje de fragmentos de ADN se realizó siguiendo el procedimiento descrito por el kit *DIG DNA Labeling and Detection Kit* de Roche. Para ello, se incorporaron de 0.1 a 1 µg del fragmento de ADN desnaturalizado de forma previa junto con 2 µl de hexanucleótidos, 2 µl de la mezcla de dNTPs con DIG-11-dUTP y finalmente, 1 µl de polimerasa Klenow (2 unidades). La reacción de marcaje transcurrió durante 2-4 h a 37°C y se detuvo al adicionar 2 µl de 0.2 M EDTA (pH 8). Por último, el ADN marcado con digoxigenina, tras ser precipitado a -80°C durante 30 min con 2 µl de 4 M LiCl y 60 µl de etanol, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en un volumen final de 50 µl de agua MilliQ estéril.

IX. 3. Hibridación de la membrana con la sonda marcada

Una vez que el ADN de cadena sencilla se fija al filtro, se preparó la membrana para la hibridación de la sonda mediante el bloqueo de todos los sitios de unión inespecíficos de la sonda al filtro a través de un tratamiento de prehibridación de la membrana. Tras este proceso, se llevó a cabo la hibridación de la membrana con la sonda marcada en forma desnaturalizada, permitiendo la unión selectiva de la sonda a fragmentos de ADN cromosómico complementarios.

En el proceso de hibridación, en primer lugar el filtro fue incubado con solución de prehibridación (0.2 ml/cm²) a 42°C durante 2-4 h en un horno de hibridación con agitación suave. Transcurrido este tiempo, se eliminó la solución de prehibridación y se adicionó la solución de hibridación (0.04 ml/cm²) con la sonda marcada, manteniendo la hibridación a 42°C toda la noche en el mismo horno de hibridación. Las soluciones de prehibridación e hibridación son idénticas, empleando en ambos casos la solución *Dig Easy Hyb* de Roche (ver C.III), con la diferencia de que la solución de hibridación contiene la sonda adecuada.

La sonda marcada con digoxigenina, en forma de DIG dUTP, se adiciona durante la hibridación a una concentración de 5 a 25 ng por ml de solución. La sonda se desnaturalizó de forma previa antes de ser incorporada a la solución de hibridación mediante calentamiento a 94°C durante 10 min, generando ADN de cadena sencilla capaz de reconocer el material genético inmovilizado a la membrana de forma específica. Tras la hibridación, la sonda libre restante se eliminó mediante el lavado del filtro dos veces durante 5 min con solución de equilibrado I y otras dos veces más con solución de equilibrado II durante 15 min cada una.

IX. 4. Revelado mediante detección con fosfatasa alcalina

El revelado del filtro se ha realizado mediante la detección inmunológica de los fragmentos de ADN donde se había enlazado la sonda marcada con digoxigenina en forma de DIG dUTP. El anticuerpo (Ac) que reconoce a la digoxigenina se encuentra asociado con la enzima fosfatasa alcalina, cuya actividad genera un producto coloreado que permite visualizar las bandas que quedaron marcadas por la sonda. El procedimiento de revelado se realizó siguiendo el protocolo *DIG DNA Labeling and Detection Kit* de Roche.

En este proceso, la membrana tras ser enjuagada 5 min en 100 ml de tampón de lavado (ver C.III), se incubó con 100 ml de solución de bloqueo (ver C.III) durante 30 min en agitación. A continuación, el filtro se pone en contacto con el Ac policlonal anti-DIG-AP conjugado con fosfatasa alcalina, tras la incorporación de 50 ml de 1x solución de bloqueo a la que se había añadido 5 µl del Ac (dilución 1:10000). De este modo, la membrana fue incubada durante 30 min en agitación para permitir el anclaje del Ac sobre la sonda marcada en el filtro, para ser posteriormente lavada dos veces durante 15 min con 100 ml de tampón de lavado con la finalidad de eliminar el exceso de Ac libre.

Entonces, el filtro fue equilibrado durante 5 min en 20 ml de tampón de detección (ver C.III) y se introdujo en una bolsa de plástico sellada que contenía solución de desarrollo de color, formada por 10 ml de tampón de detección con 0.2 ml del sustrato NBT/BCIP. En estas condiciones, la fosfatasa alcalina hidroliza el BCIP para generar un compuesto que se oxida en presencia de NBT, originando un producto de color morado. La reacción fue incubada en oscuridad hasta la aparición de bandas coloreada que indicaran la posición de la sonda unida a la secuencia específica en el filtro hasta alcanzar la tonalidad adecuada.

X. Técnicas para el estudio de proteínas

X. 1. Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de SDS-PAGE

La separación de las proteínas presentes en un extracto, en función de su masa molecular, se realizó mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida-SDS. Este tipo de geles se originan a partir de la polimerización de monómeros de acrilamida, generando cadenas lineales entrecruzadas entre sí por monómeros de bisacrilamida. En estos geles, el detergente SDS actúa como agente desnaturizante capaz de unirse a las proteínas en una cantidad proporcional al tamaño de cada proteína. Por tanto, las proteínas presentan una movilidad electroforética que depende tan sólo de su masa molecular, de forma que el desplazamiento en el gel de poliacrilamida-SDS se reduce a medida que se incrementa el peso molecular de la proteína, debido al tamizado del gel.

X. 1. 1. Preparación y corrida de geles SDS-PAGE

Se ha empleado un sistema discontinuo de geles desnaturizantes de SDS-PAGE compuesto por dos porciones de gel diferentes dispuestos de forma secuencial uno sobre otro. La porción inferior, formada por un gel separador o de resolución, con una elevada proporción de acrilamida, presenta poros de tamaño restrictivo capaces de separar las proteínas en función de su masa molecular. En cambio, la porción superior conocida como gel concentrador o condensador contiene una proporción inferior de acrilamida, dando lugar a poros de tamaño grande para el empaquetamiento progresivo de las proteínas en este gel, esencial para obtener una adecuada resolución posterior. En este estudio, los geles de SDS-PAGE utilizados para el análisis de proteínas constaban de un gel separador con un 17.5% de acrilamida junto con un gel concentrador con 5% de acrilamida (ver Tabla 4).

COMPONENTES	GEL SEPARADOR (ml)	GEL CONCENTRADOR (ml)
30% acrilamida	11.7	1.67
1% bisacrilamida	1.47	1.30
1M Tris-HCl	6.7 (pH 8.7)	0.62 (pH 6.8)
10% SDS	0.2	0.1
Agua bidestilada	0	6.28
10% persulfato amónico	0.067	0.05
TEMED	0.0067	0.005
Volumen final	20 ml	10 ml

Tabla 4. Composición de los geles separador y concentrador empleados para la electroforesis SDS-PAGE

Para la preparación de los geles SDS-PAGE, en primer lugar se vertió el gel separador y se recubrió con una capa de agua MilliQ para que el menisco superior quedara convexo. Tras la polimerización de esta porción inferior, se retiró el agua y se vertió el gel concentrador a la vez que se colocó el peine con los pocillos. Una vez que polimerizó, se retiró el peine y el gel SDS-PAGE se transfirió a un tanque de electroforesis vertical relleno de tampón de carrera (ver C.III). Las muestras proteicas se mezclaron con un volumen de tampón de carga 2x (ver C.III) y se calentaron durante 10 min a 100°C antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se desarrolló a una intensidad constante de 30 mA durante unos 120-180 min, hasta que el marcador comenzó a salir por la zona inferior del gel.

X. 1. 2. Tinción de geles SDS-PAGE con azul Coomassie

La tinción de los geles SDS-PAGE se ha llevado a cabo mediante el empleo del colorante azul Coomassie. Este compuesto porta grupos con carga eléctrica capaces de establecer interacciones electrostáticas con las proteínas, formando complejos fuertes de tipo no covalente. La intensidad de color exhibida por las bandas teñidas con azul Coomassie en un gel SDS-PAGE es proporcional a la cantidad de proteína presente en el gel. Las distintas soluciones de tinción contienen este colorante al 0.003% (p/v) disuelto en una mezcla de isopropanol/acético/agua en distinta proporción. La composición de cada una de las soluciones empleadas durante el proceso de tinción se muestra en la Tabla 5. De forma básica, durante el proceso de tinción, el gel se incubó de forma secuencial con la solución de tinción I, luego con la II y por último con la III durante al menos 8 h en agitación a temperatura ambiente. Por último, se transfirió el gel a la solución de decoloración hasta eliminar el fondo azulado del gel provocado por el exceso de colorante.

Componentes	Tinción I	Tinción II	Tinción III	Destinción
Isopropanol	25%	10%	0%	0%
Ac. Acético Glacial	10%	10%	10%	10%
Agua MilliQ	65%	80%	90%	90%
Azul Comassie	0.003%	0.003%	0.003%	0%

Tabla 5. Composición de las soluciones empleadas para la tinción de los geles de proteínas SDS-PAGE.

X. 2. Expresión y purificación de proteínas

La expresión heteróloga de proteínas recombinantes en *E. coli* llevada a efecto durante este estudio permite alcanzar un elevado nivel de síntesis de la proteína deseada, mediante el empleo de un sistema de expresión basado en vectores de la serie pET, en donde el gen de interés se sitúa bajo el control de un promotor fuerte dependiente de la polimerasa de T7 y regulado por la presencia del inductor IPTG.

X. 2. 1. Inducción de proteínas recombinantes

La inducción de la síntesis proteica requiere de la transformación previa de la estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) con el vector de expresión pET adecuado, de forma que tras la transformación, las bacterias se sembraron en medio sólido LB con antibiótico y se incubaron a 37°C durante toda la noche. A partir de las colonias resultantes, se seleccionaron una o varias de estas colonias para ser cultivadas en 3 ml de medio líquido LB con antibiótico a 225 rpm de agitación y 37°C de temperatura, hasta alcanzar una DO₆₀₀ de al menos 0.5. Este cultivo se ha empleado como preinóculo para el crecimiento de la bacteria en matraces con 100 ml de medio líquido LB con antibiótico, incubados en condiciones similares a la anterior, hasta alcanzar una DO₆₀₀ comprendida entre 0.5 y 1. En este cultivo de *E. coli* en crecimiento, la inducción de la expresión se obtuvo mediante la incorporación de 1 mM de IPTG al medio, incubando el cultivo durante el tiempo y la temperatura adecuadas, de acuerdo con las condiciones óptimas de expresión establecidas.

X. 2. 2. Preparación de los extractos proteicos crudos

Para la purificación de la proteína recombinante, se procesó en torno a un litro de cultivo inducido como muestra de partida para obtener un rendimiento adecuado de proteína. A partir de cada cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) inducido con IPTG, las células se recolectaron por centrifugación a 10000 g durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en tampón fosfato 1x (ver C.III), a razón de 2-10 ml por gramo de células obtenidas. Las bacterias se rompieron para generar un lisado celular, tras ser incubadas durante 15 min a 30°C en presencia de 0.1 mg/ml de lisozima, y seguidamente se sonicaron durante 5 min en pulsos de 30 seg, manteniendo siempre las muestras en hielo. La proteólisis de las proteínas expresadas se inhibió mediante la incorporación de 1 mM de PMSF y 1 mM de benzamidina justo antes de llevar a cabo la lisis celular. Tras este proceso, se obtuvo un extracto proteico crudo formado por una mezcla de proteínas celulares entre las que se encuentra la proteína inducida.

X. 2. 3. Separación de las fracciones celulares

Las distintas fracciones celulares se obtuvieron mediante centrifugación del lisado bacteriano a 14000 g durante 15 min, dando lugar a un sedimento formado por el material insoluble, mientras que el sobrenadante correspondía con la fracción soluble. Tras la separación de ambas fracciones, se recuperó la fracción soluble a partir del sobrenadante y se reservó en frío hasta proceder a la purificación de la proteína a partir de esta fracción mediante cromatografía de afinidad. Sin embargo, en ocasiones la totalidad de la proteína se encontraba en forma insoluble, por lo que en este caso, se procedió a purificar los cuerpos de inclusión de la fracción insoluble, solubilizando la proteína a partir de los cuerpos de inclusión aislados.

X. 2. 4. Purificación y solubilización de cuerpos de inclusión

La purificación de los cuerpos de inclusión se ha realizado mediante el lavado de la fracción insoluble con una solución de lavado constituida por tampón fosfato 1x con 10 mM de EDTA y 1% del detergente Tritón X-100. Tras la resuspensión en este tampón, la muestra fue centrifugada a 10000 g durante 10 min a 4°C para eliminar las impurezas del sobrenadante. Este proceso de lavado se repite otras dos veces, empleando en cada caso 0.1 volúmenes de solución respecto al volumen del cultivo de partida.

La solubilización de los cuerpos de inclusión se llevó a cabo en presencia de urea, debido a su capacidad para actuar a elevada concentración como un agente desnaturante de proteínas. Por tanto, los cuerpos de inclusión se resuspendieron en 10 ml de solución de solubilización, que consta de tampón fosfato 1x junto con 1 mM de β -mercaptoetanol y 8 M de urea. La muestra fue incubada durante 2 h a temperatura ambiente, sin agitación o con agitación muy suave, hasta completar la solubilización de la proteína recombinante a partir de los cuerpos de inclusión. Entonces, la preparación se sometió a centrifugación a 27500 g (máxima velocidad) durante 30 min a 4°C, con la finalidad de eliminar de la suspensión los cuerpos de inclusión residuales que podrían actuar como núcleo de agregación para la proteína. Tras esta centrifugación, la proteína desnaturada, situada en el sobrenadante ya en forma soluble, se conservó en frío hasta su purificación por cromatografía de afinidad.

X. 2. 5. Purificación por cromatografía de afinidad

La purificación de la proteína recombinante se ha realizado por cromatografía de afinidad en una columna cromatográfica suministrada por el kit *HisTrap Kit* de Amersham. Esta columna porta cationes metálicos de níquel Ni^{2+} capaces de retener de forma selectiva a proteínas portadoras de colas de histidina, como ocurre con las proteínas expresadas durante este estudio a partir de los vectores de tipo pET. La capacidad de unión de estas proteínas a la columna depende de la concentración de imidazol, quedando retenidas a concentraciones bajas para después ser eluidas con altas concentraciones del compuesto.

La muestra de partida se pasó a través de un filtro de 0.45 μm de Millipore que retiene y elimina el material particulado del extracto proteico y se le adicionó 20 mM de imidazol, para bloquear la unión inespecífica de proteínas a la columna. Tras equilibrar la columna en solución de unión, se inyectó la muestra a través de la columna cromatográfica, quedando retenida la proteína recombinante. Entonces, se lavó la columna de nuevo con solución de unión y se procedió a eluir la proteína de forma secuencial mediante el empleo de soluciones que presentan concentraciones crecientes de imidazol (40 mM, 60 mM, 100 mM, 300 mM y 500 mM) preparadas en tampón fosfato 1x (ver C.III). La presencia de las proteínas purificadas en las diferentes fracciones de elución se analizó mediante SDS-PAGE.

X. 2. 6. Renaturalización de las proteínas purificadas

Mientras que las proteínas purificadas en su forma nativa soluble pudieron ser empleadas directamente en los distintos ensayos de actividad realizados, en el caso de las preparaciones sometidas a desnaturalización fue necesario proceder a renaturalizar la proteína en condiciones adecuadas.

Este proceso se realizó mediante diálisis secuencial de la muestra en una membrana de diálisis sumergida en distintas soluciones de renaturalización (ver C.III) con concentraciones decrecientes de urea, durante al menos 3 h con agitación suave y en frío. Tras este tratamiento, la muestra fue equilibrada durante toda la noche con solución de renaturalización carente de urea y EDTA, igualmente con agitación suave y en frío. Este proceso permite eliminar de forma progresiva la urea de la muestra, promoviendo un plegamiento correcto de la proteína en presencia de aditivos que favorecen la renaturalización. Por último, la muestra se centrifugó 12000 g durante 15 min a 4°C, para eliminar los agregados proteicos precipitados durante la diálisis, a la vez que se obtiene una preparación con las proteínas renaturalizadas.

X. 3. Detección de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes expresadas a partir del vector pET-28a portan una cola de histidina en la región C-terminal, lo que permite la detección de la proteína mediante el empleo de anticuerpos específicos Anti-His. Para ello, las proteínas se transfirieron a un soporte sólido a partir de un gel SDS-PAGE mediante Western blot (Burnette, 1981), para realizar la inmunodetección de la proteína quinasa por colorimetría.

X. 3. 1. Transferencia de proteínas a membranas: Western blot

Las proteínas separadas mediante electroforesis en un gel SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF (difluoropolivinilideno) Immobilon-P de Millipore. Para ello, de forma previa, el gel de proteínas se incubó con solución de transferencia (ver C.III) durante 30 min en agitación, mientras que el filtro de PVDF, tras ser sumergido en metanol absoluto y lavado con agua MilliQ durante 2 min, se pasó igualmente a solución de transferencia durante 5 min en agitación.

El desplazamiento de las proteínas desde el gel al filtro se realizó mediante un sistema de electrotransferencia, basado en la aplicación de un campo eléctrico generado por el equipo de transferencia *Fastblot fast semi-dry blotting* de Biometra. En este aparato, la membrana de PVDF se colocó encima de cuatro papeles de filtro Whatman 3MM humedecidos en solución de transferencia, situados sobre la placa con carga positiva (ánodo). A continuación, en contacto con el filtro, se depositó el gel de proteínas y sobre él otros cuatro papeles de filtro Whatman 3MM empapados en solución de transferencia, bajo la placa con carga negativa (cátodo). La transferencia se realizó a una intensidad eléctrica de 0.8 mA/cm² durante 90 min. Tras este tiempo, la membrana fue lavada en solución de transferencia durante 5 min con agitación.

La eficiencia de transferencia de las proteínas al filtro se comprobó mediante la tinción de la membrana de PVDF con una solución de Rojo Ponceau al 5% y ácido acético al 1% durante 1 min. Tras retirar la solución de tinción, la membrana fue lavada con agua MilliQ hasta visualizar las proteínas en la membrana, anotando la posición de las proteínas del estándar sobre el filtro. Por último, para desteñir la membrana, se empleó una solución de 0.1 N NaOH.

X. 3. 2. Inmunodetección

Una vez realizada la transferencia, la membrana fue bloqueada en tampón PBS, con leche desnatada al 5% como agente bloqueante y azida sódica al 0.02%. El filtro se mantuvo en esta solución de bloqueo en agitación durante 12 h a 4°C o bien durante 2 h a temperatura ambiente y a continuación, la membrana fue lavada tres veces durante 5 min en solución de lavado TBST 1x (ver C.III).

Entonces, el filtro se puso en contacto con el Ac anti-His-AP de unión a colas de histidina conjugado con fosfatasa alcalina, tras la incorporación de 20 ml de TBST 1x y leche desnatada al 1%, con 10 µl del Ac (dilución 1:2000). De este modo, la membrana fue incubada a temperatura ambiente durante 2 h con agitación vigorosa, para permitir el reconocimiento de la proteína recombinante por el Ac en el filtro. El exceso de Ac libre se eliminó mediante cuatro lavados del filtro con TBST 1x durante 5 min cada uno y un lavado con TBS 1x (ver C.III) durante otros 5 min.

El revelado de la membrana se desarrolla mediante detección de la fosfatasa alcalina, según el sistema descrito en la sección “Hibridación de ácidos nucleicos” (ver C.IX.4).

X. 4. Ensayo de la actividad de fosfotransferencia

El análisis de la actividad catalítica de la quinasa PksA se llevó a cabo mediante un ensayo *in vitro* de autofosforilación de la proteína en presencia de ATP radiactivo marcado con P^{32} en posición γ . Para ello, se procedió a mezclar 19 μ l de la proteína concentrada con 5 μ l del tampón de fosforilación (ver C.III), incorporando a la reacción 1 μ l de ATP radiactivo con 10 μ Ci/ μ l. La muestra se incubó durante 10 min en un baño a 30°C y se detuvo la reacción mediante la incorporación de 25 μ l de tampón de carga 2x.

El producto de la reacción se cargó en un gel de proteínas SDS-PAGE, separando la proteína marcada respecto al exceso de ATP radiactivo no incorporado que permanecía en el tampón de fosforilación. Tras finalizar la electroforesis, la proteína se transfirió desde el gel a una membrana de PVDF y se procedió a realizar una autoradiografía. Para ello, se colocó una película fotográfica sobre la membrana dentro de un compartimento metálico sellado en oscuridad. Finalmente, se introdujo en un congelador a -80°C, minimizando así la dispersión de la emisión radiactiva y se dejó impresionar la película durante una noche. Finalmente, se procedió al revelado de la película en la oscuridad para detectar el marcaje de la proteína con P^{32} . La incorporación de este grupo fosfato a la proteína a partir del ATP conduce a la emisión específica de una señal radiactiva que impresiona a la película justo encima de la posición que ocupa la quinasa en el filtro.

XI. Sistema del doble híbrido de levadura

El sistema del doble híbrido de levadura es un método genético empleado durante este estudio para identificar interacciones proteicas de la quinasa PksA con otras proteínas de señalización de *M. xanthus*, así como para definir los dominios proteicos implicados en el contacto entre proteínas. En este trabajo, se ha utilizado el sistema del doble híbrido MATCHMAKER de Clontech, basado en el factor de transcripción GAL4, para detectar interacciones proteicas *in vivo* en la levadura *S. cerevisiae*. Mediante este sistema, se ha analizado la interacción entre parejas de proteínas conocidas así como se ha procedido a la búsqueda de proteínas capaces de contactar con la quinasa PksA, mediante el rastreo de una genoteca de la bacteria *M. xanthus*.

XI. 1. Construcción de una genoteca de expresión de *M. xanthus*

La búsqueda de interacciones proteicas con la quinasa PksA en el sistema del doble híbrido de levadura requiere de la construcción previa de una genoteca de expresión de *M. xanthus* en la serie de vectores pGAD. En este sistema, los fragmentos génicos clonados, provenientes de la digestión parcial del cromosoma, son expresados como proteínas de fusión con el dominio de activación del factor de transcripción GAL4. La obtención de una genoteca de expresión a partir de la estirpe silvestre de *M. xanthus* comenzó con la purificación previa del ADN cromosómico de la mixobacteria a gran escala. A partir de este proceso de extracción, se obtuvo una preparación de ADN cromosómico de elevada pureza, que contenía una cantidad de material genético adecuada para la construcción de la genoteca de expresión de *M. xanthus*.

El ADN cromosómico de *M. xanthus* se digirió de forma parcial con las endonucleasas de restricción *MspI*, *AcilI* y *HinPII*, con la finalidad de obtener fragmentos cromosómicos de un tamaño comprendido entre 0.5 kb y 3 kb. Para cada enzima de restricción, se ajustaron las condiciones de digestión necesarias para generar fragmentos del tamaño adecuado. Para ello, se realizaron varios ensayos en donde se digirió una misma cantidad de ADN cromosómico con cantidades de enzima variables durante diferentes tiempos de incubación de la reacción. Tras establecer las condiciones de reacción óptimas para cada enzima, se realizaron seis réplicas de digestión parcial con 20 μ l de la preparación de cromosoma, siguiendo estos parámetros: 1 μ l de *MspI* durante 45 min, 1 μ l de *AcilI* a partir de una dilución 1:5 durante 50 min o 8 μ l de *HinPII* durante 9 h, en todos los casos con el tampón adecuado a una temperatura de incubación de 37°C. Las reacciones se detuvieron tras inactivar la enzima a 65°C durante 20 min.

Los fragmentos de restricción generados en cada digestión se clonaron en la serie de vectores pGAD, para la expresión de estos fragmentos cromosómicos en las tres pautas de lectura. Para ello, se digirió cada uno de los tres vectores pGAD (0.5-1 μ g/ μ l) con la enzima *ClaI*, generando en cada vector extremos cohesivos compatibles para la unión de los fragmentos cromosómicos generados con las enzimas de restricción *MspI*, *AcilI* y *HinPII*. En la digestión de los vectores pGAD con *ClaI*, se emplearon 20 μ l de cada vector junto con 4 μ l de enzima en el tampón apropiado, en un volumen de reacción de 100 μ l. Una vez completada la digestión, se trataron 50 μ l de cada vector digerido con 5 μ l de la enzima fosfatasa alcalina SAP en 5 μ l de tampón, durante 10-30 min a 37°C, inactivando la enzima a 65°C durante 20 min. La desfosforilación evita el religado de los extremos de los vectores digeridos, de manera que las pruebas de autoligación realizadas confirmaron la incapacidad de religado de los vectores tratados con fosfatasa.

A continuación, los fragmentos de restricción obtenidos en cada digestión parcial del ADN cromosómico se separaron mediante electroforesis en un gel preparativo de agarosa de bajo punto de fusión al 0.7%. A partir del gel, se purificaron los fragmentos cromosómicos de tamaño comprendido entre 0.5-3 kb, empleando el sistema de filtros con resina de Wizard. Finalmente, tras esta extracción, se obtuvo una preparación purificada de fragmentos cromosómicos cortados con cada una de las enzimas de restricción en un volumen de 300 μ l. La inserción de estos fragmentos de restricción en la serie de vectores pGAD digeridos con *ClaI* se llevó a cabo mediante la ligación de 5 μ l de cada vector con 10 μ l de fragmentos cromosómicos digeridos con cada una de las enzimas, en presencia de 1 μ l de ligasa de T4 (1 U/ μ l) junto con 2 μ l de ATP y otros 2 μ l de tampón de la ligasa, incubando la reacción a 16°C durante una noche.

Cada mezcla de ligación obtenida se utilizó para transformar 50 μ l de células de la cepa DH10B de *E. coli* mediante electroporación (25 μ F, 1.7 kV y 400 Ω). Tras el pulso eléctrico, se incorporó de forma inmediata 1 ml de medio SOC a la muestra y se permitió la recuperación de las células para entonces proceder a cultivar los transformantes obtenidos en matraces con 50 ml de medio líquido LB+Amp, durante 8-9 h a una temperatura de 37°C y 250 rpm de agitación. Una vez alcanzada una turbidez adecuada, se centrifugó el cultivo a 10000 g durante 10 min en frío y se procedió a purificar la mezcla de plásmidos procedentes del pellet bacteriano con el sistema de midiprep de Promega, para obtener las diferentes preparaciones plasmídicas de la genoteca. Las muestras resultantes se conservaron en frío a -70°C hasta su utilización.

XI. 2. Detección de interacciones proteicas en el sistema del doble híbrido

El sistema del doble híbrido de levadura MATCHMAKER (Clontech) basado en GAL4 permite identificar interacciones entre proteínas *in vivo*, una vez que el contacto entre proteínas induce la expresión de un conjunto de genes testigo, al promover la reconstrucción quimérica del activador transcripcional GAL4. En este método genético, la proteína cebo se fusiona con el dominio de unión al ADN del regulador GAL4, mientras que a su vez, la proteína presa se une al dominio activador de la transcripción de GAL4. Si ambas proteínas de fusión interactúan entre sí, se restablece el contacto entre los dominios de unión y activación de GAL4, y por tanto, se estimula la expresión de los genes testigo, cuya actividad sirve de marcador para identificar la presencia de interacción entre ambas proteínas.

Por tanto, para llevar a cabo el análisis de interacciones proteicas en el sistema del doble híbrido, en primer lugar se transformó la cepa AH109 de *S. cerevisiae* con los plásmidos que expresan el cebo y la presa. Durante el rastreo de la genoteca, se realizó una transformación secuencial, incorporando primero el vector pGBK con el cebo, y tras seleccionar la estirpe resultante en un medio mínimo SDC Trp⁻, se transformó posteriormente a gran escala con la serie de vectores pGAD que portan los fragmentos cromosómicos procedentes de la librería genómica. En cambio, en las interacciones por parejas entre dos proteínas conocidas, se cotransformó de forma simultánea la cepa AH109 de *S. cerevisiae* con los plásmidos pGBK-cebo y pGAD-presa, sembrando en un medio mínimo SDC Trp⁻ Leu⁻ para seleccionar la incorporación conjunta de ambos plásmidos. Los transformantes que han captado ambos vectores crecieron en este medio mínimo, generando colonias de levaduras tras incubar las placas a 30°C durante dos a tres días.

El sistema para detectar la interacción entre ambas proteínas se basa en una selección de tipo nutricional, mediante el empleo de medios mínimos deficientes en histidina y/o adenina. La cepa de levadura AH109 es auxótrofa para estos aminoácidos, y por ello no es capaz de crecer en un medio mínimo carente de histidina o adenina. Sin embargo, la interacción del cebo (la quinasa PksA) con la presa activa la expresión de los genes testigo *HIS3* y *ADE2* dependientes de GAL4, permitiendo a la levadura crecer en medios mínimos carentes de histidina y/o adenina. Por ello, para identificar interacciones proteicas, los transformantes seleccionados en el medio SDC Trp⁻ Leu⁻, que expresan el cebo y la presa, se picaron a placas de medio selectivo SDC Trp⁻ Leu⁻ His⁻ y SDC Trp⁻ Leu⁻ His⁻ Ade⁻ y se cultivaron a 30°C durante al menos una semana. La capacidad de crecimiento de una determinada estirpe de levadura sobre este medio se correlaciona con la presencia de interacción entre el cebo y la presa en la levadura correspondiente.

El sistema para confirmar la validez de la interacción entre dos proteínas a partir de una cepa de levadura presuntamente positiva, capaz de crecer sobre las placas de medio mínimo, depende del análisis de la actividad enzimática α y β -galactosidasa desarrollada por esta estirpe. Así, la interacción proteica activa también la expresión de los genes *lacZ* y *MEL1*, igualmente dependientes de GAL4, y por tanto, los presuntos positivos se picaron a placas de medio SDC Trp⁻ Leu⁻ con el sustrato α -X-Gal y se cultivaron a 30°C durante al menos dos días. La producción de una tonalidad azulada por la levadura sobre este medio por efecto de la actividad α -galactosidasa confirmó la veracidad de las interacciones proteicas detectadas. La fuerza de la interacción entre ambas proteínas se ha estimado a partir de la determinación de la actividad β -galactosidasa siguiendo el procedimiento descrito en la sección “Actividad β -galactosidasa en *S. cerevisiae*” (ver C.XII.2).

XII. Determinación de actividad β -galactosidasa

XII. 1. Actividad β -galactosidasa en *M. xanthus*

La determinación de la actividad β -galactosidasa de las cepas portadoras de fusiones traduccionales con el gen *lacZ* de *E. coli* permitió establecer tanto el tiempo como el nivel de expresión del gen analizado a lo largo del ciclo de vida de *M. xanthus*. En principio, con cada estirpe analizada, se ha realizado una aproximación cualitativa de la actividad, para posteriormente, valorar la expresión mediante la cuantificación de la actividad desarrollada en cada caso.

XII. 1. 1. Determinación cualitativa

La actividad β -galactosidasa de una estirpe de *M. xanthus* se estimó de forma cualitativa mediante el crecimiento de las distintas cepas en placas del medio adecuado suplementado con el compuesto X-gal (40 μ g/ml), puesto que esta enzima es capaz de emplear el X-gal como sustrato generando un producto de color azul. Las estirpes con actividad β -galactosidasa adquieren una tonalidad azulada en este medio, de forma que la intensidad de color se relaciona de forma directa con el nivel de expresión génica de la enzima β -galactosidasa y con el tiempo de incubación transcurrido.

XII. 1. 2. Determinación cuantitativa

En la determinación de la actividad β -galactosidasa de las estirpes de *M. xanthus* se ha seguido el procedimiento descrito por Kroos *et al.* (1986).

La estirpe de *M. xanthus* se inoculó en medio líquido CTT+Kan para el crecimiento de la bacteria a 30°C y 300 rpm de agitación durante una noche. Cuando el cultivo alcanzó la densidad celular adecuada, con una DO_{600} en torno a 1, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 10000 g durante 10 min a temperatura ambiente y lavadas en tampón TM (ver C.III) para eliminar el medio de cultivo. Entonces, las células se concentraron a una DO_{600} de 15 en tampón TM y se sembraron sobre placas de medio sólido adecuado a razón de 200 μ l de cultivo para cada placa. Las placas se mantuvieron en incubación a 30°C y las células se recogieron a diferentes intervalos de tiempo, conservando las muestras a -20°C hasta el momento de realizar la determinación de la actividad enzimática.

La rotura de las células se realizó mediante sonicación, de forma que las muestras resuspendidas en 200 μ l de tampón TM se sometieron a tratamiento con ultrasonidos durante 5 min en pulsos de 30 seg con el sonicador *Microson Ultrasonic Homogenizer XL2007* de Misonix Inc. A lo largo de este proceso, las preparaciones se mantuvieron en hielo para evitar la desnaturalización de las proteínas provocado por el calentamiento generado durante la sonicación. Las muestras que contenían mixósporas se sonicaron con bolas de vidrio equilibradas previamente en tampón TM para facilitar la ruptura de estas formas de resistencia. Por último, el extracto celular generado en cada caso se centrifugó a 12500 rpm durante 5 min a 4°C, recuperando el sobrenadante para el ensayo de actividad enzimática.

La determinación de la actividad β -galactosidasa de cada muestra se efectuó tras el desarrollo de una reacción enzimática producida a partir de una mezcla de reacción compuesta por 5-25 μ l de cada extracto celular en 450 μ l de tampón Z (ver C.III) con 1 mg/ml de *o*-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG), completando con tampón TM hasta 500 μ l. En esta reacción enzimática, el sustrato ONPG se rompe por la actividad β -galactosidasa generando un producto con tonalidad amarilla, el *o*-nitrofenol (ONP). Las mezclas resultantes se incubaron a 37°C durante el tiempo necesario para que la tonalidad amarilla generada durante la reacción enzimática adquiriera una intensidad adecuada y en ese momento, la reacción se detuvo adicionando 0.5 ml de 1 M Na₂CO₃.

La valoración de la coloración generada por la reacción enzimática se ha realizado mediante la lectura espectrofotométrica de las muestras a 420 nm, dentro de un rango óptimo comprendido entre 0.6–0.9, empleando la aplicación *Cary Win UV Advanced Reads* del espectrofotómetro *Cary 50 Conc UV-Visible Spectrophotometer* de Varian. Durante este proceso, junto a las muestras incubadas con tampón Z + ONPG, también se determina la coloración control producida por la propia muestra incubada sólo con tampón Z en condiciones similares, puesto que el extracto por sí mismo aporta cierta tonalidad amarilla a la reacción. En cada caso, se emplea como blanco de lectura las preparaciones sometidas al mismo tratamiento en donde el extracto es sustituido por tampón TM.

La concentración de proteínas de cada muestra se evaluó con el sistema *Protein Assay* de Bio-Rad, una vez que se adicionó 1-25 μ l de cada extracto celular a 200 μ l de reactivo de Bradford en un volumen final de 1 ml. El color generado por cada muestra se midió a 595 nm tras 15-30 min de incubación, utilizando la aplicación *Cary Win UV Concentration* del espectrofotómetro *Cary 50 Conc UV-Visible Spectrophotometer* de Varian, empleando una curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA) para interpolar los valores de concentración de proteínas de las muestras.

La actividad específica se expresa como nmol de ONP producidos por min y por mg de proteína presente. La actividad específica se obtiene según la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica} = \frac{213 \cdot A_{420}}{ml \cdot \text{min} \cdot (\text{mg/ml})}$$

- 213 : Coeficiente de extinción molar del ONP
- A₄₂₀ : Absorbancia de la muestra de reacción a 420 nm
- ml : Volumen de extracto empleado para la reacción
- mg/ml : Concentración de proteínas de la muestra
- min : Tiempo de incubación de la reacción a 37°C

XII. 2. Actividad β -galactosidasa en *S. cerevisiae*

La estirpe de *S. cerevisiae* portadora de los plásmidos del sistema del doble híbrido se inoculó en 5 ml de medio mínimo SDC y se creció a 30°C con 225 rpm de agitación durante una noche, hasta alcanzar una DO_{600} en torno a 1-1.5. Una vez crecida esta levadura, se añadieron los 5 ml de cultivo a un matraz con 50 ml de medio mínimo SDC y se recreció durante 6-8 h hasta alcanzar una DO_{600} próxima a 0.5. Las células de levadura fueron recogidas tras centrifugar el cultivo a 7000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, eliminando el sobrenadante con el medio de cultivo. Finalmente, las levaduras se resuspendieron en 250 μ l de solución de lisis (ver C.III), para ser conservadas en frío a -70°C.

La rotura de las células se realizó sonicando las muestras durante 5 min en pulsos de 30 seg en presencia de 0.2 g de bolas de vidrio de 0.45 mm, y tras añadir 12.5 μ l de 40 mM de PMSF, un inhibidor de proteasas. Durante el tratamiento con ultrasonidos, las muestras se mantuvieron en hielo para evitar la desnaturalización producida por el calentamiento generado por la sonicación. Tras completar este tratamiento, se añadieron otros 250 μ l de solución de lisis y se eliminaron los restos celulares una vez que la preparación se centrifugó 15 min a 13000 rpm a 4°C, recuperando el sobrenadante para el ensayo de actividad enzimática.

La valoración de la actividad β -galactosidasa se llevó a cabo añadiendo 100 μ l del extracto obtenido a 0.9 ml de tampón Z (ver C.III), mientras que como blanco se emplearon 100 μ l de tampón de lisis en un volumen similar de tampón Z. La reacción se inició tras añadir 0.2 ml de ONPG preparado a una concentración de 4 mg/ml en tampón Z, incubando la mezcla de reacción a 33°C durante el tiempo necesario para que la muestra adquiriera una tonalidad amarilla. Finalmente, una vez conseguida una coloración de intensidad apropiada, la reacción se detuvo adicionando 0.5 ml de 1 M Na_2CO_3 . La determinación de la tonalidad producida por la reacción enzimática, se realizó mediante la lectura espectrofotométrica de las muestras a 420 nm, como se ha descrito en el apartado anterior. Por último, la concentración de proteínas de cada preparación se valoró con el sistema *Protein Assay* de Bio-Rad detallado en el apartado anterior.

La actividad específica en nmol de ONP producidos por min y por mg de proteína se obtuvo siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica} = \frac{377.77 \cdot A_{420}}{ml \cdot min \cdot (mg/ml)}$$

- 377.77 : Coeficiente de extinción molar del ONP para las condiciones ensayadas
 A_{420} : Absorbancia de la muestra de reacción a 420 nm
 ml : Volumen de extracto empleado para la reacción
 mg/ml : Concentración de proteínas de la muestra
 min : Tiempo de incubación de la reacción a 33°C

XIII. Caracterización de mutantes de delección en fase

XIII. 1. Crecimiento vegetativo

El análisis del crecimiento vegetativo de las cepas mutantes de *M. xanthus* obtenidas durante este trabajo, se realizó mediante el desarrollo de una curva de crecimiento para cada una de las estirpes mutantes, con la finalidad de comparar el crecimiento experimentado a lo largo del tiempo por estas cepas mutantes de *M. xanthus* respecto a la estirpe silvestre.

Para la ejecución de las curvas de crecimiento de las distintas estirpes de *M. xanthus*, se empleó un precultivo crecido de cada cepa como punto de partida para inocular matraces que contenían 40 ml de medio CTT líquido, utilizados para el desarrollo de la curva de crecimiento. Para ello, se determinó la DO_{600} de los precultivos y a continuación, las muestras se diluyeron ajustando la densidad óptica de partida de todos los cultivos a 0.05, añadiendo el volumen de muestra necesario en cada caso. Tras unos instantes de agitación, se tomó una muestra inicial a tiempo cero de cada una de las cepas analizadas y se pasó a incubar los cultivos a 30°C con 300 rpm de agitación. Durante el transcurso del experimento, se tomaron muestras de los cultivos de forma periódica y se determinó la DO_{600} alcanzada por cada una de las estirpes en el tiempo.

El estudio del efecto de distintos agentes químicos causantes de estrés celular sobre el crecimiento de *M. xanthus*, se realizó mediante la adición de estos compuestos a distinta concentración a cultivos que presentaban igualmente una densidad óptica de partida de 0.05. El crecimiento experimentado por cada cepa frente a cada compuesto químico, se valoró tras 24-36 h de incubación de los cultivos a 30°C con 300 rpm de agitación, mediante la determinación de la DO_{600} generada por cada cultivo en el Spectronic.

XIII. 2. Movilidad por deslizamiento

La movilidad por deslizamiento de las estirpes mutantes de *M. xanthus* se determinó mediante la valoración a lo largo del tiempo del desplazamiento desarrollado por cada una de estas cepas de *M. xanthus* sobre la superficie de un medio sólido, en comparación con el silvestre. En este estudio, un cultivo crecido de cada estirpe de *M. xanthus* a una DO_{600} de 1 fue centrifugado a 10000 g durante 10 min a temperatura ambiente, generando un precipitado que se concentró con tampón TM a una DO_{600} de 15. Entonces, se depositaron 10 μ l de cada cultivo concentrado en el centro de una placa pequeña de medio CTT sólido y se incubaron las muestras a 30°C. Finalmente, tomando como control el diámetro inicial de cada gota, se determinó de forma periódica el diámetro alcanzado por las muestras de cada estirpe sobre la placa. Se han empleado dos tipos de sustratos: un medio más consistente con 1.5% de agar para el análisis de la movilidad aventurera de la mixobacteria, y un medio blando con sólo 0.4% de agar para el estudio de la movilidad social.

XIII. 3. Ciclo de desarrollo

El análisis fenotípico de las cepas mutantes de *M. xanthus* durante el ciclo de desarrollo se llevó a cabo tras sembrar a estas estirpes sobre medios de cultivo pobres en nutrientes, como CF y TPM, capaces de inducir el desarrollo multicelular en *M. xanthus*, tomando como control a la estirpe silvestre. Para ello, un cultivo crecido a una DO_{600} de 1 de cada cepa de *M. xanthus* se centrifugó a 10000 g durante 10 min a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se sometió a un lavado con tampón TM (ver C.III) para eliminar los

restos del medio de cultivo y se resuspendió en TM a una DO_{600} de 15. Se tomaron 10 μ l de cada cultivo concentrado y se depositaron en forma de gota sobre placas pequeñas con 8 ml de medio CF y TPM. Una vez que se secaron las gotas, las muestras fueron incubadas a 30°C y se siguió de forma periódica el transcurso del ciclo de desarrollo de cada cepa hasta las 96 h de incubación, tomando imágenes de las bacterias a lo largo del tiempo con diferentes aumentos en la lupa.

XIII. 4. Esporulación

El estudio de la esporulación en las cepas mutantes de *M. xanthus* durante el ciclo de desarrollo se ha centrado en el recuento del número de mixósporas producidas por estas estirpes en un medio inductor del desarrollo, para así establecer una comparación con las generadas por el silvestre en las mismas condiciones.

Para ello, a partir de un cultivo crecido a DO_{600} de 1 de cada una de las cepas de *M. xanthus* se obtuvo una suspensión concentrada a DO_{600} 15, tras centrifugar los cultivos a 10000 g durante 10 min a temperatura ambiente y resuspender en un volumen adecuado de tampón TM. El cultivo concentrado originado se diseminó sobre placas con 20 ml de medio de cultivo sólido CF o TPM, de forma que se sembraron 200 μ l por placa distribuidos sobre su superficie en 10 gotas de 20 μ l. Una vez que se secaron las gotas, las placas fueron incubadas a 30°C y se tomaron muestras de forma periódica a partir de las 24 h, recuperando las células de la superficie de la placa mediante raspado. Las muestras se conservaron a una temperatura de -20°C, hasta proceder al recuento.

Las preparaciones obtenidas se sonicaron con la finalidad de dispersar las mixósporas agrupadas y eliminar los bacilos vegetativos presentes en las muestras, evitando que interfiriesen en el recuento. Para ello, las muestras resuspendidas en 200 μ l de TM fueron sometidas a tres pulsos de 30 seg de ultrasonidos, utilizando el sonicador *Microson Ultrasonic Homogenizer XL2007* de Misonix Inc. Por último, las muestras se diluyeron de forma adecuada en TM (ver C.III) y se procedió al recuento de las esporas en una cámara de *Petroff-Hausser* de Hausser Scientific. El resultado obtenido en el recuento se expresa como número de mixósporas por placa.

XIII. 5. Germinación

La capacidad de germinación de las mixósporas producidas por las distintas cepas mutantes de *M. xanthus* ha sido analizada mediante la determinación de la eficiencia de germinación de estas esporas en condiciones adecuadas sobre un medio rico, tomando como valor de referencia la eficiencia de germinación de la estirpe silvestre.

Para estudiar la germinación, las muestras sonicadas utilizadas para el recuento de esporas se calentaron a 50°C durante 2 h en un baño y a continuación, se sometieron a un pulso de 30 seg de sonicación para dispersar las esporas agrupadas. En ese momento, las muestras se diluyeron de forma adecuada en tampón TPM (ver C.III), adicionando 100 μ l de la dilución apropiada a 4.5 ml de CTT blando en sobrefusión para sembrarlas sobre una placa de 20 ml de medio rico CTT. Finalmente, las placas fueron incubadas a 30°C durante 7 días hasta que aparecieron colonias visibles por germinación de las mixósporas presentes en el medio. El número de esporas viables se corresponde con el número de colonias aparecidas tras 7 días de incubación, mientras que la eficacia de germinación se obtuvo dividiendo por el número de esporas recontadas en la muestra de partida.

XIV. Bioinformática

El análisis global del quinoma procariota se ha llevado a cabo mediante el rastreo de genes para ePKs a partir de la secuencia completa del conjunto de microorganismos secuenciados, depositados en la base de datos de Pubmed. La identificación de los genes para ePKs en cada genoma estudiado se ha llevado a cabo empleando el programa BLASTP disponible en esta base de datos, para confrontar la secuencia consenso del dominio catalítico de este tipo de proteínas con el conjunto de proteínas cifradas en cada uno de los genomas analizados. El valor de corte empleado para validar las ePKs detectadas en cada caso ha sido $E < 10^{-3}$, comprobando de forma manual cada uno de las secuencias obtenidas. La sintenia en los genes para ePKs dentro de las especies del grupo de las mixobacterias se ha realizado mediante comparación de la similitud con BLAST de los genes situados en la región cromosómica en torno a cada gen analizado.

El estudio de la organización estructural de cada proteína se ha realizado mediante el empleo de diferentes programas de predicción de la topología, capaces de detectar posibles segmentos transmembrana con carácter apolar a partir de la secuencia proteica. Los programas empleado con más frecuencia han sido TMHMM, SOSUI y DAS, todos ellos disponibles en ExPASy. La identificación de la similitud de la secuencia de cada proteína con aquellas depositadas en las bases de datos se ha desarrollado mediante el empleo de los programas FASTA y BLAST del EBI, mientras que para el alineamiento entre proteínas homólogas se ha empleado el programa CLUSTAW del EBI. La predicción de la estructura secundaria y el modelado de la estructura tridimensional del dominio catalítico de la quinasa se ha obtenido mediante comparación por homología de secuencia a partir de la base de datos PDB utilizando el programa SWISS MODEL de ExPASy.

La identificación de los dominios portados por cada proteína se ha llevado a cabo con el programa INTERPRO del EBI, un servidor que integra los resultados obtenidos por varios programas como PROFILE, SMART, PFAM y PRODOM, capaces de detectar motivos funcionales a partir de la secuencia de la proteína. En general, se ha verificado la búsqueda introduciendo cada secuencia a analizar en el servidor PFAM, empleando un valor de corte estricto para poder establecer la veracidad de los dominios detectados en cada caso. Las combinaciones novedosas de dominios han sido identificadas mediante comparación con la arquitectura de proteínas definidas en PFAM y en la base de datos de ePKs (Krupa y Srinivasan, 2005).

Direcciones:

Pubmed [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)

EBI <http://www.ebi.ac.uk>

ExPASy <http://www.expasy.ch>

PDB <http://www.pdb.org>

PFAM <http://pfam.sanger.ac.uk>

D. RESULTADOS



D. RESULTADOS

I. Estudio del quinoma procariótico

I. 1. Análisis de las ePKs en procariotas

El término quinoma define el conjunto de proteínas codificadas por el genoma de un organismo con capacidad para fosforilar diferentes sustratos en la célula. Recientemente, se ha realizado un análisis global sobre la diversidad global del quinoma procariótico incluyendo los diferentes tipos de quinasas similares a ePKs (ELKs), los cuales mantienen un plegamiento similar a pesar de su divergencia de secuencia (Kannan *et al.*, 2007).

Entre ellas, este trabajo se ha centrado en el estudio de las proteínas ePKs. Este grupo de enzimas mantiene una elevada similitud de secuencia, puesto que comparten una región catalítica homóloga con los once subdominios típicos conservados comunes a esta familia de proteínas. Por tanto, el objetivo preliminar de este trabajo ha sido la identificación del conjunto de genes que codifican ePKs en los genomas procarióticos secuenciados hasta el momento. El rastreo de genes para este tipo de enzimas se ha llevado a cabo en un total de 569 genomas (523 bacterias y 46 arqueas) secuenciados y depositados en las base de datos de PubMed a fecha 25 de Septiembre de 2007.

La estrategia de búsqueda empleada ha sido confrontar la secuencia del dominio quinasa consenso definida por la base de datos PFAM para esta región (PF00069) frente a la secuencia de los diferentes genomas analizados, utilizando el programa BLASTP. Para discriminar entre los genes que cifran ePKs respecto a los que no se ha fijado como punto de corte el valor $E < 10^{-3}$, eliminando todas aquellas secuencias con un valor E superior al establecido. Todos aquellos genes detectados con una similitud significativa han sido verificados manualmente para validar que codifican ePKs, tras comprobar la presencia de los subdominios característicos de este tipo de proteínas (principalmente los subdominios VIb, VII y VIII).

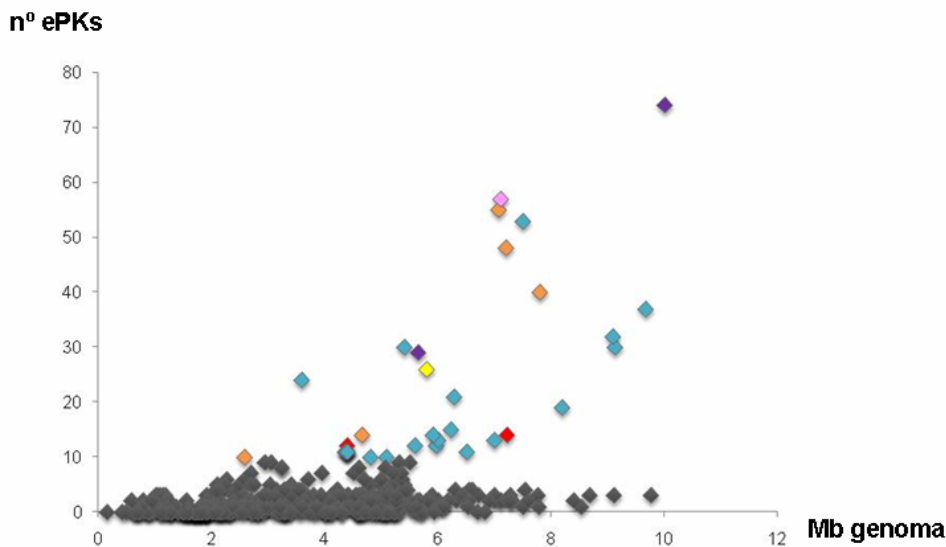


Figura 7. Número de ePKs en procariotas en relación al tamaño de su genoma (excepto mixobacterias). Se indican en color sólo los microorganismos con un número de ePKs superior a 10. Clave: azul, actinobacterias; naranja, cianobacterias; morado, acidobacterias; rosa, planctomicetes; amarillo, Chloroflexi; rojo, proteobacterias (β y γ).

En la Figura 7 se muestra el resultado obtenido tras completar el análisis del número total de genes para ePKs en los genomas secuenciados. En ella aparecen todos los microorganismos procariotas secuenciados hasta la fecha reseñada, a excepción de las especies pertenecientes al grupo de las mixobacterias. Como se aprecia en la gráfica, en general existe una correlación directa entre el tamaño del genoma respecto al número de quinastas codificadas por el microorganismo. Sin embargo, una elevada proporción de procariotas (35.5%) no codifica ninguna ePK (202 microorganismos de un total de 569 analizados), de los cuales 174 son bacterias (33%) y 28 arqueas (61%). Entre los que sí poseen este tipo de proteínas, en la mayoría de los casos el número de ePKs codificadas por su genoma es inferior a 5, y tan sólo en algunas pocas bacterias se superan las 10 ePKs.

Todos los microorganismos que contienen un número elevado de ePKs pertenecen al dominio *Bacteria*, destacando especialmente las especies pertenecientes al grupo de las actinobacterias y de las cianobacterias. De hecho, junto con la acidobacteria *Solibacter usitatus* y el planctomicete *Rhodopirelulla baltica*, entre los microorganismos con más ePKs predominan las especies de cianobacterias como *Anabaena* y *Nostoc* y sobre todo de actinobacterias como *Frankia*, *Streptomyces*, *Thermobifida* y *Rhodococcus*. Estos dos últimos grupos de microorganismos comparten con las mixobacterias el hecho de poseer un comportamiento multicelular, asociado a procesos de diferenciación y comunicación intercelular, junto con un metabolismo secundario muy desarrollado. Todos ellos poseen además un tamaño de genoma considerable, muy por encima del tamaño medio definido para el genoma de los microorganismos procariotas.

Las mixobacterias se encuadran dentro de la subdivisión δ de las proteobacterias, junto con los bdellovibrios y las bacterias sulfatoreductoras. Este grupo se encuentra muy próximo desde un punto de vista filogenético a la subdivisión ϵ de las proteobacterias. Por ello, siguiendo los criterios descritos anteriormente, se han rastreado las ePKs cifradas por los genomas secuenciados de las especies pertenecientes a ambas subdivisiones. Sin considerar a las mixobacterias, los resultados obtenidos mostrados en la Figura 8 permiten comprobar que las bacterias cercanas filogenéticamente a las mixobacterias codifican un número muy bajo de ePKs. De hecho, la mayoría de bacterias pertenecientes a ambas subdivisiones carecen de este tipo de proteínas, mientras que aquellas que sí las poseen contienen muy pocas ePKs, la mayoría tan sólo entre una y tres quinastas.

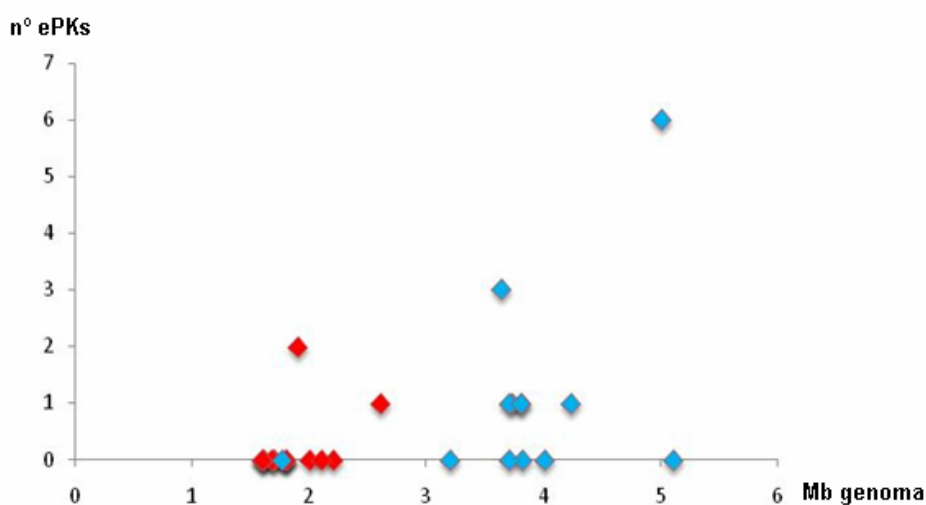


Figura 8. Número de ePKs codificado por las bacterias de la subdivisión δ y ϵ de las Proteobacterias en relación al tamaño de su genoma (excepto mixobacterias). Clave: rojo, ϵ proteobacterias; azul, δ proteobacterias.

I. 2. Análisis de las ePKs en el grupo de las mixobacterias

El estudio del quinoma procarionta se ha completado con el análisis del genoma de las mixobacterias secuenciadas hasta el momento, siguiendo la estrategia de rastreo descrita previamente. Por tanto, se ha llevado a cabo la búsqueda e identificación del conjunto de genes que codifican ePKs dentro de la secuencia de los genomas de las diferentes especies de mixobacterias disponibles en la actualidad. Como se detalla en la Introducción, se ha completado la secuenciación de cuatro mixobacterias, *M. xanthus* DK1622, *S. cellulosum* So ce56, *A. dehalogenans* 2CP-C y *Anaeromyxobacter* sp. Fw 109-5 mientras que el genoma de otras dos, *S. aurantiaca* DW4/3-1 y *P. pacifica* SIR-1 se encuentra en forma de contiguos.

El análisis de la secuencia de los genomas de estas especies de mixobacterias revela que en este grupo de bacterias el número de genes para ePKs se incrementa de forma exponencial a medida que crece el tamaño del genoma, como muestra la Figura 9. De hecho, el número de ePKs codificadas por las mixobacterias con un genoma de mayor tamaño es el más elevado entre los procariontas secuenciados hasta el momento. En este sentido, se han identificado un total de 99 genes para ePKs en *M. xanthus*, 187 en *S. aurantiaca*, 237 en *P. pacifica* y 317 en *S. cellulosum*. El extenso número de quinazas en algunas de estas mixobacterias supera incluso al de microorganismos eucariotas inferiores, como la levadura *S. cerevisiae*, que codifica tan sólo 130 quinazas. Finalmente, en las dos especies de *Anaeromyxobacter* se han detectado 18 y 20 ePKs, un valor no demasiado elevado pero superior al número de ePKs cifradas por bacterias con un genoma de tamaño similar.

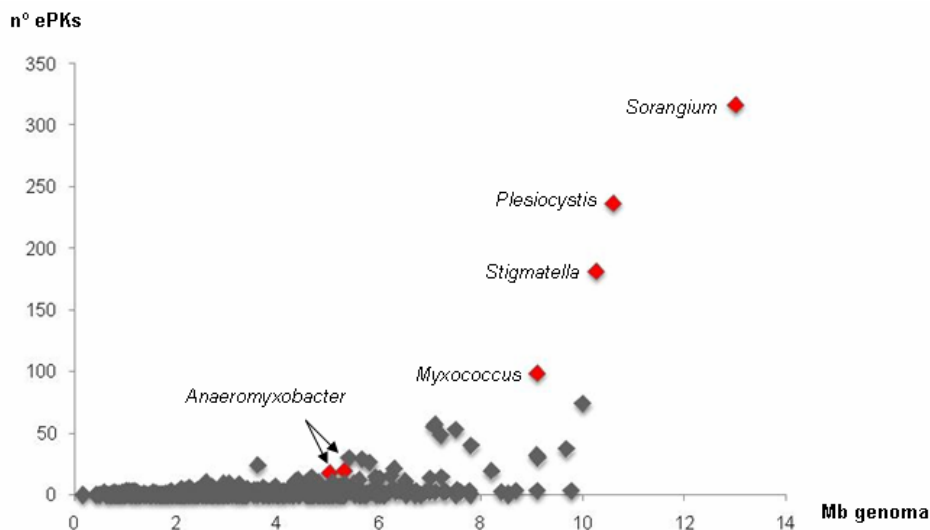


Figura 9. Número de ePKs codificadas por las diferentes especies de mixobacterias (rojo) comparado con el encontrado en otros genomas de procariontas.

La presencia de un conjunto tan numeroso de ePKs en las mixobacterias se refleja en la considerable proporción de genes destinados a este tipo de enzimas en el genoma de estas bacterias. De hecho, si se representa la densidad génica de ePKs, expresado como el número de este tipo de genes por Mb de cromosoma, se aprecia que los valores más elevados corresponden a las distintas especies de mixobacterias, como se observa en la Figura 10. Tan sólo 24 bacterias contienen más de 3 ePKs/Mb (7 actinobacterias, 6 cianobacterias, 2 acidobacterias, 1 plantomicete, 1 Chloroflexi y 1 Mollicute, junto a las 6 especies de mixobacterias). A excepción de ambas especies del género *Anaeromyxobacter*, todas ellas se sitúan muy por encima de la densidad génica registrada en el resto de procariontas.

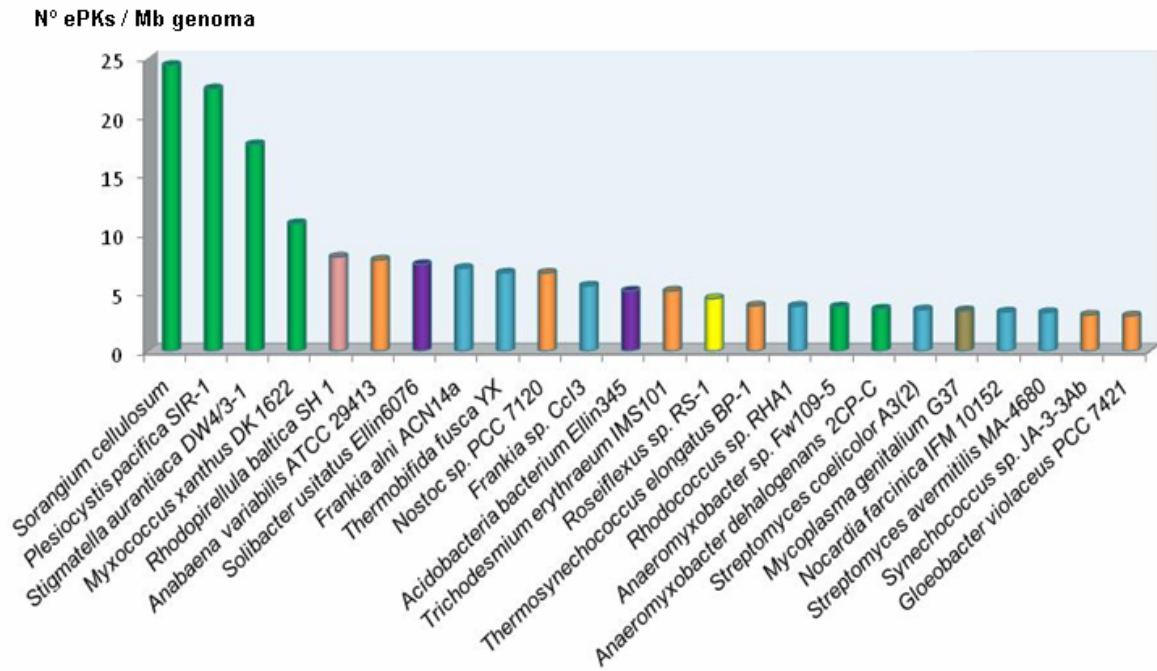


Figura 10. Densidad de ePKs en procariontes. La densidad se expresa como número de genes para ePKs por Mb de genoma en cada organismo, indicando tan sólo los microorganismos que poseen una densidad igual o superior a 3. Clave: verde, mixobacterias; azul, actinobacterias; naranja, cianobacterias; morado, acidobacterias; rosa, planctomicetes; amarillo, Chloroflexi; gris, Mollicutes.

I. 3. Características generales de las ePKs en mixobacterias

Las ePKs codificadas por las mixobacterias contienen una región muy conservada común a todas estas enzimas que corresponde al dominio quinasa de la proteína. Esta región consta normalmente de 250 a 300 aa (aminoácidos) e incluye todos aquellos residuos necesarios para la actividad de la proteína, por lo que se denomina dominio catalítico (DC). En casi la totalidad de quinazas este dominio ocupa la región N-terminal de la proteína, de manera que el comienzo de este motivo se suele situar con mucha frecuencia a menos de 50 aa del inicio de la proteína, y sólo en muy raras ocasiones se encuentra desplazado respecto a esta posición.

La mayoría de ePKs de mixobacterias contienen otra región proteica C-terminal adicional, designada como dominio regulador (DR), que participa en el control de la actividad catalítica de la proteína. Esta función se realiza mediante la modulación de la capacidad de fosfotransferencia, la interacción con la proteína sustrato o con otras proteínas reguladoras o bien, mediante el control del acceso a la localización celular apropiada para la proteína. Esta región presenta un tamaño muy variable, a diferencia del dominio catalítico, y de hecho, al comparar su secuencia en diferentes quinazas no se aprecia ningún tipo de similitud relevante entre ellas. Finalmente, en una pequeña proporción de quinazas, que constituyen en torno al 15-20% del total, el dominio catalítico ocupa la proteína completa, y en consecuencia, carecen de dominio regulador o bien éste es muy corto (inferior a 75 aa).

La topología de cada una de las ePKs identificadas en las distintas especies de mixobacterias ha sido determinada mediante el análisis de la secuencia de estas proteínas con varios programas de predicción de la topología, como TMHMM, DAS o SOSUI, capaces de detectar la presencia de dominios transmembrana putativos. A partir del rastreo de estos segmentos hidrofóbicos, se ha podido asignar la localización celular a cada quinasa, bien como proteínas solubles o bien como proteínas de membrana, integradas mediante uno o varios segmentos transmembrana.

El análisis de la organización estructural de las ePKs de *M. xanthus* indica la existencia de 53 quinasas citoplasmáticas junto con otras 46 de membrana, portadoras normalmente de un único segmento transmembrana esencial para su inserción en este compartimento celular. Entre las proteínas solubles, aparece un grupo considerable de 38 quinasas más grandes, cuyo dominio catalítico se acompaña de un dominio regulador C-terminal extenso. De igual manera, también pertenecen a este grupo todas las quinasas de pequeño tamaño (excepto dos), poseedoras tan sólo de la región que corresponde al dominio catalítico. En el grupo de proteínas situadas en la membrana, se diferencia un amplio grupo de 41 quinasas integrales de membrana, junto con otras 5 ancladas a membrana por un segmento hidrofóbico C-terminal.

La disposición estructural, determinada con estos programas de predicción de la topología para cada quinasa de membrana de *M. xanthus*, establece que este tipo de proteínas se disponen de forma similar a las quinasas receptoras de membrana de eucariotas, con una región intracelular, que contiene el dominio catalítico de la proteína, separada por un segmento transmembrana de un dominio sensor expuesto hacia el periplasma. Esta región se encarga de detectar la presencia de señales en el medio extracelular para modular en respuesta a ellas la actividad del dominio catalítico de la proteína. La mayoría de estos receptores de membrana presentan el segmento hidrofóbico transmembrana justo tras el dominio catalítico, por lo que casi toda la región C-terminal de la proteína conforma el dominio sensor, aunque en algunas ocasiones aparece también una región intracelular moduladora tras el dominio catalítico. Tan sólo se han detectado dos quinasas con un par de segmentos transmembrana consecutivos, y que por tanto, se sitúan expuestas totalmente al citoplasma, como ocurre con las quinasas ancladas a membrana.

I. 4. Dominio catalítico de las ePKs en mixobacterias

I. 4. 1. Estudio de la secuencia del dominio catalítico

El análisis de la secuencia del conjunto de ePKs de mixobacterias permite reconocer en todas ellas la presencia de un dominio catalítico definido como dominio quinasa (PF00069). En esta región proteica, es posible en cada caso diferenciar la existencia de los once subdominios que definen a este motivo característico de esta familia de proteínas. Al comparar la similitud de la secuencia del dominio catalítico de cada quinasa con la secuencia consenso para esta región (Hanks y Hunter, 1995), se observa que la mayoría de quinasas mantienen todos aquellos residuos clave para la actividad catalítica, pero en ocasiones se detecta la presencia de ciertas sustituciones importantes sobre alguno de estos residuos.

La semejanza global del dominio catalítico de las distintas ePKs respecto a la secuencia consenso se puede evaluar a partir del valor de confianza obtenido durante la identificación de esta región en cada proteína con PFAM. Al comparar los valores obtenidos en las ePKs de *M. xanthus*, se observa que un total de 81 proteínas quinazas presentan un dominio catalítico bastante bien conservado, con un valor de $E < 1.0e-20$ (PFAM), y por tanto, mantienen todos aquellos residuos relevantes que definen a esta región. Sin embargo, algo menos de un quinto del total de quinazas, un total de 18 proteínas, contienen un dominio catalítico algo inusual con ciertas sustituciones sobre residuos característicos, alcanzando valores de E próximos o por encima a $E > 1.0e-15$ (ver Figura 14). En la quinazas de este último grupo, el dominio catalítico contiene varias sustituciones en diferentes residuos pertenecientes a los subdominios I, II, III, VIb, VII y VIII, regiones normalmente muy bien conservadas dentro de esta familia.

Entre las quinazas que poseen un dominio catalítico atípico se ha detectado en varias de ellas la ausencia de uno o varios residuos clave para la fosfotransferencia, por lo que es posible que carezcan de actividad catalítica. Entre estos residuos esenciales destacan la lisina K de unión al ATP del subdominio II, el aspártico catalítico D del subdominio VIb (D1 en la Figura 11) y el aspártico de unión a Mg^{2+} del subdominio VII (D2 en la Figura 11), diferenciando así entre quinazas “no K” y quinazas “no D”. La proporción de este tipo de quinazas en las mixobacterias suele situarse entre el 5-10% (a excepción de las especies de *Anaeromyxobacter*), un valor promedio próximo al existente en organismos eucariotas. Así, tomando como ejemplo a la bacteria *M. xanthus*, se ha identificado un total de 11 ePKs carentes de alguno de los residuos esenciales, con 1 quinasa no K y no D2; 7 quinazas no D1 (4 de ellas duplicadas); y otras 3 quinazas no D2. En la Figura 11 se muestra el número de ePKs canónicas, no K, no D1 y no D2 en las diferentes especies de mixobacterias.

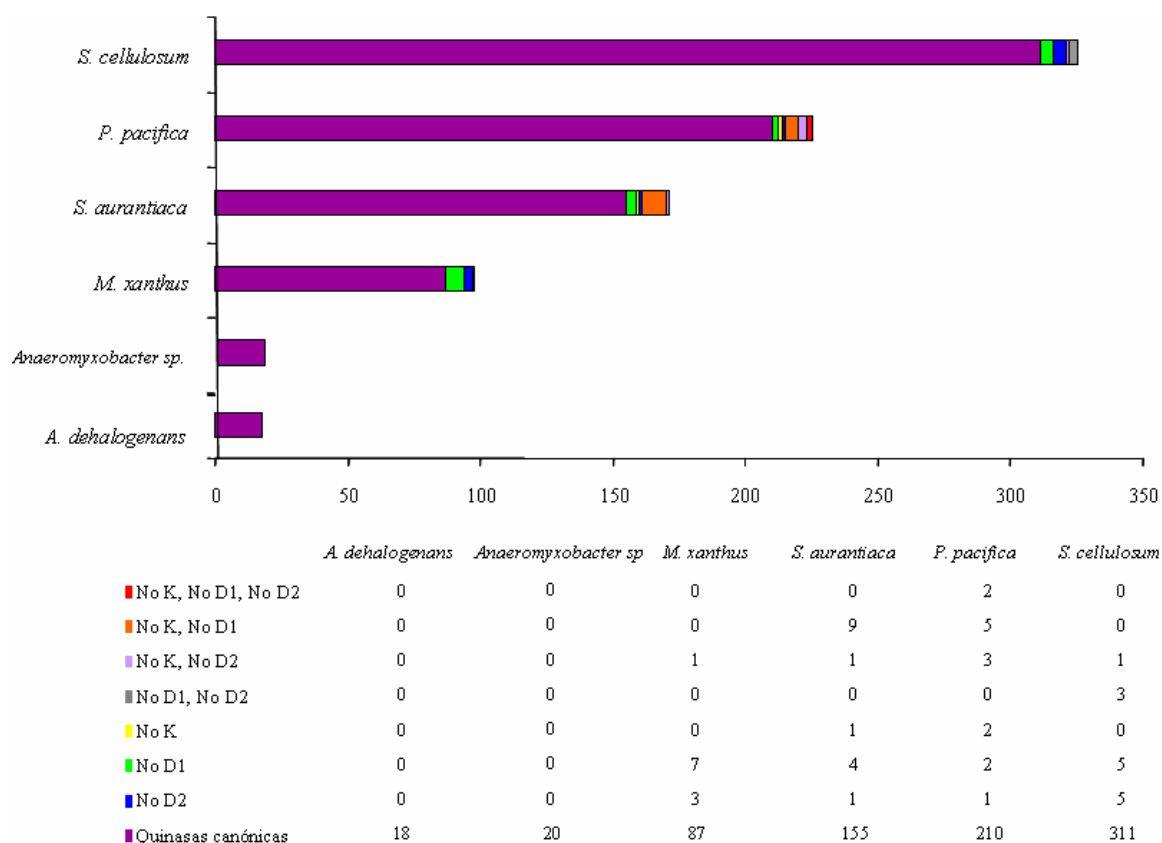


Figura 11. Conservación de los residuos esenciales para la actividad en las ePKs de mixobacterias

I. 4. 2. Actividad catalítica: especificidad

Las proteínas de tipo eucariota se diferencian en dos grandes grupos de enzimas, a partir de la especificidad de sustrato desarrollada por la proteína durante la reacción de fosforilación. En eucariotas, el grupo predominante lo conforman las Ser/Thr quininas, que fosforilan residuos polares sin carga de serina y/o treonina, mientras que las proteínas Tyr quininas tan sólo lo hacen sobre residuos aromáticos de tirosina. Ambos tipos de proteínas comparten un dominio catalítico muy similar desde el punto de vista estructural, pero con ciertas diferencias en su secuencia, sobre todo centradas en torno al centro catalítico. En concreto, las Ser/Thr quininas presentan en esta región del subdominio VIb la secuencia HRDxK, mientras que en las Tyr quininas, la lisina terminal es sustituida por alanina, serina o treonina, con el consenso HRDxA/S/T.

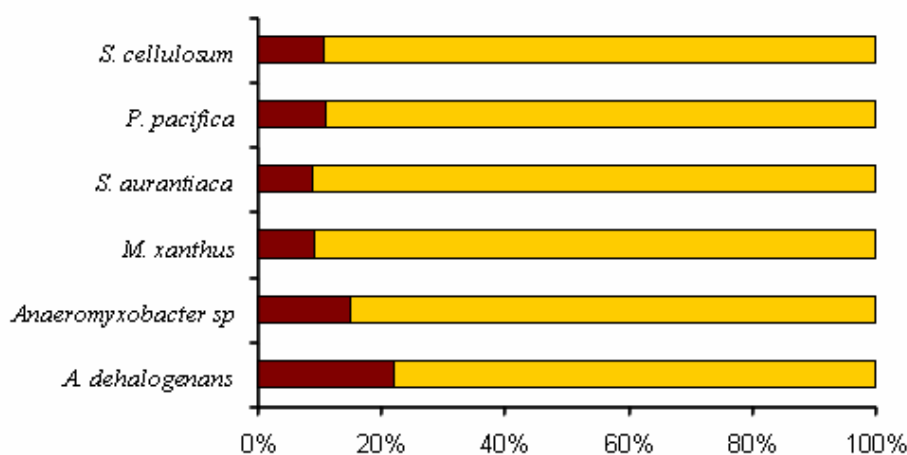
El estudio de la secuencia del centro activo de las ePKs de *M. xanthus* con el programa de análisis funcional PROSITE, junto con el rastreo de similitud de secuencia con FASTA, ha permitido identificar 58 proteínas que contienen en su centro activo la firma de las Ser/Thr quininas, junto con otras 41 que poseen la firma de Tyr quininas. La mayoría de miembros de cada grupo contienen en su centro activo la secuencia característica de las Ser/Thr quininas o de las Tyr quininas, según el caso. Sin embargo, una pequeña porción de quininas han sido asignadas a uno u otro grupo por similitud, puesto que la secuencia de su centro activo no se ajustaba a ninguna de las secuencias consenso establecidas para la especificidad serina/treonina o tirosina.

Puesto que en otras bacterias tan sólo se conoce la existencia de Ser/Thr quininas, es muy llamativa la existencia en mixobacterias de un posible grupo putativo de Tyr quininas. El análisis de la secuencia completa del dominio catalítico de las quininas de *M. xanthus* separa igualmente dos bloques de quininas, en concordancia con el tipo de especificidad propuesta para cada uno. En este sentido, al comparar la secuencia de este dominio entre miembros de ambos grupos, se pueden apreciar diferencias globales a lo largo de esta región que refuerzan las diferencias existentes en el bucle catalítico. Sin embargo, ambos tipos de quininas coinciden en la presencia en la región de activación de abundantes residuos tanto de serina como de treonina y apenas de tirosina, lo que pone en duda la auténtica especificidad de las proteínas con la firma de Tyr quininas.

I. 4. 3. Regulación de la actividad catalítica

La secuencia del centro catalítico de las ePKs (subdominio VIb) permite diferenciar dos grupos diferentes de proteínas quininas, denominadas quininas de tipo RD y no RD. Las quininas de tipo RD contienen un residuo de arginina justo por delante del aspártico catalítico del centro activo, mientras que las de tipo no RD carecen de este residuo en dicha posición. Esta diferencia en el centro activo de la enzima condiciona el mecanismo de regulación de la actividad catalítica para cada tipo de quinasa. Así, las quininas RD se encuentran normalmente reguladas mediante fosforilación del segmento de activación, sobre residuos de serina/treonina o tirosina, según se trate de Ser/Thr o Tyr quininas, mientras que las quininas de tipo no RD no se autofosforilan en ningún caso.

El análisis de la secuencia del centro activo (subdominio VIb) en las ePKs de *M. xanthus*, ha permitido identificar un grupo predominante de 87 proteínas de tipo RD junto con otras 12 proteínas no RD, que representan tan sólo algo más del 10% del total de ePKs en *M. xanthus*. Este resultado se encuentra en concordancia con la elevada proporción de quinasas RD en eucariotas, en donde este grupo de proteínas son igualmente mayoritarias. En las quinasas no RD de *M. xanthus*, el residuo de arginina es sustituido normalmente por glicina o cisteína. Entre ellas, 9 proteínas se consideran quinasas no RD canónicas, puesto que carecen de arginina pero mantienen el aspártico catalítico, mientras que las restantes corresponden a quinasas no R no D1. En la Figura 12 se muestra la proporción de quinasas RD y no RD en mixobacterias.



	NO RD	RD canónicas
<i>A. dehalogenans</i>	4	14
<i>Anaeromyxobacter sp.</i>	3	17
<i>M. xanthus</i>	9	83
<i>S. aurantiaca</i>	16	152
<i>P. pacifica</i>	26	202
<i>S. cellulosum</i>	34	276

Figura 12. Regulación de la actividad en las ePKs de mixobacterias: quinasas RD (naranja) y no RD (rojo)

El estudio de la región de activación de las quinasas de tipo RD de *M. xanthus*, correspondiente al segmento proteico de 15-30 aminoácidos de longitud situado entre los subdominios VII del VIII del dominio catalítico, permite detectar la presencia en esta región de múltiples residuos de serina y treonina, y en menor medida de residuos de tirosina, a diferencia de lo que ocurre en las quinasas no RD. En este sentido, más de la mitad de las quinasas RD contienen de 2 a 4 residuos de serina o treonina en esta región, incluso en bastantes ocasiones presentan 5 o más residuos de este tipo, mientras que las quinasas no RD normalmente contienen uno o ningún residuo de serina o treonina y en ningún caso presentan residuos de tirosina. Tan sólo se han detectado dos quinasas RD de *M. xanthus*, Mxan5045 y Mxan7251, carentes de residuos de Ser o Thr en la región de activación.

El alineamiento de la secuencia del segmento de activación de las quinasas de tipo RD revela la existencia de un residuo conservado de Thr en casi la totalidad de las quinasas RD, reemplazado en ocasiones por Ser, como se muestra en la Figura 13. Este residuo aceptor se sitúa en una posición constante dentro de esta región, siete aminoácidos por encima del residuo de glicina inicial del subdominio VIII y por tanto, conforma un posible punto para la regulación de la actividad catalítica de las proteínas RD mediante fosforilación. La existencia de múltiples residuos adicionales de Ser y Thr en la región de activación de las quinasas RD tal como aparece en la Figura 13 posibilita que muchas de ellas puedan ser reguladas mediante la fosforilación simultánea de varios residuos aceptores. En cambio, todas las quinasas no RD carecen de Thr o Ser en esta posición del segmento de activación (salvo Mxan0933), lo que reafirma la ausencia de fosforilación de esta región en este tipo de quinasas en mixobacterias.

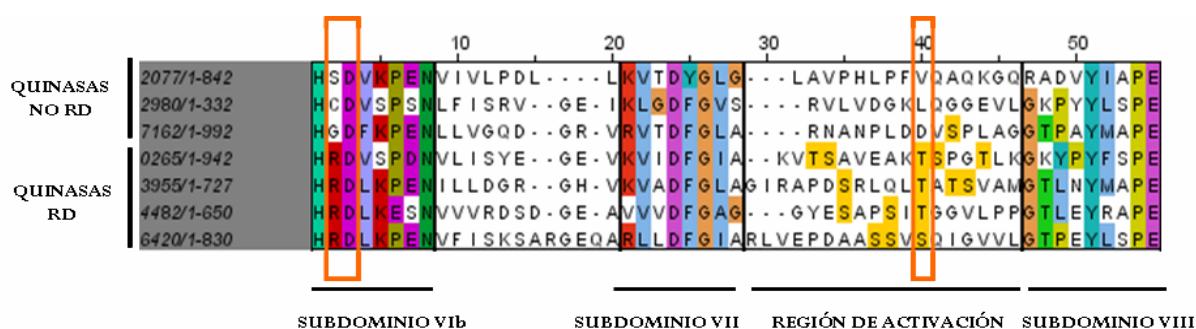


Figura 13. Fosforilación de la región de activación de las quinasas RD de *M. xanthus*. En la figura se muestra el alineamiento de la región comprendida entre los subdominios VIIb y VIII de diferentes quinasas RD y no RD de *M. xanthus*. En él se ha destacado la secuencia del centro activo así como la posición conservada ocupada por residuos de treonina o serina en el segmento de activación de las quinasas RD. Todos los residuos de serina o treonina susceptibles de fosforilación en esta región aparecen en amarillo.

I. 5. Dominio regulador de las ePKs de mixobacterias

Las ePKs de mixobacterias, como se ha comentado previamente, presentan con frecuencia una región C-terminal de longitud variable que corresponde con la región reguladora (DR) de la proteína. Al analizar la similitud de esta región con otras proteínas depositadas en las bases de datos, en la mayoría de los casos no se obtiene ningún tipo de homología significativa con cualquier otra proteína conocida. De igual forma, no es posible detectar en muchas de ellas motivos funcionales relevantes. Sin embargo, en torno a un tercio del total de quinasas presentan un dominio regulador C-terminal con motivos característicos que aportan funciones diversas a la proteína.

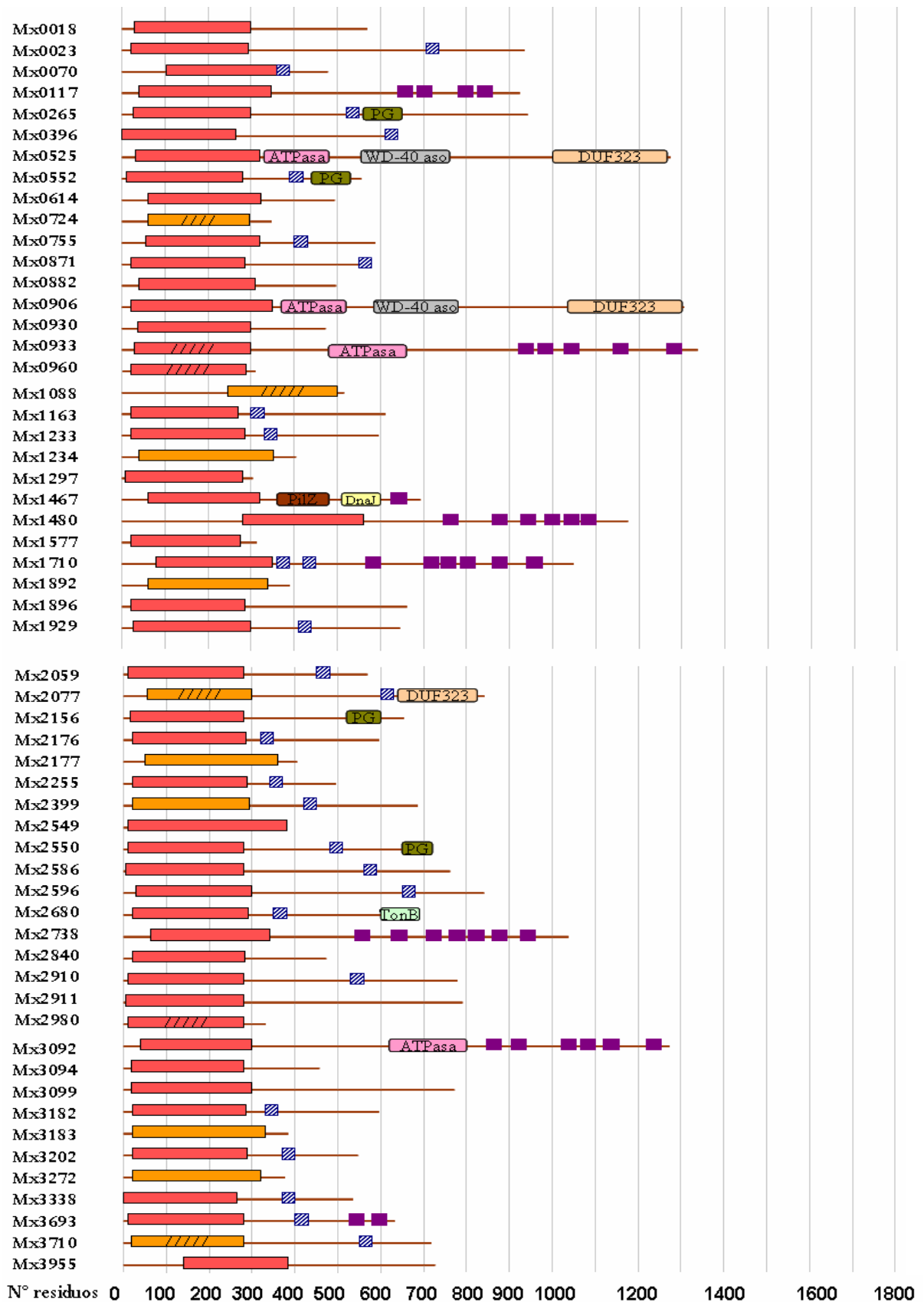
El análisis global de los dominios proteicos en las ePKs de mixobacterias, sintetizado en la Tabla 6, revela un incremento de la complejidad de motivos funcionales a medida que aumenta el número de ePKs. En este sentido, mientras las ePKs de *A. dehalogenans* son muy sencillas, a medida que aumenta el número de ePKs aparecen diferentes combinaciones de dominios funcionales, alcanzando su culminación en *S. cellulosum*, que posee múltiples ePKs multidominio muy complejas, y en muchos casos, con combinaciones novedosas no descritas previamente. Entre las ePKs que portan varios dominios se encuentran en algunas ocasiones quinasas atípicas de tipo no K o no D, así como también abundan las quinasas de tipo no RD carentes de mecanismo de regulación por autofosforilación.

Al estudiar las ePKs de mixobacterias se comprueba la existencia de un claro predominio de los motivos de interacción proteína-proteína como las repeticiones TPR o WD-40, y en mucha menor medida los motivos FHA. De igual forma, también se hace evidente la estrecha relación de las ePKs con los sistemas reguladores de dos componentes y los sistemas basados en segundos mensajeros. Así, aparecen múltiples proteínas híbridas que poseen un dominio ePK quinasa junto con un dominio histidina quinasa (HisK) o un dominio regulador de respuesta (RR), típicos de los sistemas de dos componentes, o bien, en el caso de los sistemas de segundos mensajeros, con un dominio adenilato/guanilato ciclasa (CYC) o incluso con un dominio PilZ, de unión a di-GMPc.

Dominios	<i>S. cellulosum</i>	<i>P. pacifica</i>	<i>S. aurantiaca</i>	<i>M. xanthus</i>	<i>A. debabogenans</i>	<i>Anaeromyxobacter</i> sp.
ePK-GAF-HisK	6	4	4	1	-	-
ePK-GAF-PAS-GAF-HisK	5	-	-	-	-	-
ePK-GAF-GAF-HisK	1	-	-	-	-	-
ePK-GAF-PAS-HisK	2	12	-	-	-	-
ePK-GAF-HisK-RR	2	1	-	-	-	-
ePK-GAF-STAS	8	-	-	-	-	-
ePK-GAF-PAS-HWE	1	-	-	-	-	-
ePK-PAS-PAS	-	1	-	-	-	-
ePK-RR	1	1	-	1	-	-
ePK-RR- CYC	3	-	3	1	-	-
ePK-CYC	6	3	2	1	-	-
ePK-PilZ	-	-	1	-	1	-
ePK-PilZ-DNAJ	-	-	-	-	-	1
ePK-DNAJ-PilZ-TPR	-	-	-	1	-	-
ePK-ePK	4	1	-	-	-	-
ePK-ePK-WD40	-	1	-	-	-	-
ePK-ePK-TPR	-	1	-	-	-	-
ePK-TPRs	83	52	13	14	5	3
ePK-TPR-GAF-σ54 ACT-HTH	4	-	-	-	-	-
ePK-WD40	3	6	-	-	1	1
ePK-WD40-DUF323	-	1	-	2	-	-
ePK-FHA	2	2	-	-	-	-
FHA-ePK	-	-	-	-	-	1
ePK-DNAJ	-	-	1	-	-	-
ePK-DNAJ-TPR	-	-	-	1	-	-
ePK-DUF323	11	-	2	3	-	-
ePK-PEGA	-	2	4	7	3	2
ePK-A1pp	1	-	-	-	-	-
ePK-Globina-Abhidrolasa1	1	-	-	-	-	-
ePK-CCP_MauG	1	-	-	-	-	-
ePK-SEFIR	-	1	-	-	-	-
ePK-Fer2-Globina	-	1	-	-	-	-
ePK-RHH1	-	-	1	-	-	-
ePK-GSPIIE	-	-	2	-	-	-
ePK-TonB	-	-	-	1	-	-
ePK-Usp1	-	-	-	-	1	1
ePK-HEAT_PBS	-	-	-	-	1	1

Tabla 6. Organización de dominios funcionales en las ePKs de mixobacterias. Las diferentes combinaciones de motivos se muestran siguiendo el siguiente orden (en azul, combinaciones novedosas no descritas previamente):
 -ePKs con dominios típicos de los sistemas reguladores de dos componentes (HisK dominio histidina quinasa, RR dominio regulador de respuesta, dominio sensor GAF y dominio sensor PAS).
 -ePKs con dominios de síntesis de segundos mensajeros, como CYC adenilato/guanilato ciclasa y PilZ para la unión de diGMPc.
 -ePKs con dominio catalítico Ser/Thr/Tyr quinasa duplicado en tándem.
 -ePKs con dominios de interacción proteína-proteína (TPR, WD40, FHA, DNAJ).
 -ePKs con dominios minoritarios (muchos de ellos novedosos) y/o de significado biológico desconocido.

En la Figura 14 se muestra una representación gráfica de las ePKs de *M. xanthus*, con el dominio catalítico N-terminal y el dominio regulador C-terminal, en donde aparecen las diferentes combinaciones de motivos portados por las ePKs de esta bacteria.



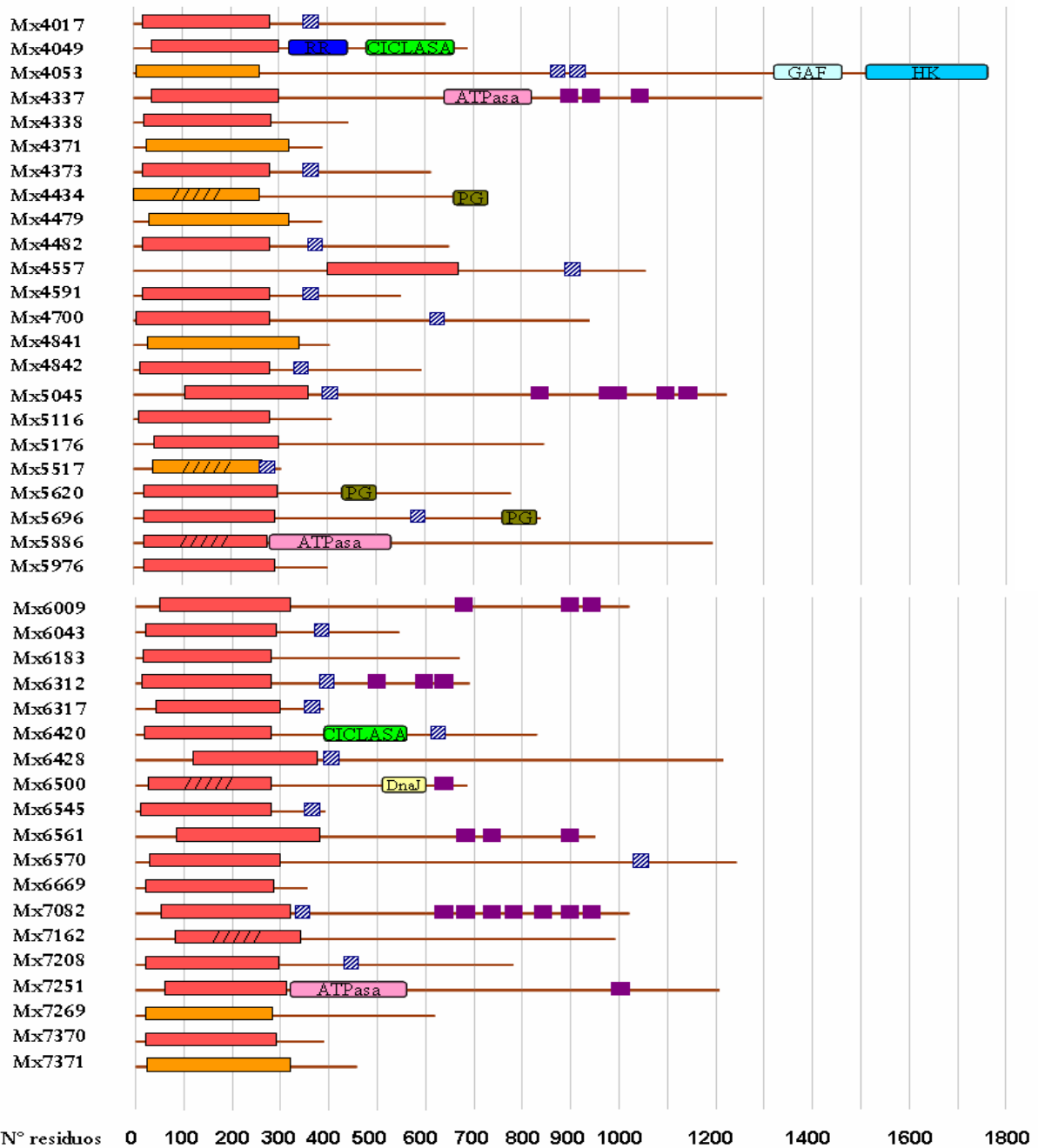
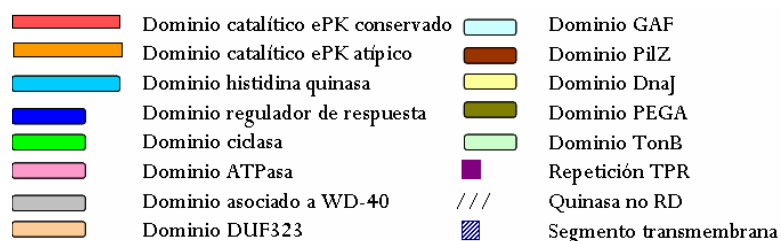


Figura 14. ePKs codificadas por el genoma de *M. xanthus*. En la figura se aprecia la longitud de la secuencia de cada quinasa así como su localización celular (citoplasmática o de membrana). En cada proteína, se ha delimitado las distintas regiones que conforman la quinasa, con el dominio catalítico N-terminal junto con el dominio regulador C-terminal. Respecto al dominio catalítico, se indica si se encuentra bien conservado ($E < 1.0e-20$) o bien presenta cambios importantes ($E > 1.0e-15$). Igualmente, se destacan aquellas proteínas con un dominio catalítico de tipo no RD. Finalmente, en el dominio regulador se reseñan los motivos funcionales importantes que aparecen en esta región.



Al centrarnos en el análisis de las ePKs de *M. xanthus*, se observa que los motivos proteicos más frecuentes en la región reguladora de las ePKs de *M. xanthus* corresponden con dominios de interacción proteína-proteína, destacando principalmente la presencia de repeticiones TPR (PF00515; PF07719; PF07721) y regiones ricas en prolina (PS50099), y de forma minoritaria los motivos WD40. Estos dominios participan en la unión de la quinasa a otras proteínas, como sustratos o moduladores, así como en el ensamblaje de complejos multiproteicos de señalización. La presencia de este tipo de motivos es muy frecuente en las ePKs de bacterias y eucariotas.

El motivo TPR (tetratricopéptido) ha sido detectado en un total de 16 ePKs de *M. xanthus*. Este dominio consta de varias repeticiones en tándem de una secuencia de 34 aminoácidos plegada en una estructura hélice-giro-hélice, cuya asociación genera una espiral de α -hélices antiparalelas en torno a una cavidad de interacción proteica (D'Andrea y Regan, 2003). En *M. xanthus*, las quinasas con TPR contienen de forma predominante de tres a cinco repeticiones como media, aunque a veces se alcanzan incluso siete u ocho repeticiones. Esta región media el establecimiento de interacciones proteicas con otros motivos TPR y WD-40, siendo necesarias al menos la presencia de tres o más repeticiones sucesivas para generar un motivo funcional.

Muchas proteínas quinasas de *M. xanthus* contienen motivos ricos en residuos de prolina, en concreto, al menos 22 de ellas presentan alguna región proteica con una elevada abundancia en este aminoácido en la región reguladora. Los dominios ricos en prolina intervienen con frecuencia como determinantes para el reconocimiento proteico por otros motivos de interacción proteína-proteína típicos de otras proteínas de señalización, dirigidos de forma selectiva hacia secuencias ricas en prolina (Kay *et al.*, 2000). De esta forma, estas regiones colaboran en la asociación entre cada quinasa con su sustratos o bien con algún regulador mediante contactos proteicos a veces dependientes del estado de fosforilación.

Por otro lado, además de dominios de interacción proteína-proteína, también se han encontrado en algunas quinasas de *M. xanthus* diversos motivos de señalización celular comunes a los sistemas reguladores de dos componentes, así como propios de las rutas de señalización dependientes de segundos mensajeros. La coexistencia en una misma proteína de dominios característicos de diferentes sistemas de señalización indica que estas rutas han de presentar cierta interconexión funcional en esta bacteria.

La combinación de motivos típicos de las ePKs y los sistemas reguladores de dos componentes se muestra en la presencia de una proteína dual, la quinasa Mxan4053, que porta un dominio Ser/Thr quinasa en la región N-terminal junto con un dominio histidina quinasa hacia la región C-terminal separadas por un motivo GAF. El dominio GAF de unión a nucleótidos cíclicos es muy frecuente en muchas histidina quinasas y adenilato ciclasas para regular la actividad de estas proteínas (Kanacher *et al.*, 2002). Esta proteína híbrida presenta bastantes cambios importantes en la región Ser/Thr quinasa, como la pérdida aparente del subdominio I de unión a ATP y el VII que coordina iones Mg^{2+} .

Por otro lado, se ha detectado igualmente la asociación en una misma proteína, Mxan6420 (Pkn2), de un dominio Ser/Thr quinasa N-terminal junto a un dominio adenilato/guanilato ciclasa para la síntesis de nucleótidos cíclicos de tipo AMPc/GMPc (PF00211). En esta combinación de dominios confluyen los sistemas basados en ePKs con aquellos que dependen de segundos mensajeros. De igual manera, en la proteína Mxan4049 aparecen el par de motivos anteriores, pero en este caso contiene entre ambos de forma

adicional un dominio regulador de respuesta, propio de los sistemas reguladores de dos componentes. Esta organización modular es única entre las ePKs de bacterias e integra de forma conjunta tres rutas diferentes de señalización en una misma proteína.

La relación con las rutas dependientes de segundos mensajeros se refleja en la presencia de un dominio PilZ (PF07238) en la quinasa Mxan1467, un motivo identificado en proteínas necesarias para el ensamblaje de pili de tipo IV. Esta región aparece en muchas proteínas de señalización bacterianas y se encuentra implicado en la unión del compuesto diguanilato cíclico (di-GMPc), un nucleótido importante en la señalización basada en segundos mensajeros. Esta proteína, al igual que la quinasa Mxan6500, porta además un dominio DnaJ N-terminal (SSF46565) implicado en mediar interacciones proteicas con otras proteínas como chaperonas.

Por otro lado, varias quinzasas de *M. xanthus* muestran similitud en su región reguladora con proteínas portadoras de dominios de unión e hidrólisis de ATP (PF B_361). En esta región ATPasa, aparece un motivo de tipo bucle P implicado en la interacción con el ATP. Este tipo de dominios aparece en una amplia variedad de proteínas implicadas en diferentes actividades que requieren un aporte energético. Finalmente, se han identificado dominios conservados de función desconocida, como ocurre con el DUF323 (PF03781) o el dominio PEGA (PF08308), una región que mantiene similitud con proteínas de la capa S.

I. 6. Relación del quinoma con la expansión del genoma en las mixobacterias

El tamaño de los genomas de las mixobacterias se sitúa entre los de mayor tamaño dentro de los procariontes, por lo que se plantea la cuestión sobre los elementos que han conducido a este incremento en la cantidad de material genético en las mixobacterias. El estudio detallado del conjunto de genes para ePKs en estas bacterias permite concluir que esta amplia familia de proteínas se ha originado de forma mayoritaria mediante amplificación, a partir de una serie de eventos de duplicación y divergencia específicos de este grupo. Así, la similitud que muestran entre sí la mayoría de ePKs de mixobacterias supera a la existente con cualquier otra quinasa ajena a este grupo. Este mecanismo genético ha contribuido de forma fundamental a la expansión del tamaño del genoma dentro de este grupo de bacterias. De hecho, el porcentaje del genoma que cada una de las mixobacterias dedica a codificar ePKs se incrementa casi exponencialmente a medida que aumenta el tamaño de dicho genoma, como se observa en la Figura 15.

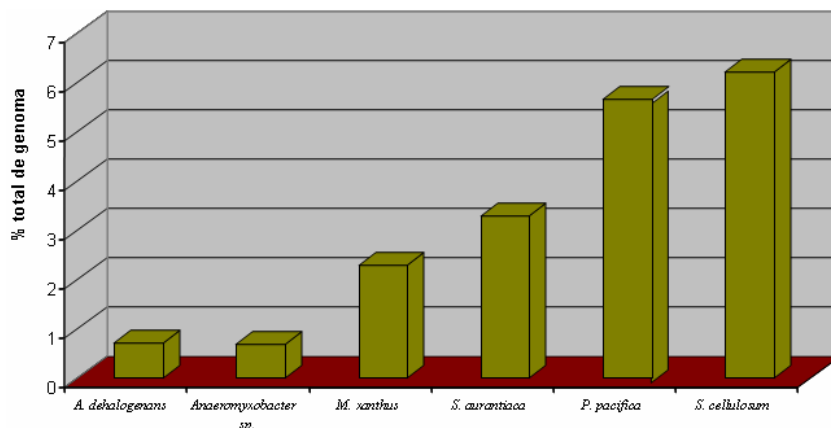


Figura 15. Porcentaje de genoma dedicado a codificar ePKs en las mixobacterias secuenciadas.

El efecto del incremento en el número de ePKs mediante duplicación y divergencia sobre la expansión del genoma de las mixobacterias revela su magnitud al considerar que el número de Kb dedicados a codificar ePKs en algunas de estas bacterias supera ampliamente el tamaño total del genoma perteneciente a las bacterias con menor cantidad de material genético entre los procariontas, como se muestra en la Tabla 7.

Bacteria	ePKs	Mbp genoma	% genoma	ePKs (Kb)	Bacteria	Kb genoma completo
<i>A. dehalogenans</i>	18	5	0,71	35,6	<i>Buchnera aphidicola</i> str Cc	416,3
<i>Anaeromyxobacter</i> sp.	20	5,3	0,69	36,7	<i>Mycoplasma genitalium</i> G37	680
<i>M. xanthus</i>	99	9,1	2,28	208,1	<i>Mycoplasma mobile</i> 163K	777
<i>S. aurantiaca</i>	181	10,2	3,3	337,1	<i>Mycoplasma synoviae</i> 53	799,4
<i>P. pacifica</i>	237	10,59	5,66	599,3	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129	816,3
<i>S. cellulosum</i>	318	13	6,22	808,4		

Tabla 7. Porcentaje del genoma y tamaño de la secuencia en Kb destinada para codificar ePKs en las mixobacterias en comparación con el tamaño en Kb de los genomas bacterianos de menor tamaño.

Este incremento en el tamaño progresivo de la proporción de genoma destinada a codificar ePKs en las mixobacterias tiene su reflejo en el aumento gradual del tamaño de estos genes a medida que crece el tamaño del genoma de la mixobacteria. Como se aprecia en la Figura 16, la frecuencia de quinasas con un tamaño considerable (superior a los 1000 residuos) se incrementa en paralelo a la expansión del genoma en las mixobacterias, desde sólo dos en *A. dehalogenans*, hasta la veintena en *M. xanthus* y *S. aurantiaca*, para ya superar el centenar en *P. pacifica* y *S. cellulosum*, en este último caso algunas de ellas llegan más allá de los 2000 residuos.

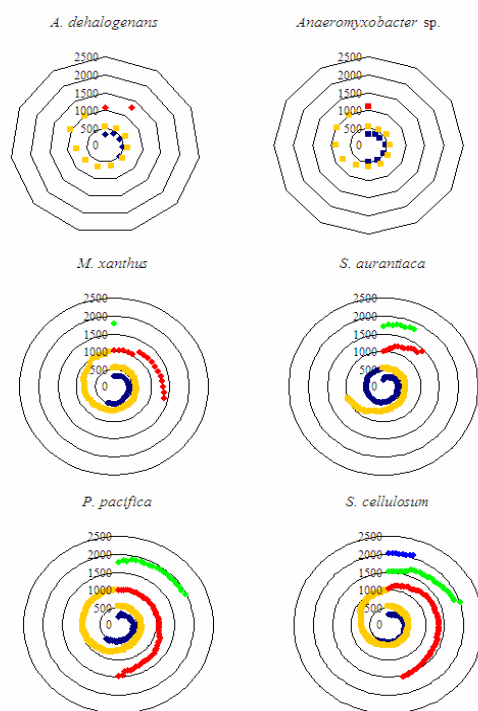


Figura 16. Tamaño de las ePKs codificadas por las mixobacterias (en número de aminoácidos). Clave: azul oscuro, menos de 500 aa; amarillo, 500-1000 aa; rojo, 1000-1500; verde, 1500-2000 aa; azul claro, más de 2000 aa.

Dentro de un mismo genoma en ocasiones aparecen quinasas que mantienen un grado de similitud muy elevado con una escasa divergencia entre ellas, lo que indica que la duplicación que las ha originado ha ocurrido de forma reciente. Además, a veces esta duplicación comprende no sólo el gen que cifra la quinasa, sino que abarca regiones más extensas que incluyen los genes próximos a las ePKs en el cromosoma. Un caso paradigmático es la duplicación de una región integrada por genes para ePKs asociadas a un gen que cifra una proteína hipotética dentro de las especies del suborden *Cystobacterinae* (*Anaeromyxobacter*, *Myxococcus* y *Stigmatella*), mostrado en la Figura 17.

En el caso de *A. dehalogenans* (5.0 Mb), tan solo aparece una única pareja ePK-proteína hipotética, mientras que en *M. xanthus*, en donde el tamaño de genoma es de 9.1 Mb, la combinación aparece repetida nueve veces, en cuatro de las cuales aparece adicionalmente una ePK de tipo no D asociada dando lugar a parejas de genes para ePKs situadas en un mismo operón. En una de ellas, la pareja de quinasas repetidas ha perdido el gen que codifica la proteína hipotética adyacente. Por último, en *S. aurantiaca* con un tamaño de genoma de 10.2 Mb, se aprecian un total de quince parejas ePK-proteína hipotética, de las cuales hasta diez combinaciones corresponden con las parejas de genes para ePKs asociadas con la proteína hipotética. La duplicación progresiva de esta región en concordancia con el incremento en el tamaño del genoma probablemente está relacionado con la presencia de genes para transposasas en la proximidad de esta región en la bacteria *S. aurantiaca*.

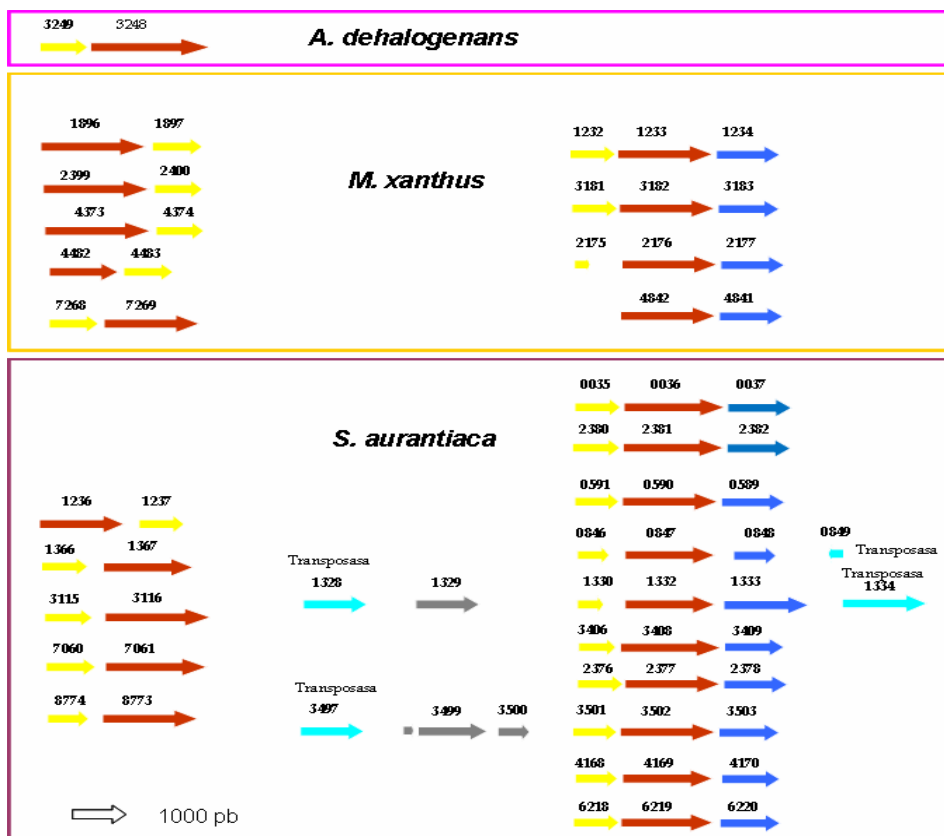


Figura 17. Duplicación de genes para ePKs en las especies del suborden *Cystobacterinae*. En la figura, se muestran los genes para ePKs similares entre sí (rojo y azul oscuro), junto con el gen conservado para la proteína hipotética (amarillo). Igualmente, se muestran los genes que codifican transposasas (azul claro) así como los genes sin similitud que aparecen en esta región (gris).

I. 7. Sintenia en las regiones cromosómicas que cifran ePKs dentro del suborden *Cystobacterinae* de las mixobacterias

El análisis global de las ePKs codificadas por las mixobacterias permite identificar en muchas ocasiones quinasas homólogas que mantienen una elevada similitud entre sí dentro de las diferentes especies de este grupo. De esta forma, una proteína de este tipo en una mixobacteria como *M. xanthus* con frecuencia se encuentra representada en otras especies de este grupo, al portar quinasas similares que conservan un elevado grado de identidad entre todas ellas. Este tipo de ePKs específicas de este grupo de microorganismos presentan por tanto un origen evolutivo anterior a la separación de las diferentes especies de mixobacterias, ya que se encuentran presentes en todos los miembros de este grupo.

La organización de los genes que codifican ePKs similares dentro de las mixobacterias en muchas ocasiones se conserva dentro de los miembros de este grupo. De esta forma, es posible apreciar que la disposición e identidad de los genes situados en el entorno de genes para ePKs homólogas en diferentes especies de mixobacterias se mantienen en general muy constantes. La sintenia en la organización de estos genes se observa con mayor claridad dentro de las especies más próximas filogenéticamente pertenecientes al suborden *Cystobacterinae* de las mixobacterias. A continuación se exponen diferentes modelos de sintenia en las especies *A. dehalogenans*, *M. xanthus* y *S. aurantiaca*, en donde se puede apreciar cómo se conserva la región que rodea a genes para ePKs homólogas pertenecientes a estas especies de mixobacterias.

El operón que codifica las ePKs Pkn11 y Pkn7 se extiende por encima y por debajo de ambos genes para ePKs generando una unidad transcripcional que contiene al gen *asgB*, implicado en la producción de la señal A durante el desarrollo. Como se observa en la Figura 18, la identidad de los genes que conforman esta región se mantiene totalmente conservada en *M. xanthus* y *S. aurantiaca*, mientras que *A. dehalogenans* tan sólo mantiene un único gen para ePK en esta región, aunque conserva la disposición de los genes situados por debajo, incluido el gen *asgB*.

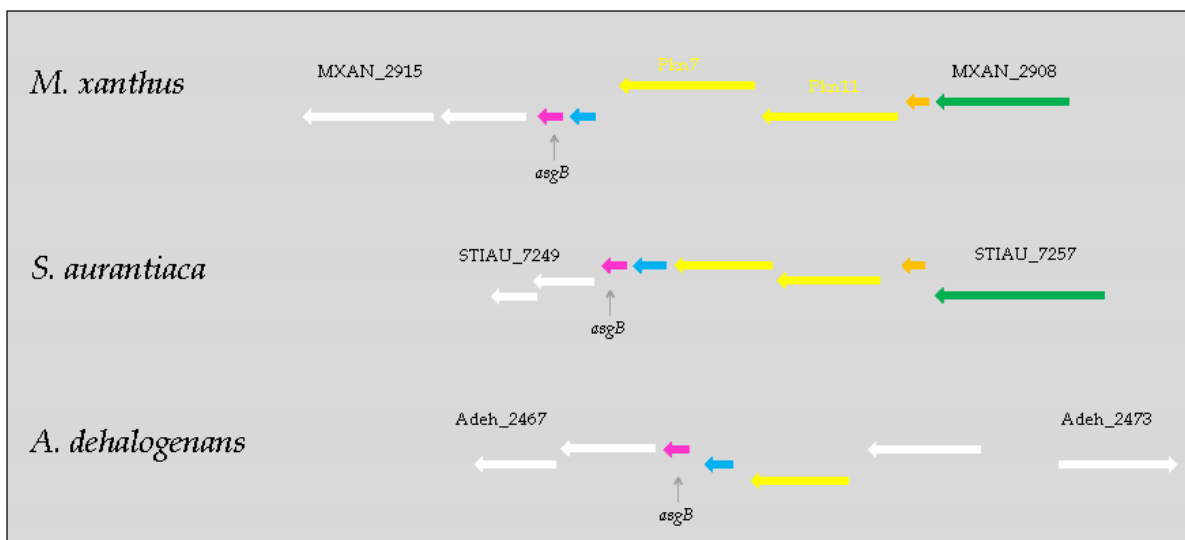


Figura 18. Sintenia en la región situada en torno al operón *pkn11-pkn7* (en amarillo).

El gen que codifica la quinasa Pkn3 se encuentra flanqueado por otros dos genes que cifran proteínas con dominio FHA y por el gen *relA* esencial para la respuesta estricta. En la Figura 19 se aprecia como toda esta región se mantiene constante en *M. xanthus* y *S. aurantiaca*, mientras que el gen *pkn3* es reemplazado por un gen hipotético de pequeño tamaño en *A. dehalogenans*, a pesar de que se mantiene la disposición de todos los genes que rodean a éste en su genoma.

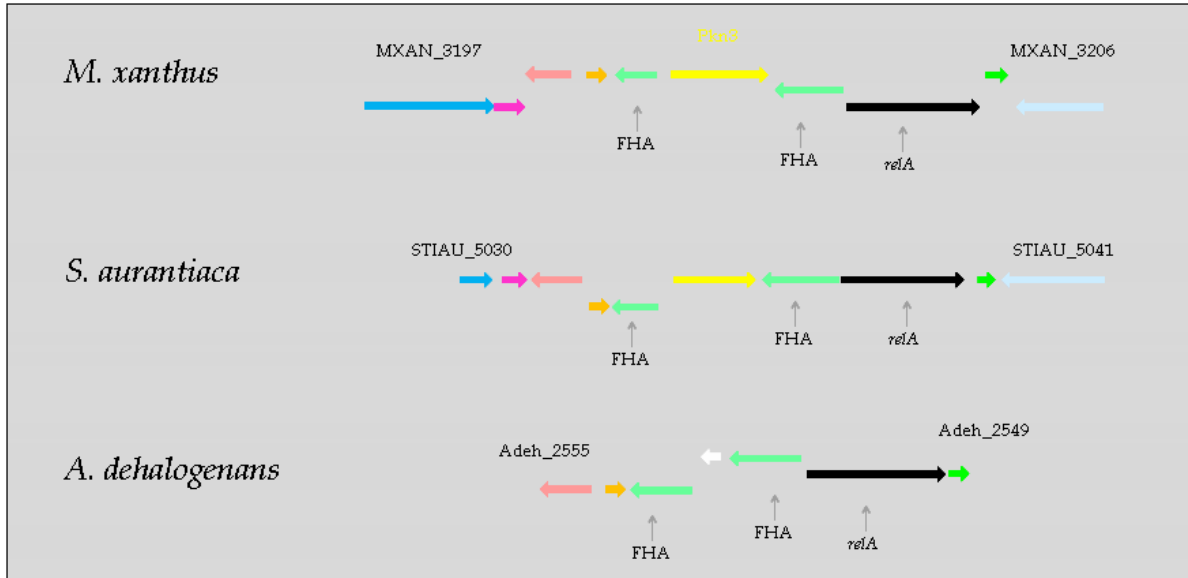


Figura 19. Sintenia en la región que contiene al gen *pkn3* (en amarillo).

Finalmente, los genes que cifran las quinastas PknD1 y PknD2 flanquean al operón *espAB*, cuyos productos se encuentran implicados en el control del ciclo de desarrollo en mixobacterias. En la Figura 20 se puede comprobar que toda esta región comprendida entre ambos genes para ePKs se conserva en *M. xanthus* y *S. aurantiaca* y *A. dehalogenans*, aunque en este último caso no aparece el gen *espA*, manteniendo tan sólo el gen *espB*.

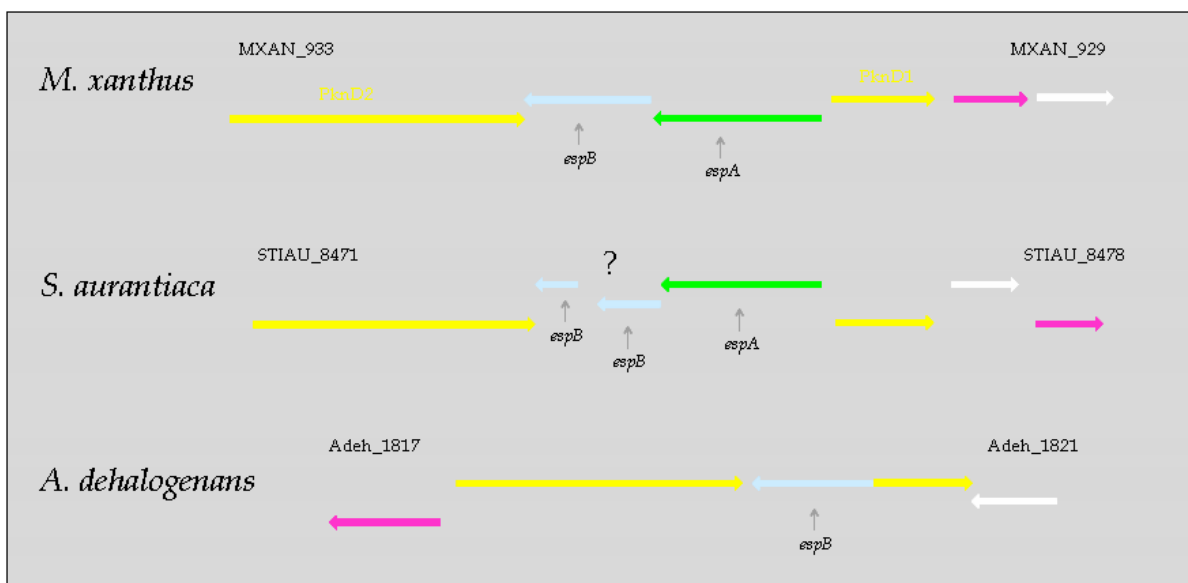


Figura 20. Sintenia en la región comprendida entre los genes *pknD1* y *pknD2* (en amarillo).

I. 8. Organización de los genes para ePKs en el genoma de *M. xanthus*

Los genes para ePKs identificados en *M. xanthus* se localizan repartidos a lo largo de todo el genoma, presentando una distribución bastante uniforme a lo largo del cromosoma de la mixobacteria, como se aprecia en la Figura 21. El análisis de la identidad de los genes próximos a aquellos que codifican ePKs en el genoma de *M. xanthus* proporciona indicios claves para conocer el rol desempeñado por cada quinasa dentro de las rutas de señalización de esta bacteria. Entre estos genes cercanos, muchos de ellos codifican proteínas de señalización que podrían participar junto a estas Ser/Thr y Tyr quinasas dentro una misma ruta reguladora.

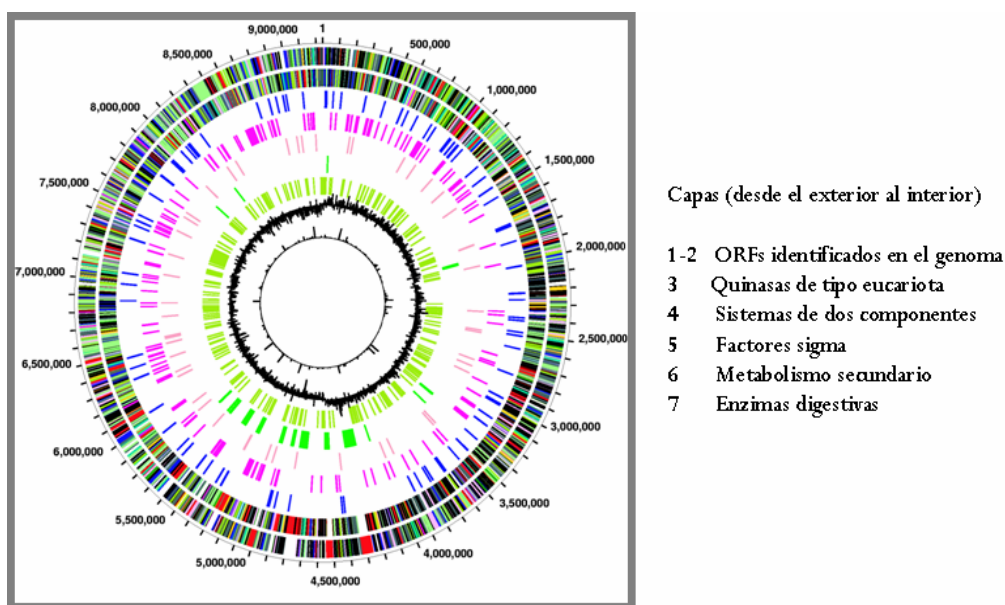


Figura 21. Localización de los genes para ePKs en el genoma de *M. xanthus* (barras de color azul, capa 3).

Al analizar la posición de los genes para ePKs en el cromosoma de *M. xanthus* se observa en ocasiones la presencia de parejas de genes situados justo al lado unos de otros y orientados en la misma dirección dentro de un mismo operón, como ocurre con el par *pkn7-pkn11* (Mx2910-Mx2911). Durante este estudio, junto a la cuádruple duplicación descrita en el apartado D. I. 6, se han identificado otros tres pares de genes de ePKs integrados en una misma unidad transcripcional: Mx4337-Mx4338, Mx7370-Mx7371 y Mx3092-Mx3094. Como se muestra en la Figura 22, estos genes se sitúan juntos en el genoma de *M. xanthus* sin apenas separación entre ambos, salvo en el último caso, en donde aparece un gen intermedio orientado en la misma dirección. Todos ellos codifican quinasas solubles de localización citoplasmática posiblemente relacionadas a nivel funcional dentro de cascadas de señalización de tipo eucariota.

Junto a ellos, otros muchos genes para quinasas se encuentran bastante cercanos en el genoma a pesar de no pertenecer a un mismo operón, tal como sucede con *pknD1-pknD2*, Mx0018-Mx0023, Mx4049-Mx4053 así como Mx6312-Mx6317, todos ellos separados por menos de cinco genes. En alguna ocasión, como en el par *pkn5-pkn6*, ambos genes presentan una orientación opuesta compartiendo una misma región promotora.

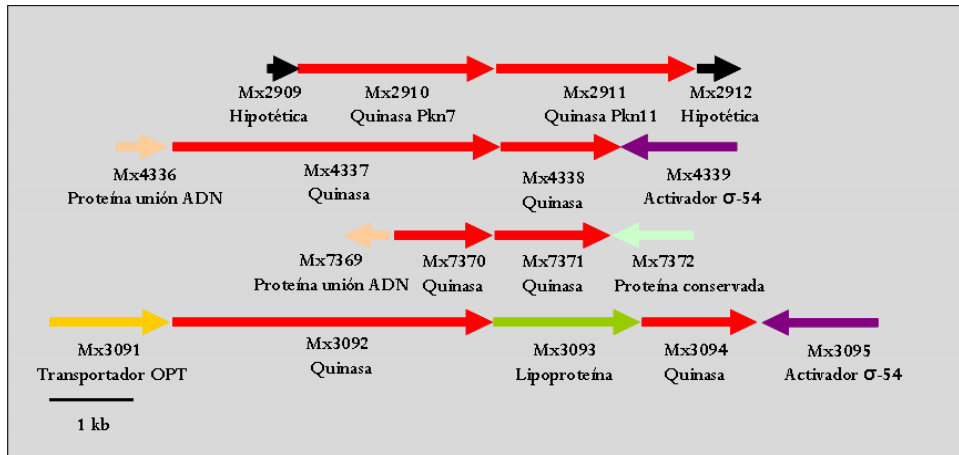


Figura 22. Disposición en el genoma de genes que cifran ePKs pertenecientes a un mismo operón. Los genes adyacentes se muestran con diferente código de color en función de su identidad.

La relación entre las ePKs y las proteínas de tipo fosfatasa durante la señalización celular se manifiesta por la presencia de varias parejas de genes quinasa-fosfatasa en el genoma de *M. xanthus*, como muestra la Figura 23. Se han identificado un total de tres operones que codifican quinazas asociadas a Ser/Thr fosfatasas de tipo PPP: Mx7162-Mx7163, Mx6545-Mx6543 y Mx0552-Mx0555, en los dos últimos casos separados entre sí por uno o dos genes orientados en la misma dirección. Otros dos genes para ePKs, Mx0265 y Mx0958, se localizan en orientación opuesta respecto a sendos genes para fosfatasas PPP. Finalmente, la quinasa codificada por el Mx4557 se sitúa en la misma orientación y probablemente dentro de un mismo operón respecto a un gen próximo para una fosfatasa de tipo PPM SpoIIE, codificada por el Mxan4562.

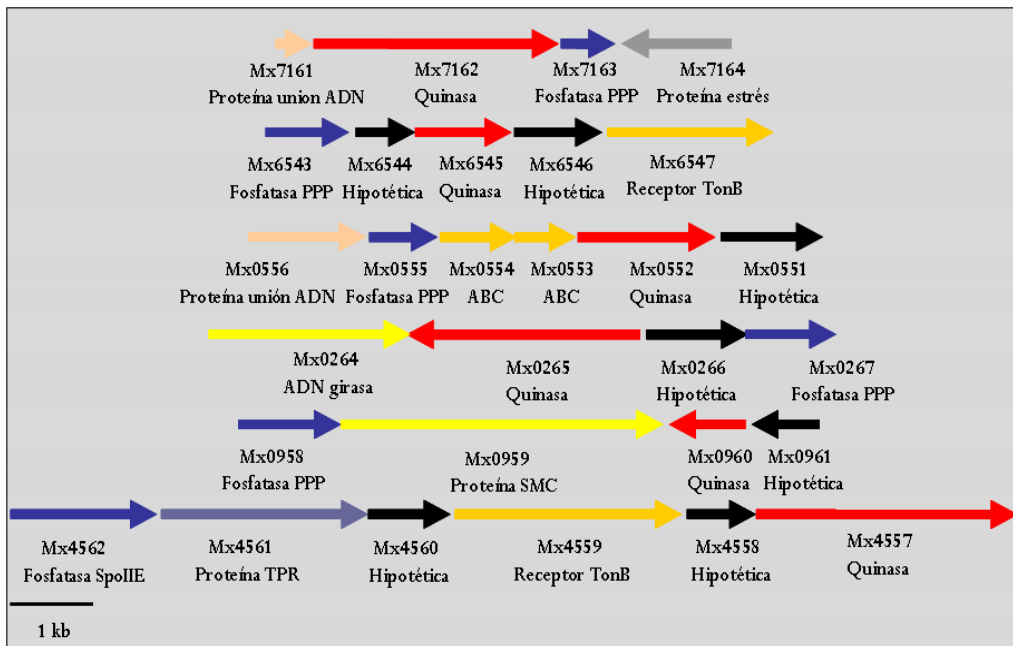


Figura 23. Disposición en el genoma de genes para ePKs asociados a genes para fosfatasas de tipo eucariota pertenecientes a los grupos PPP y PPM SpoIIE. Los genes adyacentes se muestran con diferente código de color en función de su identidad.

I. 9. Estudio del perfil de expresión de distintos genes que codifican ePKs de *M. xanthus*

Una vez completado el análisis bioinformático de las ePKs codificadas por el genoma de *M. xanthus*, se seleccionó entre todas ellas un conjunto de diez proteínas de esta familia con la finalidad de determinar el perfil de expresión de cada una de ellas a lo largo del ciclo de vida de la mixobacteria. Para conseguir este objetivo, la estrategia seguida fue la construcción de fusiones traduccionales entre cada uno de los genes que codifican estas quinasas y el gen *lacZ* de *E. coli*, que codifica para la enzima β -galactosidasa.

El principal criterio seguido durante la selección de este grupo de quinasas fue conseguir que la muestra seleccionada fuera suficientemente representativa respecto al conjunto de ePKs de *M. xanthus*. Para ello, se eligieron proteínas con características distintivas en relación a su tamaño, localización, especificidad catalítica y organización, y que por tanto, sirvieran de modelo para diferentes grupos de quinasas. De esta forma, el perfil de expresión generado por este subconjunto de quinasas podría ofrecer una aproximación para el patrón de expresión global de este tipo de proteínas en *M. xanthus*.

En la Tabla 8 se detalla la identidad de cada una de las Ser/Thr y Tyr quinasas cuyo perfil de expresión ha sido analizado durante este trabajo.

PROTEÍNAS			DOMINIO CATALÍTICO				DOMINIO REGULADOR
nº gen	tamaño	localiz	PFAM	homol	tipo	activ	motivos
Mx0525	1274	SOL	2.3e-46	CS	RD	ST	ATPasa + WD-40 + DUF323
Mx0552	556	TM	1.0e-38	CS	RD	Y	PEGA
Mx0930	473	SOL	1.2e-48	CS	RD	ST	ATPasa + TPR
Mx2176	597	TM	1.3e-32	CS	RD	ST	sin similitud
Mx3092	1274	SOL	2.0e-40	CS	RD	ST	ATPasa + TPR
Mx4338	443	SOL	9.2e-34	CS	RD	ST	sin similitud
Mx4700	941	TM	1.2e-41	CS	RD	Y	sin similitud
Mx5517	304	ANC	2.1e-08	AT	no RD	Y	ausente
Mx5696	840	TM	4.8e-29	CS	RD	Y	PEGA
Mx7370	390	SOL	2.3e-22	CS	RD	ST	sin similitud

Tabla 8. Características principales de las ePKs analizadas mediante fusión *lacZ*. Para cada una de ellas se muestra el tamaño de la proteína en número de aminoácidos y su localización celular (SOL, soluble; TM, transmembrana; ANC, anclada a membrana), el valor E del dominio catalítico (PFAM), su homología (CS, próxima al consenso; AT, atípica), el tipo (RD o no RD) y su especificidad putativa (ST, serina/treonina; Y, tirosina), junto con los motivos funcionales del dominio regulador.

La obtención de estas fusiones *lacZ* con cada uno de los genes para ePKs partió de la amplificación por PCR de un fragmento de ADN de 0.8 kb situado justo por encima del gen a analizar, empleando para ello cebadores específicos para cada gen y como molde el cromosoma de la estirpe silvestre de *M. xanthus*. El producto de PCR generado en cada caso se digirió con las enzimas adecuadas, al igual que el plásmido pKY481 portador del gen *lacZ* y entonces, se procedió a clonar en fase el correspondiente fragmento de ADN en el vector. Según el caso, la fusión con el gen *lacZ* del vector se llevó a cabo en el codón de iniciación o bien sobre los primeros codones del gen a analizar.

Las construcciones resultantes se incorporaron mediante electroporación en la cepa silvestre de *M. xanthus*, integrándose mediante recombinación sobre el gen diana correspondiente en el cromosoma bacteriano. En cada una de las cepas portadoras de fusiones *lacZ*, la síntesis de la enzima β -galactosidasa tan sólo se produce cuando a su vez se activa la expresión del gen fusionado, de manera que la actividad desarrollada por la estirpe en cada momento se correlaciona de forma directa con el nivel de expresión de la quinasa estudiada. Por tanto, para establecer el patrón de expresión de cada quinasa, se determinó la actividad β -galactosidasa desarrollada por la cepa portadora de la fusión a lo largo del ciclo de vida de *M. xanthus*.

Para mostrar el procedimiento desarrollado durante la obtención de estas fusiones *lacZ*, a continuación se detalla la construcción de la cepa portadora de una fusión traduccional entre el gen *pksA* (Mxan5696) y el gen *lacZ* de *E. coli*. La fusión *lacZ* con el gen que codifica la quinasa PksA se ha llevado a cabo mediante la fusión en fase del gen *lacZ* con los primeros 40 codones del gen *pksA*. Para ello, se ha amplificado por PCR un fragmento de ADN de 0.76 kb en la región situada justo por encima del gen *pksA* incluyendo el comienzo de este gen (posición -639 a +122), a partir de un molde de ADN cromosómico de la bacteria silvestre de *M. xanthus* con los cebadores apropiados (ver C.IV.2).

El fragmento de ADN purificado fue digerido con las enzimas *SmaI* y *BamHI*, al igual que el vector pKY481, para entonces proceder a la inserción en fase de este fragmento justo por delante del gen *lacZ* en el vector. En el plásmido obtenido portador de la fusión *lacZ*, denominado pKY-*pksA lacZ*, ambos genes se encuentran fusionados en fase a través de la diana *BamHI*, de manera que la expresión de esta construcción *in vivo* genera una proteína híbrida que contiene los primeros residuos de la quinasa unidos a la enzima β -galactosidasa completa de *E. coli*.

Finalmente, se generó la cepa portadora de la fusión tras incorporar por electroporación el plásmido pKY-*pksA lacZ* en la cepa silvestre de *M. xanthus*. Una vez introducida en esta bacteria, la construcción se integró en el cromosoma mediante recombinación sencilla a través de la región de homología situada justo por encima del gen *pksA*. Por último, se seleccionó la estirpe portadora de la fusión en un medio con kanamicina, en donde tan sólo crecieron aquellas bacterias que contenían la fusión *lacZ* inserta en su cromosoma de la bacteria

Las bacterias aisladas se analizaron mediante Southern blot. Para ello, tanto la preparación de cromosoma de la cepa silvestre (control) como las de las colonias presuntamente positivas se digirieron con la enzima *PstI* y se hibridaron con la sonda marcada, el fragmento amplificado por PCR empleado para la fusión. Esta sonda reconoce a un fragmento de 5.8 kb en el silvestre, mientras que en el caso de las bacterias portadoras de la fusión híbrida con un fragmento de 15.0 kb, debido a la integración del plásmido completo en el cromosoma de la bacteria.

En la Figura 24 se muestra el resultado del Southern blot, en donde se observa que todas las estirpes analizadas portaban la fusión *lacZ* con el gen que cifra la quinasa PksA. La bacteria resultante se denominó cepa *pksA-lacZ*. En todos los casos, las bacterias presuntamente portadoras de las diferentes fusiones *lacZ* con cada uno de los genes analizados fueron comprobadas mediante Southern blot para verificar la correcta construcción de cada fusión *lacZ*.

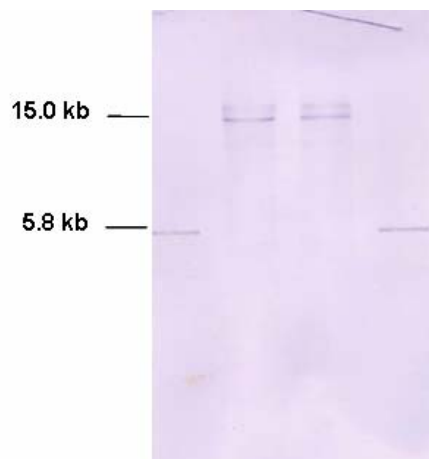


Figura 24. Southern blot de la fusión *lacZ* con el gen *pksA* de *M. xanthus*. Las preparaciones cromosómicas de la cepa silvestre (calles 1 y 4) y de las colonias analizadas (calles 2 y 3), se digirieron con *Pst*I y se hibridaron con el segmento situado justo por encima del gen *pksA*.

La actividad β -galactosidasa de cada una de las estirpes se analizó de forma cualitativa, tanto durante el crecimiento vegetativo en medio rico CTT como durante el desarrollo en medio pobre CF, en presencia en ambos casos del sustrato X-gal (100 μ g/ml). La adquisición de una tonalidad azulada tras la utilización de este compuesto por la enzima β -galactosidasa sirvió como marcador para conocer el tiempo y grado de expresión de cada quinasa a lo largo del ciclo de vida de *M. xanthus*. El análisis del perfil de expresión durante el crecimiento vegetativo así como a lo largo del ciclo de desarrollo para las diez quinastas analizadas se muestra en la Figura 25.

Como se puede observar en la imagen, en condiciones de crecimiento vegetativo, tan sólo se observa expresión de tres quinastas, (Mxan5696, Mxan4700 y Mxan0552), mientras que durante el ciclo de desarrollo en medio CF se inducen un total de cinco, las tres anteriores junto a otras dos quinastas adicionales (Mxan4338 y Mxan0930). De forma global, tan sólo la mitad de las quinastas analizadas se expresan durante el crecimiento vegetativo y/o el desarrollo en *M. xanthus*, mientras que el resto aparentemente no se expresan en las condiciones ensayadas o bien alcanzan niveles de expresión indetectables con esta técnica.

Al comparar la expresión de cada ePK en CTT y CF, se observa que todas las fusiones *lacZ* adquieren una tonalidad azulada más intensa en el medio pobre para un mismo tiempo de incubación. Por tanto, todas las quinastas analizadas se inducen de forma selectiva durante el desarrollo, incrementando de forma notable sus niveles de expresión en relación a la fase de crecimiento vegetativo, y de hecho, dos de ellas sólo se expresan durante el desarrollo.

El tiempo de expresión para cada quinasa es diferente, así, el Mxan5696 se expresa muy pronto, tan sólo tras 1 h de incubación, mientras que a partir de las 6 h comienzan a expresarse los Mxan4700 y Mxan0552 y finalmente, de forma tardía tras 24 h se inducen los Mxan4338 y Mxan0930, ambos sólo en medio CF. Igualmente, varía la intensidad de expresión de cada quinasa, de manera que el Mxan5696 se expresa siempre de forma fuerte, los Mxan4700 y Mxan0552 lo hacen a niveles moderados mientras que los Mxan4338 y Mxan0930 específicos del desarrollo se expresan tan sólo de forma débil.

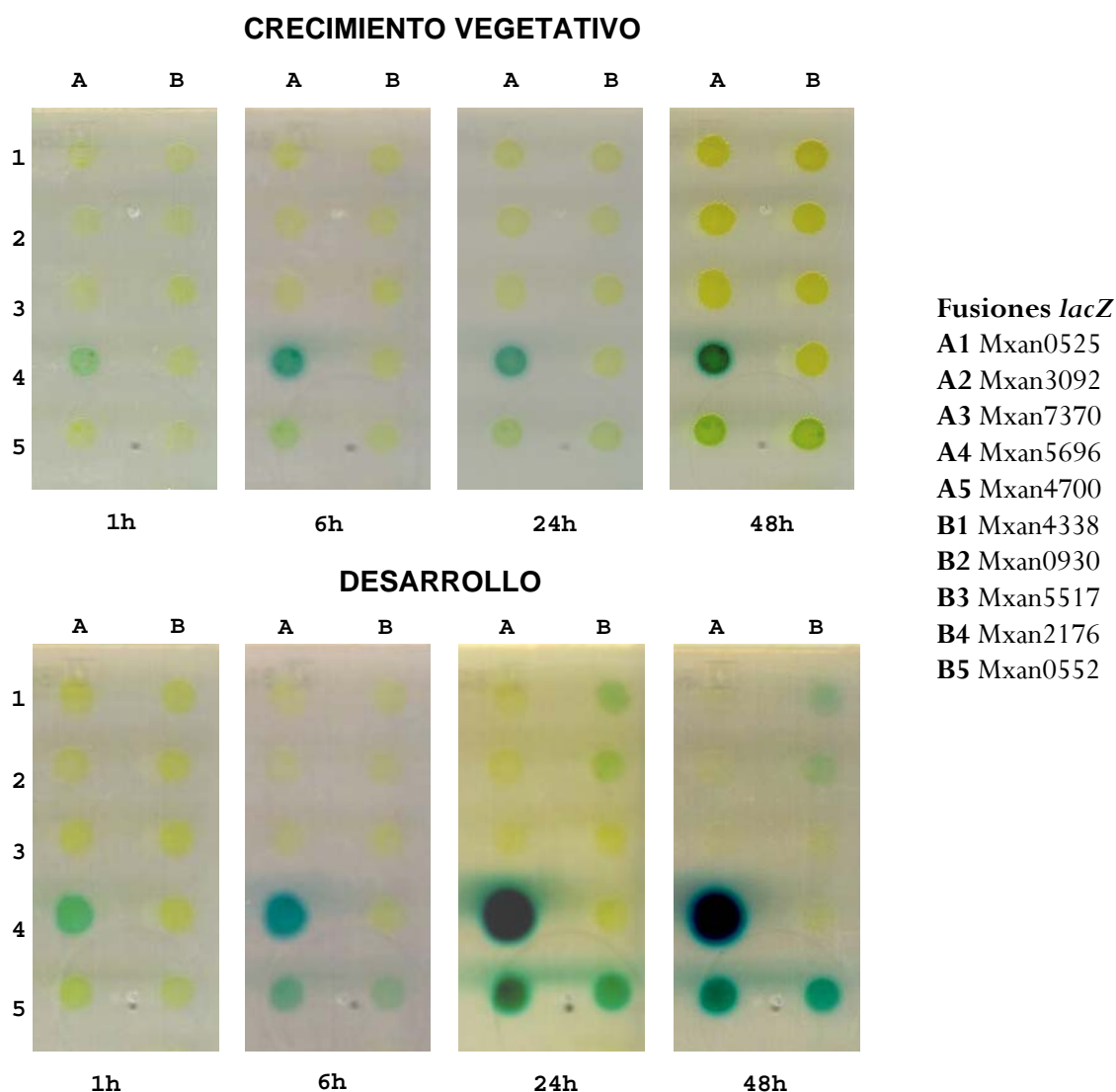


Figura 25. Actividad β -galactosidasa durante el crecimiento vegetativo (medio CTT) y el ciclo de desarrollo (medio CF) de las cepas portadoras de fusiones *lacZ* con diez genes para ePKs. Las bacterias se concentraron a DO_{600} de 15 y se mantuvieron a 30°C durante los tiempos de incubación indicados en la parte inferior de la figura.

La quinasa PksA (proteína quinasa asociada a stress celular) cifrada por el gen Mxan5696 en el genoma de *M. xanthus* presenta varias características de relevancia, como son su elevado nivel de expresión, muy por encima del resto de quinastas analizadas, su inducción específica durante el desarrollo de *M. xanthus* y su expresión temprana durante esta etapa. Todos estos elementos sugieren que esta quinasa podría desempeñar un papel clave para la regulación del ciclo de vida en la mixobacteria, y por tanto, se ha seleccionado por su interés para su caracterización a nivel molecular.

II. Caracterización de la ePK PksA de *M. xanthus* (Mxan5696)

II. 1. Análisis de la secuencia de gen *pksA* (Mxan5696)

El análisis de la secuencia del gen que codifica la ePK PksA permitió determinar la presencia de un orf constituido por 2523 pb. El triplete considerado como codón de iniciación de la traducción en este gen corresponde con un codón alternativo de tipo GTG situado justo por encima de la región que cifra el dominio catalítico de la quinasa. Este triplete de inicio, bastante común en los genes de *M. xanthus*, se sitúa tan sólo 30 pb por debajo de un codón de terminación definido en la misma pauta. No se ha podido asignar un codón ATG para el inicio de este gen, debido a que el primer triplete de este tipo situado en la pauta de lectura correcta se encuentra dentro del segmento que codifica el propio dominio quinasa. En la Figura 26 se muestra la secuencia completa del gen *pksA* así como la secuencia de aminoácidos de la proteína quinasa codificada por este gen.

El uso de codones de este gen es el característico para los genes de *M. xanthus*, con un elevado contenido en G+C, de forma que el 93% de los tripletes de este gen presentan C o G en la tercera posición. La región situada justo por encima de este gen, compuesta por un segmento de 100 pb, no presenta secuencias típicas que actúen como promotores de la transcripción, debido probablemente a la coexpresión de este gen dentro de un operón regulado por un promotor común situado más arriba. Sin embargo, en esta región se ha definido la presencia de una secuencia situada 10-20 pb por encima del codón de iniciación, GAGAACGGA, que se aproxima al consenso propuesto para la caja Shine-Dalgarno, necesaria para el inicio de la traducción.

cacgaggttgacccttggagccccggctcgataggctcgccgagaacgggaccctccccac
Shine-Dalgarno

Codón de iniciación

gtgacgaccactcaaccgaagcggcagcccatcccgtttgggaagtacctccttctggac
M T T T Q P K R Q P I P F G K Y L L L D
cgcacaaacattggcggcagggaggtgtggcgcggaagcagttcggcgagcggc
R I N I G G M A E V W R G K Q F G A S G
tttgagcggctcgtcgccatcaagcgcattcctcccaacatcgcgaggacgacgagttc
F E R L V A I K R I L P N I A E D D E F
atctcgatgttcatcgacgaggcgaagatcagcgtccagctgaccacgccaacgtcgcg
I S M F I D E A K I S V Q L T H A N V A
tccatctacgagctgggcaacatcctcggcagctacttcatctcgatggagtacatcccc
S I Y E L G N I L G S Y F I S M E Y I P
ggcaaggacatgcggggccatcttcgaccggtgcccgaagaagggggagcccgcctccagt
G K D M R A I F D R C R K K G E P A P V
ccgctggtggccttctgctgtccaagatgtgagggcctggactacgcccaccggaag
P L V A F C V S K M C E G L D Y A H R K
aaggacgggatggggcgggagatgaacatcgtccaccgacatctcgccgcagaacgctc
K D G M G R E M N I V H R D I S P Q N V
ctcatctcctacgagggcgaggtcaaggtcatcgacttcggcatcgcaaggcggccggt
L I S Y E G E V K V I D F G I A K A A G
aaggcgaccaagacgcaggccggcattcctcaagggcaagttcggctacatgagcccggag
K A T K T Q A G I L K G K F G Y M S P E
cagatccgcgccctgcccgttgaccggcgtcggacgtgttcgcatctggcgtgtgcctc
Q I R G L P L D R R S D V F A I G V C L
tacgagatgctgaccggtgagcgcctcttcgtgggtgacagcgacttcagcgtgctggag
Y E M L T G E R L F V G D S D F S V L E
aagggtgcgcaaggcggaggtgccgtcgcccaccacgtacaaccggcgcattcccggagacg
K V R K A E V P S P T T Y N R R I P E T
ctggagcgaatcgtcctcaaggcgttgccaaggacgtggacgagcgtaccagtagcc
L E R I V L K A L A K D V D E R Y Q Y A

agcgagctgggcgacgacctgcagcgcttccctcatcaccagcgacaccatcttcagccgc
 S E L G D D L Q R F L I T S D T I F S R
 aaggacctggcgagtagcatgaagtccacgttcgcggaggacgtggagcgagagaagcag
 K D L A Q Y M K S T F A E D V E R E K Q
 cgctgctggattacgcggacatcaagccgccgacggcatgcaggccgcgctggaagcc
 R L L D Y A D I K P P D G M Q A A L E A
 ggccttcaacagccccatcatgccctccgcgcccgcggcgcccgtgcccgtggg
 A S F N S P I M P S A P P P A P V P V V
 cagccggtggcgccgagccccggatgacgggctccatgccgacgggtgtctccagggggc
 Q P V A P Q P R M T G S M P T V S P G G
 gtgcgctcgctcgcccagctggccgcgctgcccagggctgacggccgccaccgcccgcgcc
 V R R S P T L A A L P R L T A A T A A P
 cctcccgcagaggacgagggcgggcgacgcagcttgtctccagcgaccacgagttcgccg
 P P D E D E G G A T Q L V S S D H E F A
 gacagccagagcccaccacgcagccgggggcccgcctgcccgtgcccgtgcccacccccgctg
 D T P E P T T Q P G A A V G R A I T P L
 gaggtgccgtcgacgccgggtcacgacgcggacgacgagcccgtcagcggcaggacgggc
 E V P S T P G H D A D D E P V S G R T A
 gtcatttcgcccctcgcccctgtcgccctcccgtcggcccgcacggctgtcgcacgcg
 V I S P P S P L S P P V G P P R L S H A
 aacatccccgtgggtgcggccgtccatgtccgtgcccacgctgcccgcctcggacgcgccc
 N I P V V R P S M S V P T L P P S D A P
 ccgcccgcctcgggggcccacgcctcggacgagtcgggggtgggggcttgccgcggatgacg
 P P A S G A T P R T S R G G G L P R M T
 cgggatgtgcaggtgctcgacgcctcgcagggccgcggcccgccttgccgcaccgctc
 R D V Q V L D A S Q A A R P L P P S
 cccggtgctcccgcgcccgggtggccccgcgctatgacgatgaagacgatggggatgcc
 P V A P P A P V A P A Y D D E D D G D A
 ccggagcggaccaccgycgcgacgcccggccgtggggcgccgagcgcaccattcccaggaag
 P E R T T G A T P A V G G R A P I P R K
 gtgctcttcggcggcatcggcgggggtcgccgtgctcctgctggcgctgatcggctggggc
 V L F G G I G G V A V L L L A L I G W A
 gtgtcggggcccgggtgtgggctacgtgctggtggacctgcagggcgctgccctcggaggtc
 V S G P G V G Y V L V D L Q G V P S E V
 cgcaaccgctgcaggtgcccctggacacgcagttgggtgccctggaggggtggcagcgcg
 R N R V Q V R L D T Q L V P L E G G S A
 acgctcctgcgcgaggtgcccgcggcaaggtcatggtggtggtgagcgcggaggggtac
 T L L R E V P A G K V M V V V S A E G Y
 aacaccttcacgaagacggtggatgtctccgaggggaaggacgtcacgcccgtgacggcg
 N T F T K T V D V S E G K D V T P V Q A
 gtgctggagagcctggtgcccaccgcggcgttggtgctcacgacggagcccgccacggcc
 V L E S L V R T A A L V L T T E P A T A
 gaggtgaaggtggatggccgggtggtgcgcgagcagggcaagtgcggcggcctacatcaag
 E V K V D G R V V R E Q G K S A A Y I K
 gacgtgcccacagcgggcccggagtgggtggaggtgagtgccctggccacaagccc
 D V P I S G P E W V V E V S A P G H K P
 gcgctccaagcgggtgcccgtgtccggcgggtggaccggtggaggtgtcgtcaagctggag
 A S K R V P V S G G G P V E V S L K L E
 ccatcgggtgacgcgggtgtcgggtgaaggtggagtccaagccggcgggtgccaccatcttc
 P S V T R V S V K V E S K P A G A T I F
 gtggacggcaaggacatgggcgccaccacgcccgcctcgtgacgggtgccaccaacgcg
 V D G K D M G A T T P A V V Q V P P N A
 cgccagctcacctgaagctgaagtgccacaacgagggccgaggtggacgtcccggacgcg
 R Q L T L K L K C H N E A E V D V P D A
 gcgccaggcaatgagccggccaccgcgagcgttccctcaagcggcagccgcgctgcccgt
 A P G N E P A T A S V S L K R Q P R C R
 tag Codón de terminación

Figura 26. Secuencia de codones del gen *pksA* completo. Se indican el codón de iniciación y terminación (en verde), junto con la secuencia Shine-Dalgarno (en azul) situada justo por encima del comienzo del gen *pksA*.

II. 2. Análisis de la secuencia de la quinasa PksA

La proteína quinasa PksA consta de 840 residuos con un peso molecular estimado de 90495. Al analizar la secuencia de aminoácidos de esta proteína, se ha comprobado en ella la presencia de un dominio catalítico quinasa (DC) característico de las Ser/Thr y Tyr quinasas, que ocupa la región N-terminal de la proteína. En esta región común para todos los miembros de esta familia de enzimas reside la actividad de fosforilación de la proteína sobre su sustrato. El dominio catalítico de la quinasa PksA (PS50011; PF00069) presenta 275 residuos que se extienden desde el aminoácido 16 hasta el 291 de la proteína, muy próximo al comienzo de la proteína, como suele ser común en las proteínas ePKs.

Además de la región catalítica, esta proteína quinasa presenta un segmento C-terminal muy extenso formado por 549 residuos, que en la mayoría de ePKs presenta una función reguladora de la actividad. Para ello, este segmento normalmente participa en el control de la capacidad de fosfotransferencia así como en la interacción con el sustrato o con proteínas moduladoras. En esta región, en la proteína quinasa PksA es posible diferenciar dos porciones proteicas: un dominio regulador intracelular (DR), situado entre los residuos 292-580 en el centro de la proteína, separado por un segmento transmembrana putativo respecto a un dominio sensor periplásmico (SS) que ocupa los residuos 610-840 en el extremo C-terminal de la proteína.

El dominio regulador citoplasmático (DR) de la quinasa PksA presenta una secuencia formada por 289 residuos, en donde es posible reconocer una región rica en prolina (PS50099), que abarca la región comprendida entre los residuos 346 al 550 de la proteína. El contenido en prolina en este segmento es muy elevado, alcanzando cerca del 25%, con un total de 50 residuos de este tipo dentro de una región formada por tan sólo 205 aminoácidos. La presencia de este tipo de dominio es frecuente en muchas ePKs, al facilitar el contacto con proteínas de señalización capaces de reconocer de forma selectiva estas secuencias ricas en prolina.

En la región reguladora de la quinasa PksA, es posible reconocer la existencia de siete repeticiones de una secuencia rica en prolina, con tres parejas repetidas consecutivas (346-358; 495-508; 537-550) junto con una repetición aislada (464-470). La secuencia consenso obtenida mediante alineamiento se aproxima a la secuencia (P)PPxpxxP, con dos o tres residuos de prolina consecutivos separados de otra prolina por varios residuos polares sin carga o apolares, entre los que aparece con frecuencia un residuo de prolina intermedio (ausente en una de las parejas). La presencia de estas repeticiones reafirma el posible papel de esta región como determinante implicado en el reconocimiento por la quinasa de su sustrato o algún tipo de proteína moduladora, mediante una interacción proteína-proteína.

El dominio sensor (SS) de la quinasa PksA consta de 230 residuos y en él destaca la presencia de un dominio PEGA (PF08308) asociado al extremo C-terminal, entre los residuos 765 al 835 de la proteína. Esta región se caracteriza por presentar un plegamiento típico a base de láminas β , como ocurre en las proteínas que componen la capa S de bacterias, aunque su significado biológico es desconocido. La localización periplásmica de esta región, expuesta hacia el exterior celular, condiciona su posible función como receptor capaz de detectar un estímulo del medio mediante la unión a algún tipo de ligando para regular la actividad de fosfotransferencia de la proteína.

A continuación, en la Figura 27 se muestra una representación gráfica de la proteína quinasa PksA, en donde es posible apreciar la presencia de un dominio catalítico N-terminal seguido por un dominio regulador ocupado principalmente por la región rica en prolina, separado por un segmento transmembrana putativo respecto al dominio sensor C-terminal con el motivo PEGA.

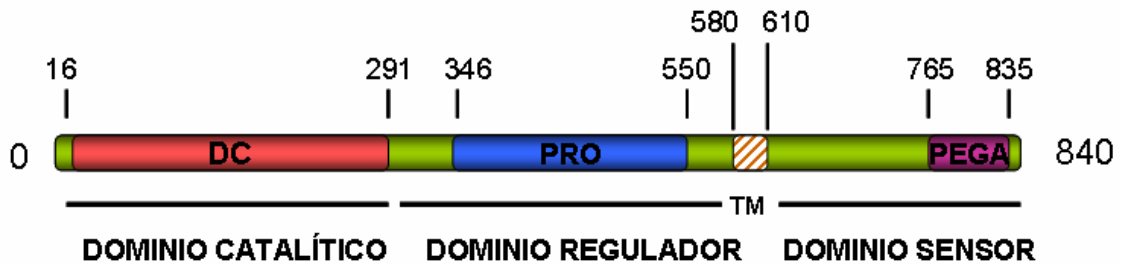


Figura 27. Organización estructural de la quinasa PksA de *M. xanthus*. En esta proteína, se diferencia un dominio catalítico N-terminal respecto a la región reguladora con el motivo rico en prolina en el centro de la proteína, separado a su vez por un segmento transmembrana putativo de un dominio sensor periplásmico.

II. 3. Estudio de la topología de la proteína PksA

II. 3. 1. Análisis de los dominios transmembrana

El análisis de la secuencia de la proteína quinasa PksA con diversos servidores empleados para la predicción de la topología proteica permitió establecer la presencia de un segmento transmembrana putativo de inserción a la membrana plasmática en esta proteína. Esta región compuesta por 23 aminoácidos se sitúa en el centro de la región reguladora de la quinasa, entre los residuos 581 a 603 según el servidor TMHMM o bien desde el residuo 584 al 606 para SOSUI. Este segmento transmembrana putativo presenta un elevado contenido de residuos apolares, dando lugar a una región con una fuerte hidrofobicidad, como se muestra en la Figura 28.

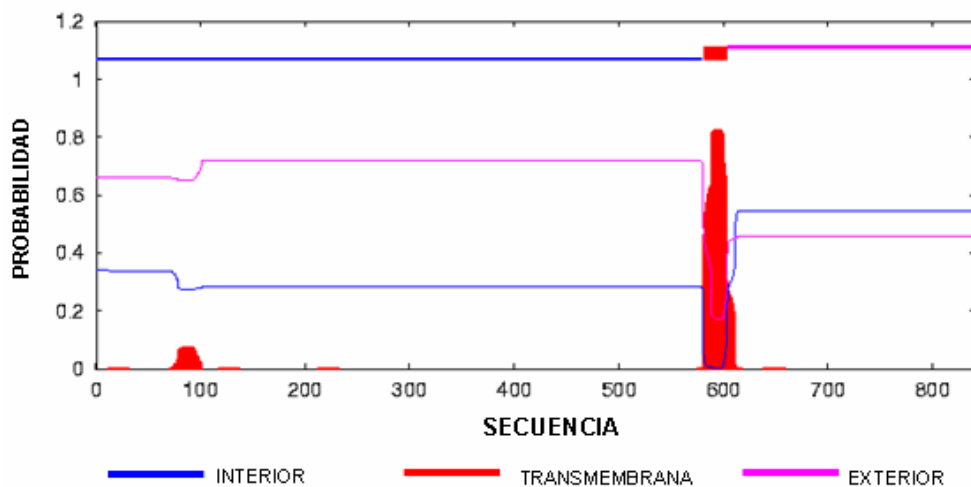


Figura 28. Determinación de los dominios transmembrana en la quinasa PksA con el servidor TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>). La porción proteica en rojo muestra la presencia de un segmento hidrofóbico transmembrana putativo situado en el centro de la proteína.

La presencia de este dominio transmembrana en la proteína PksA sitúa a la quinasa en la membrana plasmática de la bacteria, dispuesta a modo de receptor de membrana. La organización estructural prevista para esta proteína sitúa al dominio catalítico N-terminal (DC) junto a la región reguladora (DR) que precede a este segmento hidrofóbico hacia el citoplasma celular, mientras que la región proteica C-terminal quedaría expuesta al espacio periplásmico, en donde podría actuar a modo de sensor. De hecho, muchas ePKs de membrana funcionan como receptores capaces de detectar diversos estímulos procedentes del medio a través de regiones sensoras localizadas en contacto con el exterior.

La organización estructural de la quinasa en la bacteria es clave para poder establecer el mecanismo de transducción de señales desarrollado por la quinasa, por lo que como consecuencia, se ha tratado de confirmar la topología prevista para esta quinasa. Para ello, se realizaron dos fusiones traduccionales entre diferentes fragmentos del gen que codifica para PksA y el gen *lacZ* de *E. coli* portado por el plásmido pKY481. La determinación de actividad β -galactosidasa para las cepas portadoras de ambas fusiones permite establecer la topología de la quinasa, teniendo en cuenta que la enzima β -galactosidasa sólo es activa cuando se encuentra localizada en el citoplasma celular, pero no hacia el periplasma (Göt y Boos, 1998).

Estas fusiones *lacZ* se han llevado a cabo mediante la clonación en fase a través de la diana *Bam*HI de distintos fragmentos del gen *pksA* con el gen *lacZ* que codifica la β -galactosidasa de *E. coli*. La diferencia entre ambas fusiones reside en la localización del sitio de restricción *Bam*HI empleado para conectar cada fragmento del gen *pksA* con el gen *lacZ*. Así, se realizó una primera fusión por delante del segmento transmembrana, muy próximo al inicio del gen *pksA* (ver I.9 de Resultados), mientras que para la segunda fusión, el punto de conexión se situó justo tras el dominio transmembrana putativo, como muestra la Figura 29. De esta manera, al expresarse ambas fusiones, la enzima β -galactosidasa generada presentará una localización celular diferente en cada caso. Si el dominio transmembrana putativo funciona como tal, en la primera fusión carente de este segmento, la enzima se situaría en el citoplasma de la célula y sería activa, mientras que en la segunda fusión, la enzima β -galactosidasa quedaría expuesta hacia el espacio periplásmico, debido a la presencia del tramo transmembrana y por tanto, no presentaría actividad.

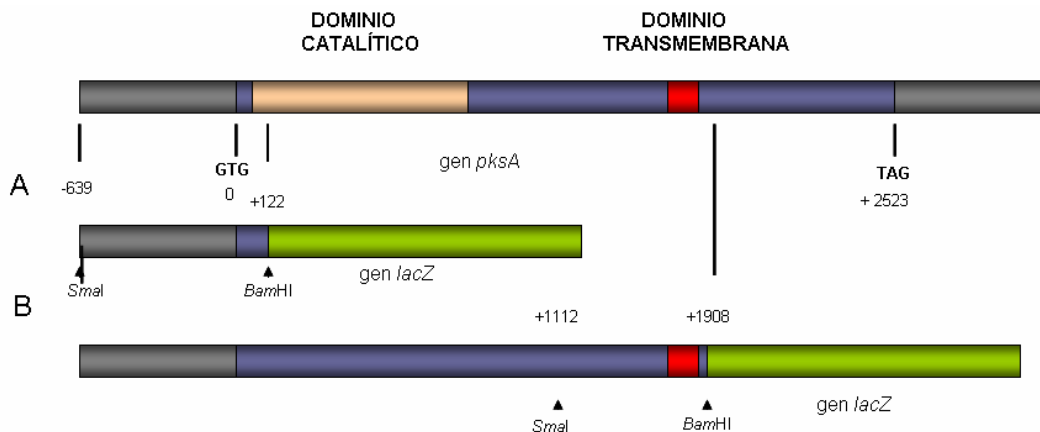


Figura 29. Esquema de las fusiones en fase generadas por diferentes fragmentos del gen *pksA* con el gen *lacZ* de *E. coli*. A) Fusión realizada por delante de la región que codifica el segmento transmembrana. B) Fusión situada justo tras la región que cifra el segmento transmembrana.

II. 3. 2. Construcción de la fusión *lacZ* tras el dominio transmembrana de la quinasa

La fusión *lacZ* situada por delante del segmento transmembrana de la quinasa se ha llevado a cabo tal como se detalla en la sección I.9 de Resultados. Para obtener la fusión *lacZ* justo tras el dominio transmembrana, inicialmente se amplificó por PCR un fragmento del gen *pksA* de 0.8 kb con la pareja de cebadores apropiados (ver C.IV.2), a partir del cromosoma de la cepa silvestre de *M. xanthus*. Este fragmento, que contiene la secuencia completa necesaria para codificar el segmento transmembrana, incorpora una diana *Bam*HI necesaria para realizar la fusión en fase sobre el codón 636-637 del gen de la quinasa, justo tras la región de inserción a la membrana.

El producto de PCR purificado se digirió con las enzimas *Sma*I y *Bam*HI y se incorporó mediante ligación al plásmido pKY481 digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante denominado pKY-Top TM conecta en fase al fragmento del gen *pksA*, que incluye la región que cifra el segmento transmembrana, con el gen *lacZ* de *E. coli*. La expresión de esta construcción *in vivo* da lugar a una proteína de fusión formada por la región intracelular de la quinasa seguida por el segmento transmembrana unido a su vez a la enzima β -galactosidasa. Esta fusión *lacZ* incorporada justo tras el segmento transmembrana de la quinasa, al igual que la realizada precediendo a esta región, se introdujo por electroporación a la cepa silvestre de *M. xanthus*. Los transformantes se sembraron en un medio con kanamicina para seleccionar aquellas cepas portadoras de la fusión *lacZ* que contenían al vector pKY-Top TM integrado en su cromosoma.

Las colonias presuntamente positivas se analizaron mediante Southern blot. Para ello, la preparación de cromosoma control de la cepa silvestre y las muestras provenientes de las estirpes portadoras de la fusión (supuestos positivos) se digirieron con la enzima *Kpn*I y se hibridaron con la sonda marcada, el fragmento del gen *pksA* amplificado por PCR previamente empleado para obtener esta fusión. La sonda se une a un fragmento *Kpn*I de 7.0 kb en la cepa silvestre, mientras que en el caso de las bacterias portadoras de la fusión lo hace sobre un segmento de 16.2 kb, debido a la integración completa del plásmido pKY-Top TM en el cromosoma de la mixobacteria. El resultado del Southern blot expuesto en la Figura 30 confirma que las colonias analizadas contenían la fusión *lacZ* con del gen *pksA* justo tras la región que codifica al segmento transmembrana. La bacteria portadora de esta fusión se denominó cepa TOP TM.

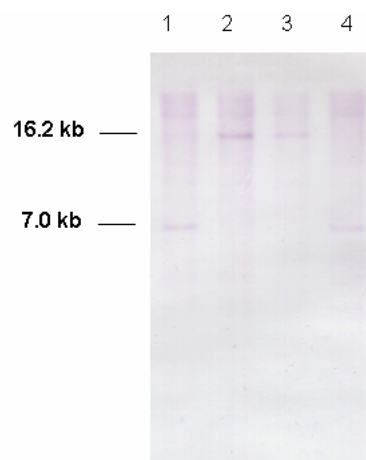


Figura 30. Southern blot de la fusión *lacZ* Top TM de *M. xanthus*. Las preparaciones cromosómicas de la cepa silvestre (calles 1 y 4) y de las colonias analizadas (calles 2 y 3), se digirieron con *Kpn*I y se hibridaron con el segmento del gen *pksA* que incluye la región que codifica al segmento transmembrana.

II. 3. 3. Análisis cualitativo de la actividad β -galactosidasa

Ambas cepas portadoras de fusiones *lacZ* con distintos fragmentos del gen *pksA* se sembraron sobre medio CTT sólido con X-gal (40 $\mu\text{g/ml}$), para estimar de forma cualitativa la presencia o ausencia de actividad en estas estirpes. De acuerdo con la predicción estructural para la quinasa PksA, la presencia de un segmento transmembrana entre los residuos 581 al 606 de la proteína conducirá a la ausencia de actividad β -galactosidasa en la cepa TOP TM, debido a que la fusión se produce tras la región transmembrana, exponiendo a la enzima β -galactosidasa hacia el espacio periplásmico. Por el contrario, cualquier fusión realizada por delante de esta región, como ocurre en la cepa *pksA-lacZ*, presentará actividad β -galactosidasa puesto que la enzima quedará localizada entonces en el citoplasma de la bacteria. Como se observa en la Figura 31, en concordancia con lo esperado, tan sólo se aprecia actividad β -galactosidasa en la cepa *pksA-lacZ*, al adquirir tonalidad azulada, mientras que en el caso de TOP TM, no se detecta actividad mostrando un aspecto similar al control, la estirpe silvestre.

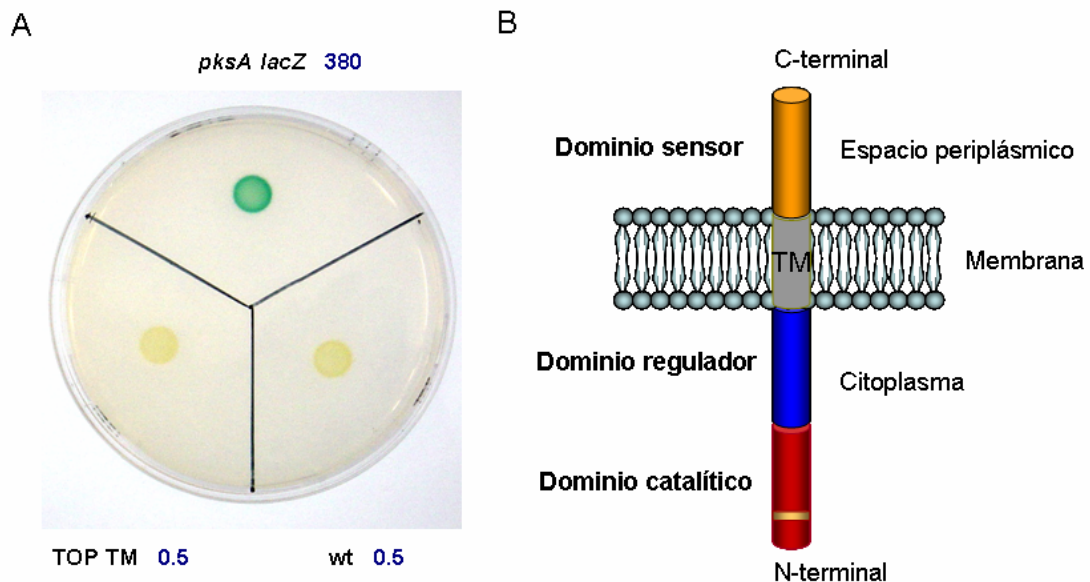


Figura 31. A) Actividad β -galactosidasa de las cepas portadoras de fusiones *lacZ* con diferentes fragmentos del gen *pksA*, expresada en nmol ONP/mg·min. B) Organización estructural de la quinasa PksA obtenido tras el análisis de la actividad β -galactosidasa de estas cepas.

II. 3. 4. Análisis cuantitativo de la actividad β -galactosidasa

La determinación de la actividad β -galactosidasa específica de las cepas portadoras de ambas fusiones *lacZ* con diferentes fragmentos del gen *pksA* se realizó a partir de cultivos de cada una de estas bacterias crecidos en medio CTT sólido durante 24 h. En la Figura 31A se indican los valores de actividad β -galactosidasa específica obtenidos para cada tipo celular. De igual manera, los valores obtenidos de actividad β -galactosidasa específica confirman la organización estructural propuesta para la quinasa PksA de *M. xanthus* en la membrana bacteriana, expuesta en la Figura 31B.

A partir de estos resultados, se ha confirmado que esta quinasa presenta un segmento transmembrana en la región central de la proteína localizado entre los residuos 581 al 606 de la quinasa. La inserción a la membrana a través de este segmento determina la presencia de una región citoplasmática muy extensa, constituida por el dominio catalítico N-terminal junto con un dominio regulador putativo intracelular, separado a su vez por la región de membrana de un dominio C-terminal más corto de tipo sensor, dirigido hacia el periplasma en contacto con el exterior, como se muestra en la Figura 31B.

II. 4. Dominio catalítico de la quinasa PksA

El análisis de la secuencia del dominio catalítico de la quinasa PksA permite identificar en esta proteína los once subdominios típicos que conforman el dominio quinasa característico de esta familia. El elevado grado de conservación de esta región se manifiesta en la elevada similitud de la secuencia respecto al consenso definido para este dominio, con un valor E muy bajo ($4.8 \cdot 10^{-29}$) para el PFAM asignado a esta proteína. De hecho, la PksA contiene todos los determinantes esenciales para la actividad de la proteína e incluso mantiene la mayoría de residuos considerados constantes o casi invariables en otras ePKs, como se puede apreciar en la Figura 32.

El lóbulo N-terminal del dominio catalítico de la quinasa PksA ocupa la región que se extiende desde los aminoácidos 16 al 90 en la secuencia de la proteína, y contiene los subdominios I-IV, que participan principalmente en la unión al ATP. El subdominio I (residuos 22-30 en PksA), formado por una secuencia conservada rica en glicina es atípico en esta quinasa, puesto que sólo conserva el residuo de glicina central G₂₅ de las tres que aparecen normalmente en esta región. Se ha comprobado en otras ePKs que la sustitución de ambos residuos suele ser común y no afecta a la unión al ATP, puesto que el residuo esencial para el reconocimiento del nucleótido es precisamente la glicina conservada que se mantiene constante en esta proteína (Shi *et al.*, 1998).

Con respecto al subdominio II, éste contiene el residuo de lisina K₄₈ esencial para la actividad, necesario para orientar de forma adecuada al ATP durante la catálisis. Esta proteína conserva igualmente el glutámico E₆₇ del subdominio III, que estabiliza a este residuo de lisina mediante la formación de un par iónico entre ambos aminoácidos, clave para posicionar correctamente a la lisina K₄₈ durante la reacción de fosfotransferencia. Además, esta región mantiene todos aquellos residuos apolares que participan en la formación de la cavidad hidrofóbica que alberga al anillo de adenina del ATP, como la valina V₃₀ del subdominio I o la alanina A₄₆ del subdominio II.

El lóbulo C-terminal del dominio catalítico de la quinasa PksA se sitúa en la región que comprende los aminoácidos 109 al 291 de la proteína, con los subdominios VI-XI. Esta porción proteica contiene el sitio activo de la enzima, con el centro catalítico, el sitio de unión al sustrato y el segmento de activación.

El centro catalítico, formado por el subdominio VIb (residuos 150-162) contiene el motivo HRD, en donde destaca la presencia de un residuo de aspártico catalítico D₁₅₄ esencial para la actividad que cataliza la fosforilación del residuo aceptor en el sustrato. La presencia de este residuo, junto con el resto de determinantes esenciales para la actividad, indican que la PksA es una quinasa activa capaz de llevar a cabo la fosfotransferencia sobre su sustrato. Además, esta proteína conserva la asparragina N₁₅₉, un residuo clave para orientar al aspártico catalítico del centro activo durante la reacción de fosforilación.

La presencia de arginina R₁₅₃ justo por encima del aspártico catalítico revela que la proteína PksA pertenece al grupo de quinasas de tipo RD. Este tipo de proteínas se encuentran reguladas mediante fosforilación del segmento de activación. La autofosforilación de este segmento induce la activación de la quinasa, una vez que la arginina R₁₅₃ interacciona con el residuo aceptor fosforilado, incrementando la capacidad de fosfotransferencia del aspártico catalítico D₁₅₄ sobre el sustrato.

En el centro catalítico, dentro del subdominio VIb, la quinasa PksA carece de la lisina típica de las Ser/Thr quinasas (HRDxK), presentando en su lugar un residuo de serina S₁₅₆, como ocurre en las Tyr quinasas. Sin embargo, esta quinasa probablemente fosforila residuos de serina/treonina, puesto que el segmento de activación tan sólo presenta dos residuos aceptores de treonina, T₁₈₃ y T₁₈₅, pero no contiene ninguna tirosina. Ambos residuos de treonina son susceptibles de ser autofosforilados por la quinasa, aunque el aceptor más probable es la T₁₈₅, que ocupa una posición conservada dentro del segmento de activación común a todas las quinasas de tipo RD de *M. xanthus*.

Justo tras el centro catalítico, aparece en esta proteína el bucle de unión a Mg²⁺ con el triplete DFG perfectamente conservado correspondiente al subdominio VII (residuos 168-174). En este segmento, destaca la presencia de otro residuo esencial para la actividad, el aspártico D₁₇₂, que interviene en la coordinación de Mg²⁺ para la unión del ATP, junto con el residuo de asparragina N₁₅₉ del centro catalítico. Junto a este residuo, tanto la fenilalanina F₁₇₃ como la glicina G₁₇₄ del triplete son importantes para la estabilización estructural de las regiones próximas al sitio activo de la enzima.

La región de activación (residuos 175-191), situada entre los subdominios VII y VIII, corresponde en esta proteína con un segmento formado por 16 aminoácidos, carente de similitud con la secuencia de otras quinasas de *M. xanthus*. Además de participar en la regulación de la actividad, con el par de residuos de treonina aceptores, en esta región se sitúan los determinantes necesarios para el reconocimiento específico del sustrato, lo que condiciona la elevada variabilidad de esta región cuando se compara su secuencia con la de diferentes ePKs.

En la Figura 32, se muestra de forma gráfica el elevado grado de conservación del dominio catalítico de la quinasa, en donde se puede apreciar cómo todos los residuos relevantes para la actividad permanecen bien conservados en su secuencia. En el dominio catalítico (DC) se indica la posición de los once subdominios que aparecen en esta región, así como los residuos conservados (rojo), los residuos con cambios leves respecto al consenso (amarillo) y los residuos con cambios no conservados (verde). Como se puede apreciar, todos los residuos considerados constantes o casi invariables en todas las quinasas (letras grandes) se mantienen conservados en esta quinasa, al igual que ocurre en la mayoría de residuos normalmente bastante conservados (letras medianas) o incluso algo variables (letras pequeñas). Finalmente, se ha destacado la región de activación (rosa) con ambos residuos aceptores conservados de Thr.

En la Figura 32 además se muestra el dominio regulador (DR), en donde se resaltan los residuos que integran la región rica en prolina (azul claro) así como la secuencia de las repeticiones próximas al consenso (P)PPxpxxP (azul oscuro subrayadas), tres de las cuales aparecen en parejas consecutivas y solapadas. Tras el segmento transmembrana putativo (marrón), en el dominio sensor (SS) se indica los residuos que forman parte del dominio PEGA (morado).

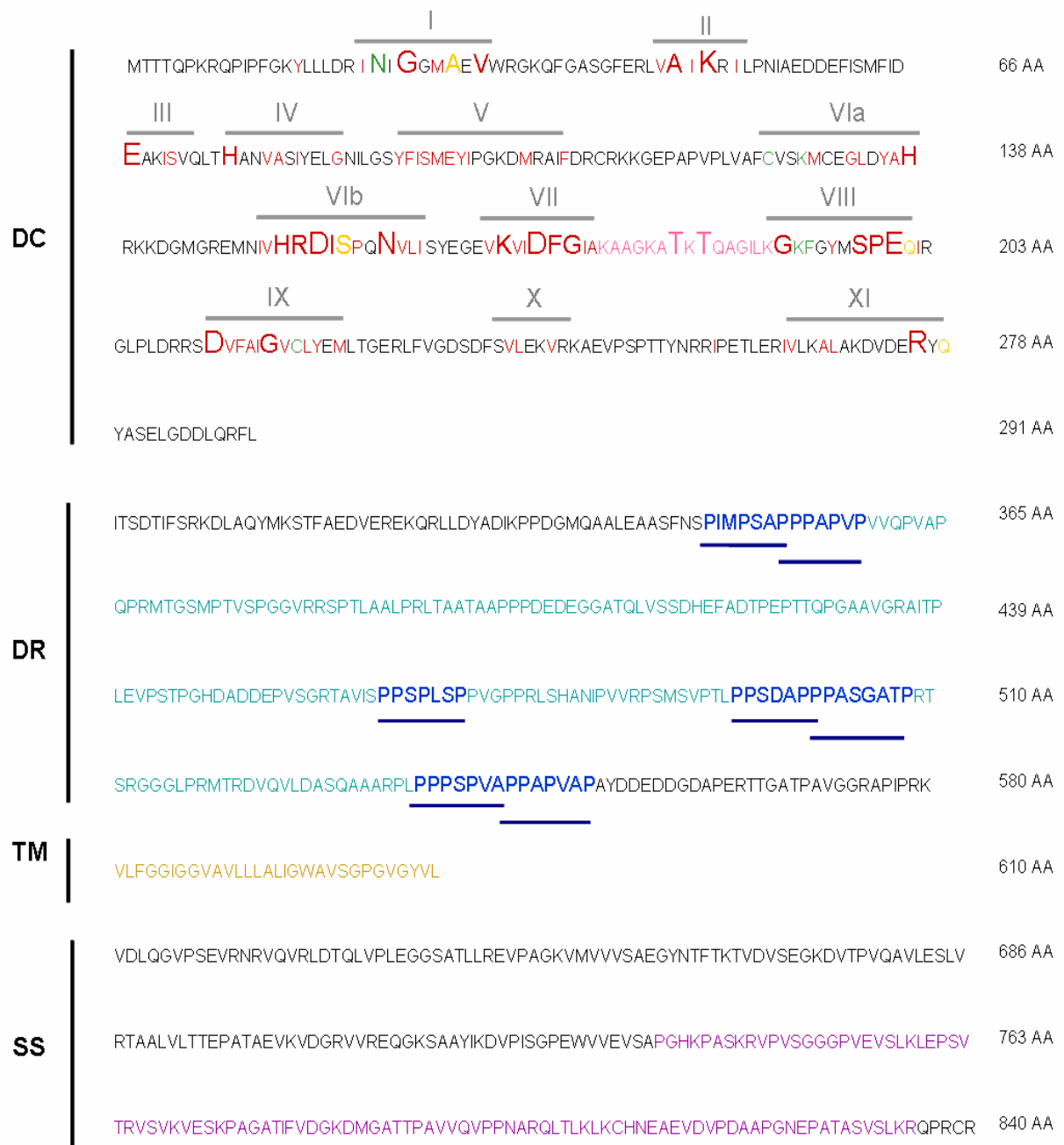


Figura 32. Secuencia de la proteína quinasa PksA (Mxan5696).

II. 5. Plegamiento del dominio catalítico de la quinasa PksA

El plegamiento del dominio catalítico se obtuvo mediante el modelado de la estructura tridimensional de esta región conservada de la proteína con el programa SWISS MODEL, disponible en ExpASY. Mediante este programa de modelado estructural, la secuencia del dominio catalítico de la proteína PksA (residuos 16-291) se confrontó con el conjunto de proteínas cuya estructura tridimensional se encuentra resuelta, depositadas en la base de datos PDB (Protein Data Bank). Como resultado de esta comparación, se obtuvieron una serie de proteínas cristalizadas de estructura conocida ordenadas por similitud de secuencia respecto a la quinasa. Entre ellas, se seleccionó aquella con mayor identidad respecto a la secuencia del dominio catalítico de la PksA para llevar a cabo el modelado.

En este caso, se ha elegido como modelo para predecir el plegamiento estructural del dominio catalítico de la PksA a la estructura cristalizada de la región catalítica de la ePK PknB de *M. tuberculosis* (PDB 2fumB). El alineamiento de la secuencia del dominio catalítico de ambas proteínas presenta una identidad del 35%, mientras que la similitud alcanza el 92% dentro de esta región. Este parámetro se aproxima al 50% de identidad necesario para optimizar el modelado del dominio catalítico por homología. La estructura tridimensional definida por el programa SWISS MODEL para el dominio catalítico de la quinasa PksA se muestra en la Figura 33. Como se puede apreciar, el plegamiento del dominio catalítico de la proteína quinasa PksA mantiene una estructura bilobular, compartida por todas las quinasas resultas hasta el momento. Así, se distingue una porción N-terminal más pequeña plegada de forma predominante a base de láminas β , separada mediante un segmento bisagra respecto a un lóbulo C-terminal de mayor tamaño compuesto principalmente por hélices α . Entre ambos, aparece una cavidad en donde se sitúa el sitio activo de la enzima con el bucle catalítico, hacia donde se dirigen todos aquellos residuos implicados en la reacción, necesarios para la unión al ATP o al sustrato.



Figura 33. Modelado de la estructura tridimensional del dominio catalítico de la proteína quinasa PksA.

III. Análisis de la actividad catalítica de la quinasa PksA

La proteína PksA presenta un dominio catalítico N-terminal típico de las Ser/Thr y Tyr quinasas. La secuencia de esta región confirma que esta proteína contiene todos los determinantes esenciales para la actividad de la proteína. Puesto que pertenece al grupo de quinasas de tipo RD, esta proteína se regula con certeza mediante la autofosforilación de residuos aceptores en el segmento de activación del dominio catalítico, como ocurre en la mayoría de proteínas de tipo ePKs.

Por tanto, se ha tratado de demostrar la actividad catalítica de la proteína PksA *in vitro* mediante un ensayo de autofosforilación, en donde se sitúa a la proteína purificada en contacto con ATP marcado radiactivamente. Si la proteína se comporta como una quinasa funcional, incorporará los grupos fosfato con P³² a la propia proteína desde el ATP, permitiendo concluir que la quinasa presenta actividad Ser/Thr/Tyr quinasa.

III. 1. Expresión heteróloga de la proteína quinasa PksA

Para realizar este ensayo de autofosforilación, previamente ha sido necesario proceder a la sobreexpresión y purificación de la proteína quinasa PksA completa. La expresión de la proteína quinasa en forma recombinante en la bacteria *E. coli* se ha llevado a cabo a partir de la construcción de un sistema regulado de expresión del gen *pksA* en el vector pET-28a, bajo el control de un promotor fuerte para la polimerasa del bacteriófago T7. En un hospedador adecuado, como la estirpe BL21 (DE3) de *E. coli*, la presencia del inductor IPTG activa la expresión selectiva del gen diana. En estas condiciones, las señales de transcripción y traducción aportadas por el vector optimizan la síntesis de la proteína en el hospedador, dando lugar a un elevado rendimiento de producción de la proteína recombinante. En este sistema de sobreexpresión, el producto generado corresponde con una proteína de fusión que incorpora una cola de seis residuos de histidina en el extremo C-terminal de la proteína para su purificación mediante cromatografía de afinidad.

La clonación del gen *pksA* en el vector pET-28a comenzó con la amplificación por PCR de la secuencia completa del gen *pksA* de 2.5 kb a partir del cromosoma de la cepa silvestre de *M. xanthus*, empleando para ello un par de cebadores que flanquean a este gen (ver C.IV.2). En la reacción de PCR se utilizó la mezcla enzimática Triple Mix de Eppendorf, que amplifica fragmentos de ADN de longitud considerable con absoluta fidelidad. En esta reacción de PCR, la incorporación de una diana *NcoI* sobre el extremo 5' del gen *pksA* permitió sustituir el codón de iniciación GTG por ATG para potenciar la eficacia de traducción del gen en la bacteria hospedadora. Por otro lado, al amplificar el gen *pksA* se eliminó el codón de terminación del extremo 3' del gen y se incorporó una diana *XhoI* con la finalidad de fusionar en fase al gen *pksA* con la región que codifica la cola de histidina en el vector pET-28a.

El producto de PCR purificado se digirió con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI*, al igual que el vector de sobreexpresión pET-28a. La inserción orientada del gen *pksA* en el vector, tras la ligación de los extremos del fragmento con los del vector, generó el plásmido pET-*pksA*. En este vector, el gen que cifra la quinasa se sitúa bajo el control de un promotor fuerte reconocido por la polimerasa del bacteriófago T7. La secuenciación de esta construcción con el cebador universal T7 confirmó la identidad de la secuencia del gen *pksA* clonada en el vector.

Para conseguir la sobreexpresión de la proteína quinasa se ha empleado como cepa hospedadora la estirpe BL21 (DE3) de *E. coli*. Para ello, se transformó esta bacteria con el plásmido pET-*pksA* y se seleccionó la incorporación del vector en un medio con kanamicina. Esta cepa hospedadora contiene una copia del gen de la ARN polimerasa del fago T7 cuya expresión se encuentra regulada por el promotor *lacUV5*. Por tanto, la presencia del inductor IPTG activa la expresión de la polimerasa de T7, que a su vez dispara la síntesis de la quinasa tras reconocer el promotor dependiente de la polimerasa de T7 situado justo por delante del gen *pksA* en el vector pET-*pksA*.

La determinación de las condiciones de expresión óptimas para la producción de la proteína recombinante se llevó a cabo mediante el ensayo de diferentes condiciones de inducción, empleando dos temperaturas de incubación distintas, 24°C y 37°C. El procedimiento seguido durante la inducción con IPTG se detalla en la sección X.2.1 de Material y Métodos. En ambos casos, tras tomar en cada caso un control sin inducir, se procedió a recoger una serie de muestras inducidas crecidas durante diferentes tiempos de incubación: 2 h, 3 h, 4 h y 24 h a 37°C o bien, 3 h, 6 h y 24 h para 24°C.

Las muestras obtenidas se lisaron obteniendo un extracto proteico bruto con las proteínas celulares totales, y además se aislaron las diferentes fracciones celulares, separando la proteínas solubles de aquellas sintetizadas en cuerpos de inclusión e insolubles. El procesamiento de las muestras se ha realizado de acuerdo al protocolo descrito en las secciones X.2.2 y X.2.3 de Material y Métodos. El análisis mediante SDS-PAGE de los extractos celulares totales así como de las diferentes fracciones celulares aisladas en cada caso no permitió en ningún caso apreciar la sobreexpresión de la proteína recombinante en las muestras inducidas con IPTG (no mostrado). De esta forma, no fue posible detectar en las muestras inducidas ninguna proteína con un peso molecular próximo al de la quinasa, ausente a su vez en el control sin inducir.

Las ePKs en muchas ocasiones se expresan generando bandas difusas difíciles de apreciar mediante SDS-PAGE, debido a la alteración de la movilidad electroforética de la proteína en función de su grado de fosforilación. Por otra parte, la expresión de la quinasa PksA recombinante en *E. coli* parece tener un efecto tóxico considerable para la bacteria, puesto que al inducir su síntesis con IPTG, la bacteria detiene de forma brusca su crecimiento. Por todo ello, existía la posibilidad de que la quinasa se sintetizara con un bajo rendimiento en este sistema heterólogo, alcanzando un nivel de producción indetectable mediante SDS-PAGE.

Por ello, se ha procedido a analizar las muestras correspondientes a los extractos proteicos totales obtenidos en ambas inducciones mediante Western blot, siguiendo las pautas descritas en la sección X.3 de Material y Métodos. La detección de la quinasa mediante esta técnica se ha realizado empleando un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina, que reconoce de forma específica la presencia de colas de histidina en posición C-terminal en la proteína. La quinasa PksA recombinante sintetizada a partir del vector pET-28a incorpora una cola de histidina en el extremo carboxilo, lo que posibilita su identificación mediante la técnica de Western blot. Este sistema incrementa la sensibilidad de detección de la proteína recombinante facilitando la identificación de la quinasa en los extractos proteicos inducidos previamente.

En la Figura 34 aparece el resultado del Western blot para las muestras de proteínas totales inducidas a 37°C y 24°C. Como se aprecia en la imagen, se ha detectado la presencia de una banda específica que corresponde con la quinasa PksA. La banda identificada pertenece a una proteína que migra en torno a los 115 kDa, algo por encima de lo esperado para la PksA que presenta un peso molecular de 90 kDa. Esta diferencia de migración es muy común en este tipo de proteínas, debido a que la incorporación de grupos fosfato a la proteína mediante autofosforilación suele modificar considerablemente su patrón de migración. La señal generada por esta proteína es muy intensa, apareciendo tan sólo en las muestras inducidas pero no en el control sin inducir, como corresponde con una proteína expresada de forma selectiva a partir del vector pET-28a en la célula hospedadora.

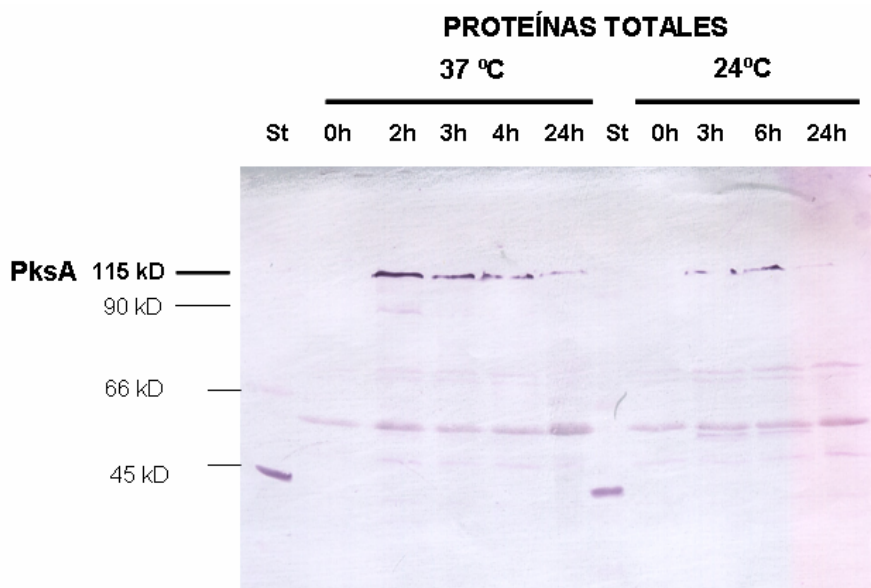


Figura 34. Western blot para la detección de la proteína PksA recombinante en las muestras de proteínas totales inducidas a 37°C y a 24°C.

La producción de la proteína recombinante es bastante escasa, aunque se aprecia que el rendimiento de síntesis es algo más elevado en los cultivos inducidos a 37°C dentro del rango comprendido entre las 2-4h de incubación. Por tanto, se analizaron las fracciones celulares de las muestras obtenidas a 37°C para determinar si la quinasa se encontraba en forma soluble o insoluble. En la Figura 35 aparece el resultado del Western blot con fracciones celulares aisladas en la inducción a 37°C. En ella, claramente se comprueba que la totalidad de la proteína recombinante se sintetiza en forma insoluble. La disminución de la temperatura de inducción a 24°C, un procedimiento que con frecuencia mejora la solubilidad proteica, en este caso ofrece un resultado similar, careciendo igualmente de proteína recombinante soluble (no mostrado). Por tanto, la inducción de la síntesis de la quinasa PksA en forma recombinante en *E. coli* se produce en todos los casos en forma de cuerpos de inclusión, en los cuales se acumula la totalidad de la proteína sintetizada.

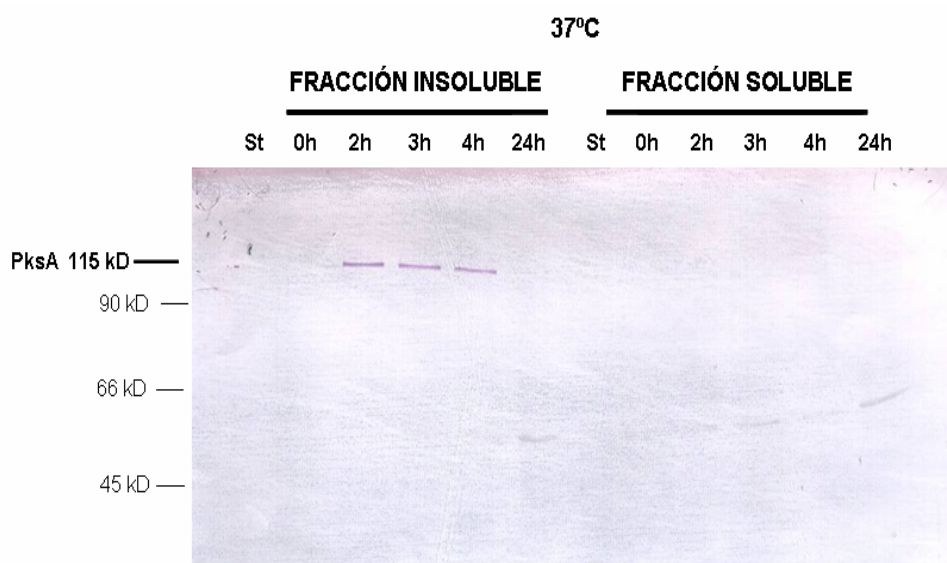


Figura 35. Western blot para determinar la localización de la proteína PksA recombinante en las distintas fracciones celulares aisladas a partir de la inducción a 37°C.

Una vez completados los ensayos de inducción realizados para la quinasa PksA en *E. coli*, se fijaron como condiciones óptimas para la producción de la proteína en este sistema heterólogo la inducción de la expresión de la proteína a 37°C durante unas 3 h de incubación en presencia de 1 mM del inductor IPTG.

III. 2. Purificación de la quinasa PksA recombinante

La purificación de la proteína recombinante requiere un volumen de muestra considerable, por lo que inicialmente se realizó una inducción a gran escala en las condiciones previamente establecidas, empleando un litro de cultivo crecido a 37°C e incubado durante 3 h en presencia del inductor IPTG. Debido a la ausencia de expresión de la proteína en forma soluble, la muestra de partida para la purificación de la proteína ha sido la fracción insoluble con la proteína en cuerpos de inclusión. Por tanto, una vez aislada esta fracción, se procedió a solubilizar con urea la proteína a partir de los cuerpos de inclusión, siguiendo el tratamiento descrito en la sección X.2.4 de Material y Métodos.

La purificación de la proteína quinasa solubilizada se ha llevado a cabo mediante cromatografía de afinidad en una columna de Ni-agarosa suministrada por el kit *HisTrap Kit* de Amersham, de acuerdo con el procedimiento detallado en la sección X.2.5 de Material y Métodos. La columna cromatográfica retiene a la proteína recombinante, al contener cationes metálicos de níquel Ni²⁺ que se unen de forma específica a proteínas con colas de histidina (6His). La elución de la proteína a partir de la columna se realizó empleando soluciones con concentraciones crecientes de imidazol, un compuesto cuya presencia reduce progresivamente la afinidad de unión por la quinasa. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE para comprobar la presencia de la proteína recombinante en las diferentes muestras eluidas.

En estas fracciones, la proteína se concentra considerablemente respecto al extracto bruto, lo que posibilita la detección de la proteína por electroforesis SDS-PAGE. De hecho, en el gel se ha conseguido identificar la presencia de una proteína que migra de forma similar a la quinasa PksA, eluida en la fracción de 100 mM de imidazol y en la fracción de 300 mM. En ambos casos la cantidad de proteína obtenida es apreciable pero escasa, puesto que esta proteína genera una banda de escasa intensidad en el gel de proteínas.

Para comprobar que la proteína purificada en estas fracciones corresponde con la quinasa en forma recombinante, se ha realizado un Western blot empleando nuevamente un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina frente a la cola de histidina C-terminal portada por la quinasa. En la Figura 36 se muestra el revelado del filtro con las muestras procedentes de las distintas fracciones eluidas a partir de la columna cromatográfica. Como se aprecia en la Figura 36, la proteína purificada se identifica con la quinasa PksA recombinante. Esta proteína se encuentra presente en la fracción de 100 mM de imidazol completa y en las primeras alícuotas con 300 mM de imidazol.

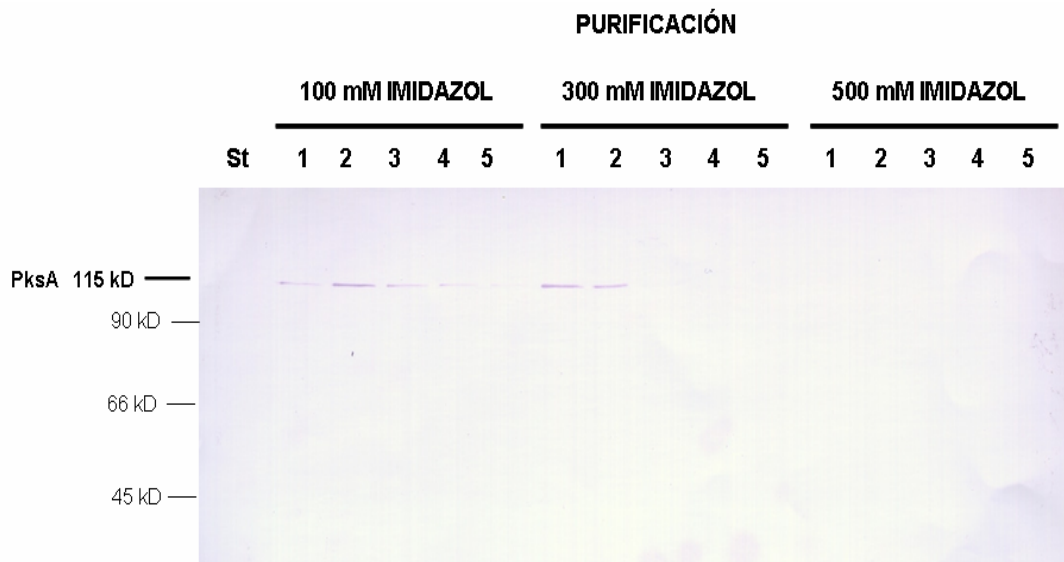


Figura 36. Detección mediante Western blot de la proteína PksA recombinante purificada. En la figura se muestran las distintas fracciones de elución recuperadas a partir de la columna de purificación de agarosa-níquel con concentraciones crecientes de imidazol.

III. 3. Análisis de la actividad catalítica de la quinasa PksA

La preparación de proteína empleada para el análisis de la actividad catalítica corresponde con la muestra recuperada a 300 mM de imidazol, que contiene una cantidad de proteína moderada pero carece de otras proteínas contaminantes detectables mediante SDS-PAGE. La proteína obtenida se renaturalizó de forma progresiva mediante diálisis en un tampón apropiado con diferentes aditivos que favorecen el plegado de la proteína. Siguiendo los pasos descritos en la sección X.2.6 de Material y Métodos, la proteína quinasa recuperó su conformación nativa, eliminando los restos de urea de la preparación. Finalmente, se concentró la muestra en filtros de centrifuga que retienen las proteínas, reduciendo el volumen de la preparación, obteniendo una muestra con una cantidad de proteína suficiente para realizar el ensayo de actividad.

La actividad catalítica de la proteína quinasa se demuestra mediante el análisis de la capacidad de autofosforilación de la quinasa sobre residuos presentes en la propia proteína. El estudio de la autofosforilación se realiza mediante un ensayo de marcaje radiactivo de la quinasa, de acuerdo las pautas expuestas en la sección X.4 de Material y Métodos. En este ensayo, se pone en contacto la muestra con la quinasa concentrada con el ATP radiactivo marcado con P^{32} en posición γ , en un tampón de fosforilación apropiado que aporta iones Mg^{2+} y Mn^{2+} necesarios para la actividad de la proteína.

Tras incubar la reacción, se corrió un gel SDS-PAGE desde donde se transfirió la proteína a un filtro y se realizó una autoradiografía colocando una película sensible a la radiactividad sobre el filtro. El revelado de esta película se muestra en la Figura 37.

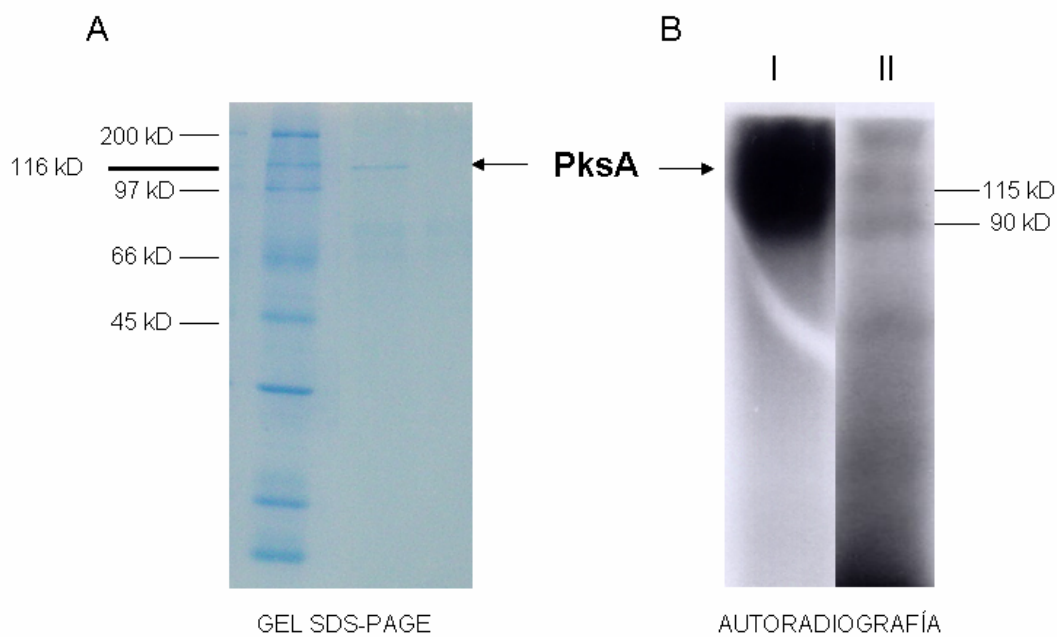


Figura 37. Autofosforilación de la quinasa PksA. A) Gel SDS-PAGE con la proteína PksA recombinante concentrada empleada para el análisis de la actividad *in vitro*. B) Autoradiografía del filtro con la quinasa marcada tras el ensayo de autofosforilación, tras un tiempo de exposición largo (I) o corto (II). La incorporación de P^{32} a la proteína a partir del ATP debido a la actividad catalítica de la quinasa se refleja en la emisión de radiación en la posición ocupada por la proteína en el filtro.

La autoradiografía demuestra que la proteína PksA es una quinasa funcional con actividad catalítica, puesto que incorpora P^{32} a partir del ATP a la propia proteína mediante autofosforilación. La intensa señal detectada en la posición del filtro que corresponde a esta proteína en el revelado de la izquierda genera a su vez tres bandas discretas si se reduce el tiempo de exposición de la película, como se muestra a la derecha. El rango en que aparecen dos de estas bandas se sitúa entre los 90-120 kDa, mientras que la última se sitúa algo por encima, por lo que parecen corresponder a distintas formas de fosforilación de la quinasa, que dispone de diferentes residuos susceptibles de autofosforilación. Por tanto, como conclusión, este ensayo confirma que la proteína PksA actúa como una ePK con actividad catalítica *in vitro*.

IV. Estudio del perfil de expresión de la quinasa PksA

El tiempo y el nivel de expresión de la ePK PksA durante el ciclo de vida de la bacteria *M. xanthus* se ha analizado a partir de la construcción de una fusión traduccional entre el gen *pksA* y el gen *lacZ* de *E. coli*, que codifica para la enzima β -galactosidasa, descrita en la sección I.9 de Resultados.

IV. 1. Análisis cuantitativo de la actividad β -galactosidasa de la fusión *lacZ* con el gen *pksA*

La valoración de la actividad β -galactosidasa específica de la estirpe portadora de la fusión *lacZ* con el gen *pksA* se efectuó de acuerdo al procedimiento detallado en el apartado XII.1.2 de Material y Métodos. Así, la determinación de la actividad β -galactosidasa se llevó a cabo mediante una reacción enzimática de ruptura del compuesto ONPG en ONP, generando un producto coloreado de tonalidad amarilla determinado espectrofotométricamente.

En el estudio de la actividad β -galactosidasa específica de la cepa *pksA-lacZ*, la bacteria se cultivó en medio sólido CTT para de esta forma determinar la actividad desarrollada por la cepa portadora de la fusión durante crecimiento vegetativo, mientras que en el caso del ciclo de desarrollo, la bacteria se sembró sobre medio CF y TPM. En ambos casos, se recogieron muestras de forma periódica a partir de estos medios de cultivo, con tiempos de incubación comprendidos entre las 0 h y las 96 h. En la Figura 38 se muestra la actividad β -galactosidasa específica de la cepa portadora de la fusión *pksA-lacZ*, tanto en condiciones de crecimiento vegetativo como durante el desarrollo.

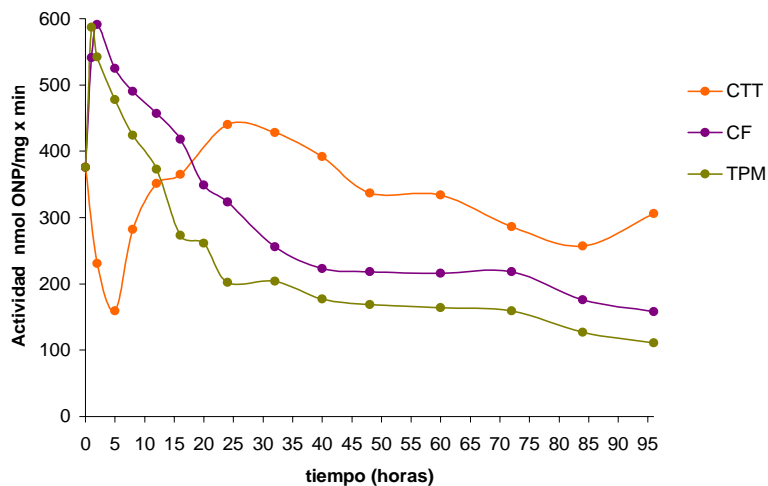


Figura 38. Actividad β -galactosidasa específica de la cepa *pksA-lacZ* en medio sólido. En la gráfica, se muestra la actividad desarrollada por la estirpe portadora de la fusión *lacZ* durante el crecimiento vegetativo en CTT (naranja) y en el ciclo de desarrollo, en CF (violeta) y TPM (verde).

El perfil de expresión de la ePK PksA mostrado en la gráfica indica que esta proteína se expresa a niveles muy elevados tanto durante el crecimiento vegetativo como en el ciclo de desarrollo de la bacteria. No obstante, el análisis de la actividad confirma que la quinasa incrementa de forma notable su expresión durante el desarrollo en comparación con la fase de crecimiento vegetativo. Así, justo al comienzo del desarrollo la expresión de esta proteína aumenta de forma drástica generando un máximo de expresión que en TPM se alcanza tras 1 h de incubación, mientras que para CF se produce tras 2 h en este medio.

En condiciones de privación de nutrientes en CF y TPM, la presencia de este pico de expresión temprano coincide con el momento en que las células detectan la carencia de nutrientes en el medio y comienza el intercambio de señales que promueve la progresión hacia el ciclo de desarrollo, lo que indica que esta proteína ha de estar implicada funcionalmente en el control del inicio de ciclo de desarrollo. Tras alcanzar este máximo de expresión, una vez que se ha desencadenado el desarrollo, la expresión de la quinasa se reduce rápidamente alcanzando un nivel de expresión basal tras 24-48 h.

En cambio, durante el crecimiento vegetativo en CTT, en respuesta a la abundancia de nutrientes frescos en el medio, la expresión de la quinasa se reprime con rapidez, alcanzando un mínimo de expresión tras 5 h en este medio. A partir de aquí, a medida que consume los nutrientes de este medio su expresión crece progresivamente hasta alcanzar niveles máximos en torno a las 24 h coincidiendo con el inicio de la fase estacionaria, desde donde retorna lentamente hasta un nivel de expresión basal.

IV. 2. Análisis de la dependencia de la expresión de la quinasa PksA respecto al nivel de nutrientes en el medio

Finalmente, se ha determinado la actividad β -galactosidasa de la estirpe portadora de la fusión *lacZ* con el gen *pksA* en medio CTT líquido. Para ello, se ha realizado una curva de crecimiento a partir de un inóculo inicial a DO_{600} de 0.075, partiendo de un cultivo a una DO_{600} de 1, tomando muestras de forma periódica durante 48 h. La correspondencia entre los valores de actividad respecto a la densidad óptica del cultivo mostrados en la Figura 39 reafirman la relación entre el nivel de expresión de la quinasa PksA y los nutrientes disponibles en el medio. Como se puede apreciar en ella, durante la fase exponencial la quinasa se expresa a niveles bajos, mientras que cuando comienzan a escasear estos nutrientes y la bacteria entre en la fase estacionaria, los niveles de expresión registrados son mucho más elevados.

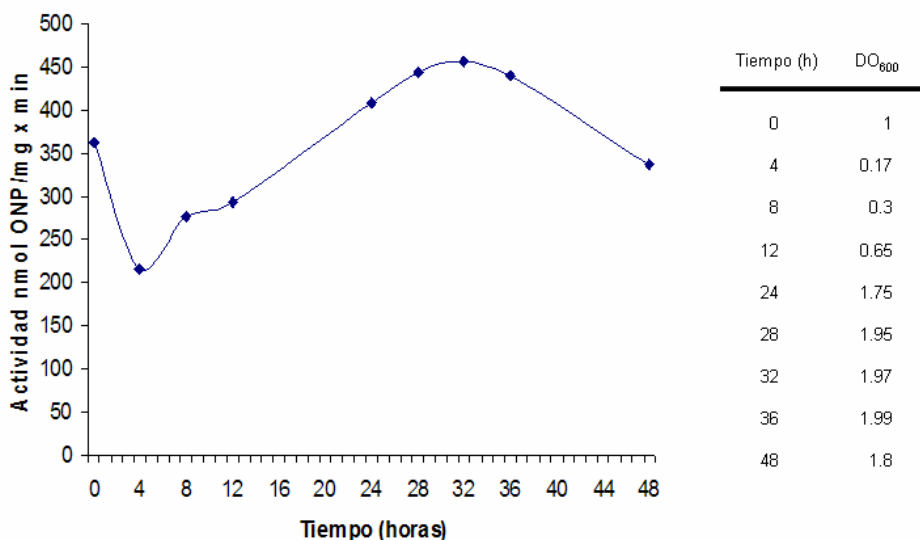


Figura 39. Actividad β -galactosidasa específica de la cepa *pksA-lacZ* en CTT líquido. A la derecha, se muestra los valores de actividad desarrollados por la bacteria para cada tiempo, mientras que a la izquierda aparece la densidad óptica alcanzada por el cultivo a lo largo de la curva de crecimiento

V. Estudio del operón del gen *pksA*

V. 1. Análisis del locus *pksA*

La exploración de los genes adyacentes al gen *pksA* es clave para identificar productos génicos relacionados a nivel funcional con la ruta de transducción de señales en la que se integra esta ePK. El estudio del locus *pksA* en el genoma de la bacteria *M. xanthus* revela la presencia de diez genes orientados en la misma dirección que el gen para la quinasa PksA, formando un bloque genético que ocupa 13.6 kb en el cromosoma. Entre estos genes, siete de ellos se sitúan justo por encima del gen *pksA* mientras que los otros tres aparecen inmediatamente por debajo. La disposición y proximidad entre estos genes sugiere la posible presencia de un operón en el locus *pksA* tal como muestra la Figura 40, integrado por un total de once genes, todos ellos coexpresados en una unidad transcripcional transcrita en un mismo ARN mensajero de tipo policistrónico.

El análisis detallado de la secuencia de este locus indica que todos estos genes comparten una misma región promotora situada justo por delante del primer gen del operón. Este segmento con 165 pb presenta una secuencia en donde es posible reconocer la existencia de un promotor característico para σ^{70} , con una caja -35 (TTGCTC) y una caja -10 (TGTAAG) bien conservadas, situadas 45 pb por encima del inicio del primer gen. Los genes integrados en este locus corresponden a marcos abiertos de lectura con un uso de codones típico de los genes de *M. xanthus*, es decir, con un contenido en G+C superior al 90% en la última base de cada triplete. La separación entre estos genes suele ser muy escasa, en general inferior a 50 pb y además, no se han identificado otras posibles promotores internos en estas regiones intergénicas.



Figura 40. Organización genética del locus *pksA* con los genes que integran esta región. En la tabla, se muestra la localización de estos genes en el genoma de *M. xanthus* así como la identidad de las proteínas que codifican cada uno de ellos.

Los genes integrados dentro del *locus pksA*, en donde el gen para la quinasa PksA se identifica con el orf8, han sido estudiados en detalle, como muestra la Figura 40. A continuación, se describen las principales características de los productos codificados por los genes de esta región:

El orf1 codifica una proteína reguladora de tipo PspA, soluble, formada por 247 residuos. Esta proteína presenta un dominio PspA / IM30 (PF04012) que ocupa la mayor parte de su secuencia, implicado en mediar la interacción proteína-proteína con un activador transcripcional dependiente de σ^{54} , ejerciendo un efecto inhibitor. Igualmente, esta proteína actúa como un efector en la respuesta a agentes de estrés capaces de reducir la carga energética celular mediante la disipación del potencial de membrana.

El grupo de tres genes formados por el orf2, orf5 y orf6 cifran para un transportador de tipo ABC completo. En este sistema, el orf2 genera la proteína de unión al sustrato de tipo II situada en el periplasma. Este componente que contiene 395 residuos presenta similitud con proteínas que reconocen sulfonatos alifáticos, una fuente alternativa de obtención de azufre para las bacterias ante la ausencia de un aporte de sulfato en el medio. El dominio de unión al sustrato (SSF53850) identificado en esta proteína se sitúa en la región C-terminal, entre los residuos 177 a 372 de la proteína.

En este transportador ABC, el orf5 genera el componente que porta el módulo de unión a ATP en el citoplasma, necesario para acoplar el transporte del sustrato a través de la membrana con el aporte de energía suministrada por la hidrólisis de ATP. En esta proteína, con 233 residuos, el dominio característico de unión al ATP de los transportadores ABC (IPR003439; PF00005) ocupa casi la totalidad de la proteína, desde los aminoácidos 32 al 216. Por último, el orf6 corresponde con el componente integral de membrana de tipo permeasa implicado en la movilización del sustrato a través de la membrana. Esta proteína consta de 427 residuos, con cuatro segmentos hidrofóbicos transmembrana en el cual se reconoce un dominio permeasa DUF214 de tipo FtsX (IPR03838; PF02687).

El orf3 genera una proteína hipotética de 267 residuos, que posee un segmento apolar N-terminal integrado en la membrana precedido a su vez por un péptido señal. Carece de dominios funcionales representativos y tan sólo muestra una similitud muy lejana con proteínas implicadas en el reparto cromosómico durante la división celular.

El orf4 cifra una lipoproteína que posee 551 residuos, cuyo sitio de anclaje lipídico (PS51257) para su inserción a la membrana se sitúan en un corto segmento de 20 residuos situados en extremo N-terminal de la proteína. No se han identificado en ella motivos funcionales conocidos e igualmente carece de similitud significativa con otras proteínas depositadas en las bases de datos, salvo con proteínas homólogas a ella en otras especies de mixobacterias.

El orf7 codifica una proteína hipotética con 259 residuos e inserta en la membrana mediante uno o dos segmentos hidrofóbicos consecutivos que ocupan la región N-terminal de la proteína, precedidos por un péptido señal. Carece de dominios funcionales reconocibles e igualmente no presenta similitud con otras proteínas más allá de la encontrada con proteínas equivalentes en otras especies de mixobacterias.

El orf9 genera una proteína de tipo AAA-ATPasa (ATPasas asociadas con diversas actividades celulares) formada por 585 residuos y situada en el citoplasma. Los miembros de esta extensa familia de proteínas participan en una amplia variedad de procesos celulares, como la transducción de señales, la regulación de la expresión génica o el control del ciclo celular. A este grupo de proteína pertenecen con frecuencia proteínas implicadas en la división celular, chaperonas, proteasas, helicasas o factores transcripcionales.

Las AAA-ATPasas actúan como motores moleculares multiméricos que acoplan la energía aportada por la hidrólisis de ATP para producir cambios conformacionales durante el remodelado de la proteína o ADN diana. En esta proteína, el dominio AAA-ATPasa de unión e hidrólisis de ATP (IPR003959, PF00004) se localiza en la región C-terminal de la proteína, entre los residuos 328 a 515, mientras que la región N-terminal participa presuntamente en el reconocimiento del sustrato. Finalmente, esta proteína presenta una identidad elevada con proteínas putativas implicadas en el control de la división celular.

El orf10 cifra una proteína hipotética citoplasmática constituida por 204 residuos. Carece de dominios funcionales reconocibles, aunque presenta similitud significativa con otra proteína codificada por el Mxan3680 en el genoma de *M. xanthus*. Esta proteína tan sólo se encuentra conservada dentro del grupo de las mixobacterias, en donde también se encuentra repetida, y en los bdellovibrios, por lo que parece constituir una proteína específica adquirida por la línea de las δ proteobacterias.

El orf11 codifica una proteína soluble de tipo endonucleasa ADN/ARN inespecífica constituida por 483 residuos. Esta proteína pertenece a una familia de enzimas común a bacterias y eucariotas, cuya característica principal es la capacidad para hidrolizar tanto ADN como ARN de cadena sencilla o doble mediante una actividad que depende de la unión de iones Mg^{2+} . El dominio ADN/ARN endonucleasa no específico (IPR001604; PF01223) detectado en esta proteína ocupa la región C-terminal, entre los residuos 233 a 450. Esta región mantiene todos los aminoácidos necesarios para la actividad catalítica, incluida la histidina conservada H299 esencial para la reacción.

El análisis de la disposición de los genes que conforman el *locus pksA* en el genoma secuenciado de distintas especies de mixobacterias indica que esta unidad genética se mantiene bien conservada dentro de este grupo, como ocurre en *S. aurantiaca* (ver Figura 41). En esta bacteria, este *locus* está formado por diez genes en lugar de once, debido a la pérdida de los dos orf finales y a la incorporación de un gen que cifra una aminohidrolasa.

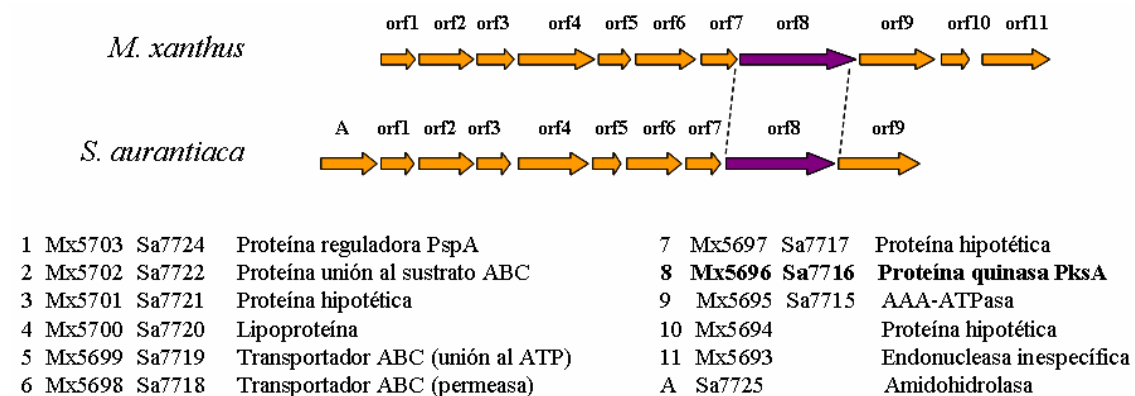


Figura 41. Sintenia en la organización del *locus pksA* en las mixobacterias *M. xanthus* y *S. aurantiaca*.

V.2. Determinación de la coexpresión del gen *pksA* por RT-PCR

El análisis *in silico* del locus *pksA* sugiere la existencia de un operón bacteriano integrado por once genes. Ante este hecho, se ha empleado la técnica de RT-PCR con la finalidad de definir los genes que conforman el operón y confirmar de forma experimental la transcripción conjunta del gen *pksA* en un mismo ARN mensajero con los genes localizados en su proximidad. Debido a la elevada longitud de esta región cromosómica, se ha llevado a cabo un total de tres reacciones de RT-PCR, siguiendo la estrategia expuesta en la Figura 42, para así verificar la coexpresión del gen *pksA* con los genes situados justo por debajo (RT-PCR 1) y por encima (RT-PCR 2 y RT-PCR 3).

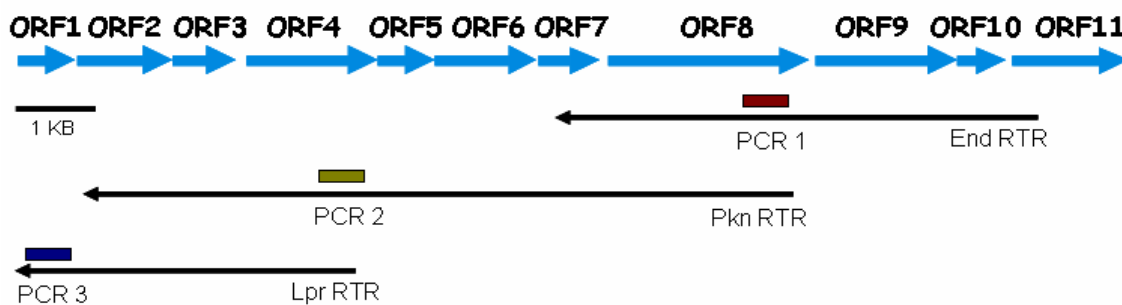


Figura 42. Análisis mediante RT-PCR para confirmar la coexpresión del locus *pksA*. Las flechas indican el sentido de la retrotranscripción a partir del punto de unión del cebador sobre el ARN mensajero. En cada caso, a partir del ADNc obtenido, se realizó una PCR para la amplificación de un fragmento de ADN aguas arriba.

En primer lugar, se aisló el ARN de un cultivo en fase de crecimiento vegetativo de la cepa silvestre de *M. xanthus* siguiendo el procedimiento descrito en la sección VII.1 de Material y Métodos. La preparación de ARN total, que contenía el conjunto de ARN mensajeros generados por la bacteria, se empleó como muestra de partida para todas las reacciones de retrotranscripción realizadas, de acuerdo con las condiciones descritas en la sección VII.2 de Material y Métodos.

A partir de esta muestra de ARN total, se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa partiendo del cebador End RTR, que hibrida con la región 5' del gen que cifra para la endonucleasa inespecífica (orf11). De este modo, a partir del transcrito derivado de este gen se obtuvo un ADN complementario (ADNc), que se extendía a lo largo de todo el operón. El producto de esta reacción se empleó como molde para llevar a cabo la amplificación por PCR de una región de ADN de 320 pb sobre el extremo 3' del gen *pksA* (orf 8), a partir de la pareja de cebadores Pkn RTF y Pkn RTR.

La coexpresión del gen *pksA* con los genes situados justo por debajo generará un mismo ARN mensajero para todos ellos. Como consecuencia, el ADNc sintetizado desde el gen para la endonucleasa alcanzará igualmente al gen que codifica la quinasa PksA y por tanto, será posible amplificar por PCR un fragmento perteneciente al gen *pksA*. Como se muestra en la Figura 43, esta reacción de PCR, designada como PCR 1, generó un amplificado de 320 pb de acuerdo a lo esperado, confirmando así la coexpresión del gen *pksA* con los tres genes situados por debajo.

Siguiendo una estrategia similar, a partir de la preparación de ARN total, se obtuvo por transcripción inversa otro ADNc desde el cebador Pkn RTR, unido al extremo 3' del gen *pksA* (orf 8), que se extiende desde este punto hacia delante en el operón. Una muestra de esta reacción se empleó como molde para la amplificación por PCR de una región de ADN de 270 pb perteneciente al extremo 3' del gen para la lipoproteína (orf4), con la pareja de cebadores Lpr RTF y Lpr RTR.

De forma similar al caso anterior, la cotranscripción del gen *pksA* con los genes situados justo por encima dará lugar a un transcrito conjunto que permite al ADNc sintetizado a partir del gen *pksA* cubrir al gen para la lipoproteína, posibilitando la amplificación por PCR de un fragmento de este gen. En la Figura 43 se puede ver con claridad cómo esta reacción de PCR, denominada PCR 2 produjo un fragmento de 270 pb, que confirma la coexpresión del gen *pksA* con los cuatro genes localizados aguas arriba.

Finalmente, de nuevo a partir de la muestra de ARN total, se sintetizó por transcripción inversa un último ADNc con el cebador Lpr RTR, desde el extremo 3' del gen para la lipoproteína (orf4) hasta alcanzar el inicio del cotranscrito de este operón. El producto de esta reacción sirvió como molde para la pareja de cebadores Psp RTF y Psp RTR durante la amplificación por PCR de una región de ADN de 230 pb en el extremo 3' del gen para el regulador PspA (orf1).

La expresión de estos genes dentro de un único ARN mensajero permite la amplificación por PCR de un fragmento del gen *pspA*, a partir del ADNc generado desde el gen para la lipoproteína. Como se observa en la Figura 43, esta reacción de PCR denominada PCR 3, originó un amplificado de 230 pb, que verifica la coexpresión del gen *pksA* con el conjunto de siete genes situados aguas arriba.

El resultado de estas reacciones de RT-PCR sobre el *locus pksA* confirman la presencia de una unidad transcripcional integrada por once genes coexpresados en un mismo mensajero. Como se muestra en la Figura 43, junto a la reacción de RT-PCR, se han llevado a cabo en cada caso un control positivo a partir de ADN cromosómico molde, así como un control negativo partiendo de ARN mensajero sin retrotranscribir.

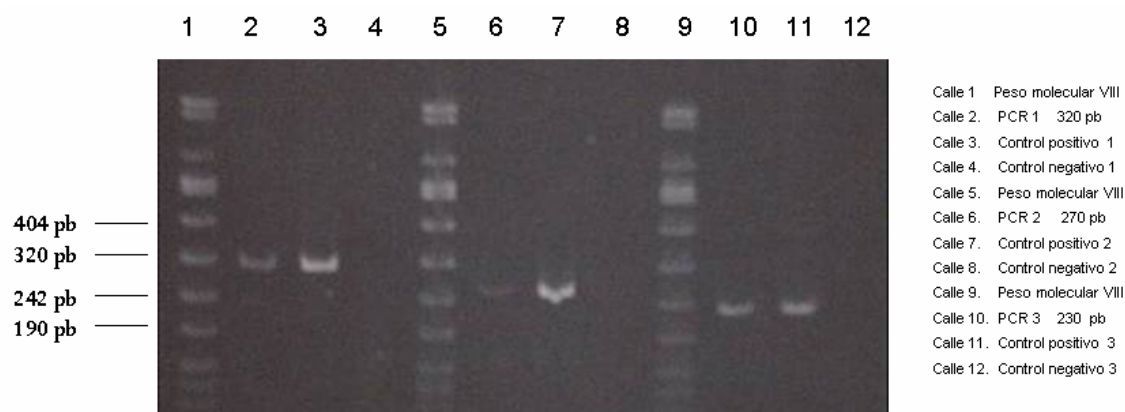


Figura 43. Productos de PCR obtenidos a partir de las reacciones de retrotranscripción para delimitar el operón en torno al *locus pksA*. En cada caso, se indica la reacción de amplificación a partir del ADNc (PCR 1, PCR 2 y PCR3), junto con un control + empleando ADN cromosómico y un control - con la muestra de ARN total sin retrotranscribir.

VI. Papel de la quinasa PksA en el ciclo de vida de *M. xanthus*

Las ePKs previamente caracterizadas en *M. xanthus* se encuentran implicadas en el control del ciclo de vida de esta bacteria, dentro de rutas de transducción de señales que participan en la regulación tanto del crecimiento vegetativo como del desarrollo multicelular de la mixobacteria. Para conocer el rol ejercido por la quinasa PksA en el transcurso del ciclo de vida de *M. xanthus*, se procedió a la obtención de una estirpe portadora de una delección en fase del gen *pksA*. El análisis fenotípico de esta cepa carente de la proteína PksA es clave para poder establecer la relación de esta quinasa con el ciclo de vida de la bacteria *M. xanthus*.

La obtención de una estirpe de *M. xanthus* carente del gen *pksA* se ha llevado a cabo a partir de la construcción de un plásmido portador de la delección en fase de este gen. Para ello, se procedió a la clonación en el vector pBJ113 de dos fragmentos de ADN de tamaño similar que flanquean por encima y por debajo al gen diana. El brazo 5' situado inmediatamente por encima del gen *pksA* contiene los primeros codones de la región codificante, mientras que el brazo 3' localizado justo por debajo a su vez incluye los últimos codones del gen *pksA*. La inserción en fase de estos fragmentos en el vector conduce a la sustitución completa del gen *pksA* a la vez que se mantiene la pauta de lectura, evitando así el efecto polar de la delección.

La integración del plásmido portador de la delección mediante recombinación en el cromosoma de la estirpe silvestre de *M. xanthus* generó intermediarios merodiploides resistentes a kanamicina. El crecimiento de estas estirpes diploides parciales durante varias generaciones en ausencia de kanamicina facilitó la pérdida del plásmido mediante recombinación homóloga. La selección de los segregantes haploides carentes de plásmido se realizó en un medio CTT con galactosa 1%, puesto que la presencia del azúcar inhibe el crecimiento del intermediario. Las colonias obtenidas al eliminar el plásmido son sensibles a kanamicina, a diferencia del intermediario merodiploide.

Durante la pérdida del plásmido, la probabilidad de eliminar el gen *pksA* por recombinación cruzada entre fragmentos homólogos, es similar a la probabilidad de reversión a silvestre debido a una recombinación sucesiva sobre el mismo fragmento empleado para la integración en el cromosoma. Por ello, las colonias haploides seleccionadas conforman una mezcla heterogénea en donde la frecuencia de mutantes carentes del gen *pksA* se sitúa en torno a la mitad de los segregantes obtenidos. Por tanto, para diferenciar el mutante de delección respecto a las colonias silvestres obtenidas por reversión se llevó a cabo un Southern blot.

VI. 1. Construcción de una cepa portadora de una delección en fase del gen *pksA*

La obtención del mutante $\Delta pksA$ comenzó con la amplificación por PCR a partir del cromosoma bacteriano de un segmento de ADN de 1.0 kb *EcoRI-XbaI*, correspondiente a la región situada justo por encima del gen, delimitado por los cebadores apropiados (ver C.IV.2.). El producto de PCR se digirió con ambas enzimas al igual que el vector pBJ113 y se insertó en el vector, generando el plásmido pBJ-*pksA*5'.

Por otro lado, se amplificó por PCR otro segmento de ADN de 1.0 kb *XbaI-HindIII* sobre la región situada inmediatamente por debajo del gen *pksA*, utilizando como molde el cromosoma bacteriano con los cebadores adecuados (ver C.IV.2). El producto de PCR se introdujo en el vector pBJ-*pksA5'*, tras digerir de forma previa al fragmento y al vector con ambas enzimas, dando lugar al plásmido pBJ-*pksA*.

Este vector porta la delección en fase del gen de la quinasa, puesto que la región codificante de la proteína PksA es reemplazada por los dos brazos que flanquean al gen. En la construcción resultante, se ha deleccionado el 96% del gen *pksA* y por tanto, se ha eliminado de forma completa la región correspondiente al dominio catalítico de la quinasa. Sin embargo, para evitar el efecto polar de la delección y mantener la pauta de lectura, el plásmido conserva 33 codones pertenecientes al inicio y final del gen *pksA*, fusionados en fase mediante la diana *XbaI*, que a su vez sirve de conexión entre ambos brazos.

La delección del gen de la quinasa se incorporó a la cepa silvestre de *M. xanthus* mediante electroporación del plásmido pBJ-*pksA*. La integración de la construcción en el cromosoma de la mixobacteria se produjo por entrecruzamiento de uno u otro brazo del gen *pksA* sobre su respectiva región de homología en el cromosoma bacteriano. Los transformantes se seleccionaron en un medio CTT con kanamicina, en donde tan sólo fueron capaces de crecer aquellas bacterias con el plásmido pBJ-*pksA* inserto en su cromosoma. La integración del plásmido portador de la delección a través de un primer evento de recombinación dio lugar a una estirpe intermedia merodiploide que contiene duplicados ambos brazos del gen *pksA*. La identidad de esta estirpe se comprobó mediante Southern blot (no mostrado).

La cepa intermedia mantiene integrado el plásmido pBJ-*pksA* de forma estable en presencia de kanamicina. Sin embargo, la supresión de esta presión selectiva facilita su pérdida mediante un segundo evento de recombinación, por lo que se procedió a cultivar al intermedio en un medio CTT sin antibiótico. Durante este proceso, la recombinación sobre un brazo diferente al empleado previamente para la integración del plásmido en el genoma conlleva la delección del gen *pksA*, ya que en caso contrario se produce una reversión a silvestre. La similitud de tamaño de ambos brazos es clave para que la frecuencia de mutantes de delección se sitúe en torno a la mitad de los segregantes generados.

El aislamiento de colonias haploides se realizó mediante la siembra de diluciones seriadas de un cultivo en medio líquido sin antibiótico del intermedio sobre placas de medio sólido CTT con galactosa al 1%. En este medio selectivo, tan sólo fueron capaces de crecer aquellas células que previamente perdieron el plásmido por recombinación, bien sean mutantes de delección o revertientes a silvestre, mientras que las células de intermedio portadoras del plásmido integrado no prosperaron por la sensibilidad a la galactosa conferida por la enzima galactosa quinasa cifrada por el plásmido.

Finalmente, los segregantes haploides obtenidos se analizaron mediante Southern blot con la finalidad de diferenciar los mutantes de delección carentes del gen *pksA* respecto a los revertientes a silvestre. Las preparaciones de cromosoma de cada una de las estirpes candidatas se digirió con *SmaI*, al igual que la muestra control correspondiente a la cepa silvestre. La sonda utilizada durante la hibridación, el brazo 5' del gen *pksA*, hibrida con un fragmento de 5.8 kb en la cepa silvestre, mientras que se une a un fragmento de 3.4 kb en el mutante de delección, debido a la pérdida del gen *pksA* de 2.5 kb.

En la Figura 44 se aprecia la imagen del Southern blot obtenido durante el análisis del mutante de delección para la quinasa, en donde se observa cómo tan sólo una única colonia analizada ha perdido el gen *pksA* (calle 6). Esta estirpe mutante que carece de la ePK PksA fue denominada $\Delta pksA$.

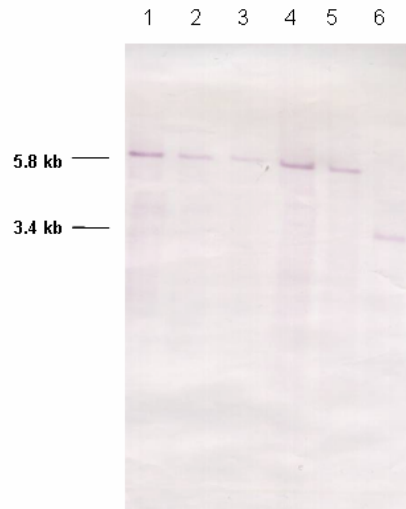


Figura 44. Southern blot del mutante de delección $\Delta pksA$ de *M. xanthus*. Las preparaciones cromosómicas de la cepa silvestre (control, calles 1 y 4) y de las colonias haploides analizadas (calles 2, 3, 5 y 6) se digirieron con *SmaI* y se hibridaron con el brazo 5' del gen *pksA*.

VI. 2. Análisis fenotípico del mutante de delección $\Delta pksA$

VI. 2. 1. Crecimiento vegetativo

La influencia de la delección del gen *pksA* en el crecimiento vegetativo de *M. xanthus* se ha determinado tras cultivar tanto la cepa silvestre como el mutante de delección $\Delta pksA$ en medio CTT líquido para la realización de una curva de crecimiento, siguiendo las pautas expuestas en la sección XIII.1 de Material y Métodos. Durante este experimento, no se detectaron diferencias significativas en el crecimiento desarrollado por ambas estirpes a lo largo del tiempo, ni durante la fase exponencial ni tampoco durante la fase estacionaria (no mostrado). Además, tanto el tiempo de generación (unas 4 h), como la densidad celular alcanzada al entrar en la fase estacionaria es similar entre ambas bacteria. De esta forma, la pérdida de la quinasa PksA no afecta al crecimiento vegetativo de *M. xanthus*.

VI. 2. 2. Desarrollo

El análisis fenotípico de la estirpe mutante $\Delta pksA$ durante el ciclo de desarrollo permite establecer la función desempeñada por la proteína quinasa durante el control de los distintos eventos que conforman esta etapa del ciclo de vida de *M. xanthus*. En este sentido, se ha estudiado el efecto de la delección del gen *pksA* sobre la agregación y fructificación así como durante la esporulación y la germinación de las mixósporas.

i) Formación de cuerpos fructificantes

El estudio de la progresión del ciclo de desarrollo del mutante de delección $\Delta pksA$ se llevó a cabo tras cultivar esta bacteria sobre dos medios pobres en nutrientes inductores del desarrollo, CF y TPM, siguiendo el protocolo descrito en la sección XIII.3 de Material y Métodos. Ambos medios de cultivo presentan características diferenciales que condicionan el avance de esta fase del ciclo de vida de *M. xanthus*. Así, mientras TPM carece totalmente de nutrientes, y por tanto induce con rapidez el desarrollo, en medio CF la presencia de una pequeña cantidad de nutrientes permite crecer a la bacteria durante un corto espacio de tiempo, hasta que su consumo desencadena el inicio del desarrollo (ver C.II.2.2).

Los cuerpos fructificantes generados en medio CF por la estirpe silvestre y el mutante de delección $\Delta pksA$ se muestran en la Figura 45. Al comparar la progresión del desarrollo en ambas cepas, se aprecia que el mutante carente de la quinasa PksA presenta un desarrollo prematuro, puesto que la fructificación se encuentra adelantada en esta cepa respecto a la estirpe silvestre en torno a 3-4 h. Este resultado es similar al obtenido tras sembrar ambas bacterias, la estirpe silvestre y el mutante de delección $\Delta pksA$, en medio TPM (no mostrado). En ambos casos, la progresión durante el desarrollo es ligeramente más rápida en el mutante para la quinasa en comparación con el silvestre, formando cuerpos fructificantes de forma prematura.

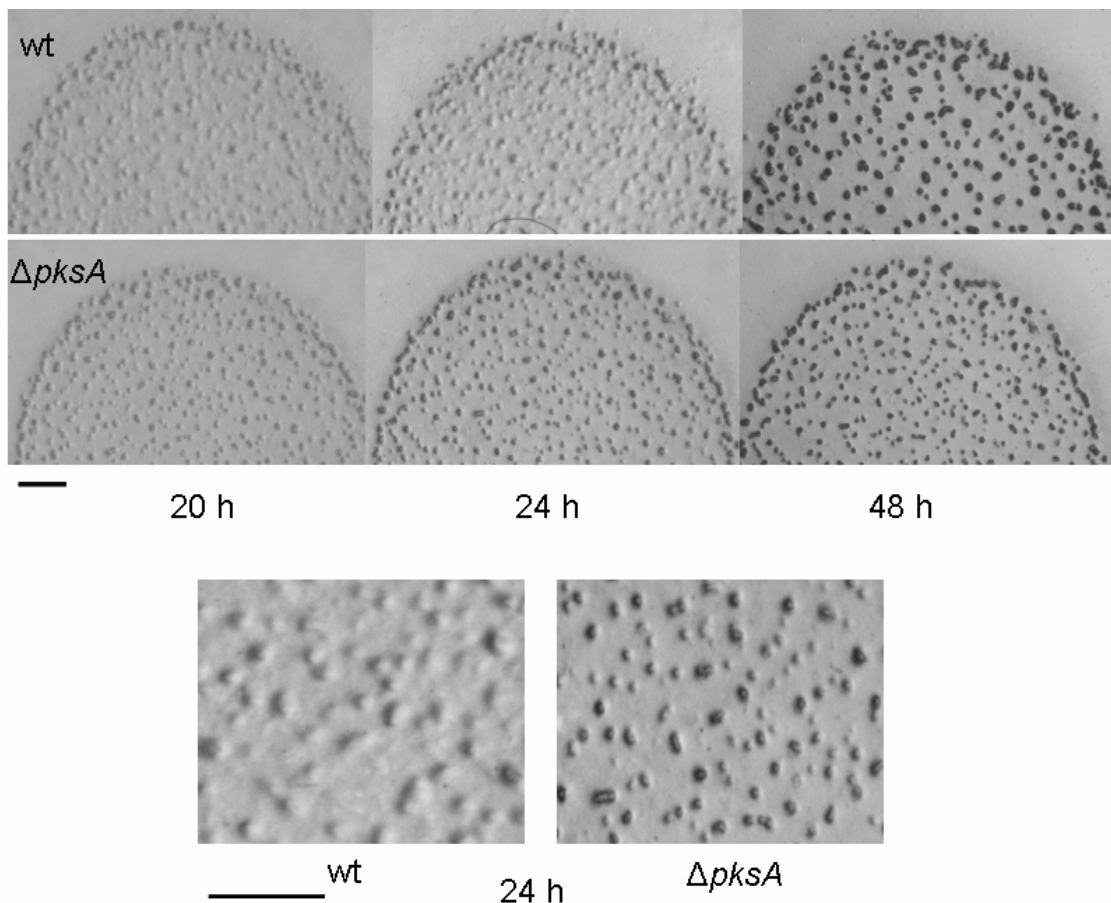


Figura 45. Cuerpos fructificantes de la cepa silvestre (wt) y del mutante de delección $\Delta pksA$ de *M. xanthus* en medio CF. La DO_{600} empleada para estos cultivos fue de 15, incubando las bacterias a 30°C durante los periodos de tiempo indicados. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 18x, excepto las dos últimas que corresponden a un detalle ampliado de los cuerpos formados de cada estirpe. Barra: 1 mm.

Como se aprecia en la Figura 45, tras 24 h el silvestre genera tan sólo simples agregados muy inmaduros y totalmente translúcidos, con un aspecto similar al que presenta el mutante $\Delta pksA$ tras tan sólo 20 h de incubación. En cambio, una vez transcurridas 24 h de incubación, la bacteria carente de la quinasa PksA produce ya cuerpos fructificantes definidos y empaquetados con cierta opacidad, en pleno proceso de maduración, a diferencia del silvestre. A medida que progresa el desarrollo, una vez completadas 48 h de incubación, ambas estirpes presentan cuerpos fructificantes maduros muy similares entre sí, totalmente opacos y con un elevado grado de empaquetamiento. Sin embargo, se observa que los cuerpos formados por el mutante $\Delta pksA$ son considerablemente más pequeños y numerosos que los generados por el silvestre.

ii) Esporulación y germinación

El análisis de la eficiencia de esporulación desarrollada por el mutante $\Delta pksA$ respecto a cepa silvestre permite valorar el efecto de la delección del gen $pksA$ sobre el proceso de esporulación. El método empleado para ello ha sido el recuento del número de mixóporas producidas por ambas bacterias en dos medios pobres en nutrientes, CF y TPM, durante el ciclo de desarrollo. El protocolo seguido para la cuantificación del número de esporas se muestra en la sección XIII.4 de Material y Métodos.

En ambos recuentos mostrados en la Figura 46 se comprueba que el número de mixóporas producidas por el mutante $\Delta pksA$ es sensiblemente inferior al generado por el silvestre para un mismo tiempo de incubación, tanto en medio CF como en TPM. Además, esta diferencia se amplía a medida que progresa el tiempo, debido a que la producción de esporas se estabiliza con mucha mayor rapidez en el mutante $\Delta pksA$ en comparación con el silvestre (en torno a 24 h de diferencia), debido al adelanto de la estirpe carente de la quinasa durante el desarrollo. Este hecho se manifiesta igualmente en que en ambos medios el mutante $\Delta pksA$ comienza a esporular de forma temprana, apareciendo algunas esporas ya a las 24 h, mientras en el silvestre sólo se detectan a partir de las 32 h de incubación.

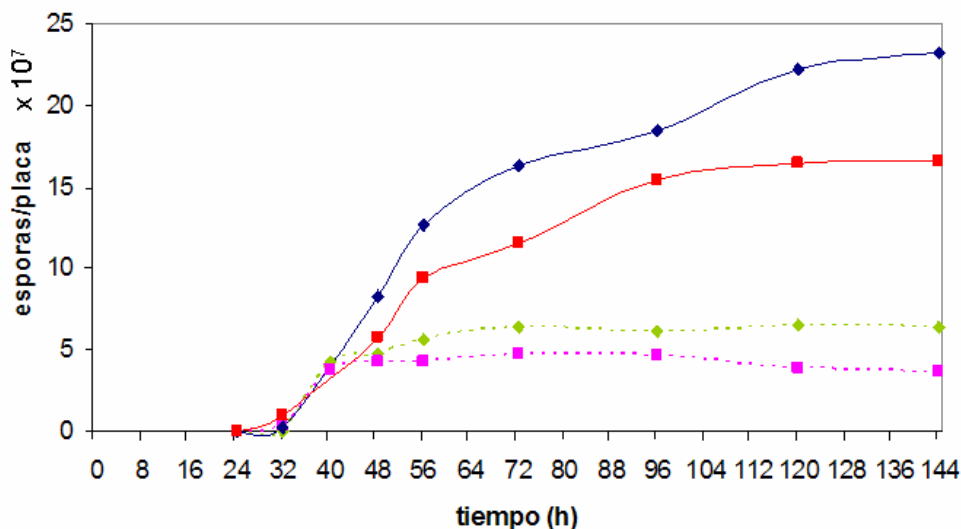


Figura 46. Recuento de esporas producidas por placa por la estirpe silvestre y el mutante de delección $\Delta pksA$ en medio CF y TPM. Clave: silvestre en CF, azul; $\Delta pksA$ en CF, rojo; silvestre en TPM, verde; $\Delta pksA$ en TPM, rosa.

En el medio TPM, tanto el silvestre como el mutante $\Delta pksA$ siguen un perfil similar hasta las 48 h, cuando la bacteria carente de la quinasa comienza a estabilizarse, mientras el silvestre continúa produciendo esporas. Una vez que ambos alcanzan el máximo, en torno a las 72-96 h, se aprecia que el mutante $\Delta pksA$ presenta una reducción en torno al 25% en el número de mixóporas generadas respecto al silvestre. En medio CF, el mutante $\Delta pksA$, que inicialmente esporula antes, se ve rápidamente superado por el silvestre, incrementándose esta diferencia tras 72 h, una vez que el silvestre continúa produciendo esporas, mientras el mutante se detiene. En este caso, la diferencia en el recuento de mixóporas entre ambos es un 30% inferior para el mutante $\Delta pksA$ en comparación con el silvestre tras 120-144 h de incubación.

La germinación de la cepa silvestre y el mutante $\Delta pksA$ se evaluó a partir del análisis de la viabilidad de las mixóporas recuperadas de CF y TPM, siguiendo el procedimiento descrito en la sección XIII.5 de Material y Métodos. El resultado obtenido, tras el recuento de las colonias generadas a partir de las mixóporas procedentes de cada bacteria, indica que tanto el silvestre como el mutante $\Delta pksA$ presentan una eficiencia de germinación similar, en torno al 30%.

VII. Papel de regulador PspA en el ciclo de vida de *M. xanthus*

La proteína PspA, codificada por el primer gen del operón al que pertenece el gen que codifica la quinasa PksA, presenta un dominio de tipo PspA/IM30 (PF04012), entre los residuos 2 a 217 de la proteína (valor E 2e-06). Esta proteína es homóloga a la de *E. coli*, con la que mantiene una identidad del 15%, mientras su similitud se sitúa por encima del 45%. En *E. coli*, la proteína PspA pertenece al sistema Psp (*phage shock protein*), un mecanismo celular de defensa frente a la pérdida del potencial de membrana producido por un daño sobre la integridad de la membrana plasmática de la bacteria (Darwin, 2005).

En condiciones de crecimiento vegetativo, la proteína PspA actúa como un regulador implicado en la represión de los genes *psp*, inhibiendo al activador de σ^{54} PspF mediante un contacto proteína-proteína sobre el dominio AAA-ATPasa del factor transcripcional. Sin embargo, ante el estímulo inductor adecuado, PspA libera esta proteína, permitiendo la expresión de los genes *psp*, a la vez que se asocia con la membrana en donde actúa como un efector de la respuesta Psp (Dworkin *et al.*, 2000; Elderkin *et al.*, 2002; Elderkin *et al.*, 2005).

En este compartimento, esta proteína promueve el mantenimiento de la fuerza protón motriz de la membrana y por tanto, resulta esencial para la supervivencia de la bacteria durante la fase estacionaria, ante la reducción de la carga energética celular debida al agotamiento de los nutrientes en el medio. La carencia de esta proteína incrementa la sensibilidad frente a agentes de estrés que dañan las envueltas celulares y que por tanto, reducen la carga energética celular (Darwin, 2005).

La proteína PspA actúa como un regulador de control global, puesto que se ha comprobado que su carencia o sobreexpresión altera el patrón de expresión de múltiples genes implicados en el metabolismo aerobio y anaerobio, la movilidad, el transporte, la secreción de proteínas o la respuesta frente a diversos agentes de estrés celular. En todos los casos, el efecto sobre estos procesos celulares regulados por esta proteína es tratar de mantener la carga energética celular, ajustándola a las condiciones nutricionales y/o de estrés celular existentes (Jovanovic *et al.*, 2006).

En *M. xanthus*, la privación de nutrientes induce la progresión hacia el ciclo de desarrollo como mecanismo de supervivencia frente a la carencia de un aporte energético. Por tanto, es posible que el regulador PspA participe en la mixobacteria dentro de rutas de transducción de señales implicadas en el control del desarrollo multicelular de *M. xanthus*, colaborando de esta manera con la quinasa PksA, ambos codificados por genes situados en un mismo operón. Por ello, para establecer el rol desempeñado por esta proteína reguladora en el control del ciclo de vida de la bacteria *M. xanthus*, se ha llevado a cabo la construcción de una estirpe portadora de una delección en fase del gen *pspA*.

VII. 1. Construcción de una cepa portadora de una delección en fase del gen *pspA*

La obtención del plásmido portador de la delección en fase del gen *pspA* se llevó a cabo siguiendo un procedimiento similar al descrito para el gen *pksA*. Inicialmente, se amplificó por PCR un fragmento de ADN de 0.8 kb *EcoRI-BamHI* a partir de la región situada justo por encima del gen *pspA* y de igual forma, se obtuvo otro fragmento de ADN *BamHI-HindIII* de tamaño similar inmediatamente por debajo del gen *pspA*, empleando como molde el ADN cromosómico de la cepa silvestre de *M. xanthus* sobre el que anillaban los cebadores utilizados en cada caso (ver C.IV.2). Ambos productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción apropiadas y se insertaron en el vector pBJ113 previamente digerido, dando lugar al plásmido pBJ-*pspA*.

La construcción resultante, que contiene la delección en fase del gen *pspA*, sustituye al gen *pspA* completo por el par de brazos que delimitan a este gen, los cuales incorporan 42 codones pertenecientes al propio gen. En total, se ha eliminado el 83% del gen *pspA*, incluida toda la región que cifra el dominio PspA/IM30, necesario para que la proteína actúe como regulador. En el vector, ambos segmentos de ADN se encuentran conectados en fase mediante una diana *BamHI* esencial para mantener la pauta de lectura, evitando así el efecto polar de la delección del gen.

El plásmido portador de la delección se introdujo por electroporación en la cepa silvestre de *M. xanthus*, obteniendo intermediarios merodiploides con el vector integrado en su cromosoma. Las colonias generadas capaces de crecer en un medio con kanamicina se analizaron mediante Southern blot para confirmar su identidad (no mostrado). Una vez obtenido este intermediario, se cultivó a esta bacteria en un medio sin antibiótico durante varias generaciones, facilitando la pérdida del plásmido mediante un segundo evento de recombinación en ausencia de presión selectiva. Tras realizar diluciones sobre un medio selectivo con galactosa se obtuvieron segregantes haploides carentes del plásmido, y por tanto sensibles a kanamicina.

Las colonias aisladas en este medio podían corresponder con mutantes de delección carentes del gen *pspA* o bien, con silvestres generados mediante reversión. Por ello, las colonias candidatas obtenidas se analizaron mediante PCR para diferenciar entre ambas estirpes. Finalmente, se seleccionó una de estas cepas, que aparentemente carecía del gen *pspA* de acuerdo con el resultado de la PCR, para ser analizada mediante Southern blot. Así, las preparaciones cromosómicas digeridas con *BamHI* de la colonia a analizar y del silvestre (control) se hibridaron con el brazo 3' del gen *pspA*. Esta sonda marcada reconoce un fragmento de 15.3 kb en el silvestre, mientras que la delección del gen *pspA* se identifica por la unión de la sonda a un fragmento de 6.4 kb, debido a la inserción de una diana *BamHI* entre ambos brazos.

En la Figura 47 se presenta el resultado del Southern blot para la identificación del mutante $\Delta pspA$, en donde se aprecia que la colonia analizada carece del gen *pspA* (calle 2). Esta estirpe mutante para el regulador PspA fue denominada $\Delta pspA$.

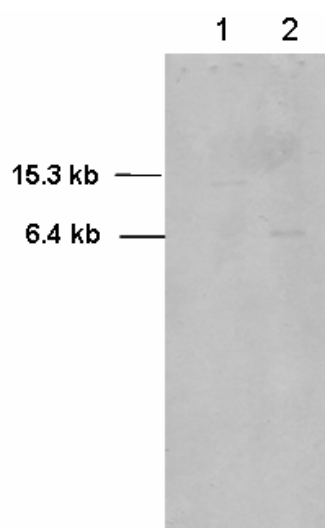


Figura 47. Southern blot del mutante de delección $\Delta pspA$ de *M. xanthus*. Las preparaciones cromosómicas de la cepa silvestre (control, calle 1) y de la colonia presuntamente positiva (calle 2) se digirieron con *Bam*HI y se hibridaron con el brazo 3' del gen *pspA*.

VII. 2. Análisis fenotípico del mutante de delección $\Delta pspA$

VII. 2. 1. Crecimiento vegetativo

El resultado de la delección del gen *pspA* sobre el crecimiento vegetativo de *M. xanthus* se ha valorado mediante la realización de una curva de crecimiento en medio CTT líquido de la cepa silvestre de *M. xanthus* y del mutante de delección $\Delta pspA$, de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección XIII.1 de Material y Métodos. En ellas, se aprecia que no existen diferencias significativas durante el crecimiento exponencial ni tampoco durante la fase estacionaria entre ambas estirpes (no mostrado). En ambos casos, el tiempo de generación es similar, en torno a 4 h, y la densidad celular máxima alcanzada por ambos cultivos es equivalente. Por tanto, la carencia del regulador PspA no parece afectar al crecimiento vegetativo de *M. xanthus*.

VII. 2. 2 Desarrollo

La relación de la proteína reguladora PspA con el control de los distintos eventos que se suceden durante el ciclo de desarrollo se ha llevado a cabo mediante el estudio del fenotipo exhibido por la estirpe mutante $\Delta pspA$ en el transcurso del desarrollo. Para ello, se ha analizado la influencia de la delección del gen *pspA* durante la agregación y fructificación así como durante la esporulación y la germinación desarrollada por esta estirpe carente de la proteína PspA.

i) Formación de cuerpos fructificantes

El análisis de la progresión del ciclo de desarrollo en el mutante de delección $\Delta pspA$ ha sido estudiado, al igual que en el caso del mutante para la quinasa, sobre dos medios diferentes, CF y TPM, de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección XIII.3 de Material y Métodos. Como se comentó previamente, la diferencia entre ambos reside en el aporte de nutrientes en cada uno de ellos, lo que determina que mientras en TPM se dispara el desarrollo con rapidez debido a la privación total de nutrientes, en CF se retrasa moderadamente debido al aprovechamiento de los escasos nutrientes disponibles.

Los cuerpos fructificantes originados en medio CF por la estirpe silvestre y el mutante de delección $\Delta pspA$ se muestran en la Figura 48. Como se observa en ella, el mutante para el regulador PspA presenta un severo defecto fenotípico para la formación de los cuerpos fructificantes durante el desarrollo, generando agrupaciones anómalas con un aspecto inmaduro, a diferencia de los cuerpos formados por silvestre. Además, el mutante de delección $\Delta pspA$ se encuentra muy retrasado para la progresión de los distintos eventos del desarrollo en relación al silvestre, puesto que tan sólo de forma tardía, unas 24-48 h después, origina estos cuerpos irregulares sobre este medio.

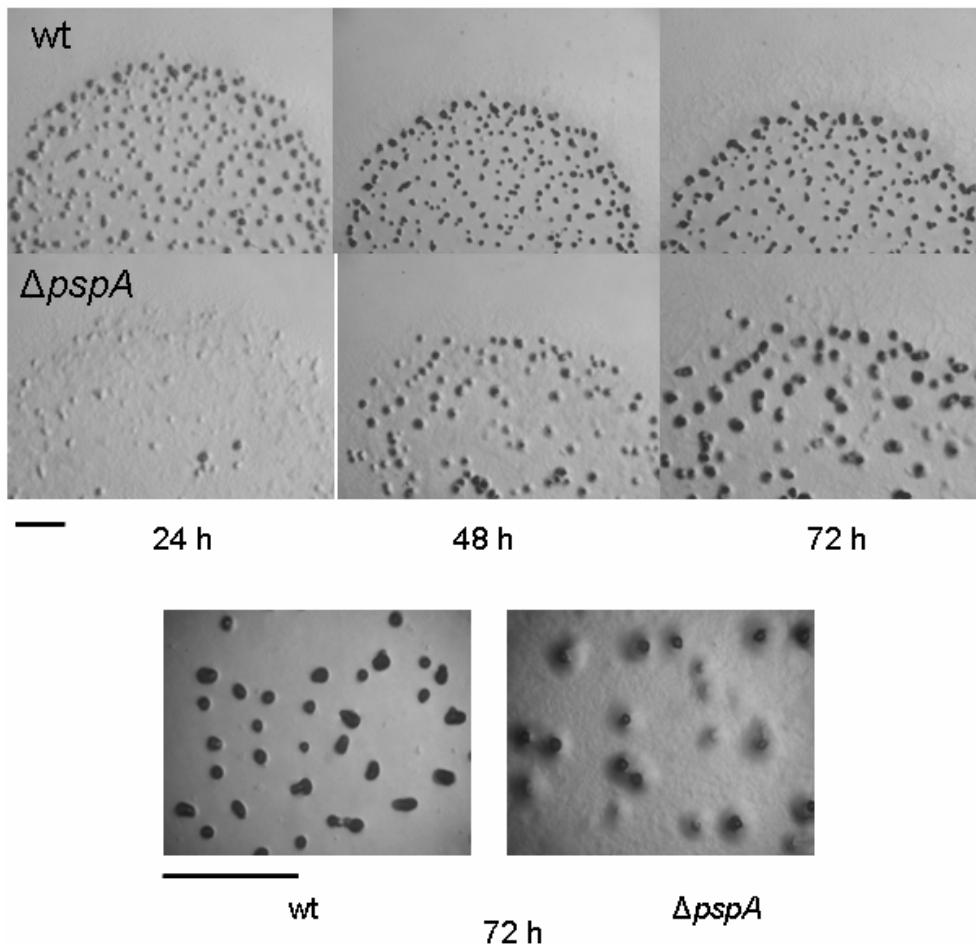


Figura 48. Cuerpos fructificantes de la cepa silvestre (wt) y del mutante de delección $\Delta pspA$ de *M. xanthus* en medio CF. La DO_{600} empleada para estos cultivos fue de 15, incubando las bacterias a 30°C durante los periodos de tiempo indicados. Las imágenes se tomaron a 18x de aumento, excepto las dos últimas que fueron tomadas a 50x. Barra: 1 mm.

En este sentido, como se puede ver en la Figura 48, tras 24 h de incubación el silvestre origina ya agregados definidos aunque todavía muy inmaduros y translucidos mientras el mutante $\Delta pspA$ permanece prácticamente liso. A medida que avanza el desarrollo, transcurridas 48 h se forman ya cuerpos maduros opacos y bien formados en el silvestre, a diferencia del mutante que en ese instante presenta tan sólo algunas agrupaciones celulares dispersas. Finalmente, estas formaciones producidas por el mutante progresan, como se aprecia tras 72 de incubación, dando lugar a cuerpos fructificantes que se diferencian con claridad respecto a los generados por el silvestre. Estos cuerpos presentan un aspecto anómalo con una zona central más opaca rodeada por una región periférica que se mantiene translúcida, totalmente diferente respecto al aspecto homogéneo de los cuerpos maduros y empaquetados producidos por el silvestre (ver Figura 48).

En el medio TPM, el mutante de delección $\Delta pspA$ se comporta de forma similar a la estirpe silvestre durante el ciclo de desarrollo tal como muestra la Figura 49, generando cuerpos fructificantes normales que maduran generando formaciones bien empaquetadas, definidas y opacas, al igual que ocurre en el silvestre. Además, no se aprecian diferencias en el transcurso de los distintos eventos del desarrollo, careciendo de retraso en este medio respecto a la bacteria silvestre. Este resultado indica que el fenotipo exhibido por la cepa $\Delta pspA$ durante el desarrollo depende del nivel de nutrientes en el medio.

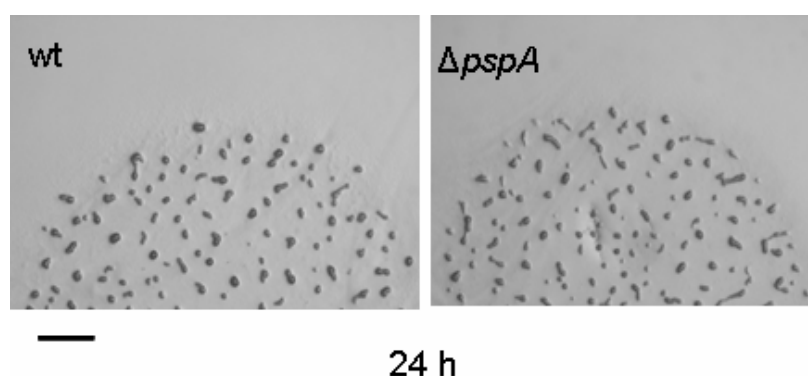


Figura 49. Cuerpos fructificantes de la cepa silvestre (wt) y del mutante de delección $\Delta pspA$ de *M. xanthus* en medio TPM. La DO_{600} empleada para estos cultivos fue de 15, incubando las bacterias a 30°C durante los periodos de tiempo indicados. Las imágenes se tomaron a 18x de aumento. Barra: 1 mm.

ii) Esporulación y germinación

El efecto de la delección del gen *pspA* sobre el proceso de esporulación en *M. xanthus* se realizó mediante el recuento de las mixósporas producidas por la cepa silvestre y el mutante $\Delta pspA$. La determinación del número de esporas generadas por cada estirpe se llevó a cabo tras sembrar estas bacterias en medio CF y TPM. El procedimiento seguido para el recuento de mixósporas se detalla en la sección XIII.4 de Material y Métodos.

El resultado obtenido, reflejado en la Figura 50 indica una ausencia de diferencias significativas en la producción de mixósporas al comparar el silvestre y el mutante $\Delta pspA$ a lo largo del tiempo en medio TPM. En cambio, sí aparecen diferencias considerables en el número de mixósporas generadas por ambas cepas sobre medio CF. Así, ambas bacterias comienzan a esporular a la vez, pero se aprecia que el número de esporas producidas por el silvestre crece con mucha más rapidez a lo largo del tiempo en comparación con $\Delta pspA$, debido al retraso experimentada por el mutante durante el desarrollo.

Así, en este recuento se observa que tras 48 h de incubación, la estirpe $\Delta pspA$ presenta una reducción en la formación de esporas en torno al 75% respecto al silvestre. Sin embargo, a medida que el mutante $\Delta pspA$ comienza a fructificar a partir de las 72h, se dispara la producción de esporas en esta bacteria, disminuyendo al 50% la diferencia respecto al número de esporas generadas por silvestre hasta que finalmente, tras 96 h, ambas bacterias alcanzan una producción de mixósporas muy similar.

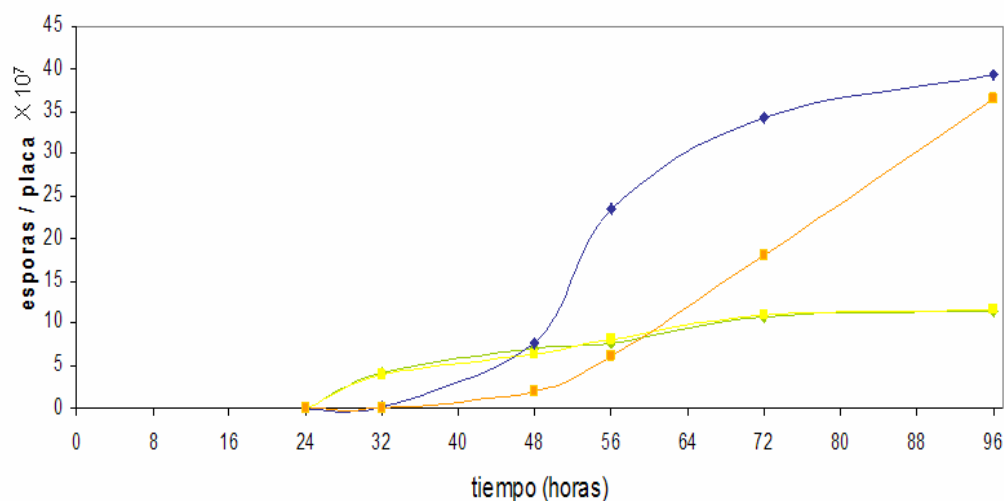


Figura 50. Recuento de esporas producidas por placa por la estirpe silvestre y el mutante $\Delta pspA$ en medio CF y TPM. Clave: silvestre en CF, azul; $\Delta pspA$ en CF, naranja; silvestre en TPM, verde; $\Delta pspA$ en TPM, amarillo.

A partir de las muestras de mixósporas recuperadas desde CF y TPM, se ha analizado la viabilidad de las esporas generadas por la cepa silvestre y el mutante $\Delta pspA$, siguiendo los pasos detallados en la sección XIII.5 de Material y Métodos. El recuento del número de colonias generadas por cada bacteria a partir de las diferentes preparaciones de mixósporas indica que no existen diferencias entre el silvestre y el mutante $\Delta pspA$ durante el proceso de germinación, con una tasa de eficiencia próxima al 30%.

VIII. Expresión de marcadores del desarrollo

La delección tanto del gen *pksA* como del gen *pspA* conduce a la alteración en la progresión del ciclo de desarrollo en *M. xanthus*, puesto que mientras el mutante para la quinasa PksA presenta un desarrollo prematuro, la ausencia del regulador PspA determina un retraso muy marcado a lo largo de este proceso. Por tanto, ambas proteínas controlan el momento en que ocurren los distintos eventos que conforman el ciclo de desarrollo con un efecto opuesto. Esta regulación ha de tener su reflejo a nivel genético en la modificación del patrón de expresión de los marcadores genéticos implicados en el control de este proceso.

Durante el transcurso del desarrollo, tiene lugar la activación programada de un conjunto de genes inducidos de forma específica en respuesta al intercambio de señales celulares. El patrón de expresión característico de cada evento que conforma el ciclo de desarrollo depende del nivel de expresión de cada uno de estos genes implicados en la regulación de este proceso. En consecuencia, se ha analizado en los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ la expresión en el tiempo de varios genes dependientes del ciclo de desarrollo, *fruA*, *mrpC* y *tps*, cuya expresión se incrementa de forma drástica durante esta etapa para conseguir que la mixobacteria complete el ciclo de desarrollo.

La proteína FruA es un regulador de respuesta de tipo FixJ clave para el control del ciclo de desarrollo, al mediar la respuesta a los niveles crecientes de señal C, necesarios para que progrese el desarrollo (Ogawa *et al.*, 1996). Este regulador controla la movilidad, promoviendo inicialmente la agregación y fructificación, para finalmente, tras activarse totalmente por fosforilación, estimular la diferenciación durante el proceso de esporulación. En relación con esta proteína, se encuentran MrpC, un activador transcripcional inhibido por una cascada de ePKs durante el crecimiento vegetativo, necesario para inducir la expresión de *fruA* durante el desarrollo (Sun y Shi, 2001a; Sun y Shi, 2001b, Nariya e Inouye, 2005b) y la proteína S, el componente principal de la cubierta de la espora, codificado por el gen *tps* cuya expresión depende a su vez de la presencia de FruA (Inouye *et al.*, 1979; Ueki e Inouye, 2006). En la sección I.6 de la Introducción se ofrece una revisión detallada de estos marcadores del desarrollo.

El estudio del perfil de expresión de los marcadores genéticos *fruA*, *mrpC* y *tps* durante el ciclo de desarrollo de *M. xanthus* se ha realizado mediante la obtención de tres fusiones traduccionales de cada uno de estos genes con el gen *lacZ* de *E. coli*. Tras incorporar cada una de estas construcciones en las distintas cepas de *M. xanthus*, tanto en la estirpe silvestre como en ambos mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$, se han obtenido estirpes portadoras de distintas fusiones *lacZ*, en las cuales la actividad β -galactosidasa desarrollada por cada una de ellas refleja el nivel de expresión de cada marcador analizado en el tiempo. De esta forma, ha sido posible comparar el patrón de expresión de cada uno de estos marcadores genéticos del desarrollo en ambos mutantes en relación al silvestre, para así tratar de explicar el fenotipo exhibido por estas estirpes durante el desarrollo.

VIII. I. Construcción de fusiones *lacZ* con los marcadores del desarrollo *fruA*, *mrpC* y *tps*

La fusión *lacZ* con los genes *fruA*, *mrpC* y *tps* se ha llevado a cabo mediante la amplificación por PCR de la región situada justo por encima de cada uno de estos genes, obteniendo fragmentos de ADN de 0.8 kb, generados a partir del cromosoma molde de *M. xanthus* y empleando para ello los cebadores apropiados (ver C.IV.2). En cada caso, los fragmentos obtenidos contenían a su vez la región que codifica los primeros codones de cada uno de estos genes. Tras digerir los productos de PCR con las enzimas adecuadas, se insertó cada uno de estos fragmentos en el vector pKY481, igualmente digerido con las mismas enzimas, dando lugar a diferentes fusiones en fase de los correspondientes marcadores del desarrollo con el gen *lacZ* a través del sitio *Bam*HI del vector.

Los tres plásmidos portadores de cada una de estas fusiones *lacZ* se introdujeron en la estirpe silvestre de *M. xanthus* y en los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$, seleccionando en cada caso las colonias resistentes a kanamicina generadas por inserción de cada plásmido en el cromosoma. Las cepas portadoras de la fusión *lacZ* con cada uno de estos marcadores, obtenidas a partir del silvestre y de ambos mutantes, se analizaron mediante Southern blot. Para ello, tanto el cromosoma del silvestre (control) como el de las colonias portadoras de la fusión *lacZ* con cada gen introducida en las distintas estirpes se digirió con la enzima indicada y se hibridó en cada caso con la sonda, el producto de PCR amplificado a partir de la región situada justo por encima de cada marcador.

A continuación, en la Figura 51 se muestra el perfil generado por las distintas cepas analizadas portadoras en cada caso de la fusión *lacZ* con los genes *fruA*, *mrpC* y *tps* introducidos en el silvestre y en ambos mutantes.

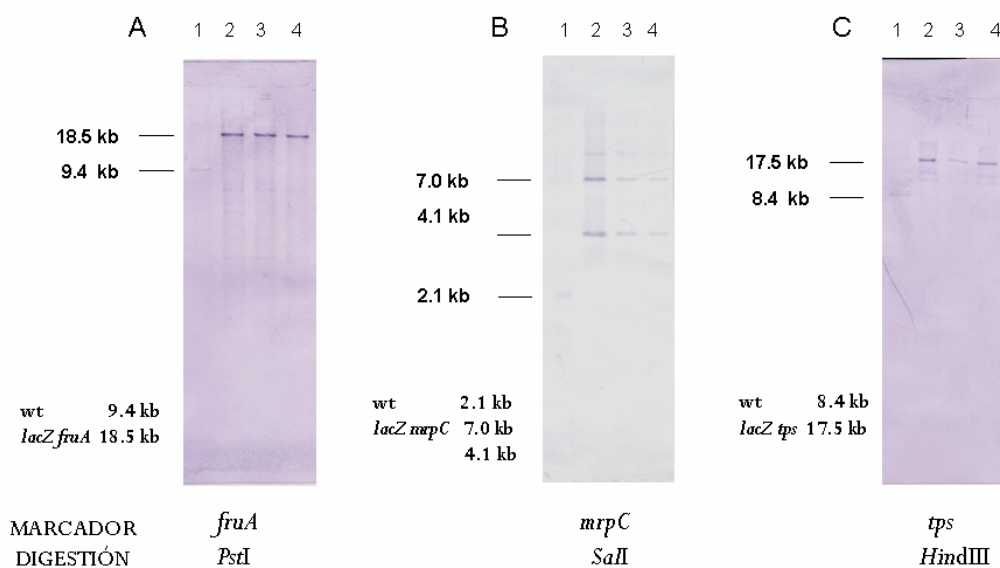


Figura 51. Southern blot de las fusiones *lacZ* con los genes *fruA* (A), *mrpC* (B) y *tps* (C), introducidas en el silvestre (wt) y los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$. Los cromosomas del silvestre (control, calle 1) y de cada fusión *lacZ* en el silvestre (calle 2), en el mutante $\Delta pksA$ (calle 3) y en el mutante $\Delta pspA$ (calle 4), se digirieron con la enzima apropiada y se hibridaron con el segmento aguas arriba de cada marcador.

VIII. 2. Actividad β -galactosidasa de las fusiones *lacZ* con los marcadores *fruA*, *mrpC* y *tps* en el silvestre y los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$

La determinación de la actividad β -galactosidasa de las cepas portadoras de las fusiones *lacZ* con los genes *fruA*, *mrpC* y *tps*, incorporados tanto al silvestre como a los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$, permite comparar el perfil de expresión de cada una de estos genes del desarrollo en estas estirpes. La expresión de estos marcadores se ha cuantificado en todos los casos tras sembrar las distintas cepas en medio CF inductor del desarrollo.

VIII. 2. 1. Marcador *fruA*

El gen *fruA* no se expresa en el silvestre durante el crecimiento vegetativo, mientras que durante el desarrollo, tras 4-6 h de incubación, su expresión se induce alcanzando un máximo en torno a las 24 h. En el mutante para la quinasa PksA, el gen *fruA* se expresa a niveles más elevados respecto al silvestre, puesto que aunque el marcador comienza a expresarse al mismo tiempo en ambas bacterias, a partir de las 8 h se induce con mucha más fuerza en $\Delta pksA$, alcanzando niveles muy superiores a los registrados en el silvestre tras 24 h de incubación.

En cambio, en el mutante del regulador PspA, el gen *fruA* mantiene niveles de expresión considerablemente más bajos que en el silvestre. De hecho, aunque hasta las 10 h de incubación *fruA* presenta un perfil similar en ambas bacterias, a partir de aquí tan sólo se incrementa débilmente su expresión en el mutante $\Delta pspA$ hasta estabilizarse transcurridas tan sólo 20 h del desarrollo, a diferencia de lo que ocurre en el silvestre. En la Figura 52 se muestra la actividad β -galactosidasa específica en CF de la fusión *fruA-lacZ* en el silvestre y los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$.

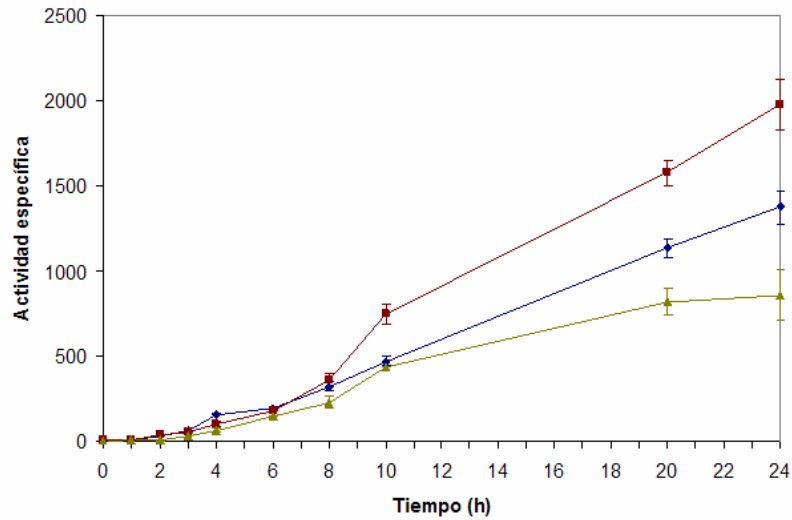


Figura 52. Actividad β-galactosidasa específica (nmol ONP/mg·min) de la fusión *lacZ* con el gen *fruA* en el silvestre (azul), en el mutante $\Delta pksA$ (rojo oscuro) y en el mutante $\Delta pspA$ (verde) durante el desarrollo en medio CF.

VIII. 2. 2. Marcador *mrpC*

El gen *mrpC* se expresa en el silvestre a un nivel considerable durante el crecimiento vegetativo, pero es en el desarrollo cuando se induce de forma drástica ya desde su inicio, aumentando su nivel de expresión a medida que progresa el desarrollo. El perfil de expresión de este marcador en el silvestre y los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ se encuentra en concordancia con el resultado obtenido para *fruA*. Así, el gen *mrpC* se induce a niveles más elevados en el mutante $\Delta pksA$ en comparación con su expresión en el silvestre, mientras que presenta niveles de expresión algo inferiores en el mutante $\Delta pspA$. A diferencia de *fruA*, las diferencias en el patrón de expresión del gen *mrpC* en las diferentes estirpes comienzan a producirse justo tras el agotamiento de nutrientes y se mantienen al menos durante 24 h a lo largo del desarrollo. En la Figura 53 aparece la actividad β-galactosidasa específica en CF de la fusión *mrpC-lacZ* incorporada tanto al silvestre como a los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$.

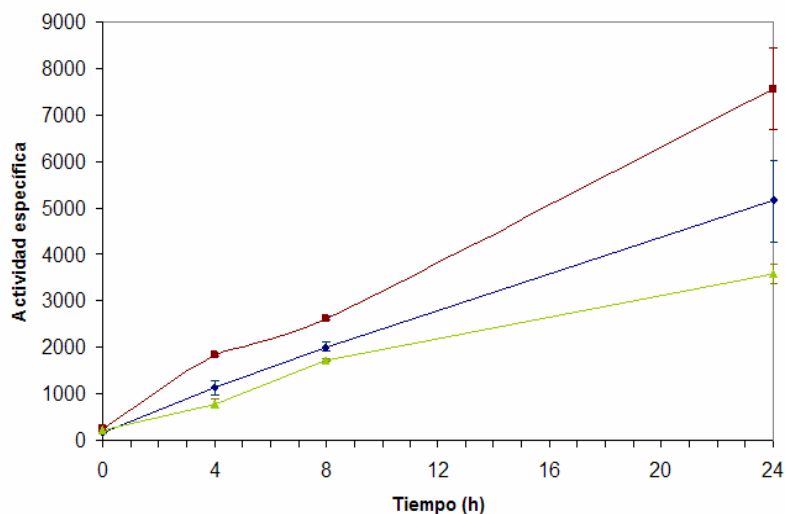


Figura 53. Actividad β-galactosidasa específica (nmol ONP/mg·min) de la fusión *lacZ* con el gen *mrpC* en el silvestre (azul), en el mutante $\Delta pksA$ (rojo oscuro) y en el mutante $\Delta pspA$ (verde) durante el desarrollo en medio CF.

VIII. 2. 3. Marcador *tps*

El gen *tps* sólo se expresa en el silvestre a partir de las 6-8 h del desarrollo, incrementando considerablemente su expresión hasta llegar a un máximo en torno a las 48 h. Al comparar este perfil con el registrado en ambos mutantes, se observa que durante las primeras 24 h del desarrollo, el gen *tps* presenta niveles de expresión más altos en el mutante $\Delta pksA$ y considerablemente más bajos en el mutante $\Delta pspA$, en relación a la expresión de este gen en el silvestre. Sin embargo, a partir de las 24 h, en ambos mutantes la expresión de *tps* se mantiene constante, mientras que continúa su inducción en el silvestre, por lo que transcurridas 48 h, la expresión de este gen alcanza niveles muy superiores a los registrados en ambos mutantes. En la Figura 54 se exhibe la actividad β -galactosidasa específica de la fusión *tps-lacZ* introducida en el silvestre y en los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pksA$.

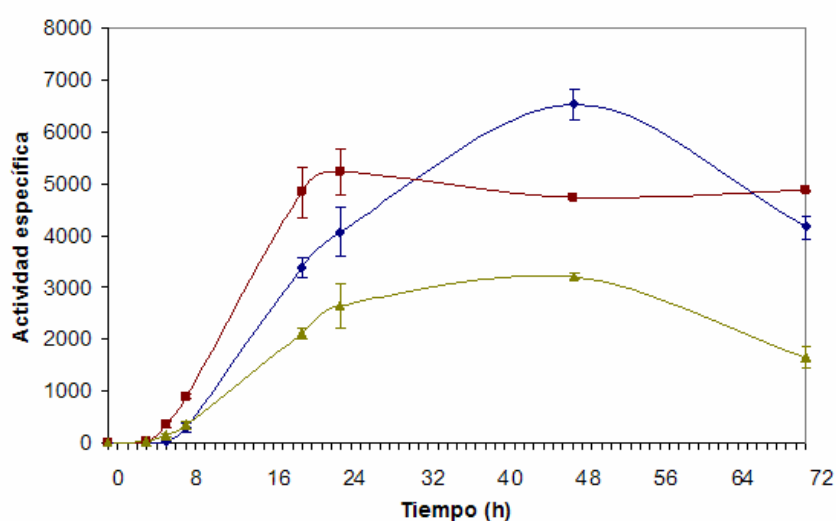


Figura 54. Actividad β -galactosidasa específica (nmol ONP/mg-min) de la fusión *lacZ* con el gen *tps* en el silvestre (azul), en el mutante $\Delta pksA$ (rojo oscuro) y en el mutante $\Delta pspA$ (verde) durante el desarrollo en medio CF.

IX. Efecto sobre la movilidad de las deleciones $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$

Las células de *M. xanthus* se desplazan mediante deslizamiento sobre un sustrato sólido, empleando para ello los sistemas de movilidad social y aventurera. En *M. xanthus*, entre las proteínas que controlan la movilidad participan ePKs similares a la PksA, como la MasK. De igual forma, la proteína PspA interviene en el control del movimiento durante la adaptación de *E. coli* a diferentes condiciones nutricionales. Por ello, se ha analizado la capacidad de deslizamiento desarrollada por los mutantes de deleción $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ sobre un sustrato sólido para conocer si estas proteínas participan en el control de la movilidad.

El estudio de la movilidad se ha llevado a cabo mediante la siembras de las distintas estirpes sobre placas de medio sólido rico en nutrientes CTT o CYE, de acuerdo con los pasos descritos en la sección XIII.2 de Material y Métodos. Se han empleado dos tipos de sustratos, uno más consistente, con un porcentaje normal de agar al 1.5% que favorece la movilidad aventurera, junto con otro mucho más blando que tan sólo posee 0.4% de agar, adecuado para la movilidad social. Una vez depositadas las bacterias sobre la superficie del sustrato en forma de gotas, las placas se incubaron a 30°C y se visualizaron de forma periódica para comprobar el movimiento de cada estirpe desde el borde de la gota.

En la Figura 55 se muestra el aspecto adquirido por el borde de las gotas de las cepas silvestre DZF1, $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ en medios CTT y CYE con 1.5% y 0.4 % de agar tras 48 h de incubación. Como se observa en la imagen, no se aprecian diferencias significativas para la movilidad aventurera en los mutantes de delección respecto al silvestre, ya que el deslizamiento desarrollado por todos ellos es muy similar sobre el medio con 1.5% de agar. Sin embargo, con 0.4% de agar aparecen diferencias considerables en relación a la movilidad social entre el silvestre y las cepas $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$. Así, el mutante para la quinasa PksA se desliza socialmente de una forma mucho más activa que el silvestre, generando grupos de células de tamaño considerable que se expanden con celeridad desde el borde de la gota (ver flechas en la Figura 55). En cambio, el mutante que carece del regulador PspA apenas se mueve socialmente, puesto que el borde de la gota permanece con un contorno muy definido, a diferencia del silvestre.

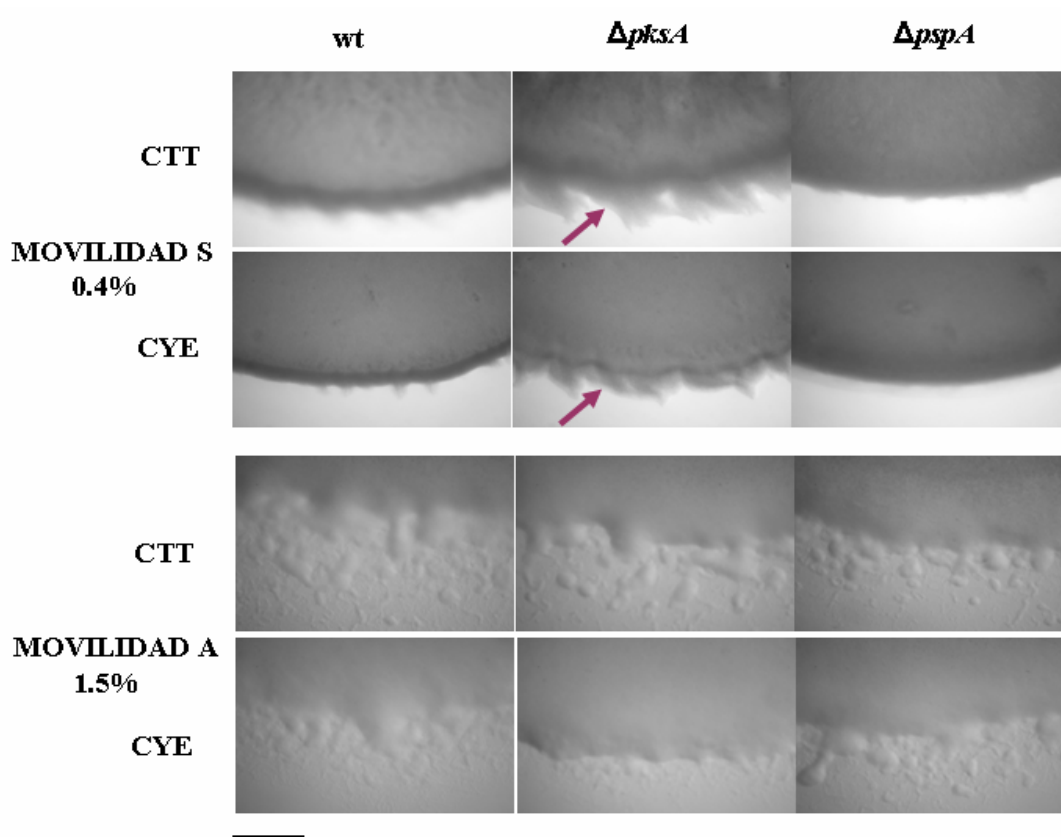


Figura 55. Movilidad de la estirpe silvestre DZF1 (wt), $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ de *M. xanthus* sobre placas de medio sólido CTT y CYE para el análisis de la movilidad. Se han empleado diferentes porcentajes de agar: 0.4 % de agar para la movilidad S social (arriba) y con 1.5% de agar para la movilidad A aventurera (abajo). Las imágenes del borde de la gota se tomaron a 50x tras 48h de incubación a 30°C. Barra: 1 mm.

La cepa DZF1, empleada como bacteria silvestre de partida para la obtención de los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$, es parcialmente defectiva para la movilidad social, puesto que porta una mutación en el gen *pilQ* que reduce su capacidad de deslizamiento. Este hecho facilita su manipulación al impedir su agregación en medio líquido, pero a la vez dificulta el análisis de la movilidad social ya que disminuye sensiblemente la velocidad de deslizamiento, reduciendo las posibles diferencias producidas por la delección tanto del gen *pksA* como del gen *pspA*.

Por ello, el efecto de la carencia tanto de la quinasa PksA como del regulador PspA sobre la movilidad social se ha comprobado mediante la obtención de dos estirpes mutantes de delección para los genes que codifican cada una de estas proteínas a partir de la cepa silvestre DK1622 de *M. xanthus*, una estirpe que posee un sistema de movilidad intacto y que por tanto, se desliza con mucha más rapidez sobre el sustrato. El procedimiento seguido para la obtención de estos mutantes a partir de la cepa DK1622 ha sido similar al descrito previamente para la delección de cada uno de estos genes a partir de la estirpe DZF1. En cada caso, las colonias obtenidas se analizaron mediante Southern blot para identificar a aquellas que perdieron al gen correspondiente.

En el caso del mutante para la quinasa PksA, los fragmentos cromosómicos obtenidos tras la digestión con *Xho*I de las colonias aisladas y del silvestre DK1622 (control), se hibridaron con el brazo 5' del gen *pksA*. La sonda reconoce un segmento de 7.4 kb en el silvestre, mientras que la delección del gen *pksA* conduce a que la sonda se una a un fragmento de 4.9 kb, debido a la pérdida completa del gen. En la Figura 56 se aprecia cómo las colonias 2 y 4 muestran un perfil que se ajusta al del mutante de delección para el gen *pksA*, y por tanto, se ha denominado a esta cepa DK Δ *pksA*.

Para identificar al mutante carente del regulador PspA, las preparaciones cromosómicas digeridas con *Bam*HI de las colonias a analizar y del silvestre DK1622 (control), se hibridaron con el brazo 3' del gen *pspA*. En este caso, la sonda pasa de reconocer un fragmento de 15.3 kb en el silvestre a 6.4 kb tras la pérdida del gen *pspA*, al insertar una diana *Bam*HI adicional. En la Figura 56, las colonias 2 y 7 presentan un perfil acorde con el esperado para el mutante de delección del gen *pspA*, designando a la cepa resultante DK Δ *pspA*.

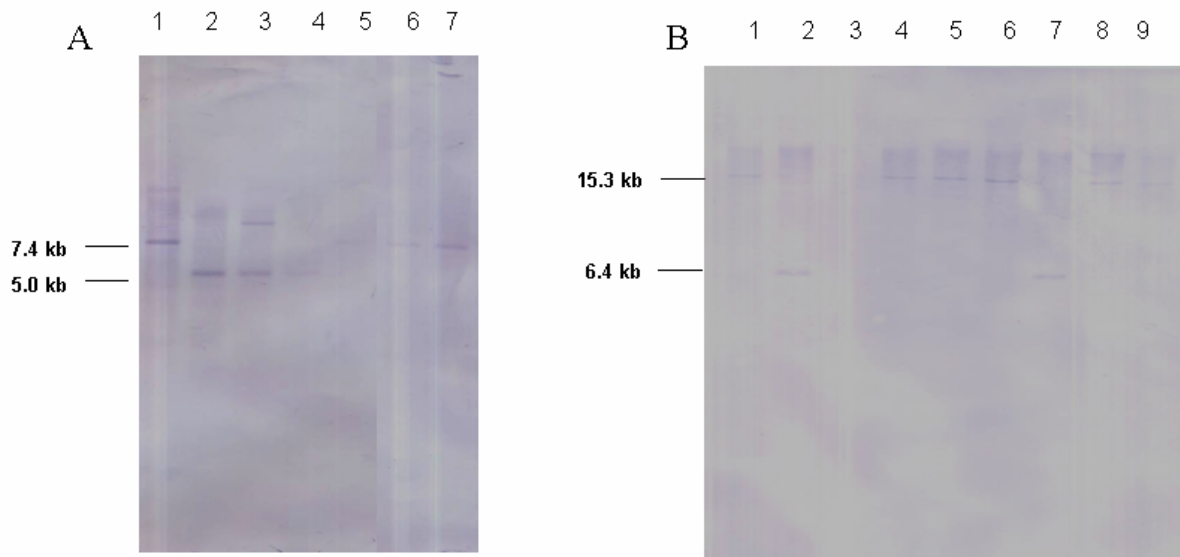


Figura 56. Southern blot para la identificación del mutante de delección Δ *pksA* (A) y Δ *pspA* (B) construidos a partir de la cepa DK1622 de *M. xanthus*. A) cromosoma digerido con *Xho*I de la cepa DK1622 (calle 1 y 7) y de las colonias analizadas para la detección del mutante DK Δ *pksA* (calle 2-6). B) cromosoma digerido con *Bam*HI de la cepa DK1622 (calle 1 y 9) y de las colonias candidatas analizadas para la obtención del mutante DK Δ *pspA* (calle 2-8).

Finalmente, una vez obtenidos los mutantes de delección $DK\Delta pksA$ y $DK\Delta pspA$ se procedió a valorar la movilidad de estas estirpes sobre medio CYE, tomando como referencia la cepa silvestre DK1622. En este medio rico en nutrientes, estas bacterias se deslizan extendiéndose progresivamente sobre la superficie de la placa de cultivo. Por tanto, se cuantificó la movilidad de estas bacterias mediante la determinación del diámetro alcanzado por cada una de ellas a lo largo del tiempo a partir de una gota de partida depositada en el centro de la placa, siguiendo el procedimiento detallado anteriormente. De nuevo, se emplearon dos tipos de sustratos, con 1.5% de agar para el análisis de la movilidad aventurera y con 0.4% para movilidad social.

En la Figura 57 se muestran las gráficas que expresan las dimensiones alcanzadas mediante deslizamiento del silvestre DK1622 y los mutantes $DK\Delta pksA$ y $DK\Delta pspA$ a lo largo del tiempo. En ella, se observa que mientras todas ellas se mueven igual de forma aventurera (agar 1.5%), pero difieren de forma considerable en la capacidad para deslizarse socialmente (agar 0.4%). En este sentido, el mutante $DK\Delta pspA$ presenta una considerable reducción en la movilidad social respecto a DK1622, mientras que por el contrario el mutante $DK\Delta pksA$ se desliza más rápido que este último. Por tanto, tanto la quinasa PksA como el regulador PspA se encuentran implicados en el control de la movilidad social en *M. xanthus*.

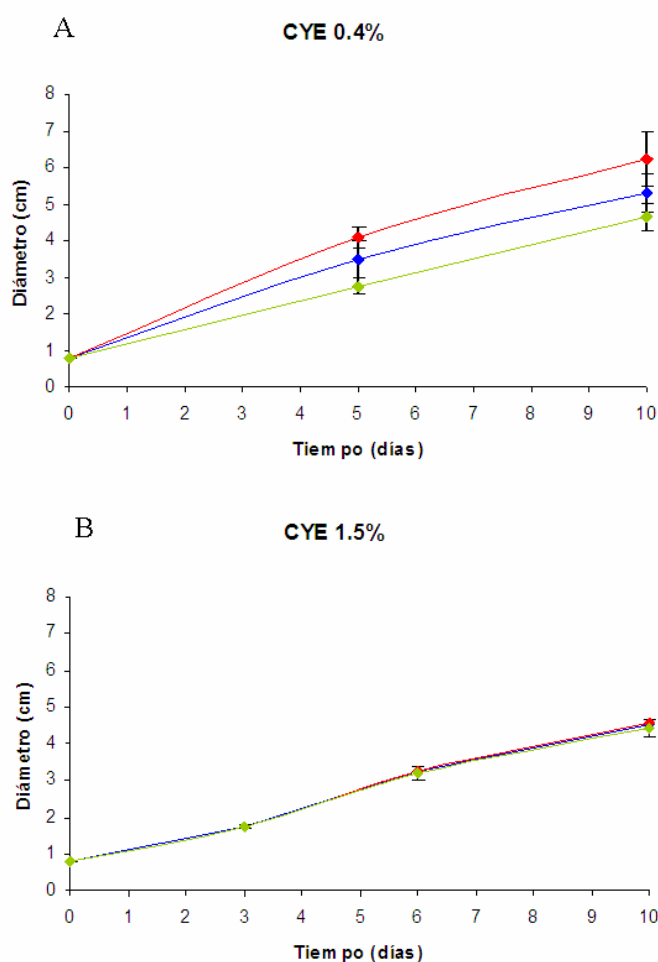


Figura 57. Movilidad de la cepa silvestre DK1622 (azul) y los mutantes de delección $DK\Delta pksA$ (rojo) y $DK\Delta pspA$ (verde) de *M. xanthus* sobre medio CYE con 0.4% de agar para el análisis de la movilidad social (A) y con 1.5% de agar para la movilidad aventurera (B). Las placas se incubaron durante 10 días a 30°C.

X. Efecto de agentes de estrés sobre el crecimiento de los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$

Las ePKs actúan como reguladores clave durante la señalización celular, controlando diferentes procesos biológicos en respuesta a una amplia diversidad de agentes de estrés. Se han caracterizado un amplio número de quinasas esenciales para la adaptación ante diferentes tipos de estrés, como el estrés oxidativo o el choque osmótico. De igual forma, la proteína PspA se encuentra implicada en la respuesta frente a condiciones de estrés en la bacteria *E. coli*. En este sentido, se ha procedido a estudiar el efecto de un conjunto de agentes químicos sobre el crecimiento de la bacteria *M. xanthus*, con la finalidad de comparar la sensibilidad de la estirpe silvestre de *M. xanthus* respecto a los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ ante diferentes condiciones de estrés celular.

Los factores de estrés analizados interfieren con procesos celulares o componentes celulares específicos. Por ello, la deficiencia durante el crecimiento de los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ bajo un agente de estrés concreto permite asignar a estas proteínas como componentes de la ruta de señalización necesaria para mediar la respuesta celular ante un factor de estrés dado. Este resultado ha de correlacionarse con una hipersensibilidad de estos mutantes de delección al agente respecto al silvestre.

El crecimiento de las diferentes cepas de *M. xanthus*, el silvestre y los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ en presencia de agentes químicos de estrés se ha valorado mediante la realización curvas de crecimiento de estas estirpes en medio líquido CTT con diferentes concentraciones de cada una de las sustancias químicas ensayadas, siguiendo el procedimiento descrito en la sección XIII.1 de Material y Métodos. El rango óptimo empleado para cada sustancia se ha determinado de forma experimental probando diferentes concentraciones hasta conseguir que la estirpe silvestre, empleada como control, inhibiera su crecimiento a partir de la máxima concentración empleada.

Los compuestos químicos analizados han sido seleccionados en base al tipo de estrés celular generado en la bacteria. Entre ellos, aparecen sustancias que producen estrés energético, oxidativo u osmótico, junto con compuestos que dañan a componentes celulares específicos. El efecto de cada sustancia sobre el crecimiento de las distintas estirpes se ha determinado gráficamente mediante la representación de la densidad óptica alcanzada por cada bacteria en escala logarítmica respecto al rango de concentración empleado para cada agente.

X. 1. Crecimiento frente a compuestos que alteran componentes celulares bacterianos

Se han ensayado cuatro agentes químicos que generan daños celulares sobre la bacteria: etanol, SDS, EGTA y bleomicina. El etanol es un compuesto con actividad bactericida que actúa principalmente sobre la membrana alterando su fluidez; el detergente SDS desorganiza las membranas lipídicas a la vez que induce la desnaturalización de las proteínas celulares; el EGTA es un quelante de calcio que permeabiliza las membranas biológicas, bloquea la división celular y genera alteraciones en la morfología celular; y finalmente, el antibiótico bleomicina produce cortes en el ADN que dañan al material genético bacteriano. Tras la realización de las curvas de crecimiento en presencia de estas sustancias, no se apreciaron diferencias significativas en el crecimiento de las estirpes silvestre, $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ de *M. xanthus* (no mostrado).

X. 2. Estrés osmótico

Se ha analizado el efecto de dos agentes productores de una elevada osmolaridad en el medio, la sal cloruro potásico KCl y el azúcar sacarosa. La presencia de estos componentes incrementa la presión osmótica ejercida sobre la bacteria, generando un estrés celular por la pérdida de turgor en el citoplasma. Para una misma concentración, el poder osmótico desarrollado por el cloruro potásico es más elevado que el ejercido por la sacarosa. Por ello, como muestra la Figura 58, mientras que la sacarosa afecta de forma similar al crecimiento de todas las estirpes, sin embargo, con el KCl se aprecia que tanto la bacteria $\Delta pksA$ como sobre todo el mutante $\Delta pspA$ reducen de forma moderada su crecimiento en presencia de esta sal.

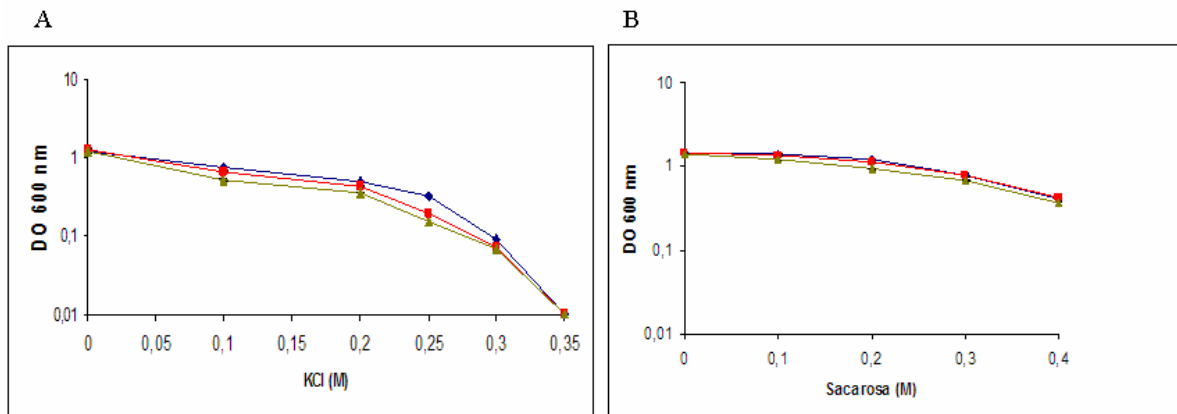


Figura 58. Curvas de crecimiento de la cepa silvestre (azul), $\Delta pksA$ (rojo) y $\Delta pspA$ (verde) de *M. xanthus* en presencia de KCl (izquierda) y sacarosa (derecha). Los cultivos se incubaron durante 24h a 30°C con 300 rpm de agitación.

X. 3. Estrés oxidativo

X. 3. 1. Crecimiento en presencia de agentes productores de estrés oxidativo

La presencia de peróxido de hidrógeno H_2O_2 induce la aparición de estrés oxidativo en la bacteria, debido a la formación de especies reactivas del oxígeno que producen múltiples lesiones oxidativas tras contactar con los diferentes componentes celulares. En este sentido, el estrés oxidativo genera daños en el ADN, bloqueando su replicación y favoreciendo la producción de mutaciones en el material genético, y además, produce la inactivación de proteínas por oxidación y a la degradación de lípidos tras su peroxidación.

Se ha comprobado la sensibilidad de la estirpe silvestre de *M. xanthus* y los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ ante la presencia de peróxido de hidrógeno en el medio, para analizar el efecto de diferentes concentraciones de agua oxigenada sobre el crecimiento de estas estirpes. En la Figura 59 se aprecia el crecimiento de estas bacterias en presencia de este agente oxidante. Ambos mutantes de delección son mucho más sensibles al estrés oxidativo inducido por el agua oxigenada, puesto que su crecimiento se reduce de forma drástica en comparación con el silvestre. El mutante $\Delta pksA$ es el más sensible ya que su crecimiento se ve afectado considerablemente con sólo 0.025 mM de H_2O_2 , mientras que el mutante $\Delta pspA$ se inhibe con 0.05 mM; en cambio, el silvestre crece incluso con 0.1 mM de H_2O_2 en el medio. Por tanto, tanto la quinasa PksA como el regulador PspA son necesarios para la respuesta frente al estrés oxidativo, contribuyendo a la tolerancia de *M. xanthus* frente a agentes oxidativos.

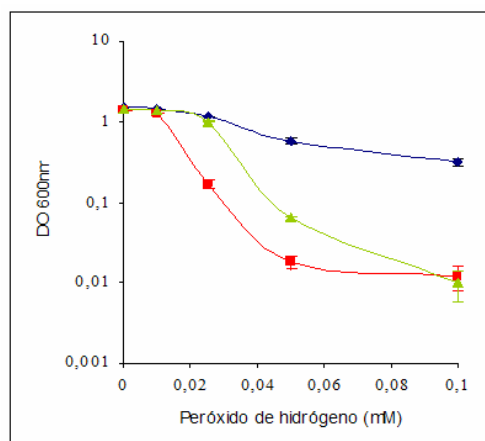


Figura 59. Curva de crecimiento de la cepa silvestre (azul), $\Delta pksA$ (rojo) y $\Delta pspA$ (verde) de *M. xanthus* en presencia de peróxido de hidrógeno. Los cultivos se incubaron con peróxido de hidrógeno (0-0.1 mM) durante 24h a 30°C con 300 rpm de agitación.

Una vez comprobada la elevada sensibilidad de los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ frente al estrés oxidativo, se ha analizado el efecto de una serie de compuestos químicos empleados generalmente para inducir este tipo de estrés celular, como el tert-butilo hidroperóxido, la nitrofurantoina, el sulfato de cobre, el paraquat, el nitrito sódico y la menadiona. Estos agentes promueven la formación de especies reactivas del oxígeno en la célula, como el peróxido de hidrógeno o el superóxido, siguiendo diferentes mecanismos en función del compuesto. En la Figura 60 se muestra el crecimiento de la estirpe silvestre de la bacteria *M. xanthus* y los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ en presencia de estos inductores de estrés oxidativo.

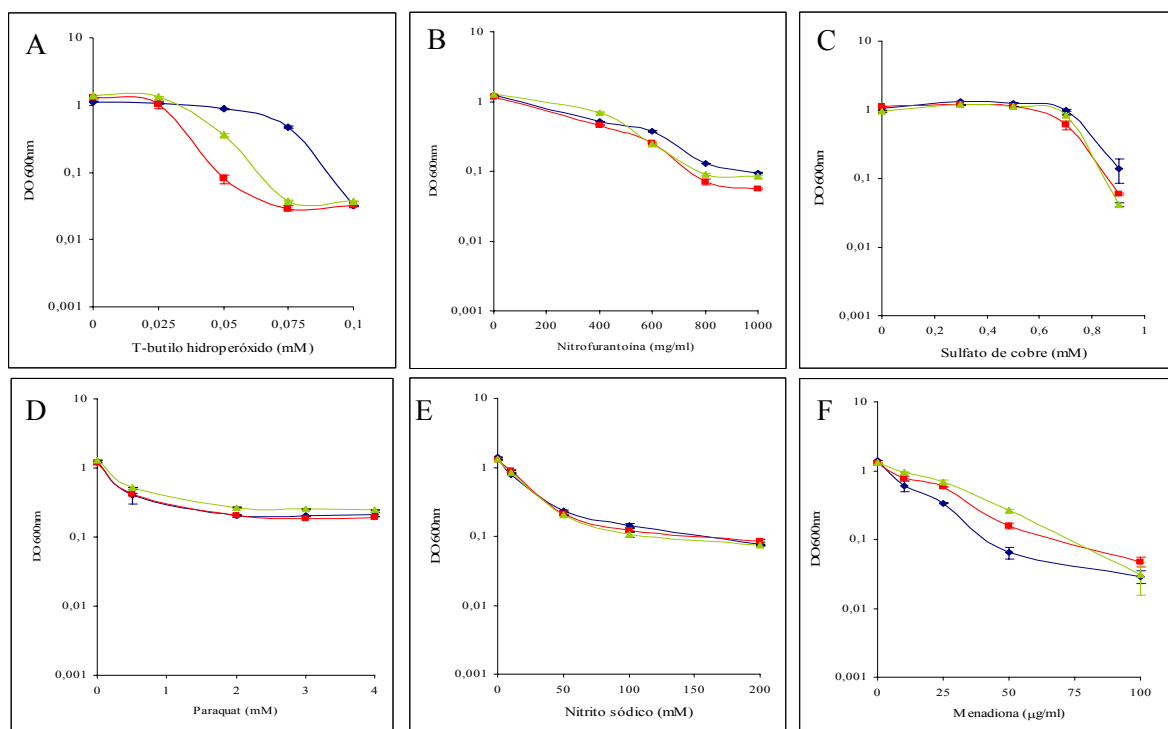


Figura 60. Curvas de crecimiento de las cepas silvestre (azul), $\Delta pksA$ (rojo) y $\Delta pspA$ (verde) de *M. xanthus* en presencia de T-butilo hidroperóxido (A), nitrofurantoina (B), sulfato de cobre (C), paraquat (D), nitrito sódico (E) y menadiona (F). Los cultivos se incubaron en presencia con cada agente durante 24h a 30°C a 300 rpm.

Al analizar su efecto sobre el crecimiento y comparar estos resultados con los obtenidos frente al agua oxigenada, se comprueba que el tert-butilo hidroperóxido reproduce el patrón de sensibilidad de estas estirpes frente al peróxido de hidrógeno (ver Figuras 59 y 60). Así, ambos mutantes son considerablemente más sensibles a este compuesto respecto al silvestre, de manera que la bacteria $\Delta pksA$ se inhibe con 0.05 mM de t-butilo hidroperóxido mientras que $\Delta pspA$ no crece con 0.075 mM, a diferencia del silvestre. De igual forma, también estas estirpes son ligeramente más sensibles para la nitrofurantoina y el sulfato de cobre, puesto que su crecimiento se reduce respecto al del silvestre para concentraciones elevadas de ambos agentes químicos.

Sin embargo, un hecho notable es la ausencia de diferencias significativas para el crecimiento de todas estas estirpes en presencia de paraquat o nitrito sódico, e incluso para la menadiona el crecimiento de los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ es ligeramente superior al del silvestre para las concentraciones ensayadas con esta vitamina. Este hecho se explica por el diferente mecanismo de acción de cada uno de estos agentes químicos, lo que a su vez ha de condicionar su eficacia para desencadenar estrés oxidativo en *M. xanthus*.

X. 3. 2. Efecto del estrés oxidativo sobre la expresión del operón *pksA*

El requerimiento de la quinasa PksA y el regulador PspA para la resistencia de la bacteria *M. xanthus* al estrés oxidativo plantea la posible inducción de la expresión de ambas proteínas en respuesta a agentes oxidantes. Por tanto, se ha procedido a analizar la actividad β -galactosidasa de la estirpe portadora de la fusión *lacZ* con el gen *pksA* de *M. xanthus* en un medio con concentraciones de H_2O_2 equivalentes a las empleadas durante la curva de crecimiento. Tras cuantificar la actividad, se ha podido concluir que la expresión del gen *pksA* no se modifica por la presencia de este agente oxidante (no mostrado), por lo que la resistencia al estrés oxidativo mediada por la quinasa PksA y el regulador PspA no requiere de la inducción de los genes que codifican ambas proteínas.

X. 4. Estrés nutricional

X. 4. 1. Crecimiento ante agentes que inducen un estrés nutricional

La carencia de nutrientes en el medio genera un estado de baja carga energética celular que induce una respuesta adaptativa en la bacteria para aprovechar al máximo los recursos disponibles. Si este agotamiento de los nutrientes persiste, *M. xanthus* detiene su crecimiento ante este estrés nutricional, iniciando el ciclo de desarrollo. Este choque energético puede ser inducido igualmente mediante el empleo de diversos compuestos químicos que reducen el contenido energético celular.

Entre este grupo de agentes, se encuentran los inhibidores de la fosforilación oxidativa, que bloquean la cadena de transporte de electrones impidiendo la formación del gradiente quimiosmótico necesario para la síntesis de ATP. Entre ellos se ha analizado el efecto del cianuro, un inhibidor del complejo citocromo oxidasa de la cadena de transporte electrónico. El crecimiento de la cepa silvestre, $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ de *M. xanthus* en presencia de cianuro se exhibe en la Figura 61. Como se puede apreciar en ella, este compuesto inhibe con rapidez a todas estas bacterias, bloqueando a bajas concentraciones el crecimiento de estas estirpes. Sin embargo, la bacteria carente de la quinasa PksA parece ser moderadamente más sensible al cianuro respecto al silvestre de *M. xanthus*.

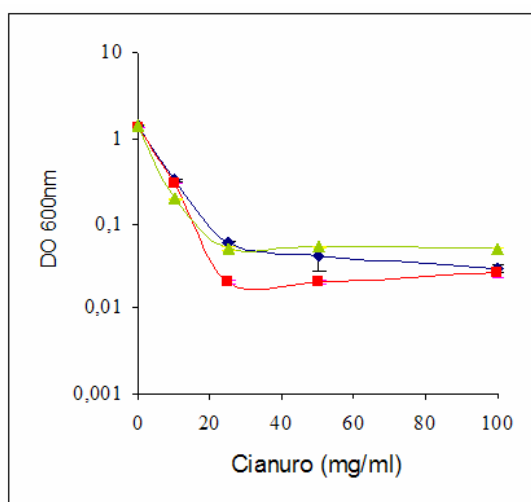


Figura 61. Curva de crecimiento de la cepa silvestre (azul), $\Delta pksA$ (rojo) y $\Delta pspA$ (verde) de *M. xanthus* en presencia de cianuro. Los cultivos se incubaron con cianuro (0-100 mg/ml) durante 24h a 30°C con 300 rpm de agitación.

Por otro lado, otro grupo de compuestos actúan como desacopladores, disipando el gradiente quimiosmótico de la membrana. En este caso, la pérdida del potencial protón motriz no se encuentra acoplada a la síntesis de ATP por el complejo ATPasa, generando una reducción drástica en el nivel energético celular. Dentro de este grupo, se ha analizado el efecto del desacoplador CCCP (carbonil cianida m-cloro fenil hidrazona), un compuesto que destruye el potencial de membrana tras introducirse de forma repetida en forma protonada en el citoplasma, en donde libera los protones captados en el periplasma. La sensibilidad de la estirpe silvestre de *M. xanthus* y los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ frente al CCCP se ha determinado mediante la valoración del crecimiento de estas cepas bacterianas en presencia de diferentes concentraciones de este compuesto. En la Figura 62 se muestra el crecimiento de estas estirpes bacterianas en presencia de CCCP.

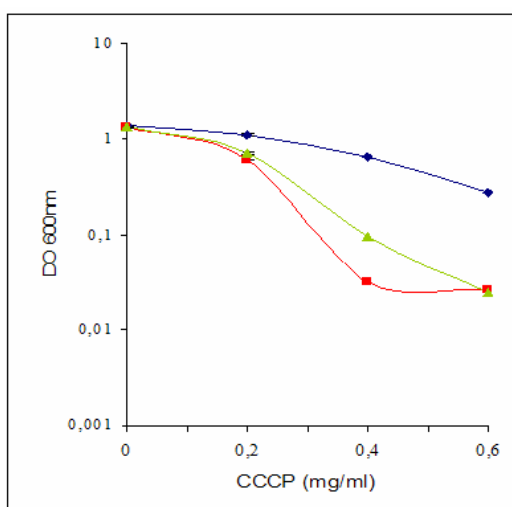


Figura 62. Curva de crecimiento de la cepa silvestre (azul), $\Delta pksA$ (rojo) y $\Delta pspA$ (verde) de *M. xanthus* en presencia de CCCP. Los cultivos se incubaron con CCCP (0-0.6 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 h a 30°C con 300 rpm de agitación.

El crecimiento de los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ se encuentra muy afectado ante la presencia de CCCP, a diferencia del silvestre. Ambos mutantes son más sensibles a la acción de este compuesto, especialmente la bacteria que carece de la quinasa. Así, con sólo 0.2 $\mu\text{g/ml}$ de CCCP se reduce moderadamente el crecimiento de ambas bacterias, a diferencia del silvestre, y ya con 0.4 $\mu\text{g/ml}$ se inhibe totalmente el crecimiento de ambos mutantes, mientras el silvestre es capaz de prosperar de forma adecuada incluso en presencia de 0.6 $\mu\text{g/ml}$ del desacoplador. Estos resultados indican que tanto la quinasa PksA como el regulador PspA son esenciales para que *M. xanthus* se adapte y sobreviva ante un estrés nutricional productor de un bajo estado energético celular en esta bacteria.

X. 4. 2. Efecto del CCCP sobre el ciclo de desarrollo

La proteína quinasa PksA al igual que el regulador PspA son necesarios para el crecimiento de la bacteria frente a condiciones que generan una reducción en la carga energética celular. En la naturaleza, el agotamiento de nutrientes en el medio produce una disminución del nivel energético, induciendo el inicio del ciclo de desarrollo en *M. xanthus*. El efecto combinado de la carencia de nutrientes en presencia del desacoplante CCCP ha sido analizado tras cultivar las estirpes silvestre y los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ en medio CF con concentraciones crecientes de CCCP, hasta una concentración máxima de 0.3 mM de este compuesto. La progresión del ciclo de desarrollo para cada una de estas bacterias en este medio se muestra en la Figura 63.

En el silvestre, la presencia de CCCP en el medio retarda la agregación y fructificación, puesto que mientras que en el medio CF a partir de las 24 h de incubación aparecen cuerpos definidos y bien formados aunque todavía algo translúcidos, en la placa con CCCP tan sólo se aprecian agregados celulares con cuerpos incipientes. Finalmente, tras 48 h se originan cuerpos maduros opacos en ambos casos, aunque los cuerpos fructificantes con CCCP se encuentran empaquetados más laxamente. Por tanto, el efecto de este inhibidor sobre *M. xanthus* reduce aún más la disponibilidad energética de las células, sufriendo un estrés nutricional más severo que ralentiza las actividades celulares necesarias para avanzar en el ciclo de desarrollo.

El análisis fenotípico de los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ respecto al silvestre de *M. xanthus* durante el desarrollo indica que ambas estirpes se encuentran mucho más afectadas por la presencia de CCCP en comparación con el silvestre. De hecho, ambos mutantes, al ser más susceptibles a este compuesto, se resienten de forma más drástica y por tanto sufren un considerable retraso en la progresión del desarrollo en relación al silvestre.

Así, la estirpe $\Delta pksA$ permanece lisa, sin agregados apreciables tras 24 h de incubación con CCCP, mientras que en ese momento el silvestre ya presenta cuerpos incipientes con agrupaciones considerables. Tras 48 h, ambas estirpes presentan cuerpos fructificantes formados, pero los del mutante $\Delta pksA$ son todavía inmaduros a diferencia del silvestre y sólo adquieren un aspecto similar transcurridas 72 h de incubación. Este retraso del mutante para la quinasa contrasta con el ligero adelanto de esta estirpe respecto al silvestre durante el desarrollo en medio CF control. De igual forma, la estirpe $\Delta pspA$ ya de por sí presenta un considerable retraso respecto al silvestre DZF en medio CF, pero en este caso este retraso se hace más acusado por la presencia de CCCP. En este sentido, tras 72 h de incubación, mientras que la bacteria $\Delta pspA$ genera al menos unos agregados anómalos definidos en CF, en cambio permanece totalmente liso en el medio con CCCP, en donde el silvestre ya presenta cuerpos fructificantes maduros.

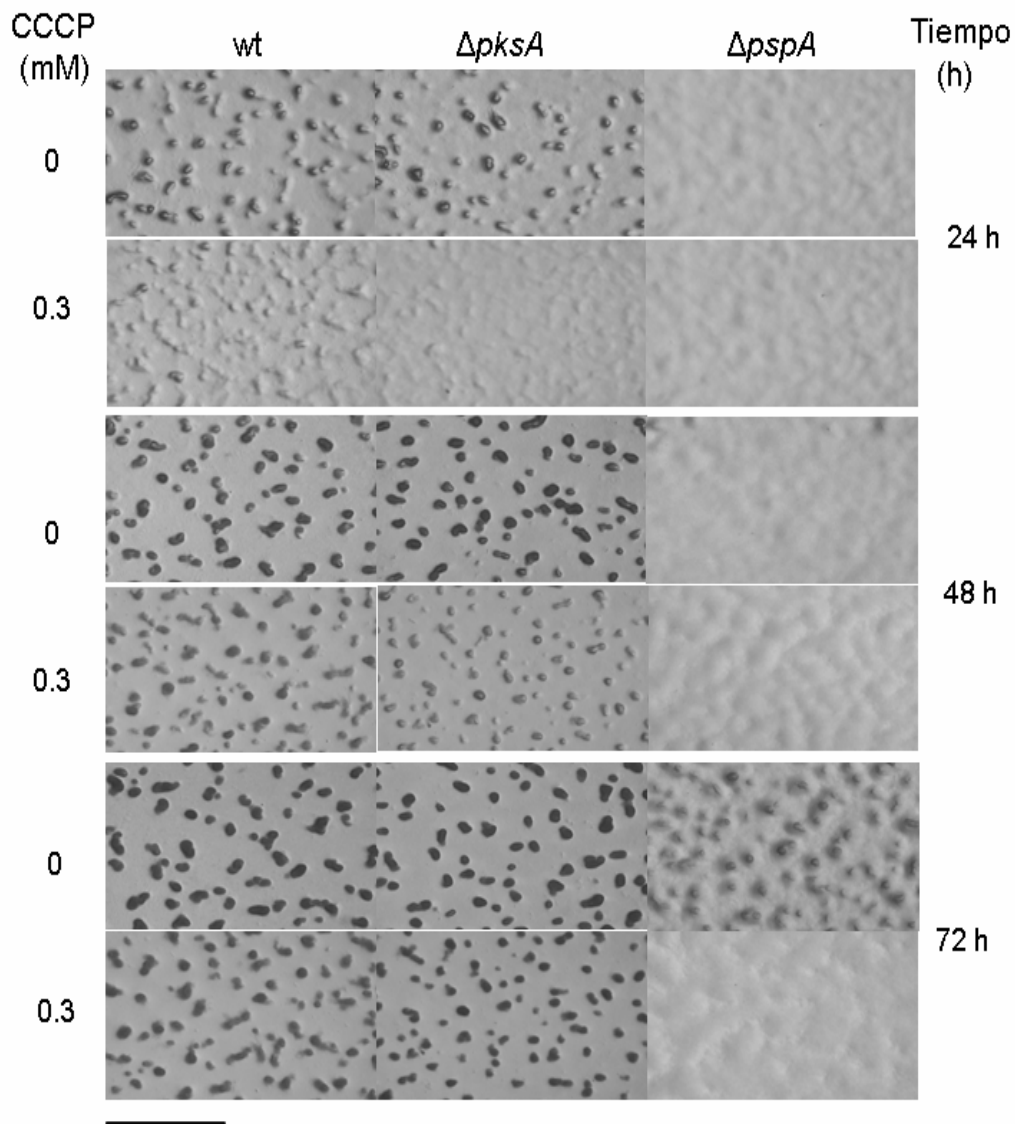


Figura 63. Análisis fenotípico del ciclo de desarrollo de la cepa silvestre (wt) y de los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ de *M. xanthus* en medio CF sin CCCP (control) y con 0.3 mM de CCCP. La DO_{600} empleada para estos cultivos fue de 15, incubando las bacterias a 30°C durante los periodos de tiempo indicados. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 50x. Barra: 1 mm.

X. 4. 3. Efecto del CCCP sobre la expresión de la quinasa PksA y el regulador PspA

La pérdida del gradiente protónico de la membrana constituye el estímulo principal para inducir la expresión del regulador PspA en *E. coli*. Por ello, se ha tratado de comprobar si este agente desacoplador activa igualmente la expresión del operón que incluye los genes *pspA* y *pksA* en *M. xanthus*, mediante el análisis de la actividad β -galactosidasa en presencia de CCCP desarrollada por la estirpe portadora de la fusión *lacZ* con el gen *pksA* de *M. xanthus*. Una vez obtenidos los resultados de actividad, no se aprecian diferencias en la expresión respecto a los controles sin CCCP (no mostrado). Por tanto, la ausencia de inducción de la expresión del gen *pksA* en presencia del desacoplante CCCP indica que en *M. xanthus* la pérdida del potencial de membrana no es el estímulo inductor que dispara la expresión de la quinasa PksA y el regulador PspA ante el agotamiento de nutrientes.

XI. Identificación de proteínas que interactúan con la quinasa PksA

La proteína PksA presenta una organización estructural similar a las quinasas receptoras de membrana identificadas en eucariotas. Un elemento de interés en relación a esta proteína es identificar la ruta de transducción de señales en la que participa esta proteína. En respuesta a un estímulo apropiado, las quinasas intervienen en la transducción de señales contactando con otras proteínas de señalización para activar cascadas de proteínas reguladas mediante fosforilación. En las rutas de señalización integradas por ePKs, la transmisión de la señal depende del contacto entre proteínas, y de hecho es frecuente la presencia de motivos que facilitan la interacción proteína-proteína entre los diversos componentes.

En consecuencia, un objetivo primordial de este estudio ha sido la búsqueda de proteínas capaces de contactar físicamente con la PksA, que participen junto a la quinasa en una misma ruta reguladora durante la señalización celular en *M. xanthus*. Por tanto, se ha tratado así de identificar posibles sustratos o moduladores para esta proteína, dentro de la vía de transducción de señales activada por este receptor. El método utilizado en este estudio para detectar interacciones proteicas ha sido el sistema del doble híbrido de *S. cerevisiae*.

El sistema del doble híbrido se emplea con frecuencia para analizar la interacción entre parejas de proteínas conocidas relacionadas a nivel funcional, así como para delimitar las regiones de cada proteína responsables de la interacción. Además, también se emplea para rastrear genotecas de expresión durante la búsqueda de interacciones con una proteína de interés. De acuerdo con ello, se han seguido dos estrategias para identificar proteínas capaces de interactuar con la quinasa. En primer lugar, se ha probado la interacción por parejas entre la quinasa PksA y el regulador PspA, ambas implicadas en procesos similares y codificadas por un mismo operón. Por otro lado, se ha rastreado una genoteca de *M. xanthus* para la búsqueda de proteínas capaces de interactuar con la quinasa.

El sistema del doble híbrido se basa en la naturaleza modular de los factores de transcripción eucariotas, que constan de un dominio de unión al ADN junto con un dominio activador de la transcripción. La capacidad del regulador transcripcional para estimular la expresión génica requiere que ambos dominios se sitúen en estrecha proximidad, aunque no es necesario que se encuentren unidos en una misma proteína. Por tanto, en este sistema se fusiona la proteína de interés (“cebo”) al dominio de unión, mientras que la proteína diana (“presa”) se une al dominio activador. La expresión de ambas proteínas híbridas en una misma cepa de levadura permite reconstituir al factor de transcripción quimérico sólo si el cebo y la presa contactan físicamente entre sí, activando entonces la expresión de varios genes marcadores capaces de generar una señal fenotípica.

En este trabajo, se ha utilizado el sistema del doble híbrido MATCHMAKER de Clontech, basado en el factor de transcripción GAL4, para la identificación de interacciones proteicas *in vivo* en la levadura *S. cerevisiae*. Este sistema requiere de la construcción de fusiones génicas entre cada pareja de proteínas con los distintos elementos del factor de transcripción GAL4 de levaduras. En este caso, para la interacción por parejas, la fusión de la quinasa PksA con el dominio de unión al ADN se lleva a cabo en el plásmido cebo pGBKT7, mientras que la del regulador PspA con el dominio activador de la transcripción tiene lugar en el plásmido presa pGADT7. Ambas proteínas híbridas se expresan con una elevada eficiencia en la levadura debido a que ambas fusiones se encuentran bajo el control de un promotor constitutivo perteneciente al gen *ADHI*.

En el sistema del doble híbrido, es necesario que ambas proteínas híbridas se expresen de forma simultánea en una misma estirpe de levadura, y por tanto, ambos plásmidos han de ser captados por la levadura mediante cotransformación. Cada uno de estos vectores dispone de un marcador nutricional esencial para seleccionar su incorporación en *S. cerevisiae*, un gen *TRP1* en el vector pGBKT7 y un gen *LEU2* en el vector pGADT7. Al cultivar la levadura en un medio mínimo SDC carente de triptófano y leucina, tan sólo crecen aquellos transformantes que portan a ambos plásmidos a la vez y que por tanto, expresan tanto al cebo como a la presa. Además, estos vectores contienen un origen de replicación para *E. coli* y otro para *S. cerevisiae* que facilita la estabilidad de ambos vectores en la levadura.

La cepa hospedadora empleada para analizar las interacciones proteicas en el sistema del doble híbrido ha sido la estirpe AH109 de *S. cerevisiae*. Como muestra la Figura 64, esta levadura contiene cuatro genes testigo, cuya expresión se sitúa bajo el control de diferentes promotores para el factor de transcripción GAL4. Los genes regulados son dos marcadores nutricionales, *HIS3* y *ADE2*, necesarios para la síntesis de histidina y adenina en un medio mínimo deficiente para estos compuestos, junto con dos marcadores enzimáticos, *MEL1* y *lacZ*, que codifican para la enzima α -galactosidasa y β -galactosidasa, respectivamente. Los genes *HIS3* y *ADE2* se expresan a partir de promotores fuertes de tipo GAL1 y GAL2, mientras que *MEL1* y *lacZ* dependen de un promotor débil de tipo MEL1. La presencia de promotores inducibles por un mismo regulador pero con distinta secuencia reduce la incidencia de falsos positivos, puesto que sólo las interacciones específicas consiguen activar la expresión de todos estos genes dependientes de GAL4 de forma simultánea.

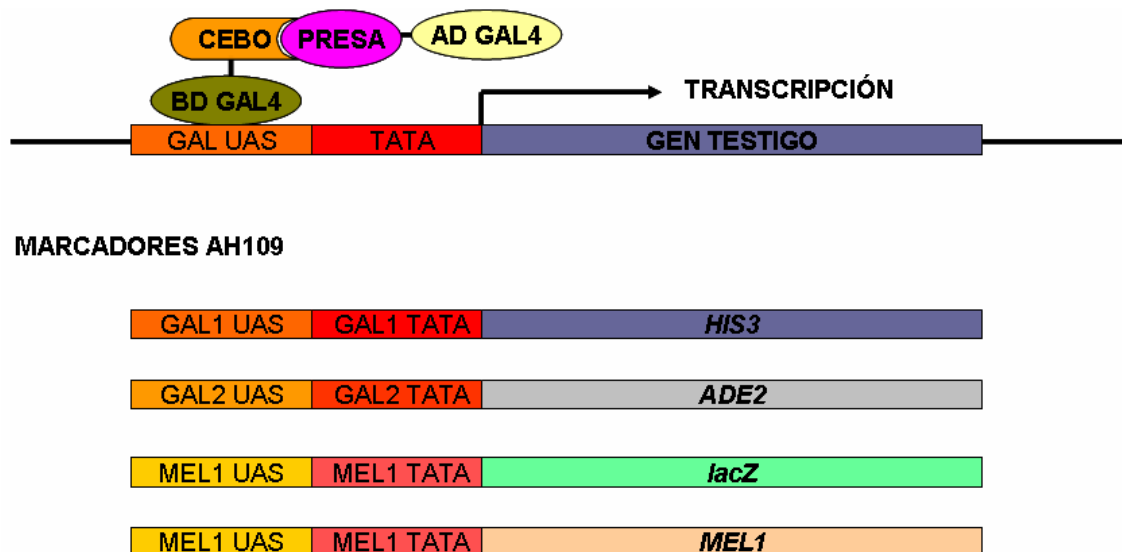


Figura 64. Sistema del doble híbrido de *S. cerevisiae*. El contacto físico entre la proteína cebo unida al dominio de unión al ADN (BD) de GAL4 (residuos 1-147) con la presa fusionada al dominio activador de la transcripción (AD) de GAL4 (residuos 768-881) activa la expresión de los genes testigo en la cepa hospedadora. A continuación, se muestran los diferentes promotores dependientes de GAL4 que controlan la expresión de los distintos genes marcadores en la levadura hospedadora AH109, con una región UAS de unión a GAL4 junto con una caja TATA justo por encima de cada gen testigo.

La interacción entre el cebo y la presa en esta estirpe de levadura se detecta mediante una selección nutricional, tras cultivar a la estirpe que expresa a ambas proteína híbridas sobre un medio mínimo carente de histidina y/o adenina. La presencia de dos marcadores nutricionales, *HIS3* y *ADE2*, permite controlar el nivel de selección de la interacción. Así, la ausencia de histidina en el medio permite detectar interacciones débiles, incapaces de prosperar en ausencia de adenina, cuya carencia sólo permite el crecimiento de levaduras poseedoras de interacciones muy fuertes entre el cebo y la presa. En ambos casos, para validar el contacto entre ambas proteínas, se analiza la expresión de los marcadores de actividad galactosidasa, *MEL1* y *lacZ*, con el desarrollo de una tonalidad azulada en placas indicadoras con el sustrato α -X-Gal.

XI. 1. Interacción de la quinasa PksA con el regulador PspA en el sistema del doble híbrido

XI. 1. 1. Construcción de fusiones para la expresión de la proteína quinasa PksA como cebo y del regulador PspA como presa

El estudio de la interacción de la quinasa con la proteína PspA mediante el sistema del doble híbrido de levadura requiere de la obtención de fusiones traduccionales capaces de expresar la quinasa PksA como cebo y el regulador PspA como presa. El contacto entre dos proteínas en el sistema del doble híbrido sólo es detectable si tanto el cebo como la presa son solubles, para que el complejo formado por ambas proteínas pueda ser translocado al núcleo de la levadura y active la expresión génica de los genes testigo. En este caso, la quinasa PksA es una proteína de membrana y por tanto, la expresión de su secuencia completa como cebo impediría detectar cualquier tipo de interacción, debido a la localización celular de la proteína híbrida.

Por tanto, para analizar el contacto de la quinasa PksA con el regulador PspA, se han construido varias fusiones traduccionales solubles entre distintos segmentos de la quinasa pertenecientes a la región intracelular de la proteína con el dominio de unión al ADN de GAL4 en el vector pGBKT7. Puesto que esta porción intracelular contiene dos regiones diferenciadas, con un dominio catalítico N-terminal y un dominio regulador putativo, se han expresado un total de 3 segmentos diferentes de la quinasa como cebo: la región intracelular completa, el dominio catalítico sólo y el dominio regulador sólo. Finalmente, se ha construido como control negativo una fusión que expresa el dominio sensor extracelular de la quinasa, incapaz de interactuar en ningún caso con el regulador PspA citoplasmático.

Para obtener el cebo, los fragmentos de ADN del gen *pksA* que codifican las distintas regiones que integran la proteína quinasa fueron amplificadas por PCR a partir del cromosoma de *M. xanthus*, empleando para ello los cebadores necesarios en cada caso (ver C.IV.2). Los productos de PCR amplificados se digirieron con las enzimas de restricción adecuadas al igual que el vector pGBKT7, para proceder a su clonación en este plásmido. Los distintos segmentos génicos se expresan en la levadura a partir de este vector como proteínas de fusión portadoras del dominio de unión al ADN de GAL4 en el extremo N-terminal unido a la correspondiente porción de la quinasa.

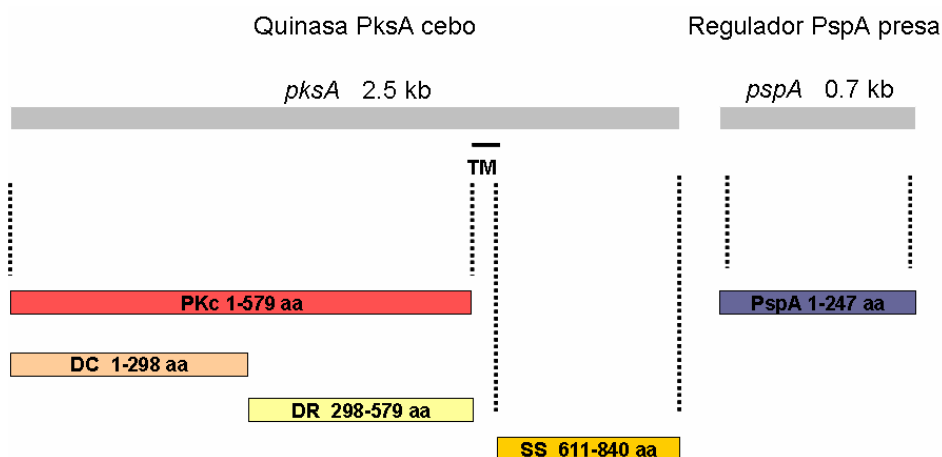


Figura 65. Expresión de la quinasa PksA como cebo y del regulador PspA como presa en el sistema del doble híbrido. Los distintos segmentos de la proteína quinasa se sintetizan fusionados al dominio BD de GAL4 a partir del vector pGBKT7, mientras la proteína PspA completa se fusiona con el dominio AD de GAL4 en el vector pGADT7.

Como se muestra en la Figura 65, se han generado un total de cuatro construcciones portadoras de distintas fusiones traduccionales con varios fragmentos de la quinasa en el plásmido pGBKT7. En primer lugar, se clonó en este vector el segmento del gen *pksA* que cifra la porción citoplasmática completa de la proteína quinasa PKc (residuos 1-579 de la PksA). A continuación, se construyeron distintas fusiones para cada uno de los dominios que integran la proteína: la región catalítica DC (residuos 1-298), la región reguladora DR (residuos 298-579) y finalmente como control negativo, la región sensora extracelular SS (residuos 611-840). Los plásmidos obtenidos se designaron de acuerdo con la denominación de la porción de la quinasa expresada en cada caso.

Para obtener la presa, el gen *pspA* completo se amplificó a partir de una preparación de cromosoma de *M. xanthus* mediante PCR, empleando para ello los cebadores apropiados que delimitan al gen (ver C.IV.2). El producto de PCR, con un tamaño de 0.74 kb se digirió con *EcoRI* y *BamHI* y se insertó en el vector pGADT7, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. El plásmido resultante, denominado pGAD-PspA, tras ser incorporado a la levadura, expresa una proteína híbrida con el dominio activador de la transcripción de GAL4 N-terminal fusionado a la proteína reguladora PspA íntegra.

XI. 1. 2. Estudio de la interacción PksA-PspA en el sistema del doble híbrido de levadura

El empleo en el sistema del doble híbrido de la quinasa PksA como cebo y del regulador PspA como presa sólo es posible si la expresión por separado de cada una de estas proteínas no induce la activación de la transcripción de los genes marcadores en la levadura. Los controles de autoactivación realizados en cada caso demostraron que ambas proteínas son incapaces de inducir por sí mismas la expresión de los genes regulados por GAL4. Así, tanto las cepas control obtenidas por cotransformación con los plásmidos cebo y el vector pGADT7 sin inserto como la generada al incorporar el plásmido presa y el vector pGBKT7 sin inserto, fueron incapaces de crecer sobre medio mínimo selectivo.

El análisis de la interacción proteína-proteína entre la quinasa PksA y el regulador PspA se llevó a cabo mediante la transformación de la cepa de levadura AH109 con las diferentes combinaciones de cada uno de los plásmidos cebo, que expresan distintas porciones de la quinasa fusionadas al dominio de unión de GAL4, junto con un mismo plásmido presa, con el regulador PspA unido a su vez al dominio de activación de GAL4. Las estirpes resultantes se sembraron en medio SDC Trp⁻ Leu⁻, seleccionando los transformantes que incorporaron ambos plásmidos. Se obtuvieron 4 cepas de levadura, que expresan las siguientes combinaciones cebo/presa: PKc/PspA, DC/PspA, DR/PspA, SS/PspA (control negativo).

Finalmente, se evaluó la interacción entre ambas proteínas mediante el análisis de la expresión del conjunto de genes testigo en las distintas estirpes obtenidas. El contacto entre el cebo y la presa se manifiesta por la inducción de la expresión de los marcadores nutricionales *HIS3* y *ADE2*, necesarios para el crecimiento de la levadura sobre un medio deficiente en histidina y/o adenina. Por ello, las estirpes de levadura obtenidas se sembraron sobre dos tipos de medios selectivos: un medio mínimo carente de histidina, para detectar una posible interacción débil entre ambas proteínas, así como sobre un medio mínimo sin histidina ni adenina, que requiere de una interacción fuerte. En la Figura 66 se muestra el crecimiento de estas estirpes sobre ambos medios.

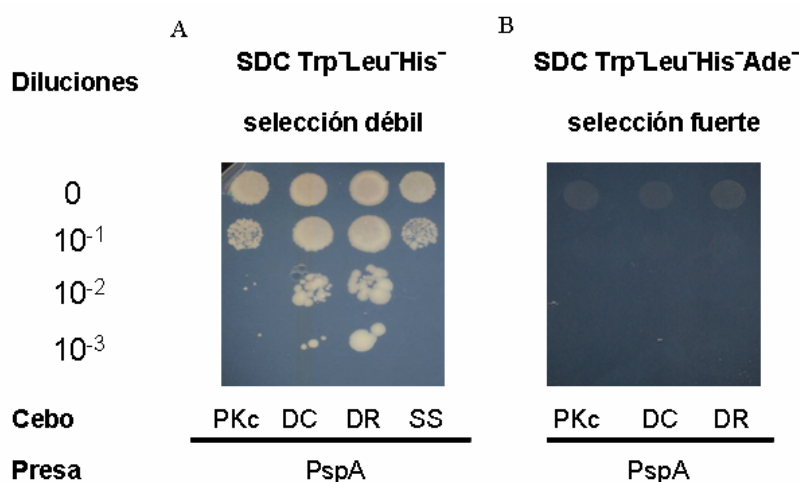


Figura 66. Análisis de la expresión de los marcadores nutricionales *HIS3* y *ADE2* sobre medio mínimo selectivo durante el estudio de la interacción PksA-PspA. Las estirpes de levadura crecidas a DO₆₀₀ de 0.5 se sembraron tras realizar diluciones decimales sobre medio SDC Trp⁻ Leu⁻ His⁻ (A) y SDC Trp⁻ Leu⁻ His⁻ Ade⁻ (B) y se incubaron durante cinco días a 30°C.

El análisis del crecimiento de las distintas estirpes sobre ambos medios mínimos confirma un contacto débil entre la proteína quinasa PksA y el regulador PspA. Esta interacción depende principalmente de la región reguladora de la proteína (DR), aunque la proteína PspA también parece contactar en menor medida con el dominio catalítico de la quinasa (DC). Por otro lado, la porción intracelular completa de la proteína quinasa PksA parece no interactuar con el regulador PspA, ya que la estirpe que expresa toda la región citoplasmática de la proteína no se diferencia en su crecimiento respecto al control negativo.

En este sentido, como se aprecia en la Figura 66, la cepa que expresa el dominio regulador como cebo crece considerablemente bien hasta al menos la dilución 10^{-3} en un medio sin histidina, mientras que aquella que genera el dominio catalítico prospera hasta la 10^{-2} . Sin embargo, ambos apenas crecen en un medio carente de histidina y adenina, aunque aquí también se aprecia cómo la cepa con el dominio regulador crece algo mejor sobre este medio en comparación con el resto de estirpes. A diferencia de los anteriores, los controles negativos no crecen en absoluto en un medio sin histidina y adenina (no mostrado) y tan sólo prosperan parcialmente en la dilución 10^{-1} en un medio sin histidina.

Por otro lado, la asociación del cebo con la presa produce una inducción de los marcadores de actividad enzimática α y β -galactosidasa, *MEL1* y *lacZ*, que a su vez, se manifiesta en la adquisición de una tonalidad azulada en presencia del sustrato adecuado para cada enzima. La valoración cualitativa de la expresión de la enzima α -galactosidasa, secretada por la levadura al exterior se realizó mediante el cultivo de estas estirpes de levadura en un medio indicador con el sustrato α -X-Gal. En la Figura 67 se muestra el crecimiento de estas estirpes en el medio SDC Trp⁻ Leu⁻ con α -X-Gal.

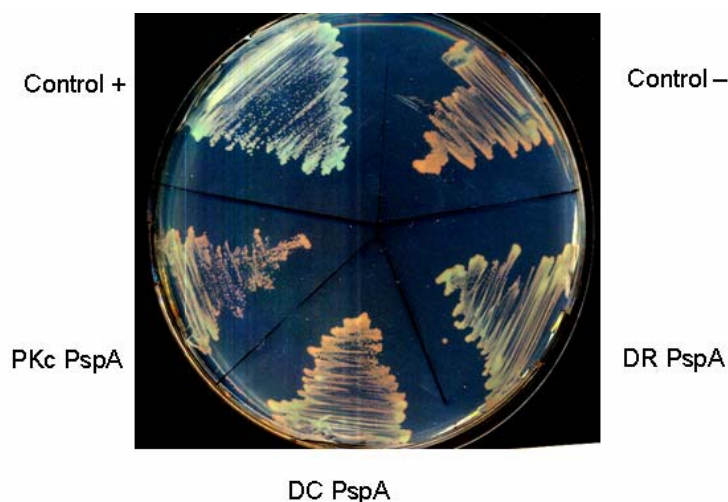


Figura 67. Análisis cualitativo de la expresión del marcador enzimático *MEL1*, que codifica para la enzima α -galactosidasa, sobre medio mínimo indicador con α -X-Gal durante el estudio de la interacción PksA-PspA.

El análisis cualitativo de la actividad α -galactosidasa confirma la validez de la interacción entre la quinasa PksA y el regulador PspA. De hecho, en la placa indicadora se aprecia una tonalidad azulada intensa en la levadura que expresa como cebo al dominio regulador de la quinasa, y de igual forma, adquiere cierta coloración azul aquella que porta al dominio catalítico e incluso se observa una tonalidad tenue en la levadura con la región citoplasmática completa. En cambio, el control negativo carente de interacción mantiene un color rojizo en este medio.

La determinación cuantitativa de la actividad β -galactosidasa en cada una de las estirpes de levadura permite estimar la fuerza relativa de la interacción proteína-proteína. La determinación de actividad β -galactosidasa en presencia del sustrato ONPG en levaduras se desarrolló siguiendo el procedimiento descrito en la sección XII.2 de Material y Métodos. En la Figura 68 se muestran los valores de actividad obtenidos para cada una de las cepas analizadas durante el estudio de la interacción PksA-PspA.

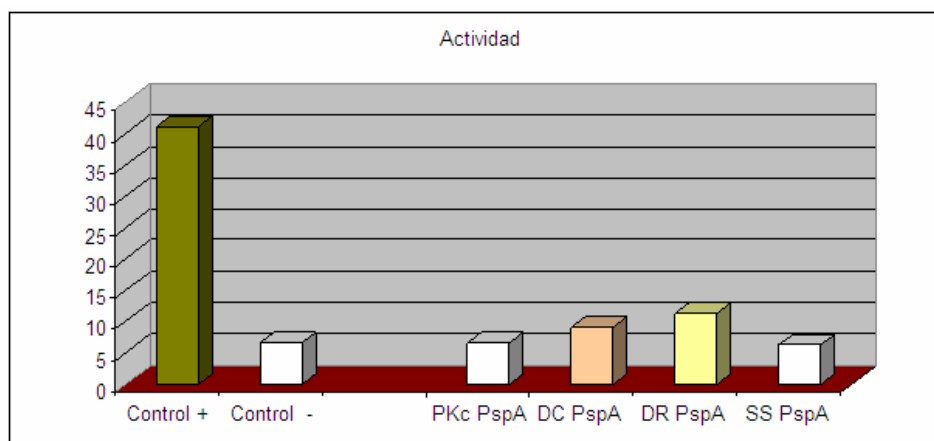


Figura 68. Análisis cuantitativo de la expresión del marcador enzimático *lacZ*, que codifica para la enzima β-galactosidasa durante el estudio de la interacción PksA-PspA, expresado en nmol ONP/mg·min. La desviación estándar de la actividad enzimática β-galactosidasa para las muestras analizadas es inferior en todos los casos a una unidad.

Los valores de actividad β-galactosidasa indican que el contacto PksA-PspA depende de una interacción débil basada principalmente en la asociación con el dominio regulador de la quinasa, y en menor medida, con el dominio catalítico. Los niveles de actividad detectados para la interacción entre ambas proteínas son relativamente bajos pero significativos, teniendo en cuenta que la expresión de esta enzima se encuentra controlada por un promotor muy débil de tipo MEL1, lo que condiciona que incluso en el control positivo que corresponde a una interacción proteína-proteína muy fuerte, se obtienen valores de actividad bajos.

XI. 2. Estudio de la interacción PspA-PilR en el sistema del doble híbrido de levadura

En *E. coli*, la proteína PspA contacta con PspF, un regulador dependiente de σ^{54} que controla la expresión génica en respuesta al estrés. Puesto que no existe un homólogo a PspF en *M. xanthus*, se han analizado todas aquellas proteínas activadoras dependientes de σ^{54} codificadas por el genoma de la mixobacteria. Entre ellas, un candidato para contactar físicamente con PspA es el regulador PilR, que controla la expresión de los genes necesarios para la síntesis de los pili de tipo IV, esenciales para la movilidad social en *M. xanthus*. En este sentido, ambas proteínas se encuentran relacionadas a nivel funcional, puesto que PspA modula el deslizamiento de esta bacteria, y por tanto, existe la posibilidad de que esta proteína interactúe con PilR para controlar la movilidad social en *M. xanthus*.

El análisis de la interacción PspA-PilR requiere la expresión como cebo de la proteína PilR. En primer lugar, se amplificó por PCR el gen *pilR* completo de 1.4 kb, a partir de un par de cebadores que flanquean a este gen (ver C.IV.2), partiendo de un molde de ADN cromosómico de *M. xanthus*. Entonces, tras digerir con *EcoRI* y *BamHI*, el gen *pilR* se insertó en el vector pGBKT7 digerido con ambas enzimas, dando lugar a la construcción pGBK-*pilR*, que expresa la proteína PilR fusionada al dominio de unión al ADN de GAL4. Finalmente, una cepa de levadura portadora del plásmido presa pGAD-*pspA*, fue transformada con este plásmido cebo. Los transformantes obtenidos no fueron capaces de crecer en medios mínimos carentes de histidina y/o adenina, ni tampoco presentaban coloración azulada en un medio con el sustrato α-X-Gal (no mostrado). Por tanto, la proteína PspA no interactúa con PilR en el sistema del doble híbrido de levadura.

XI. 3. Rastreo de interacciones con la quinasa PksA en una genoteca de expresión de *M. xanthus*

XI. 3. 1. Obtención de una genoteca de expresión de ADN cromosómico de *M. xanthus*

La identificación de todas aquellas proteínas capaces de contactar físicamente con la quinasa PksA precisa de la obtención previa de una colección completa de proteínas de *M. xanthus* expresadas a partir del genoma de esta bacteria. Por ello, a partir del material genético cromosómico de *M. xanthus* se ha construido una genoteca de expresión en la serie de vectores pGAD, con la finalidad de expresar los fragmentos génicos procedentes de la digestión parcial del cromosoma como proteínas híbridas fusionadas al dominio de activación de GAL4. Este conjunto de proteínas sintetizadas como presa se encuentran así disponibles para el rastreo de interacciones proteicas con la proteína quinasa PksA cebo.

La construcción de la genoteca de expresión de *M. xanthus* se ha realizado siguiendo el procedimiento descrito en la sección XI.1 de Material y Métodos. Para incrementar la diversidad de fragmentos en la librería génica, el cromosoma se digirió de forma parcial por separado con un total de tres enzimas de restricción diferentes, *MspI*, *AciI* y *HinPII*, cada una de ellas con un sitio de corte distinto. La diana en todos los casos es una secuencia muy corta de 4 pb que deja extremos protuberantes CG, compatibles para ser incorporado en el sitio *ClaI* de la serie de vectores pGAD. La elevada frecuencia de estas secuencias diana en el genoma de *M. xanthus*, que posee un alto contenido en G+C, facilitó la incorporación a la genoteca de un conjunto de fragmentos génicos suficiente para cubrir el genoma completo.

El tamaño de los fragmentos de restricción clonados como presa se sitúa dentro de un rango que comprende desde los 0.5 kb a 3 kb, correspondiente al tamaño medio de los genes de *M. xanthus*, excluyendo así tanto los insertos demasiado grandes, que generan con frecuencia falsos positivos, como aquellos excesivamente pequeños, que cifran porciones proteicas reducidas. Los fragmentos de ADN purificados de tamaño adecuado procedentes de cada digestión parcial se ligaron con cada uno de los tres vectores pGAD digeridos con *ClaI*. La inserción de estos fragmentos en esta serie de vectores, que difieren entre sí en la pauta de lectura del sitio de clonación, maximiza la posibilidad de expresar cada fragmento fusionado al dominio de activación en la fase correcta de lectura.

Los fragmentos de ADN genómico de *M. xanthus* clonados en cada caso podían incluir un gen completo o bien un segmento parcial de un gen o incluso una región no codificante del genoma de esta bacteria. Además, la integración de estos fragmentos en cada vector se podía haber producido en cualquier orientación, siguiendo una de las tres pautas de lectura posibles. Por ello, tan sólo una fracción de las construcciones obtenidas generan realmente una proteína de fusión correcta al ser expresadas por la levadura.

El recuento de los transformantes de *E. coli* obtenidos en cada una de las electroporaciones realizadas con las distintas mezclas de ligación se evaluó tras sembrar diferentes diluciones de cada muestra en medio LB con ampicilina, obteniendo una media de 5×10^6 colonias diferentes por transformación. Teniendo en cuenta las múltiples combinaciones posibles para la unión entre los tres vectores pGAD con los fragmentos provenientes de cada una de las tres digestiones parciales posibles, el número total de clones independientes obtenidos se situó en torno a los 45-50 millones. Los controles de autoligación realizados con cada vector pGAD indican que tan sólo un 1-2% de los transformantes obtenidos portan al vector religado sin inserto.

La librería génica obtenida contiene por tanto un extensa colección de fragmentos de ADN diferentes procedentes del cromosoma de *M. xanthus*, suficientemente representativa para que cada uno de los genes codificados en el genoma de esta bacteria se exprese como presa a partir de alguna de las construcciones generadas. Los transformantes obtenidos se crecieron en medio líquido LB durante la fase exponencial de crecimiento, evitando así la pérdida de clones por competencia, y se extrajo el ADN plasmídico que contenían para generar las preparaciones de material genético de la genoteca.

XI. 3. 2. Búsqueda de proteínas que interaccionan con la quinasa PksA a partir de la genoteca de expresión

El rastreo de interacciones de la quinasa PksA con otras proteínas expresadas a partir de la genoteca de *M. xanthus* se realizó mediante la transformación secuencial de la cepa hospedadora AH109 de levadura con el plásmido que genera la quinasa cebo y posteriormente, con la colección de plásmidos portadores de los diferentes fragmentos de ADN cromosómico de la genoteca. La disposición de la quinasa PksA como receptor de membrana determina que el contacto de esta proteína con otros componentes de señalización en *M. xanthus* ha de venir mediado por la región intracelular de la quinasa, por lo se ha empleado esta porción del receptor como cebo.

La estirpe que expresa la región intracelular de la quinasa como cebo se transformó con el ADN plasmídico procedente de las preparaciones de la librería génica de *M. xanthus*, para la expresión del conjunto de genes codificados por el genoma de esta bacteria como presa. Se han realizado un total de 30 transformaciones con diferentes muestras de la genoteca, procedentes de preparaciones que contienen las diferentes combinaciones de vectores pGAD con fragmentos cromosómicos *MspI*, *AciI* o *HinPII*. En cada una de ellas, se ha empleado un 1 µg de ADN plasmídico, con la finalidad de que las células de levadura incorporen de forma mayoritaria un único plásmido de la genoteca, facilitando así la posterior identificación del plásmido responsable de la interacción.

Las células de levadura resultantes expresan todas ellas la región intracelular de la quinasa como cebo, junto con una combinación diferente de proteínas codificadas cada una de ellas por diferentes fragmentos cromosómicos procedentes de la genoteca. La eficiencia obtenida en cada transformación se valoró mediante la siembra de diferentes diluciones en medio mínimo SDC Trp⁻ Leu⁻, donde sólo crecen aquellas células de levadura que contienen tanto el plásmido cebo como la presa. El recuento del número de colonias indica la obtención de 15000-30000 cotransformantes con cada una de las muestras de la librería genómica de *M. xanthus*, por lo que en total se han rastreado en torno a 500000 colonias de levadura para la búsqueda de interacciones con la quinasa PksA.

El rastreo de proteínas interaccionantes se realizó mediante una doble selección nutricional, empleando para ello medios mínimos SDC deficientes en histidina y/o adenina. En estos medios selectivos, tan sólo crecen aquellas células de levadura que portan alguna proteína, expresada a partir de la genoteca, capaz de contactar físicamente con la quinasa. La interacción entre ambas proteínas activa la expresión de los marcadores nutricionales *HIS3* y *ADE2*, dependientes de *GAL4*, permitiendo el crecimiento aún en ausencia de histidina y/o adenina.

Inicialmente, el conjunto de transformantes obtenidos se sembraron sobre un medio moderadamente selectivo, en SDC Trp⁻ Leu⁻ His⁻. Este medio mínimo carente de histidina no es demasiado restrictivo, por lo que permite que prosperen en un principio las células de levadura y comiencen a crecer. La elección de este medio se debe a que la siembra inmediata de los transformantes sobre un medio demasiado exigente, deficiente también en adenina, les impide prosperar, ya que no disponen del suficiente tiempo para que la interacción entre el cebo y la presa genere una expresión adecuada de los marcadores nutricionales.

La selección nutricional en el medio SDC Trp⁻ Leu⁻ His⁻ favorece el crecimiento diferencial de las levaduras que portan interacciones positivas, dando lugar a colonias definidas de tamaño considerable sobre el fondo de crecimiento de la placa. En este caso, la ausencia de histidina no impide totalmente el crecimiento de las células no interaccionantes, pero éstas apenas progresan sobre este medio. Las estirpes candidatas capaces de crecer en ausencia de histidina se picaron en estría sobre un medio muy restrictivo, carente tanto de histidina como de adenina, SDC Trp⁻ Leu⁻ His⁻ Ade⁻. Aquí tan sólo crecen aquellas cepas de levadura poseedoras de una interacción lo suficientemente considerable como para prosperar en este medio tan exigente, eliminando así cualquier posible falso positivo.

Las cepas de levadura presuntamente positivas, capaces de crecer sobre medios selectivos, se verificaron mediante el análisis de la actividad enzimática α y β -galactosidasa desarrollada por estas estirpes. La interacción proteica con la quinasa activa igualmente la expresión de los genes *MEL1* (α -galactosidasa) y *lacZ* (β -galactosidasa), dependientes de factor transcripcional GAL4, induciendo así ambas actividades en la levadura. La valoración cualitativa de la expresión de la enzima α -galactosidasa se llevó a cabo mediante la adición al medio del sustrato α -X-Gal, dando lugar a una coloración azul en las estirpes de levadura que expresan el gen *MEL1*. En la Figura 69 se muestra el crecimiento de las distintas estirpes analizadas sobre medio mínimo de doble selección SDC Trp⁻ Leu⁻ His⁻ Ade⁻ así como en medio indicador con α -X-Gal, para el desarrollo de la actividad α -galactosidasa.

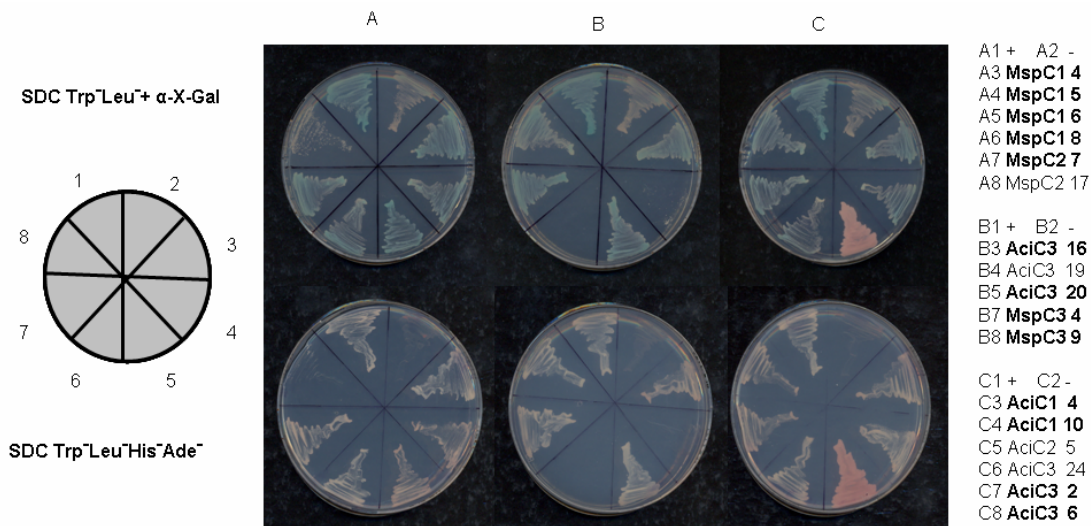


Figura 69. Crecimiento de las estirpes obtenidas tras el rastreo con la quinasa PksA como cebo en un medio indicador con α -X-Gal (arriba) y en un medio selectivo carente de histidina y adenina (abajo). En cada placa aparece un control positivo + y un control negativo - de referencia. Las cepas interaccionantes seleccionadas que expresan todos los marcadores se encuentran resaltados en negrita a la derecha. Junto a ellas, también se seleccionaron siguiendo los mismos criterios las estirpes MspC2 1 y MspC3 1 (no mostrado).

A partir del rastreo de la genoteca, se seleccionaron 15 colonias que mostraban activación en todos los genes marcadores analizados, y que por tanto eran capaces de crecer en un medio mínimo deficiente tanto en histidina como en adenina y además presentaban actividad galactosidasa. El análisis del crecimiento en medio selectivo y el desarrollo de tonalidad azulada en un medio indicador con α -X-Gal permitió diferenciar dos grupos de interaccionantes. Las ocho estirpes de levadura que conformaban el primer grupo crecían fácilmente en medio selectivo, y además desarrollaban una fuerte coloración azulada, mientras que los siete miembros del segundo grupo prosperaban débilmente en medio selectivo y poseían una tenue coloración azulada.

XI. 3. 3. Secuenciación de los plásmidos presa contenidos en las cepas de levadura interaccionantes

A partir de cada una de las cepas seleccionadas se procedió a purificar los plásmidos presa que expresan los diferentes fragmentos cromosómicos responsables de la interacción con la quinasa. Tras extraer los plásmidos contenidos en cada estirpe de levadura, se realizó una transformación en *E. coli* y se seleccionó la incorporación de cada uno de los plásmidos presa en un medio selectivo con ampicilina, el marcador de resistencia portado por los vectores de la serie pGAD. Una vez transferidos a *E. coli*, se purificó cada uno de estos plásmidos y se procedió a su secuenciación.

La secuenciación de los fragmentos cromosómicos contenidos en los plásmidos presa se llevó a cabo empleando para ello el cebador pGAD SECF (ver C.IV.2). El análisis de las secuencias obtenidas permitió identificar el segmento cuya expresión era responsable en cada caso de la interacción con la quinasa PksA, a partir de la secuencia del genoma de *M. xanthus*. Además, el estudio del punto de inserción de estos fragmentos cromosómicos en el vector permitió conocer si la fusión obtenida mantenía una pauta correcta de lectura para la expresión de la proteína híbrida. En la Tabla 9 se detallan las distintas cepas interaccionantes junto con la identidad de los genes a los que pertenecen cada uno de los fragmentos cromosómicos expresados como presa por estas estirpes de levadura.

CEPA	IDENTIDAD	INTERACCIÓN	ORIENTACIÓN	INSERCIÓN	VALIDEZ
MspC1 4	Mxan2659 proteína hipotética	fuerte	inversa		NO
MspC1 5	Mxan5813 proteína hipotética	débil	directa	en fase	SI
MspC1 6	Mxan1834 proteína hipotética	fuerte	directa	en fase	SI
MspC1 8	Mxan0555 Ser/ Thr fosfatasa	fuerte	inversa		NO
MspC2 1	Mxan+166 proteína hipotética	fuerte	inversa		NO
MspC2 7	Mxan0797 acil-CoA deshidrogenasa	fuerte	inversa		NO
MspC3 1	Mxan7181 KapA	fuerte	directa	en fase	SI
MspC3 4	Mxan1668 KapC	fuerte	directa	en fase	SI
MspC3 9	Mxan7465 proteína de transporte	débil	inversa		NO
AciC1 4	Mxan1329 proteína hipotética	débil	inversa		NO
AciC1 10	Mxan0411 proteína hemaglutinina	débil	directa	no en fase	NO
AciC3 2	Mxan0254 proteína de membrana	débil	opuesta		NO
AciC3 6	Mxan0254 proteína de membrana	débil	opuesta		NO
AciC3 16	Mxan1668 KapC	débil	directa	en fase	SI
AciC3 20	Mxan6558 lipoproteína	fuerte	inversa		NO

Tabla 9. Cepas de levadura aisladas durante el rastreo de la genoteca con la quinasa PksA como cebo. En cada caso, se indica la identidad de las presas obtenidas, la fuerza de la interacción, la orientación del fragmento y su inserción en el vector, y finalmente, la validez de la interacción detectada.

El análisis de los fragmentos cromosómicos detectados durante el rastreo de la genoteca en el sistema del doble híbrido revela que tan sólo cinco de las quince estirpes encontradas expresan fragmentos génicos pertenecientes a genes anotados en el genoma e insertos en el vector con la orientación adecuada y en la fase de lectura correcta. El resto de las cepas son falsos positivos, que expresan secuencias integradas en una orientación opuesta respecto al gen en que se localizan, o bien expresadas en una pauta de lectura errónea, dando lugar a proteínas anómalas carentes de sentido biológico.

Para confirmar la interacción en las cinco estirpes positivas, es necesario comprobar que las presas detectadas eran incapaces de autoactivar la expresión génica y que además, median la interacción con la quinasa de una forma específica. Esta verificación se realizó tras transformar con cada uno de los plásmidos presa a una cepa control, que contiene el plásmido pGBKT7 sin inserto y a la cepa que expresa la porción intracelular de la quinasa, portadora del plásmido pGBK-PKc. En todos los casos, mientras que el control era incapaz de crecer en medios selectivos, se reconstituía el fenotipo de la interacción tras reincorporar la presa en la levadura que expresa la quinasa.

Como resultado de este rastreo, se ha comprobado que la proteína quinasa PksA interacciona con las proteínas KapA (Mxan7181) y KapC (Mxan1668), pertenecientes al grupo de proteínas Mkap (*multi-kinase associated protein*) por su capacidad para contactar con diferentes ePKs de *M. xanthus* (Nariya e Inouye, 2005a).

KapA es una proteína de pequeño tamaño formada por 151 aminoácidos portadora de un motivo de tipo dedo de zinc. En el centro de la proteína (residuos 50-68), KapA contiene la secuencia CX₃CX₉HX₃H que corresponde con un dedo de zinc de tipo C₂H₂, muy común en muchas proteínas de eucariotas. En este estudio, el fragmento de ADN detectado en la cepa MspC3 1 cifra un segmento de la proteína KapA formado por 119 aminoácidos, que comprende desde el residuo 33 al 151 de esta proteína. Esta región que contiene el motivo dedo de zinc, es la responsable de contactar con la porción intracelular de la proteína PksA.

KapC es una proteína de gran tamaño con 1167 aminoácidos, que contiene tres repeticiones en tándem de un dominio fibronectina FN3 situado entre los residuos 252 al 507 de la proteína. Durante este rastreo, se han identificado dos fragmentos de ADN pertenecientes a las cepas MspC3 4 y AciC3 16, que codifican diferentes porciones de KapC, implicadas en la asociación con la región citoplasmática de PksA. En el primer caso, el fragmento detectado cifra un segmento de gran tamaño que comienza en el residuo 168 y se extiende a lo largo de las 3 repeticiones FN3, mientras que el segundo de estos fragmentos tan sólo incluye las dos primeras repeticiones, partiendo desde el residuo 107 de KapC.

Finalmente, durante el rastreo de la genoteca, se han detectado dos proteínas novedosas no identificadas previamente, codificadas por los genes Mxan1834 y Mxan5813, capaces de contactar de forma específica con la quinasa PksA. La primera de ellas ha sido identificada a partir de un fragmento de ADN cromosómico portado por la cepa MspC1 6, cuya expresión como presa genera una interacción fuerte con la porción intracelular de la quinasa. En cambio, la segunda procede de un segmento de ADN cromosómico obtenido a partir de la cepa MspC1 5, que al ser expresado determina una interacción débil con la misma región de la quinasa. Ambas proteínas corresponden a proteínas hipotéticas de función desconocida, por lo que se ha emprendido la caracterización de cada una de ellas para conocer su papel dentro de la ruta de señalización activada por la quinasa PksA.

XI. 4. Caracterización de la proteína Pfl (Mxan1834)

El Mxan1834 codifica una proteína hipotética soluble de pequeño tamaño constituida por 151 aminoácidos. La secuencia de esta proteína carece de motivos funcionales reconocidos e igualmente tan sólo mantiene similitud con la proteína Sa1265 de *S. aurantiaca*. En el genoma, el gen que codifica esta proteína se sitúa dentro de una amplia región de 16.3 kb, formada por 19 genes orientados en la misma dirección dentro de una posible unidad transcripcional. Varios de estos genes codifican para proteínas de la etapa tardía de la infección por bacteriófagos, por lo que esta región presenta cierta semejanza con una estructura genética de tipo profago. De esta forma, la proteína cifrada por el Mxan1834 se denominó Pfl (proteína similar a profago).

XI. 4. 1. Interacción de la proteína Pfl con la quinasa PksA

La proteína Pfl (Mxan1834) contacta con la porción citoplasmática de la proteína PksA en el sistema del doble híbrido de levadura. La región implicada en el contacto con la quinasa corresponde con la porción C-terminal de la proteína Pfl, que incluye un segmento de 83 aminoácidos, desde el residuo 68 al 151 en esta proteína. Por tanto, una vez detectada la interacción con la proteína Pfl durante el rastreo de la genoteca, se ha tratado de identificar la región de la quinasa necesaria para el contacto con esta proteína en el sistema del doble híbrido.

Para ello, se ha introducido en una cepa de levadura que expresa la porción interaccionante de la proteína Pfl, los tres plásmidos cebo previamente construidos, pGBK-PKc, pGBK-DC y pGBK-DR, que cifran las distintas regiones de la quinasa expuestas hacia el citoplasma: la porción intracelular completa (control positivo), el dominio catalítico y el dominio regulador, respectivamente. Los transformantes seleccionados en cada caso se sembraron en medio mínimo selectivo sin histidina y/o adenina para comprobar su capacidad de crecimiento, como muestra la Figura 70.

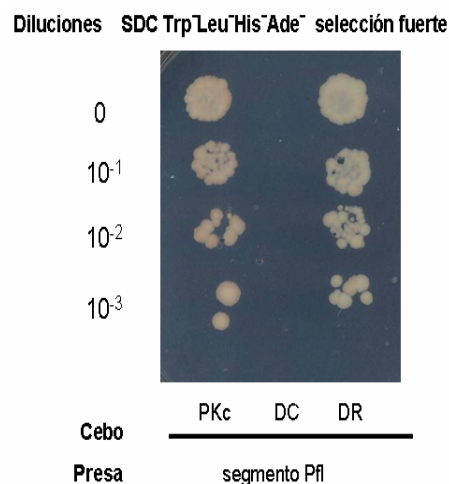


Figura 70. Análisis de la expresión de los marcadores nutricionales *HIS3* y *ADE2* sobre medio mínimo selectivo durante el estudio de la interacción PksA-Pfl. Las estirpes de levadura crecidas a DO_{600} de 0.5 se sembraron mediante diluciones decimales seriadas sobre medio SDC Trp⁻ Leu⁻ His⁻ Ade⁻ y se incubaron durante cinco días a 30°C. El resultado obtenido es similar al crecimiento desarrollado por estas estirpes en el medio SDC Trp⁻ Leu⁻ His⁻ (no mostrado).

Por último, se ha determinado la actividad β -galactosidasa de cada una de estas estirpes de levadura para valorar la fuerza de la interacción de la proteína Pfl con las distintas regiones de la quinasa PksA. En la Figura 71 se muestran los valores de actividad en las estirpes generadas para la caracterización de la interacción PksA-Pfl.

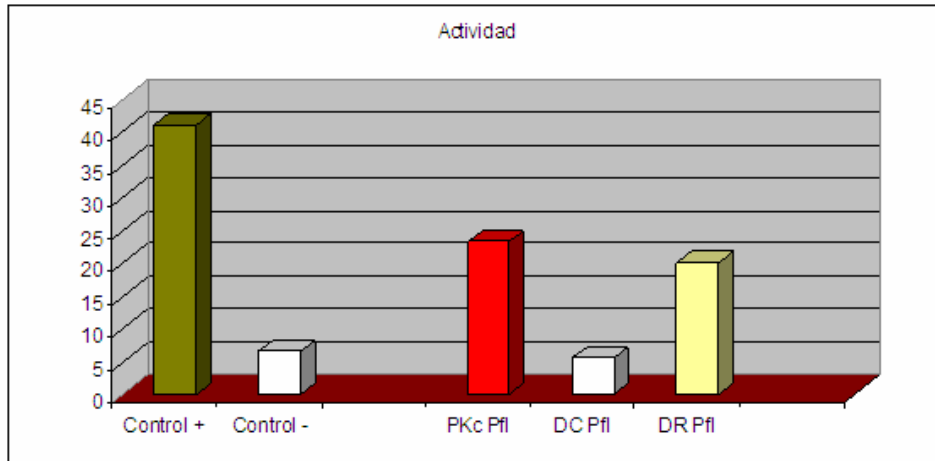


Figura 71. Análisis cuantitativo de la expresión del marcador enzimático *lacZ*, que codifica para la enzima β -galactosidasa durante el estudio de la interacción PksA-Pfl, expresado en nmol ONP/mg-min. La desviación estándar de la actividad enzimática β -galactosidasa para las muestras analizadas es inferior a una unidad.

El análisis de la expresión de los diferentes marcadores en estas estirpes permite concluir que la interacción de la quinasa PksA con la proteína Pfl depende tan sólo del contacto mediado por la región reguladora de la quinasa. La cepa que expresa como cebo al dominio regulador (DR) es capaz de crecer en medio selectivo, y presenta una actividad β -galactosidasa similar a la cepa con la región intracelular completa (control positivo), mientras que aquella que expresa el dominio catalítico (DC) no induce ningún marcador.

XI. 4. 2. Expresión del gen *pfl*

El patrón de expresión de la proteína Pfl durante el ciclo de vida de *M. xanthus* ha sido analizado mediante la construcción de una cepa portadora de una fusión *lacZ* con este gen. La obtención del plásmido con la fusión *lacZ* del gen *pfl* se llevó a cabo tras la amplificación por PCR de un segmento aguas arriba de este gen con un tamaño de 0.6 kb, desde un molde de ADN cromosómico con los cebadores apropiados (ver C.IV.2). El producto obtenido, que incluye los nueve codones iniciales del gen *pfl*, se digirió con *KpnI* y *BamHI* al igual que el vector pKY481. Por último, se generó el plásmido pKY-*pfl* tras la inserción en fase de este fragmento inmediatamente por delante del gen *lacZ* en el vector.

Finalmente, se generó la cepa portadora de la fusión *lacZ* con el gen *pfl* tras la integración del plásmido pKY-*pfl* en el cromosoma de la estirpe silvestre de *M. xanthus*. La estirpe resultante, denominada *pfl-lacZ*, se verificó mediante Southern blot. Las preparaciones de cromosoma digeridas con *XhoI* tanto de la cepa silvestre como de aquella que contiene presuntamente la fusión *pfl-lacZ*, fueron hibridadas con una sonda marcada correspondiente al fragmento aguas arriba del gen *pfl*. La sonda reconoce un fragmento de 5.4 kb en el silvestre, mientras que la inserción del vector con una diana *XhoI* adicional determina que la sonda se una a dos fragmentos de 12.0 kb y 2.2 kb en la fusión. En la Figura 72 se aprecia que la colonia analizada contenía en el cromosoma la fusión del gen *pfl* con el gen *lacZ* de *E. coli*.

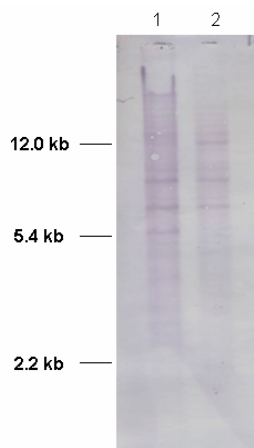


Figura 72. Southern blot para la identificación de la cepa portadora de la fusión del gen *pfl* (Mxan1834) con el gen *lacZ* de *E. coli*. Líneas 1: ADN cromosómico digerido con *Xho*I de la estirpe silvestre (control). Línea 2: ADN cromosómico de la colonia presuntamente positiva digerida con *Xho*I.

El análisis cualitativo de la actividad β -galactosidasa de la cepa *pfl-lacZ* en placas con X-gal indica que el gen *pfl* no se expresa a niveles detectables ni durante el crecimiento vegetativo en CTT ni tampoco a lo largo del desarrollo, en CF o TPM, ya que esta bacteria fue incapaz de desarrollar un color azulado bajo las condiciones establecidas. De igual forma, la cuantificación de actividad β -galactosidasa no ofreció resultados significativos, lo que ha impedido conocer el perfil de expresión del gen *pfl* a lo largo del ciclo de vida de *M. xanthus*.

XI. 4. 3. Delección del gen *pfl*

El papel de la proteína Pfl en relación con la quinasa PksA durante el ciclo de vida de *M. xanthus* se ha tratado de estudiar mediante la obtención de una cepa mutante carente del gen *pfl*.

El plásmido con la delección en fase del gen *pfl* se ha obtenido tras proceder a la clonación de dos segmentos de 0.6 kb situados justo por encima y por debajo de este gen en el vector pBJ113. Para ello, se llevó a cabo la amplificación por PCR de ambos brazos a partir de un ADN cromosómico molde de *M. xanthus* con los pares de cebadores necesarios en cada caso (ver C.IV.2). Así, se obtuvo un fragmento *Kpn*I-*Bam*HI correspondiente a la región aguas arriba junto con otro fragmento de ADN *Bam*HI-*Hind*III inmediatamente aguas abajo. Finalmente, ambos segmentos de ADN digeridos se clonaron en el vector pBJ113 para generar el plásmido portador de la delección pBJ-*pfl*.

Tras electroporar este plásmido en la cepa silvestre de *M. xanthus*, se originaron merodiploides resistentes a kanamicina con el plásmido pBJ-*pfl* integrado en el cromosoma, que fueron comprobados por Southern blot. Sin embargo, a partir de este intermediario no fue posible aislar segregantes haploides, debido a que en este caso el merodiploide era capaz de crecer en un medio con galactosa, enmascarando a aquellas células que eliminaron el plásmido mediante recombinación en ausencia de presión selectiva. Al carecer de un sistema apropiado de selección, todas las colonias obtenidas correspondían a intermediarios que conservaban el plásmido inserto en el cromosoma y que por tanto, no habían perdido el gen *pfl*.

Un sistema alternativo para la obtención de mutantes en fase consiste en la utilización del plásmido pKY-*oar*, un derivado del vector pKY481 al que se le ha insertado el promotor constitutivo del gen *oar* de *M. xanthus* justo por delante del gen *lacZ* de *E. coli* en el vector. En este caso, la expresión de la enzima β -galactosidasa actúa como marcador fenotípico para seguir la delección del gen diana, puesto que la integración del vector en el intermediario genera colonias azules, mientras que su posterior eliminación en los segregantes haploides se diferencia por la pérdida de esta coloración en las colonias resultantes. Esta estrategia evita los problemas asociados con la escasa toxicidad de la galactosa sobre el intermediario para la obtención del mutante Δpfl , al facilitar la selección fenotípica de los recombinantes.

Por tanto, siguiendo esta estrategia, se procedió a clonar los brazos portadores de la delección del gen *pfl* sobre la diana *KpnI* del plásmido pKY-*oar*. Para ello, se amplificaron por PCR ambos brazos de forma conjunta desde el vector pBJ-*pfl*, empleando cebadores que flanquean a estos segmentos e incorporan extremos *KpnI* (ver C.IV.2). El producto de PCR digerido con esta enzima se insertó en el vector pKY-*oar* previamente digerido y desfosforilado para evitar su religado, dando lugar al plásmido pKY-*oar pfl*.

De forma similar al caso anterior, se aislaron merodiploides resistentes a kanamicina tras introducir el plásmido pKY-*oar pfl* en la cepa silvestre de *M. xanthus* mediante electroporación y se comprobaron por Southern blot. La expresión de la enzima β -galactosidasa permitió diferenciar a este intermediario por la adquisición de una tonalidad azulada en placas con X-gal como indicador. Finalmente, se creció esta cepa en ausencia de presión selectiva para facilitar la pérdida del plásmido y generar así el mutante Δpfl . En este caso, ha sido posible identificar y seleccionar en placas con X-gal colonias segregantes haploides sin plásmido de tonalidad amarilla, carentes por tanto de actividad β -galactosidasa.

Las colonias candidatas obtenidas se analizaron por PCR empleando como molde el cromosoma de cada una de las estirpes a partir de los cebadores empleados para amplificar ambos brazos. A partir del silvestre se amplifica un producto de 1.62 kb, que incluye el gen *pfl* con 0.45 kb, mientras que el mutante de delección Δpfl da lugar a un fragmento de tan sólo 1.2 kb. Tal como se muestra en la Figura 73, todas las cepas analizadas correspondían con silvestres generados mediante reversión. Tras analizar un total de 20 colonias haploides, en todos los casos se obtuvo un amplificado de tamaño similar al control. De esta forma, la delección del gen *pfl* parece ser letal para *M. xanthus*, y por ello no se ha podido generar una cepa mutante para Pfl.

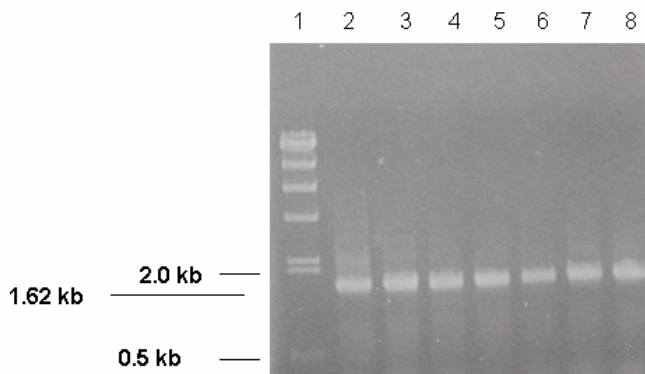


Figura 73. PCR para la identificación de la cepa mutante de delección en fase del gen *pfl* (Mxan1834). En la imagen, aparecen los productos de PCR obtenidos tras la amplificación con los cebadores Pfl MutLacZ *KpnI* y Pfl Mut HindR a partir del cromosoma de la cepa silvestre (calle 2), y de las diferentes colonias candidatas (calles 3-8).

XI. 5. Caracterización de la proteína Znf (Mxan5813)

El Mxan5813 codifica para una proteína hipotética formada por 787 aa, con un segmento transmembrana putativo situado entre los residuos 607-629. Esta proteína presenta un dedo de zinc en el extremo N-terminal (TIGR02098), común a muchas proteínas procariotas, con un motivo de tipo CX₂CX₁₉CX₂C. Esta región, que ocupa la porción comprendida entre los residuos 5 a 31 en la proteína, es común a la proteína AgmX de *M. xanthus*, implicada en el control de la movilidad aventurera (Youderian *et al.*, 2003). Este tipo de motivo presenta cierta semejanza con la región reguladora C1 de unión a segundos mensajeros lipídicos (DAG/ésteres de forbol) en ePKs como la PKC, aunque en este caso aparecen dos cisteínas e histidinas adicionales en torno a un núcleo formado por estas dos parejas de cisteínas. Por ello, la proteína codificada por el Mxan5813 se denominó Znf (proteína con dedo de zinc)

XI. 5. 1. Interacción de la proteína Znf con la quinasa PksA

La proteína Znf (Mxan5813) interacciona con la porción intracelular de la proteína PksA en el sistema del doble híbrido de levadura. El segmento de Znf que se asocia con la quinasa se identifica con una región que ocupa el centro de la proteína con 103 aminoácidos, entre los residuos 395 al 498, y que no incluye al dedo de zinc N-terminal. De esta forma, en este caso, el contacto de la quinasa con esta proteína no depende de la asociación con este motivo. Tras identificar la interacción con la proteína Znf, se ha procedido a delimitar la región de la quinasa implicada en el contacto con esta proteína.

A partir de una cepa de levadura portadora del plásmido presa, que cifra el segmento interaccionante de la proteína Znf, se han incorporado tres plásmidos cebo diferentes, pGBK-PKc, pGBK-DC y pGBK-DR, que a su vez expresan distintas regiones de la quinasa: la porción intracelular (control positivo), el dominio catalítico y el dominio regulador, respectivamente. Las estirpes resultantes se sembraron en medio SDC Trp⁻ Leu⁻, y una vez crecidas, se analizó su capacidad de crecimiento sobre medio selectivo carente de histidina y/o adenina, tal como muestra la Figura 74.

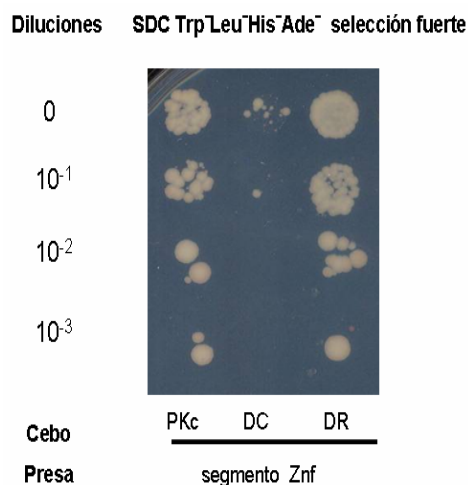


Figura 74. Análisis de la expresión de los marcadores nutricionales *HIS3* y *ADE2* sobre medio mínimo selectivo durante el estudio de la interacción PksA-Znf. Las estirpes de levadura crecidas a DO₆₀₀ de 0.5 se sembraron tras realizar diluciones decimales sobre medio SDC Trp⁻ Leu⁻ His⁻ Ade⁻ y se incubaron durante cinco días a 30°C. El crecimiento resultante es similar al obtenido en el medio SDC Trp⁻ Leu⁻ His⁻.

Finalmente, se ha cuantificado la fuerza de la interacción de la proteína Znf con cada región de la quinasa mediante la determinación de la actividad β -galactosidasa en cada una de las estirpes de levadura. En la Figura 75 se indican los valores de actividad generados por las distintas estirpes analizadas durante la caracterización de la interacción PksA-Znf.

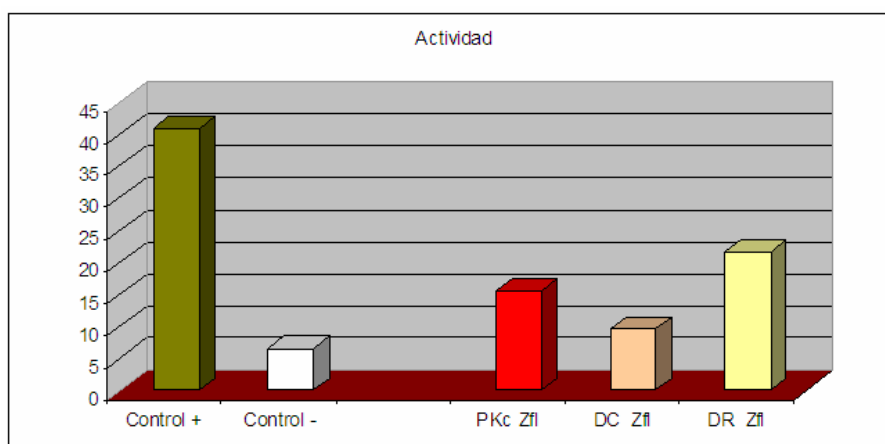


Figura 75. Análisis cuantitativo de la expresión del marcador enzimático *lacZ*, que codifica para la enzima β -galactosidasa durante el estudio de la interacción PksA-Znf, expresado en nmol ONP/mg-min. La desviación estándar de la actividad enzimática β -galactosidasa para las muestras analizadas es inferior a una unidad.

Ambos resultados indican que tanto el dominio catalítico como el dominio regulador participan en la interacción de la quinasa PksA con la proteína Znf. Sin embargo, la región reguladora es la responsable principal del contacto con la proteína diana, puesto que la cepa que expresa esta porción de la quinasa presenta un crecimiento más fuerte sobre medio selectivo y además desarrolla niveles de actividad β -galactosidasa mucho más elevados que aquella que expresa el dominio catalítico.

XI. 5. 2. Expresión del gen *znf*

La obtención del perfil de expresión de la proteína Znf requiere la obtención de una estirpe de *M. xanthus* portadora de una fusión *lacZ* con el gen *znf*. La construcción del plásmido portador de la fusión *lacZ* se inició con la amplificación por PCR de un fragmento de 0.8 kb situado justo por encima del gen *znf*, a partir del cromosoma de *M. xanthus* con los cebadores adecuados (ver C.IV.2). Este segmento de ADN, que contiene los primeros cinco codones del gen *znf*, se digirió con *KpnI* y *BamHI*, al igual que el plásmido pKY481 y se clonó en fase justo por delante del gen *lacZ* en el vector. El plásmido resultante fue denominado pKY-*znf*.

La cepa portadora de la fusión *lacZ* con el gen *znf* se obtuvo tras la inserción del plásmido pKY-*znf*, incorporado previamente por electroporación, en el cromosoma de la estirpe silvestre de *M. xanthus*. La cepa resultante, denominada *znf-lacZ*, se analizó mediante Southern blot para comprobar que el plásmido se había integrado en la posición correcta en el cromosoma de la bacteria. Los fragmentos de ADN *BamHI* obtenidos tras la digestión de la preparación de cromosoma de la estirpe silvestre y de las colonias presuntamente portadoras de la fusión se hibridaron con el segmento amplificado por PCR marcado con digoxigenina. Esta sonda se une a un fragmento de 14.3 kb en el silvestre, mientras que en la cepa *znf-lacZ*, lo hace sobre dos fragmentos de 14.8 kb y 8.6 kb, por incorporación de la diana *BamHI* en el vector. En la Figura 76 se observa que todas las colonias analizadas portaban la fusión del gen *znf* con el gen *lacZ* en su cromosoma.

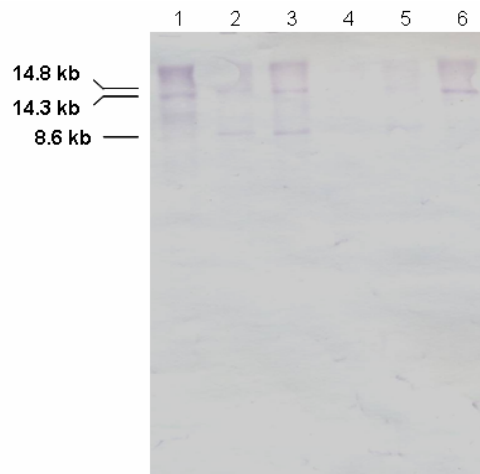


Figura 76. Southern blot para la identificación de la cepa portadora de la fusión del gen *znf* (Mxan5813) con el gen *lacZ* de *E. coli*. Calles 1 y 6: ADN cromosómico digerido con *Bam*HI de la estirpe silvestre (control). Calles 2-5: ADN cromosómico de las colonias a analizar digeridas igualmente con *Bam*HI.

El análisis cualitativo de la actividad β -galactosidasa de la cepa portadora de la fusión *znf-lacZ* en placas con X-gal no presentaba actividad detectable, ya que la estirpe no adquirió tonalidad azulada en las condiciones ensayadas, ni durante el crecimiento vegetativo en medio CTT ni durante el desarrollo, en CF y TPM. La valoración cuantitativa de esta actividad no dio resultados apreciables, por lo que no ha sido posible establecer en tiempo y nivel de expresión del gen *znf*.

XI. 5. 3. Delección del gen *znf*

El rol desempeñado por la proteína Znf en relación con la quinasa PksA durante el ciclo de vida de *M. xanthus* se trató de estudiar mediante el análisis fenotípico de una cepa mutante poseedora de una delección para el gen *znf*.

La construcción del plásmido con la delección en fase del gen *znf* se realizó mediante la amplificación por PCR de dos brazos de 0.8 kb en torno al gen diana, tomando como molde el ADN cromosómico de *M. xanthus*, a partir de los pares de cebadores necesarios en cada caso (ver C.IV.2). Así, se obtuvo un fragmento de ADN *Kpn*I-*Bam*HI por encima del gen a deleccionar y de igual forma, se generó otro fragmento *Bam*HI-*Hind*III, en este caso a partir de la región situada justo por debajo del gen *znf*. Tras digerir ambos brazos con las enzimas adecuadas, se clonaron en el vector pBJ113 dando lugar al plásmido portador de la delección pBJ- *znf*.

Finalmente, el vector pBJ-*znf* electroporado a la cepa silvestre de *M. xanthus* se integró en el cromosoma de esta bacteria, para dar lugar al intermediario merodiploide resistente a kanamicina. A partir de él, se trató de obtener el mutante Δ *znf*, tras facilitar la pérdida del vector en ausencia de presión selectiva. Los segregantes haploides resultantes se seleccionaron en un medio con galactosa y se comprobó su sensibilidad a kanamicina. Finalmente, las colonias candidatas obtenidas carentes del plásmido se analizaron mediante Southern blot, para diferenciar entre revertientes a silvestre y mutantes de delección Δ *znf*.

Las preparaciones cromosómicas digeridas con *Bam*HI pertenecientes a las distintas colonias a analizar y al silvestre (control), se hibridaron con la sonda, el brazo 5' del gen *znf*. La reversión a silvestre da lugar a la aparición de una banda de 14.3 kb, mientras que la delección del gen *znf* determina que la sonda se una a un fragmento de 8.6 kb, por la inserción de una diana *Bam*HI entre ambos brazos. Como se aprecia en la Figura 77, todas las estirpes estudiadas se identifican con bacterias silvestres que conservan el gen *znf*. El análisis de un total de 20 colonias indica que la delección de este gen tiene un efecto letal, puesto que en todos los casos las estirpes aisladas correspondían con silvestres obtenidos mediante reversión. Por tanto, ha sido imposible obtener una cepa mutante para *Znf*, ya que esta proteína parece ser esencial para el crecimiento de *M. xanthus*.

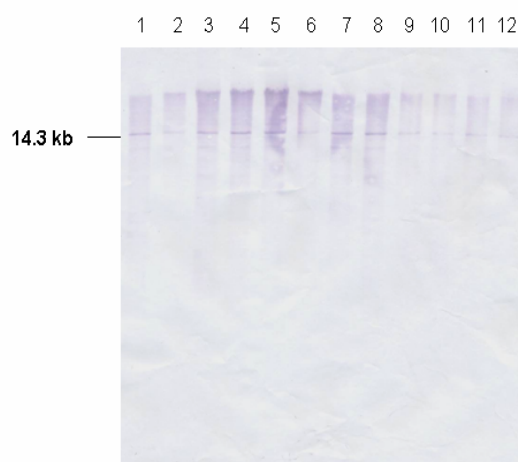


Figura 77. Southern blot para la identificación de la cepa mutante de delección en fase carente del gen *znf* (Mxan5813). Calles 1 y 7: ADN cromosómico de la estirpe silvestre empleado como control digerido como *Bam*HI; calles 2-6 y 8-12: ADN cromosómico de las colonias candidatas (segregantes haploides sin plásmido) igualmente digeridas con *Bam*HI.



E. DISCUSIÓN



E. DISCUSIÓN

I. ePKs en mixobacterias

I. 1. Relevancia de las ePKs en mixobacterias

El análisis durante este estudio del número de genes para ePKs en los genomas secuenciados de diferentes especies de mixobacterias revela la presencia de un abundante complemento de este tipo de quinasas dentro de este grupo de bacterias. Como ejemplo, la mixobacteria modelo *M. xanthus* posee un total de 99 ePKs, mientras que *S. cellulosum* contiene hasta 317 ePKs. El elevado contenido en ePKs en las mixobacterias se sitúa muy por encima de la presencia de este tipo de proteínas en el resto de procariotas, siendo comparable el encontrado en microorganismos eucariotas como levaduras. El porcentaje de genes destinados a ePKs en *S. cellulosum* alcanza el 3.4%, duplicando la proporción de genes de este tipo cifrada por el genoma humano (Manning *et al.*, 2002b). Además, dentro de las mixobacterias el número de ePKs se incrementa de forma exponencial con el aumento en el tamaño del genoma y no de forma lineal como en el resto de procariotas.

En bacterias, las rutas de señalización predominantes durante la transducción de señales son los sistemas reguladores de dos componentes (Kim y Forst, 2001), mientras que el contenido en ePKs suele ser minoritario. Sin embargo, la elevada proporción de Ser/Thr y Tyr quinasas en las mixobacterias se aproxima al contenido en histidina quinasas típicas de los sistemas de dos componentes (99 ePKs frente a 133 histidina quinasas en *M. xanthus*) (Goldman *et al.*, 2006), lo que representa una situación única dentro de los procariotas. Este resultado revela que en mixobacterias las rutas de señalización basadas en ePKs han de constituir un mecanismo de considerable relevancia para la señalización celular. Por tanto, estos microorganismos se asemejan a los eucariotas en relación a los mecanismos empleados para la transducción de las señales recibidas por la célula.

Las mixobacterias presentan un comportamiento multicelular durante el desarrollo, en donde se producen procesos muy sofisticados de coordinación celular, intercambio de señales y diferenciación celular (Kaiser, 2003). En las especies de las cianobacterias y actinobacterias, con un contenido en ePKs considerable, tienen lugar procesos celulares equivalentes a los que ocurren en las mixobacterias, como es la formación de heteroquistes en cianobacterias o la generación de esporas en el micelio aéreo de estreptomicetos (Wang *et al.*, 2002; Petrickova y Petricek, 2003). De igual forma, todos ellos comparten la capacidad para la biosíntesis de una amplia diversidad de metabolitos secundarios.

Por tanto, parece que las ePKs conforman rutas esenciales para la regulación de procesos complejos, como es el control del desarrollo multicelular y el metabolismo secundario en bacterias. La regulación de este tipo de actividades requiere mecanismos de transducción de señales más elaborados, a los cuales contribuyen de forma clave las rutas de señalización integradas por ePKs. De hecho, las cascadas de ePKs conforman con frecuencia redes de proteínas que permiten una elevada integración del conjunto de señales recibidas para generar respuestas mucho más precisas frente a las condiciones del medio, a diferencia de las rutas lineales características de los sistemas de dos componentes (Cashin *et al.*, 2006).

Los mecanismos de señalización de tipo eucariota desarrollados por las mixobacterias permanecen muy conservados dentro de los miembros de este grupo. El análisis de la sintenia de diferentes ePKs permite comprobar que en muchos casos se conserva la región

cromosómica completa que rodea a cada ePK en el genoma de las diferentes especies de mixobacterias. Puesto que en muchos casos los genes adyacentes codifican proteínas relacionadas a nivel funcional con cada quinasa, parece que la mayor parte de rutas basadas en ePKs en las especies de este grupo corresponden con sistemas de transducción de señales que permanecen muy constantes dentro de las mixobacterias, y que por tanto, desempeñan mayoritariamente funciones específicas de este grupo, como el control del desarrollo.

En este sentido, en la bacteria *M. xanthus*, la mayoría de quinasas caracterizadas se encuentran implicadas en la regulación de los distintos eventos que conforman el desarrollo, como se describió en la Introducción de este trabajo. En *M. xanthus*, el análisis del patrón de expresión de un grupo de ePKs seleccionadas entre los miembros de esta familia confirma la relación de las ePKs con el control del desarrollo en las mixobacterias. Así, entre las diez quinasas analizadas, todas aquellas cuya expresión ha podido ser determinada se expresan predominantemente durante el desarrollo, induciendo su expresión ante el agotamiento de nutrientes, e incluso, la expresión de dos de ellas se produce exclusivamente durante esta etapa. El tiempo de expresión diferencial de cada una de las quinasas estudiadas se asocia de forma plausible con el control de los diferentes eventos que se suceden durante el desarrollo.

El análisis global del conjunto de ePKs en las mixobacterias realizado durante este trabajo revela que esta familia de proteínas se ha expandido considerablemente en este grupo de bacterias mediante fenómenos de duplicación y divergencia génica. Este proceso evolutivo de amplificación específico de este grupo ha contribuido a incrementar el tamaño del genoma de estos microorganismos, a la vez que ha dotado a las mixobacterias de una enorme diversidad de proteínas de señalización capaces potencialmente de regular múltiples actividades celulares. La duplicación génica es un mecanismo evolutivo muy potente para la adquisición de funciones génicas novedosas, al aportar el material necesario para la modificación de una o ambas copias génicas, y con ello mejorar la adaptación del organismo al medio (Pushker *et al.*, 2004; Gevers *et al.*, 2004).

El incremento en el número de ePKs en las mixobacterias colabora de forma evidente en el enorme potencial adaptativo de estas bacterias, facilitando la colonización de una amplia diversidad de nichos ecológicos (Dawid, 2000). En el suelo, el hábitat principal de las mixobacterias, estos microorganismos se enfrentan a condiciones nutricionales y ambientales muy variables, por lo que la adquisición de un abundante complemento de ePKs para la detección de las señales del medio confiere a estas bacterias una ventaja selectiva sobre la microbiota edáfica para su supervivencia en este medio. De hecho, se ha verificado que las bacterias con un número más elevado de componentes de señalización en relación al tamaño de su genoma son aquellas que poseen mayor versatilidad ecológica (Galperin, 2005).

En el genoma de *M. xanthus* se ha comprobado que las familias de proteínas amplificadas selectivamente corresponden con componentes implicados en el control de la expresión génica, la comunicación intercelular y la transducción de señales (Goldman *et al.*, 2006). Estas conclusiones se encuentran en consonancia con los resultados obtenidos en relación a las proteínas de señalización de tipo ePKs analizadas durante este estudio en esta bacteria, al igual que en *S. aurantiaca*, *P. pacifica*, y *S. cellulosum*, en los cuales la proporción de genoma dedicada a este tipo de quinasas se incrementan exponencialmente. Tan sólo las mixobacterias pertenecientes al género *Anaeromyxobacter* presentan un número modesto de ePKs, debido a la adaptación de esta bacteria a un nicho ecológico especializado anaerobio con condiciones más estables (Sanford *et al.*, 2002).

I. 2. Características generales de las ePKs en mixobacterias

Las ePKs identificadas en mixobacterias comparten todas ellas un dominio catalítico conservado formado por once subdominios, que en la mayoría de los casos se ajusta al consenso propuesto para esta región, por lo que constituyen quinasas funcionales. En ocasiones, en torno al 20% de ePKs detectadas han sufrido un proceso más acusado de divergencia y especialización, por lo que presentan ciertas variaciones en su secuencia aunque mantienen los residuos clave para la actividad. Sin embargo, al igual que ocurre en muchos eucariotas (Manning *et al.*, 2002b), algunas ePKs (5-10% del total) carecen de residuos esenciales para la actividad, denominándose quinasas no K o bien no D, en función del residuo reemplazado. Aunque en ocasiones este tipo de quinasas emplean un mecanismo catalítico diferente (Xu *et al.*, 2000), se ha demostrado que estas proteínas participan de forma predominante en las rutas de señalización como moduladores o sustratos de otras quinasas activas o como proteínas de sostén para el ensamblaje de complejos multiproteicos de señalización (Boudeau *et al.*, 2006).

El estudio de las características de las ePKs dentro del grupo de las mixobacterias indica que el incremento en el número de este tipo de proteínas se asocia con un aumento proporcional de su tamaño. Este incremento permite que la mayoría de quinasas (en torno al 80% en *M. xanthus*) posean de forma adicional un dominio regulador C-terminal para modular la actividad catalítica de la quinasa, lo que a su vez aporta una capacidad de control más precisa a la señalización celular dependiente de ePKs en las mixobacterias. En esta región se puede comprobar que la combinación de motivos funcionales asociados al dominio catalítico es cada vez más variada y diversa a medida que crece el número de ePKs, culminando este proceso en *S. cellulosum*, que posee un elevado número de ePKs multidominio. Por tanto, a medida que aumenta el contenido de quinasas en las mixobacterias, la señalización basada en ePKs se hace mucho más compleja mediante el desarrollo de ePKs más especializadas desde un punto de vista funcional.

La actividad de las ePKs normalmente se encuentra regulada en función de la presencia o ausencia de un estímulo concreto, empleando para ello diferentes mecanismos de control, como la fosforilación del segmento de activación o de regiones diferentes de la quinasa, la interacción con proteínas reguladoras o la unión a segundos mensajeros (Rubenstein y Schmidt, 2007). En relación con el control de la actividad, las quinasas RD se regulan mediante fosforilación del segmento de activación, a diferencia de las no RD (Huse y Kuriyan, 2002; Nolen *et al.*, 2004). En *M. xanthus*, todas las ePKs de tipo RD estudiadas se autofosforilan, mientras que se ha comprobado que la única quinasa no RD caracterizada, la PknD2, es activa pero no se autofosforila (Stein *et al.*, 2006).

En este sentido, se ha identificado que las ePKs en mixobacterias pertenecen de forma mayoritaria al grupo de quinasas RD, por lo que es posible concluir que el mecanismo más común de regulación de la actividad en las ePKs de mixobacterias es la fosforilación del segmento de activación, al igual que ocurre en eucariotas. Este hecho viene avalado por la presencia de múltiples residuos aceptores de Ser y Thr en la región de activación de las quinasas RD de *M. xanthus*, a diferencia de lo que ocurre en las de tipo no RD. De hecho, se ha identificado una posición conservada dentro de esta región que actúa probablemente como aceptor, aunque es posible que en muchos casos se fosforilen varios residuos simultáneamente, como ocurre en muchas ePKs bacterianas (Boitel *et al.*, 2003; Madec *et al.*, 2003; Duran *et al.*, 2005).

La regulación de la actividad mediante fosforilación es compatible con la presencia de mecanismos de control adicionales, como ocurre en la Pkn4, una quinasa que se activa mediante fosforilación, y se inhibe por la unión de la proteína reguladora KapB (Nariya e Inouye, 2005a). El número de quinasas de tipo no RD detectadas en mixobacterias se sitúa entre el 9-22%, una proporción dentro del rango detectado en organismos eucariotas, que oscila entre el 9-29%. Las quinasas no RD se asocian con funciones especializadas como la inmunidad y el control del ciclo celular en eucariotas (Dardick y Ronald, 2006), por lo que es posible que en mixobacterias este tipo de ePKs desempeñen el control de funciones celulares complejas.

La especificidad catalítica en las ePKs permite diferenciar entre Ser/Thr quinasas respecto a las Tyr quinasas (Krupa *et al.*, 2004). El análisis de la secuencia del centro catalítico de las quinasas codificadas por *M. xanthus* ha revelado la presencia de un numeroso grupo de ePKs con la firma de Tyr quinasas (más del 40% del total de quinasas). Sin embargo, hay varias evidencias que ponen de relieve que probablemente la mayoría o la totalidad de estas ePKs se comportan como Ser/Thr quinasas. Así, mientras las Tyr quinasas de eucariotas se activan por fosforilación de residuos de tirosina (Hubbard y Till, 2000), durante este estudio se ha comprobado que todas las ePKs de *M. xanthus* reguladas mediante fosforilación poseen residuos de serina y/o treonina aceptores, pero apenas de tirosina en el segmento de activación, lo que sugiere que estas proteínas podrían fosforilarse en serina y/o treonina, al igual que sucede en las Ser/Thr quinasas (Ten Dijke y Hill, 2004).

En eucariotas superiores, las Ser/Thr quinasas conforman el grupo predominante de ePKs, mientras que las Tyr quinasas tan sólo representan una proporción minoritaria (en torno al 10% del total), constituyendo un grupo de ePKs muy evolucionado y especializado que desempeñan funciones clave para el control del crecimiento, proliferación y diferenciación celular (Hubbard y Till, 2000). Sin embargo, las Tyr quinasas se encuentran ausentes en eucariotas inferiores como levaduras (Manning *et al.*, 2002a) e igualmente no se han descrito ePKs con actividad tirosina quinasa en bacterias, a excepción de la MasK de *M. xanthus* (Thomasson *et al.*, 2002), realmente también una Ser/Thr quinasa (Inouye S. comunicación personal). En bacterias, tan sólo se ha identificado la fosforilación de residuos de tirosina por proteínas que no corresponden con ePKs (Cozzone *et al.*, 2004; Grangeasse *et al.*, 2007), lo que explica la presencia de Tyr fosfatasa en procariontes. Por tanto, desde un punto de vista evolutivo se refuerza la tesis de la especificidad sobre serina y treonina en las ePKs de mixobacterias.

I. 3. Rutas de señalización integradas por ePKs en mixobacterias

El análisis de las ePKs en mixobacterias realizado durante este estudio aporta datos clave para comprender de forma global la señalización basada en ePKs dentro de las bacterias. En *M. xanthus* se han identificado un escaso número de reguladores de tipo unicomponente, formados por una única proteína que acopla la percepción de la señal con la respuesta al estímulo (Ulrich *et al.*, 2005; Goldman *et al.*, 2006). Sin embargo, las ePKs normalmente actúan dentro de rutas de señalización formadas por varias proteínas conectadas entre sí entre las que destacan la presencia de Ser/Thr y Tyr quinasas como elemento central (Schenk y Snaar-Jagalska, 1999). De acuerdo con este hecho, la presencia de un considerable número de ePKs en las mixobacterias indica que en estos microorganismos la señalización se basa principalmente en sistemas más complejos de tipo multicomponente, al igual que ocurre en eucariotas, para conseguir un control más preciso y elaborado de las funciones celulares.

En mixobacterias se ha detectado la presencia de una considerable proporción de ePKs localizadas en la membrana, en un número que se aproxima al 40% del total codificadas por estos microorganismos. La presencia de este elevado número de ePKs sensoras permite a las bacterias detectar las condiciones del medio, estimulando a su vez la activación de rutas de señalización intracelulares de tipo eucariota para la adaptación al ambiente. Para ello, la mayoría de estas proteínas se disponen a modo de quinasas receptoras de membrana, con un dominio sensor extracelular que regula la actividad del dominio catalítico intracelular en respuesta a la presencia de un estímulo adecuado, al igual que ocurre en las Tyr y Ser/Thr quinasas receptoras de eucariotas (Hendrickson, 2006).

En bacterias, tan sólo se ha identificado una única cascada de Ser/Thr quinasas, en donde la quinasa receptora Pkn8 de *M. xanthus* fosforila a la quinasa citoplasmática Pkn14, para inhibir al factor transcripcional MrpC, un regulador clave del ciclo de desarrollo en la mixobacteria (Nariya e Inouye, 2005b). La identificación de un conjunto de ocho operones formados por parejas de ePKs en el genoma de *M. xanthus* revela que la transducción de señales basada en rutas de ePKs reguladas mediante fosforilación en cascada podría ser un mecanismo común para la señalización en mixobacterias. En estas rutas, ante una señal adecuada, una ePK fosforilaría a otra para finalmente regular la actividad de un sustrato efector que desencadenaría la respuesta celular.

El análisis de los motivos funcionales de las ePKs en mixobacterias revela la presencia en la región reguladora de motivos de interacción proteína-proteína, entre los que destacan principalmente las repeticiones TPR, así como los motivos WD-40 y las regiones ricas en prolina. Este tipo de dominios permite conectar a las ePKs con los componentes situados justo por encima y por debajo de la quinasa en una misma ruta de señalización. La presencia de estos motivos de interacción favorece la formación de cascadas entre ePKs portadoras de estos motivos, ya que se conoce que las repeticiones TPR median el contacto con proteínas de señalización que portan este mismo motivo así como con proteínas con WD-40 (D'Andrea y Regan, 2003). En este sentido, este motivo facilita la formación de redes de señalización, como suele ser característico en la señalización de tipo eucariota, en donde se interconectan diferentes vías de transducción de señales para la integración de las señales detectadas.

Junto con estas cascadas de ePKs, la mayoría de quinasas parecen formar parte de sistemas integrados por una única ePK que controla directamente a su sustrato mediante fosforilación, como suele ocurrir en la mayoría de rutas de ePKs conocidas en bacterias (Molle *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2006a; Sharma *et al.*, 2006b). Al analizar el genoma de *M. xanthus*, se aprecia que los genes que cifran la mayor parte de ePKs se sitúan en la proximidad de posibles sustratos, destacando la presencia de una abundante proporción de factores transcripcionales de unión al ADN. Entre ellos aparecen una amplia diversidad de proteínas que controlan la expresión génica, como reguladores transcripcionales con motivos HTH, factores sigma de tipo ECF o reguladores dependientes de σ^{54} . Por tanto, es posible que en respuesta a un estímulo adecuado estas ePKs controlen por sí mismas la actividad transcripcional de estos reguladores mediante fosforilación, para estimular o reprimir la expresión de diferentes genes diana.

Las ePKs generan con frecuencia rutas de señalización formadas por varias proteínas de señalización que regulan la transducción de la señal en función del estado de fosforilación de estas proteínas (Yaffe y Elia, 2001; Yaffe, 2002). Por ello, es notable la escasez en las ePKs de mixobacterias de motivos de reconocimiento de fosfoaminoácidos, capaces de reconocer secuencias diana fosforiladas en las ePK activadas. De hecho, sólo se han detectado un par de ePKs con dominio FHA en *S. cellulosum*, *P. pacifica* y una en *Anaeromyxobacter sp.* Sin embargo, se ha comprobado que muchas proteínas adyacentes en el genoma a diversas ePKs contienen dominios FHA para la unión a residuos de fosfotreonina (Pallen *et al.*, 2002; Hammet *et al.*, 2003). Por tanto, parece que las ePKs de mixobacterias se asocian en ocasiones con su sustrato o con otras proteínas reguladoras mediante dominios de fosforeconocimiento, cuya actividad depende del estado de fosforilación de las ePKs.

Un caso paradigmático es la regulación de la actividad de proteínas activadoras dependientes de σ^{54} por ePKs en mixobacterias. Se han identificado un conjunto muy numeroso de 52 activadores de σ^{54} en *M. xanthus*, muchos de ellos implicados en el control del ciclo de desarrollo o la movilidad en este microorganismo (Jelsbak *et al.*, 2005). Un total de 12 reguladores de este tipo poseen un dominio FHA, y seis de ellos se sitúan muy próximas a ePKs en el genoma (Jelsbak *et al.*, 2005). Por ello, parece que en respuesta a un estímulo, las Ser/Thr quinasas se activan mediante autofosforilación, lo que a su vez facilita la unión de estos reguladores a la ePK activada para controlar la expresión de genes diana regulados por promotores para σ^{54} . La relación con las proteínas activadoras de σ^{54} se manifiesta en *S. cellulosum*, en donde aparecen cuatro ePKs híbridas con regiones reguladoras típicas de los activadores de σ^{54} .

Las fosfatasa de tipo eucariota participan en la transducción de señales desfosforilando a las ePKs activadas así como a los sustratos previamente fosforilados (Barford *et al.*, 1998). La presencia de un conjunto de seis parejas quinasa/fosfatasa en el genoma de *M. xanthus*, cuatro de ellas dentro de un mismo operón, confirma que las rutas de ePKs en mixobacterias se encuentran reguladas por fosfatasas de tipo eucariota. Debido a la especificidad de fosforilación preferente sobre residuos de serina y/o treonina en las quinasas de mixobacterias, tan sólo se han detectado Ser/Thr fosfatasas asociadas a ePKs (5 PPP y 1 PPM SpoIIE), pero no Tyr fosfatasas. La proporción de fosfatasas es notablemente inferior al de ePKs en mixobacterias, debido a la capacidad de este tipo de proteínas de actuar sobre diferentes sustratos, por lo que es probable que una misma fosfatasa interactúe con diferentes rutas de ePKs en mixobacterias, al igual que se ha descrito en otras bacterias (Sharma *et al.*, 2006a).

En la señalización celular desarrollada por las mixobacterias, las rutas basadas en ePKs comparten una relevancia equivalente al papel desempeñado por los sistemas reguladores de dos componentes. Por ello, en estas bacterias es importante establecer si ambos sistemas de señalización funcionan por separado o bien colaboran entre sí. En levaduras y plantas, en donde coexisten ambos sistemas, los reguladores de dos componentes actúan a modo de sensores que controlan la actividad de una cascada de Ser/Thr quinasas, las MAP quinasas, como ocurre durante la respuesta a la elevada osmolaridad en *S. cerevisiae* (Hohmann, 2002; Santos y Shiozaki, 2004) o la respuesta al etileno y citocininas en *Arabidopsis thaliana* (Urao *et al.*, 2001; Grefen y Harter, 2004). En cambio, en *S. agalactiae* la ePK Stk1 controla al sistema de dos componentes CovR-CovS mediante la fosforilación del regulador de respuesta para regular la expresión de citotoxinas implicadas en la virulencia bacteriana (Rajagopal *et al.*, 2006).

En *M. xanthus*, no se conoce la relación entre ambos sistemas de señalización, pero se ha comprobado que un mismo proceso puede ser regulado a distinto nivel por ambos mecanismos de señalización (Sun y Shi, 2001a; Sun y Shi, 2001b; Nariya e Inouye, 2005b). Así, el regulador transcripcional del desarrollo MrpC se induce traduccionalmente por el sistema de dos componentes MrpA-MrpB, mientras que se inhibe a nivel post-traducciona l mediante fosforilación por la cascada de ePKs Pkn8-Pkn14. En mixobacterias, la integración entre las ePKs y los sistemas de dos componentes se pone de manifiesto por la presencia de proteínas que poseen dominios típicos de ambos sistemas. En este sentido, se han identificado proteínas que poseen un dominio catalítico ePK junto con dominios típicos de las rutas de dos componentes, como motivos de tipo histidina quinasa o regulador de respuesta.

La presencia de estas proteínas híbridas indica que ambos sistemas de señalización pueden funcionar conjuntamente, de forma que este tipo de proteínas podrían constituir los elementos de intersección entre los sistemas de dos componentes y las cascadas de ePKs. Este tipo de proteínas con motivos de señalización de diferentes sistemas es muy frecuente en las ePKs de *Nostoc sp. PCC7120* (Wang *et al.*, 2002). En la quinasa HstK de esta cianobacteria (Phalip *et al.*, 2001), el mecanismo de señalización empleado acopla de forma simultánea la actividad Ser/Thr quinasa con la His quinasa, puesto que esta proteína es capaz de autofosforilarse sobre ambos dominios, por lo que es probable que las ePKs híbridas de mixobacterias funcionen de forma similar.

Otro mecanismo empleado normalmente por las bacterias durante la transducción de señales es el empleo de segundos mensajeros (Baker y Kelly, 2004; Jenal y Malone, 2006). En ocasiones, las proteínas reguladoras de respuesta poseen motivos implicados en la síntesis o degradación de nucleótidos cíclicos como dominio efector (Galperin, 2006). De igual forma, durante este estudio se han descrito en mixobacterias proteínas que contienen un dominio catalítico ePK acoplado a un dominio ciclasa, implicado en la síntesis de AMPc/GMPc o a un motivo PilZ de unión a di-GMPc. Por tanto, parece que las rutas de señalización basadas en ePKs controlan los niveles de segundos mensajeros en la bacteria para ejercer un control sobre la actividad de aquellas enzimas celulares reguladas por nucleótidos cíclicos.

La integración entre sistemas de señalización en las mixobacterias alcanza su culminación con la interconexión de las cascadas de ePKs con los sistemas de dos componentes y los sistemas de síntesis de segundos mensajeros. Así, se han identificado quinasas híbridas que contienen un dominio ePK, un dominio regulador de respuesta y un dominio ciclasa dentro de la misma proteína. La presencia de este tipo de proteínas demuestra que en las rutas de señalización de las mixobacterias se pueden integrar potencialmente componentes pertenecientes a sistemas de señalización diferentes. Por tanto, parece que, en algunos casos, en las rutas de ePKs de mixobacterias participan proteínas de señalización típicas de los sistemas de dos componentes y/o de síntesis de segundos mensajeros.

II. Estudio de la ruta de transducción de señales PksA-PspA

II. 1. Caracterización de la quinasa PksA de *M. xanthus*

El análisis de la expresión mediante fusiones *lacZ* de un conjunto de ePKs de *M. xanthus* ha permitido conocer el perfil global de expresión de este tipo de proteínas en esta bacteria. En todos los casos, las ePKs cuya expresión ha podido ser detectada se inducen durante el desarrollo, lo que indica que muchas proteínas de este tipo se encuentran implicadas en el control del ciclo de vida de *M. xanthus*. Entre las ePKs analizadas destaca la proteína quinasa PksA, seleccionada entre todas ellas por su elevado nivel de expresión así como por su inducción selectiva durante una fase temprana del desarrollo. Por ello, se ha procedido a su caracterización para conocer el papel desempeñado que desempeña en el ciclo de vida de *M. xanthus*.

El estudio de la organización estructural de esta quinasa indica que esta proteína, constituida por 840 aminoácidos, se sitúa integrada en la membrana plasmática mediante un segmento apolar transmembrana situado entre los residuos 581 al 606 de la proteína. El análisis de la topología de esta proteína mediante fusiones *lacZ* con diferentes porciones de la quinasa ha confirmado esta disposición estructural. Así, la fusión realizada por delante de la región transmembrana presenta actividad β -galactosidasa, con la enzima en el citoplasma en forma soluble, mientras que la fusión llevada a cabo justo tras este segmento carece de actividad al exponer a la enzima hacia el periplasma debido a la presencia de la región transmembrana.

La localización celular de la proteína PksA permite afirmar que esta proteína se comporta como una quinasa receptora de membrana, que actúa a modo de proteína sensora para detectar las condiciones nutricionales y/o ambientales del entorno que rodea a la bacteria. Para ello, la quinasa dispone de una región sensora periplásmica C-terminal que se encuentra en contacto directo con el medio extracelular. En las quinasas receptoras de membrana, esta región se encarga de reconocer un ligando específico cuya unión estimula la actividad catalítica de la proteína (Hendrickson, 2006). Esta región de la proteína suele carecer de similitud reconocible con otras proteínas ya que en cada caso la señal detectada por cada receptor es diferente. Por ello, no es posible determinar el estímulo reconocido por la quinasa PksA, aunque se ha identificado en esta región la presencia de un dominio PEGA cuyo significado biológico se desconoce (Adinla *et al.*, 2004).

El mecanismo de transducción de señales empleado por las quinasas receptoras de membrana de eucariotas ha sido caracterizado en detalle. Entre este amplio grupo de proteínas, se han identificado tanto proteínas con actividad Ser/Thr quinasa como el receptor TGF β (Ten Dijke y Hill, 2004), junto con Tyr quinasas, como los receptores para factores de crecimiento (Ward *et al.*, 2007). En ambos casos, este tipo de quinasas se autofosforilan en respuesta a una señal detectada por la porción extracelular sensora. La unión del ligando extracelular desencadena un cambio conformacional que se transmite a toda la proteína, responsable de estimular la actividad del dominio catalítico intracelular, tras la autofosforilación de la proteína (Hendrickson, 2006). Se ha comprobado que las ePKs receptoras de bacterias funcionan de forma equivalente a las de eucariotas (Greenstein *et al.*, 2007), lo que permite predecir que este mecanismo de señalización probablemente sea común también para la quinasa PksA.

El dominio catalítico intracelular de la quinasa PksA contiene los once subdominios conservados que definen a esta región, así como todos los residuos clave para la actividad (Kannan *et al.*, 2007) De esta forma, el análisis de la secuencia del dominio catalítico revela que la proteína comparte todos los determinantes que caracterizan a las ePKs, y por tanto, constituye una enzima funcional con actividad catalítica. Esta proteína pertenece al grupo de quinasas RD, debido a la presencia de un residuo de arginina justo por encima del aspártico catalítico en el centro activo de la enzima. Por ello, el mecanismo de regulación de la actividad de esta enzima debería basarse en la autofosforilación de uno o varios residuos aceptores del segmento de activación del dominio catalítico, como suele ser común a todas las quinasas pertenecientes a este grupo (Huse y Kuriyan, 2002; Nolen *et al.*, 2004).

En este sentido, se ha podido inferir que la proteína quinasa PksA posee actividad catalítica *in vivo*, puesto que al ser expresada en la bacteria *E. coli* se comporta como una proteína de peso molecular 115 kD al desplazarse en un gel de proteínas muy por encima del tamaño esperado para esta quinasa de 90 kD. Esta diferencia se atribuye a la incorporación de grupos fosfato a la propia proteína mediante autofosforilación, lo que a su vez alteraría el patrón de migración de la proteína. De hecho, en múltiples ePKs caracterizadas se ha comprobado que el incremento aparente en el peso molecular de la proteína se produce por la autofosforilación de la propia quinasa, ya que la mutación puntual sobre cualquier residuo esencial para la actividad conduce a que la proteína migre con normalidad de acuerdo con su peso molecular (Motley y Lory, 1999).

El análisis de la actividad catalítica de la proteína quinasa purificada mediante cromatografía de afinidad ha confirmado que esta enzima presenta actividad catalítica quinasa. En este sentido, la proteína purificada se marca radiactivamente *in vitro* en presencia de ATP con P³², al incorporar sobre la propia proteína los grupos fosfatos marcados procedentes del ATP. Esta reacción indica que la proteína PksA es una ePK que presenta actividad catalítica *in vitro*, con capacidad para fosforilar residuos aceptores de serina/treonina o tirosina en el sustrato. La diana más certera para ser fosforilada corresponde con el segmento de activación de la proteína, al tratarse de una quinasa RD. Este resultado confirma el mecanismo de transducción de señales propuesto para esta proteína, en donde la actividad catalítica de la enzima se encuentra regulada mediante la autofosforilación de la proteína en respuesta a un estímulo adecuado, una vez que la proteína posee cierta capacidad intrínseca para autofosforilarse *in vitro*. La activación completa de este receptor dependería por tanto de la autofosforilación de uno o varios residuos aceptores en el segmento de activación.

Se han identificado dos residuos aceptores de treonina (Thr₁₈₃ y Thr₁₈₅) en el segmento de activación de la quinasa susceptibles de autofosforilación. La fosforilación de residuos de treonina de la propia proteína sugiere que esta quinasa podría presentar especificidad para la fosforilación de residuos de serina y treonina en el sustrato, al igual que sucede en las Ser/Thr quinasas de eucariotas (Ten Dijke y Hill, 2004). El aceptor primario para la fosforilación parece ser la Thr₁₈₅, ya que este residuo mantiene una posición conservada en las quinasas RD de *M. xanthus*, aunque también podría tener lugar la fosforilación simultánea de ambos residuos de treonina en el segmento de activación de la quinasa. De hecho, durante el estudio de la actividad catalítica mediante marcaje de la proteína con P³² se han detectado varias bandas pertenecientes a diferentes estados de fosforilación de la quinasa.

La fosforilación parcial de diferentes residuos aceptores posibles explica que la proteína contenga uno, dos o más grupos fosfato, generando formas proteicas parcial o totalmente fosforiladas que se diferencian a su vez claramente en relación a su migración en un gel de proteínas, como se aprecia durante el ensayo de fosforilación con la quinasa PksA. En este sentido, en aquellas ePKs como la PknB de *M. tuberculosis* en donde se ha podido determinar los residuos susceptibles de fosforilación, se ha identificado en la región de activación un par de residuos aceptores de treonina, equivalentes a los que posee la PksA, cuya fosforilación es esencial para conseguir la máxima actividad de la enzima (Boitel *et al.*, 2003; Duran *et al.*, 2005).

El dominio regulador intracelular de la quinasa PksA es otra región susceptible de fosforilación. Esta región contiene múltiples residuos aceptores de serina y treonina y de hecho, en muchas ePKs de bacterias este segmento próximo a la membrana es fosforilado sobre diferentes residuos (Duran *et al.*, 2005). En general esta fosforilación no suele modificar la actividad de la proteína, pero crea puntos para la interacción con proteínas de señalización que requieren el contacto sobre motivos fosforilados en la quinasa activada. Por tanto, es posible que la autofosforilación de la quinasa no sólo regule la actividad de fosfotransferencia del propio receptor, sino que también podría ser clave para la transducción de la señal a lo largo de la ruta de señalización, facilitando el contacto con proteínas sustrato o reguladoras para la quinasa.

II. 2. El *locus pksA*: Caracterización del regulador PspA de *M. xanthus*

El estudio de la coexpresión de los genes que integran el *locus pksA* mediante RT-PCR revela la presencia de un operón integrado por un conjunto de once genes. En este bloque genético, aparecen siete genes por encima del gen *pksA*, junto a otros tres justo por debajo, de forma que todos ellos se transcriben de forma simultánea en un mismo mensajero policistrónico. Esta unidad transcripcional se encuentra regulada por un promotor capaz de responder a señales relacionadas con el desarrollo, por lo que es probable que alguno de los productos generados por este operón participe junto con la quinasa PksA dentro de una misma ruta de transducción de señales implicada en el control del desarrollo. El análisis de las proteínas codificadas a partir de este operón sólo identifica dos proteínas de señalización capaces de modular la transducción de señales en la bacteria, la propia quinasa PksA y la proteína PspA, cifrada por el primer gen que integra el operón.

La relación funcional entre ambas proteínas coexpresadas en respuesta al agotamiento de nutrientes es clara, al tener en cuenta que la mayoría de ePKs de *M. xanthus*, como la PksA, participan en la detección de señales nutricionales (ver Introducción), mientras que la proteína PspA en *E. coli* regula la respuesta de adaptación ante la reducción de la carga energética celular, prolongando la supervivencia de la bacteria durante la fase estacionaria ante la limitación de nutrientes en el medio (Weiner y Model, 1994; Model *et al.*, 1997). En *M. xanthus*, la escasez de nutrientes produce un descenso en el aporte energético que desencadena el inicio del desarrollo para la supervivencia celular. Por tanto, ambas proteínas son muy interesantes a nivel funcional debido a la posibilidad de que participen dentro de un mismo proceso de transducción de señales asociado al control del desarrollo multicelular, inducido por la privación de nutrientes.

En *E. coli*, la proteína PspA regula la inducción de la respuesta Psp (*phage shock protein*) frente a condiciones que reducen la fuerza protón motriz en la membrana, como ocurre con los agentes de estrés ambiental, productores de un descenso en la carga energética celular (Darwin, 2005). Una vez que se activa esta respuesta, esta proteína participa como efector promoviendo la recuperación del potencial de membrana para optimizar la obtención de energía a partir de los nutrientes disponibles (Kobayashi *et al.*, 2007). De hecho, se ha comprobado en esta bacteria que el principal estímulo inductor de la proteína PspA corresponde con la pérdida del potencial de membrana, con frecuencia debido al daño sobre la propia integridad de la misma (Darwin, 2005). Además, esta proteína actúa como regulador global capaz de modular diferentes procesos, como el metabolismo, la movilidad o la respuesta al estrés, dentro de la estrategia de adaptación a la privación de nutrientes y al mantenimiento de la carga energética (Jovanovic *et al.*, 2006)

El mecanismo empleado por la proteína PspA para ejercer su función reguladora dentro de las rutas de señalización en la bacteria *E. coli* depende del establecimiento de contactos proteína-proteína, esenciales para modular la actividad de los componentes que regulan la respuesta Psp (Adams *et al.*, 2003; Elderkin *et al.*, 2002; Elderkin *et al.*, 2005). Sin embargo, *M. xanthus* no contiene ninguna otra proteína típica de la respuesta Psp de Enterobacterias, lo que unido a la elevada divergencia con el regulador PspA de *E. coli* podría explicar que esta proteína reguladora conservada en *M. xanthus* se haya adaptado a las rutas características de señalización típicas de mixobacterias, manteniendo la capacidad de regulación de la actividad de proteínas de señalización a través de contactos proteína-proteína. De hecho, en *M. xanthus*, se ha comprobado que la proteína PspA interacciona con la quinasa PksA en el sistema del doble híbrido de levadura, por lo que se ha procedido a caracterizar el papel regulador desempeñado por ambas proteínas dentro de las rutas de señalización que controlan el ciclo de vida de *M. xanthus*.

II. 3. Control del ciclo de vida de *M. xanthus* por la quinasa PksA y el regulador PspA

II. 3. 1. Control del ciclo de desarrollo por la quinasa PksA y el regulador PspA

El análisis fenotípico de los mutantes para la quinasa PksA y el regulador PspA revela que ambas proteínas se encuentran implicadas en el control del ciclo de vida de la bacteria *M. xanthus*. La carencia de cualquiera de estas proteínas no afecta al crecimiento vegetativo, pero sí influencia el transcurso del desarrollo multicelular de esta bacteria. Por tanto, ambas proteínas funcionan como reguladores encargados del control del ciclo de desarrollo de *M. xanthus*. De hecho, los niveles de expresión de ambas proteínas se incrementan de forma considerable durante el desarrollo. En este sentido, la expresión de la quinasa PksA y el regulador PspA varía en función de las condiciones de crecimiento de la bacteria, dependiendo de forma esencial del ciclo de desarrollo.

El papel modulador desempeñado por estas proteínas durante el desarrollo multicelular se encuentra en concordancia con el ejercido por varias ePKs caracterizadas de *M. xanthus*, muchas de ellas implicadas igualmente en el control de los distintos eventos que conforman esta etapa de desarrollo multicelular (ver Introducción). En este sentido, se ha comprobado que los componentes reguladores implicados en el control del ciclo de desarrollo de *M. xanthus* se expresan tan sólo durante esta etapa o bien incrementan su expresión durante el desarrollo (Kroos *et al.*, 1986; Kroos y Kaiser, 1987), como se aprecia en el perfil de expresión de estas proteínas.

La delección del gen *pksA* produce un desarrollo prematuro ante el agotamiento de nutrientes, en donde la formación de cuerpos fructificantes tiene lugar de forma temprana, con un adelanto de 3-4 h respecto al silvestre. En consonancia con este resultado, la formación de mixósporas dentro de los cuerpos fructificantes comienza de forma prematura dando lugar a formas de resistencia diferenciadas mucho antes que el silvestre. Por tanto, la carencia de la quinasa afecta a la progresión del desarrollo, produciendo un adelanto tanto en la fructificación como en la esporulación. La rápida sucesión de eventos durante el desarrollo del mutante $\Delta pksA$ no afecta a la estructura de los cuerpos fructificantes originados prematuramente, dando lugar a formaciones maduras, definidas y opacas al igual que el silvestre, aunque claramente de menor tamaño, debido a la agregación de un número inferior de bacterias. Sin embargo, se reduce considerablemente la eficiencia de esporulación debido a la incapacidad de muchas de las células para completar la diferenciación en mixósporas.

En cambio, la delección del gen *pspA* conduce a un severo defecto fenotípico durante el desarrollo, que se traduce en un marcado retraso de 24-48 h durante la formación de los cuerpos fructificantes. A diferencia del anterior, este hecho conduce a una alteración en la morfología de los cuerpos que adquieren un aspecto anómalo e irregular, con el centro más opaco rodeado de una región periférica translúcida, muy diferentes respecto a los cuerpos homogéneos y bien empaquetados generados por el silvestre. En su interior, la esporulación se produce igualmente con un considerable retraso, puesto que aunque se alcanzan eficiencias de esporulación similares al silvestre, el perfil de diferenciación en mixósporas sigue esta progresión ralentizada que determina un incremento mucho más lento en la formación de mixósporas a medida que progresa el desarrollo. Por tanto, la carencia del regulador PspA también influye en el transcurso del desarrollo, pero en este caso produce un retraso muy acusado tanto en la fructificación como en la esporulación en *M. xanthus*, que altera la organización de esta bacteria dentro de los cuerpos fructificantes.

Estos resultados evidencian que tanto la quinasa PksA como el regulador PspA controlan con un efecto opuesto el momento en que tienen lugar los distintos eventos que se suceden durante el ciclo de desarrollo. Para verificar este efecto a nivel molecular se han realizado diferentes fusiones *lacZ* con varios genes marcadores del desarrollo: *fruA*, *mrpC* y *tps*, cuya expresión se induce de forma específica durante el desarrollo (Inouye *et al.*, 1979; Ogawa *et al.*, 1996; Sun y Shi, 2001a; Sun y Shi, 2001b). El análisis de la actividad de estas fusiones *lacZ* en el silvestre y en los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ durante el desarrollo permite explicar el fenotipo exhibido por ambos mutantes, puesto que los niveles de expresión de todos estos marcadores se encuentran incrementados de forma notable en la estirpe $\Delta pksA$ en comparación con el silvestre, dando lugar a un desarrollo temprano, y por el contrario, se reducen de forma considerable en la estirpe $\Delta pspA$, conduciendo a un desarrollo tardío.

El componente clave para la progresión del ciclo de desarrollo en *M. xanthus* es el regulador de respuesta FruA. Esta proteína controla la transducción de señales ante los niveles crecientes de señal C recibidos por la célula, incrementando a su vez su nivel de expresión durante el desarrollo (Ogawa *et al.*, 1996; Ellehauge *et al.*, 1998). Durante esta etapa, esta proteína dirige inicialmente a las células hacia la agregación para la formación de cuerpos fructificantes, para posteriormente a medida que avanza el desarrollo, promover la diferenciación de las células contenidas dentro de los cuerpos en mixósporas de resistencia (Bonner y Shimkets, 2001). Por tanto, la detección de niveles de FruA más elevados en la bacteria $\Delta pksA$ durante el desarrollo explica el adelanto en la fructificación y esporulación de la estirpe que carece de la quinasa, mientras que su reducción en la bacteria $\Delta pspA$ se traduce en un retraso de esta estirpe.

La expresión del regulador FruA se induce durante el desarrollo por acción del activador MrpC (Nariya e Inouye, 2005b; Nariya e Inouye, 2006). Se ha comprobado que la cascada de ePKs Pkn8-Pkn14 inhibe mediante fosforilación a este factor transcripcional, lo que a su vez produce una reducción en los niveles tanto de FruA como de MrpC, incapaz de autoactivar su propia expresión. Por ello, los mutantes para cualquiera de estas quinasas presentan un desarrollo prematuro con niveles más elevados de ambos marcadores (Nariya e Inouye, 2005b). En este sentido, también se han apreciado niveles más elevados de MrpC en la bacteria $\Delta pksA$ y mucho más reducidos en $\Delta pspA$ desde el comienzo del desarrollo, lo que a su vez determina los diferentes niveles de FruA alcanzados en cada uno de estos mutantes de delección, en consonancia con la progresión del desarrollo de cada una de estas bacterias.

La actividad del regulador FruA estimula la expresión de la proteína S, el componente principal de la cubierta de la espora, codificada por el gen *tps* (Inouye *et al.*, 1979). Una vez completada la agregación, FruA dispara la expresión de los genes *dev*, necesarios para la diferenciación de mixósporas en los cuerpos fructificantes, ante la presencia de niveles crecientes de señal C. Sin embargo, otros genes dependientes del desarrollo, como ocurre con *tps*, requieren de la acción de FruA pero no se encuentran regulados por la señal C (Ueki e Inouye, 2006). Como se ha comprobado durante este estudio, los niveles más elevados de FruA en la bacteria $\Delta pksA$ incrementa a su vez la expresión de los genes activados por FruA, como el gen *tps*, a diferencia de lo que ocurre en $\Delta pspA$, condicionando la evolución diferencial del desarrollo en ambas bacterias.

La alteración en los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ del perfil de expresión de estos marcadores del desarrollo, todos ellos inducidos específicamente durante esta etapa para dirigir a las células hacia la fructificación y posteriormente la esporulación, corrobora la hipótesis de que ambas proteínas son necesarias para la progresión del ciclo de desarrollo. En este sentido, todos los marcadores analizados se encuentran afectados en cuanto a su patrón de expresión por la delección de la quinasa PksA o del regulador PspA ya desde el momento en que las células comienzan a detectar el agotamiento de nutrientes. Por ello, estos hechos sugieren que más que controlar directamente a estos componentes moduladores del desarrollo, ambas proteínas actuarían regulando el momento en que se desencadena el desarrollo, produciendo una alteración en un mismo sentido en el perfil global de todos los marcadores, bien con niveles elevados prematuramente en $\Delta pksA$ o reducidos y tardíos en $\Delta pspA$, dando lugar al fenotipo exhibido por ambos mutantes.

II. 3. 2. Mecanismo de regulación del desarrollo

El análisis fenotípico de los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ indica que mientras la quinasa PksA se comporta como un represor del desarrollo que trata de prolongar el crecimiento vegetativo de la bacteria, el regulador PspA, por el contrario, promueve que la bacteria se agregue y se diferencie ante el agotamiento de nutrientes. En *M. xanthus* tiene lugar un estricto control en el inicio del ciclo de desarrollo basado en la respuesta estricta (Singer y Kaiser, 1995), puesto que una vez que este proceso se dispara ha de ser completado con el consiguiente coste para la bacteria. La decisión entre mantener el crecimiento vegetativo o progresar hacia el desarrollo depende del nivel de nutrientes del medio (Kaiser, 2004). En este sentido, la bacteria ralentiza el crecimiento mientras los nutrientes son escasos pero suficientes, evitando la autólisis masiva asociada al desarrollo. Sin embargo, por debajo de un punto crítico, la privación de nutrientes desencadena inevitablemente el inicio del desarrollo, facilitando la supervivencia de la bacteria en forma de mixósporas de resistencia ante la posibilidad de que toda la población muera por inanición (Kaiser, 2004).

Por tanto, ante la limitación de los nutrientes disponibles, las células han de decidir en función de las condiciones existentes (nivel de nutrientes en el medio, número y proximidad de las células, características del sustrato, parámetros medioambientales, etc) si comprometen al conjunto de la población hacia la fase de desarrollo multicelular o bien mantienen el crecimiento vegetativo. En este momento, durante el control de este punto clave para el ciclo de vida de *M. xanthus*, la participación de la quinasa PksA y del regulador PspA permitiría a la célula valorar si las condiciones nutricionales y ambientales impuestas por el medio son adecuadas para prolongar el crecimiento vegetativo, o bien se hace necesario dirigir a la bacteria hacia el ciclo de desarrollo.

Como se ha comentado previamente, la carencia de cualquiera de estas proteínas altera no sólo el inicio del desarrollo, sino la temporalidad en que se suceden los distintos eventos que conforman el desarrollo, produciendo un adelanto (en $\Delta pksA$) o bien un retraso (en $\Delta pspA$). Este control sobre el transcurso del desarrollo podría ser explicado a partir de la regulación ejercida por ambas proteínas sobre el momento de inicio de esta etapa, determinando a su vez la progresión en que se suceden los distintos eventos que conforman el desarrollo. El perfil de expresión de ambas proteínas avala la participación de ambas proteínas en la modulación del comienzo del desarrollo. Así, el análisis de la expresión de estas proteínas durante el ciclo de vida de *M. xanthus* revela que ambas proteínas se inducen de forma considerable en una fase muy temprana del desarrollo, alcanzando un pico de expresión que se solapa temporalmente con el instante en que las células detectan la privación de nutrientes en el medio.

II. 3. 3. Modulación del desarrollo en función del nivel de nutrientes

La relación de la quinasa PksA y el regulador PspA con la detección del nivel de nutrientes disponibles durante el control del desarrollo se comprueba por la dependencia de la expresión de ambas proteínas respecto al nivel de nutrientes presentes en el medio. En este sentido, existe una correlación inversa entre el nivel de expresión de ambas proteínas respecto a la cantidad de nutrientes disponibles para la bacteria. Así, en medio líquido, a medida que la bacteria crece y consume los nutrientes tiene lugar un incremento progresivo en la expresión de ambas proteínas, existiendo una dependencia lineal directa entre la densidad óptica alcanzada por el cultivo y el nivel de expresión alcanzado por estas proteínas. El estímulo inductor que activa la expresión tanto de la quinasa PksA como del regulador PspA depende del progresivo agotamiento de los nutrientes, responsable de la inducción de la expresión de ambas proteínas.

Ambas proteínas son necesarias para afrontar el agotamiento de nutrientes en el medio, como ocurre durante la fase estacionaria y en el ciclo de desarrollo. La dependencia respecto al estatus nutricional se pone de manifiesto por la hipersensibilidad de los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ frente a agentes inductores de estrés nutricional como el compuesto desacoplante CCCP. La presencia de esta sustancia genera una reducción de la carga energética celular, al disminuir el rendimiento obtenido a partir de la utilización de los nutrientes disponibles para la célula mediante la disipación del potencial de membrana (Jovanovic *et al.*, 2006). La reducción en el crecimiento de ambos mutantes en comparación con el silvestre en presencia de este agente revela que tanto la quinasa PksA como el regulador PspA son necesarios para la supervivencia de la bacteria ante la reducción en la carga energética, participando en la respuesta adaptativa ante la limitación de nutrientes.

La necesidad de ambas proteínas para afrontar la carencia en el aporte de nutrientes se pone de manifiesto por el marcado retraso experimentado por los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ en relación con el silvestre durante el desarrollo en presencia de CCCP. El fenotipo exhibido por ambas bacterias es mucho más acusado a medida que se incrementa la concentración de CCCP en el medio. Por tanto, tanto la quinasa PksA como el regulador PspA contribuyen a que la mixobacteria aproveche los recursos disponibles para su supervivencia, ya que en su ausencia las células son incapaces de obtener la energía necesaria para progresar en el desarrollo, dando lugar a este acusado retraso ante la presencia de CCCP. Sin embargo, a pesar de que en *E. coli* la pérdida del potencial de membrana es el estímulo clave para inducir la expresión de la proteína PspA (Weiner y Model, 1994; Model *et al.*, 1997), en *M. xanthus* se ha comprobado que la disipación de la fuerza protón motriz por el CCCP no incrementa la expresión de la quinasa PksA o el regulador PspA.

El mecanismo empleado por estas proteínas para facilitar la adaptación ante la limitación de nutrientes resulta evidente en el caso del regulador PspA, cuya activación actuaría estimulando la recuperación del potencial de membrana, incrementando la eficiencia de obtención de energía a partir de los nutrientes disponibles para la célula, tal como sucede en *E. coli* (Kobayashi *et al.*, 2007). En el caso de la quinasa PksA, es posible que alguna de las proteínas activadas por la quinasa correspondan con proteínas implicadas en el transporte de nutrientes o la utilización de recursos alternativos para la célula que permitan sostener el crecimiento celular, puesto que esta proteína promueve el mantenimiento del crecimiento vegetativo. En este sentido, dentro del mismo operón aparecen proteínas implicadas en la obtención de nutrientes como un transportador de tipo ATP o una endonucleasa inespecífica extracelular, que vinculan a este sistema con el aprovechamiento de los nutrientes disponibles.

II. 4. Control de la movilidad por la quinasa PksA y el regulador PspA

La bacteria *M. xanthus* se mueve mediante deslizamiento sobre una superficie utilizando dos sistemas de movilidad independientes, la movilidad social S y la movilidad aventurera A (Hodgkin y Kaiser, 1979a; Hodgkin y Kaiser, 1979b). Durante este estudio, se ha comprobado que tanto la quinasa PksA como el regulador PspA modulan la movilidad social en la mixobacteria, pero no influencia la movilidad aventurera. En este sentido, la delección de la quinasa incrementa la movilidad social sobre una medio blando con 0.4% de agar, mientras que por el contrario, la delección del regulador PspA reduce la movilidad social de la mixobacteria.

La movilidad social es clave para el desarrollo multicelular en *M. xanthus*, puesto que durante la agregación las células entran en contacto intercambiando una serie de señales entre ellas para coordinar de forma apropiada el movimiento conjunto de todas ellas (Jelsbak y Søgaard-Andersen, 2002). Por ello, el control ejercido por la quinasa PksA y el regulador PspA sobre la movilidad social ha de influenciar el transcurso del desarrollo en *M. xanthus*. De hecho, existe una correlación directa entre el fenotipo exhibido por los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ durante el desarrollo en relación con el efecto de cada una de estas proteínas sobre la movilidad. En este sentido, el adelanto en el desarrollo en $\Delta pksA$ se corresponde con un incremento en la movilidad social de esta estirpe que conduce a la agregación temprana de las células, mientras que el retraso en $\Delta pspA$ se debe a una reducción de la movilidad social que retrasa considerablemente la agregación.

Estos resultados revelan que mientras la quinasa PksA se comporta como un inhibidor que reduce la movilidad social de *M. xanthus*, a su vez el regulador PspA estimula este sistema. Se ha caracterizado una ePK en *M. xanthus*, la MasK, implicada en el control de la movilidad social de la mixobacteria, cuya delección influye igualmente en el transcurso del desarrollo multicelular (Thomasson *et al.*, 2002). Sin embargo, a diferencia de la MasK, ni la PksA ni el regulador PspA son esenciales para la movilidad social de la mixobacteria, ya que su delección no suprime la capacidad de este microorganismo para deslizarse socialmente y por tanto no bloquea totalmente el transcurso del ciclo de desarrollo.

En este sentido, la relación funcional de la quinasa PksA y el regulador PspA con la disponibilidad de nutrientes sugiere que ambas proteínas podrían modular la capacidad de deslizamiento de la bacteria para ajustar la movilidad a las condiciones nutricionales del medio. De hecho, se ha comprobado que el efecto regulador de estas proteínas sobre la movilidad depende del nivel de nutrientes en el medio, ya que el fenotipo de los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ se hace más acusado en ambos casos si se reduce la disponibilidad de nutrientes, como ocurre en medio CF, pero no ante su total ausencia como sucede en el medio TPM. De acuerdo con este resultado, parece que tanto la PksA como el regulador PspA regulan la movilidad social en *M. xanthus* en respuesta a las condiciones nutricionales, tras valorar la disponibilidad de nutrientes para la bacteria.

La modulación de la movilidad social ejercida por ambas proteínas no parece implicar la regulación de la expresión de los pili, como ocurre en las ePKs que controlan el deslizamiento en la cianobacteria *Synechocystis sp* (Kim *et al.*, 2004; Panichkin *et al.*, 2006). La proteína PilA, componente principal de los pili de *M. xanthus*, se encuentra codificada por un gen cuya expresión se encuentra regulada por un promotor reconocido por σ^{54} , estimulado por la acción de la proteína activadora PilR (Wu y Kaiser, 1997). Sin embargo, la proteína PspA, que en *E. coli* contacta con un regulador dependiente de σ^{54} similar a PilR (Elderkin *et al.*, 2002; Elderkin *et al.*, 2005), no interacciona con esta proteína en el sistema del doble híbrido para modular la movilidad social.

Un mecanismo regulador posible para ejercer este control sobre la movilidad social de *M. xanthus* son los sistemas quimiotácticos (Zusman *et al.*, 2007). Estas rutas regulan la frecuencia de reversión de las células para modular la movilidad social en respuesta a la presencia de sustancias atrayentes o repelentes en el medio (Shi *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1998), pero no afectan a la movilidad aventurera, al igual que sucede en este caso. La presencia de nutrientes en el medio dispara la actividad de estos sistemas quimiotácticos, permitiendo así su modulación por las proteínas PksA o PspA, que actuarían como reguladores de la movilidad en función del nivel de nutrientes disponibles.

El significado biológico de la regulación ejercida por ambas proteínas sobre la movilidad social se encuentra en relación con la estrategia de supervivencia a seguir en función de las condiciones nutricionales. Al detectar la presencia de suficientes nutrientes, la quinasa PksA inhibe la movilidad social para prolongar el crecimiento vegetativo de la bacteria, evitando el consumo innecesario de recursos y energía que requiere el desplazamiento de las células. En cambio, el regulador PspA, que se activa una vez que los nutrientes se agotan por debajo de un umbral, estimula a su vez la movilidad social para impulsar las células hacia el desarrollo como mecanismo de supervivencia. En *E. coli*, la proteína PspA reduce la movilidad de las células como estrategia de ahorro energético para prolongar la fase estacionaria de crecimiento (Jovanovic *et al.*, 2006), al carecer de mecanismo de diferenciación para la supervivencia de la bacteria.

II. 5. Control de la respuesta al estrés oxidativo por la quinasa PksA y el regulador PspA

El análisis del crecimiento de los mutantes de delección $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ frente a diferentes agentes de estrés celular ha revelado que ambas estirpes son muy sensibles ante el estrés oxidativo. La presencia de especies reactivas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno o el superóxido genera daños celulares severos debido a las mutaciones sobre el ADN, la inactivación de proteínas por oxidación, la degradación de lípidos por peroxidación y el bloqueo de la replicación del material genético (Cabiscol *et al.*, 2000; Imlay, 2003). En este sentido, el peróxido de hidrógeno ejerce un efecto inhibitor muy potente sobre el crecimiento de ambos mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$, a diferencia del silvestre. Este resultado revela que tanto la quinasa PksA como el regulador PspA participan en la ruta de señalización necesaria para la respuesta frente al estrés oxidativo, facilitando la supervivencia de la bacteria ante la presencia de especies reactivas del oxígeno.

La respuesta ante el estrés oxidativo depende de la eliminación de las especies derivadas del oxígeno, la reducción en la producción por la célula de este tipo de compuestos y la reparación de las lesiones oxidativas generadas (Cabiscol *et al.*, 2000; Imlay, 2003). La relación de las ePKs con la respuesta al estrés oxidativo es muy conocida en eucariotas, como levaduras, plantas o humanos. Estas quinasas reguladas por el estrés celular, como las proteínas SAPK, se activan ante la presencia de compuestos oxidantes como el peróxido de hidrógeno para hacer frente a la presencia de estas especies reactivas del oxígeno (Tibbles y Woodgett, 1999). En bacterias también se han identificado recientemente ePKs implicadas en la respuesta al estrés oxidativo, como la proteína StoPK-1 de *S. toyocaensis*, aunque se desconoce su mecanismo de acción (Neu *et al.*, 2002).

La respuesta frente al estrés oxidativo se basa en la presencia de una serie de proteínas de defensa implicados en la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno. Entre ellas, aparecen componentes constitutivos junto con otros cuya síntesis se induce ante la presencia de estos agentes oxidantes. De hecho, en *E. coli* se conocen dos regulones, OxyR y SoxR-SoxS, activados por la presencia de peróxido de hidrógeno y superóxido, que controlan la expresión de múltiples proteínas necesarias para eliminar estos compuestos (Pomposiello y Demple, 2001). Sin embargo, en este caso, los niveles de expresión de la quinasa PksA y el regulador PspA no se modifican ante la presencia de peróxido de hidrógeno, por lo que la respuesta mediada por ambos componentes frente a este tipo de estrés celular es constitutiva o mediada por un aumento en la actividad enzimática.

El estudio del efecto de diferentes agentes químicos empleados de forma general para inducir estrés oxidativo ha ofrecido un resultado diferente en función del compuesto empleado. En este sentido, ambos mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ son muy sensibles al tert-butilo hidroperóxido, al igual que ocurre con el peróxido de hidrógeno, y son algo más sensibles para la nitrofurantoina y el sulfato de cobre, pero en cambio se afectan igual que el silvestre en presencia de paraquat, nitrito sódico y menadiona. De forma similar, se ha apreciado una sensibilidad diferencial ante distintos agentes productores de estrés oxidativo en diferentes mutantes de delección para ePKs implicadas en la respuesta frente al estrés oxidativo en otros microorganismos. Así, mientras que ciertos agentes oxidantes son muy efectivos para inhibir el crecimiento de una estirpe, otros en cambio permiten que el mutante prospere de igual forma que el silvestre (Neu *et al.*, 2002).

El efecto diferencial sobre el crecimiento de los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ ante los distintos agentes de estrés oxidativo depende de la capacidad de esta ruta para ser estimulada de forma específica ante ciertos compuestos oxidantes inductores pero no frente a cualquier estímulo general de estrés. La hipersensibilidad ante el peróxido de hidrógeno confirma la relevancia de este compuesto, responsable principal de las lesiones oxidativas celulares, para estimular la respuesta ante el estrés oxidativo mediada por la quinasa PksA y el regulador PspA. Además, el mecanismo empleado por cada agente químico para producir especies reactivas del oxígeno es diferente. Por ello, se ha comprobado que la efectividad para inducir estrés oxidativo en cada caso es muy variable, en función de su naturaleza y mecanismo de acción así como en función del organismo sobre el que actúa (Neu *et al.*, 2002). De esta forma, es normal que la sensibilidad ante distintos agentes varíe desde niveles muy elevados hasta niveles inapreciables, como ocurre en los mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$.

El patrón de sensibilidad de ambos mutantes $\Delta pksA$ y $\Delta pspA$ sigue un perfil similar en relación al efecto de diferentes agentes oxidantes, aunque en general la estirpe carente de la quinasa es en todos los casos algo más sensible. El solapamiento en el perfil de crecimiento de ambos mutantes sugiere que tanto la quinasa PksA como el regulador PspA participarían dentro de una misma ruta de señalización implicada en la respuesta frente al estrés oxidativo. Se desconoce el mecanismo protector conferido por estas proteínas en relación a este tipo de estrés celular, aunque entre las posibles dianas se plantea la posible activación de enzimas de detoxificación o de reparación de daños celulares. De hecho, en la mixobacteria *S. aurantiaca*, la proteína superóxido dismutasa, una enzima clave en la eliminación de los radicales libres, es fosforilada por ePKs (Müller R, comunicación personal).

II. 6. Contacto de la quinasa PksA con el regulador PspA mediante interacción proteína-proteína

La relación funcional entre la quinasa PksA y el regulador PspA se encuentra sustentada por la capacidad de interacción entre ambas proteínas. El análisis de esta interacción mediante el sistema del doble híbrido de levadura indica que la región reguladora intracelular de la quinasa es el principal determinante para el contacto con la proteína PspA, aunque también parece existir cierta interacción con el dominio catalítico de la quinasa. La asociación entre ambas proteínas es débil, en consonancia con el hecho de que mayoritariamente las interacciones proteicas con significado biológico suelen ser contactos reversibles entre proteínas. El contacto entre estas proteínas avala la participación de la quinasa PksA y el regulador PspA dentro de una misma ruta de transducción de señales implicada en la regulación del desarrollo, la movilidad y la respuesta a agentes de estrés.

El dominio regulador intracelular de la quinasa PksA está formado principalmente por una región rica en prolina. Este tipo de segmentos ricos en prolina es probable que constituyan el determinante esencial para el reconocimiento del regulador PspA por la quinasa, puesto que este tipo de motivos median con frecuencia el establecimiento de interacciones proteicas entre componentes pertenecientes a una misma ruta de señalización (Kay *et al.*, 2000). Las secuencias ricas en prolina adquieren una conformación estructural que facilita su papel como determinantes capaces de asociarse específicamente con otras proteínas de señalización, portadoras de dominios de interacción dirigidos de forma selectiva hacia la unión de estas secuencias ricas en prolina. De hecho, se han identificado múltiples motivos de interacción proteína-proteína cuyo principal ligando son secuencias ricas en prolina (Macias *et al.*, 2002; Zarrinpar *et al.*, 2003; Li, 2005).

La presencia de prolina favorece la formación de hélices extendidas formadas por tres residuos por vuelta que mantienen una conformación muy rígida y estable, en donde los residuos de prolina quedan dirigidos hacia la misma cara de la hélice para mediar la interacción con la proteína. La secuencia de prolinas origina una región apolar sobre la superficie de la hélice fácilmente accesible para el contacto con la proteína diana mediante el establecimiento de interacciones hidrofóbicas, disponiendo además de diferentes sitios de unión para la formación de puentes de hidrógeno con la proteína diana (Adzhubei y Sternberg, 1993; Stapley y Creamer, 1999).

Las regiones ricas en prolina, como parece suceder durante la interacción entre la quinasa PksA y el regulador PspA, normalmente median interacciones débiles debido a la rigidez conformacional conferida por su secuencia. Sin embargo, este hecho facilita que el contacto proteína-proteína pueda ser modulado con rapidez en respuesta a las señales recibidas, en donde la afinidad de unión entre ambas proteínas puede verse alterada en respuesta a la modificación covalente de una de ellas por fosforilación (Kay *et al.*, 2000). De hecho, este tipo de motivos aparecen principalmente asociados a cascadas de señalización, que requieren de un rápido reclutamiento de proteínas en función de los estímulos recibidos para que interactúen funcionalmente entre sí dentro de la ruta durante la transmisión de la señal sin necesidad de formar complejos estables (Kay *et al.*, 2000).

La interacción proteica mediada por las regiones ricas en prolina, principalmente de tipo apolar, explica su enorme versatilidad funcional, que posibilita que diferentes secuencias ricas en prolina pueden actuar como ligando para la unión de la proteína diana, sin necesidad de complementariedad entre ambas. La presencia de repeticiones en tándem de secuencias ricas en prolina facilita la aparición de una red compleja de interacciones proteicas dentro de una misma ruta de señalización, actuando este tipo de motivo a modo de adaptador que interconecta a diferentes proteínas dentro de una misma ruta de señalización (Williamson, 1994). Este hecho se encuentra en consonancia con la capacidad de esta región de mediar la interacción no sólo con el regulador PspA, sino también con las proteínas Pfl y Znf, detectadas durante el rastreo de interacciones con la quinasa PksA frente a una genoteca de expresión de *M. xanthus* empleando el sistema del doble híbrido de levadura.

II. 7. Transducción de señales en la ruta PksA-PspA

La interacción entre la quinasa receptora PksA con la proteína PspA indica que ambos componentes forman parte de una misma ruta de transducción de señales. Esta cascada de señalización actúa a modo de regulador global capaz de controlar diversas funciones celulares, como es el desarrollo, la movilidad y la respuesta a condiciones de estrés energético y oxidativo. El efecto pleiotrópico ejercido por ambas proteínas sobre diferentes actividades en la mixobacteria se encuentra en estrecha relación con el estado nutricional de las células, puesto que la actividad de esta ruta de señalización parece correlacionarse con el nivel de nutrientes disponibles en el medio.

A partir de los resultados expuestos, es posible tratar de establecer un modelo para la transducción de señales en la ruta PksA-PspA:

La proteína PksA situada en la membrana a modo de quinasa receptora parece funcionar como un sensor de tipo nutricional. La actividad de esta proteína como represor del inicio del desarrollo revela que este receptor podría ser estimulado por la presencia de nutrientes disponibles en el medio capaces de mantener el crecimiento vegetativo celular. La activación de la quinasa desencadenaría un cambio conformacional que estimularía la autofosforilación de este receptor en el dominio catalítico, incrementando la actividad catalítica de la quinasa. La señal transmitida por la quinasa ha de potenciar la capacidad de la célula para captar y emplear los nutrientes disponibles necesarios para que la célula prolongue las condiciones de crecimiento vegetativo. Al retrasar el comienzo del desarrollo, la cascada de fosforilación estimulada por esta quinasa activada ha de actuar sobre algún componente regulador cuya fosforilación inhibe el inicio del desarrollo.

La proteína PspA localizada en el citoplasma podría asociarse a la membrana tras ser activada por la reducción en la carga energética celular inducido por el agotamiento de nutrientes. Esta proteína actuaría promoviendo un incremento en la eficiencia de obtención de energía a partir de los nutrientes disponibles, favoreciendo la recuperación del potencial de membrana. En *M. xanthus*, ante el agotamiento de nutrientes la proteína PspA se comporta como un activador del inicio del desarrollo como mecanismo de supervivencia celular ante la reducción en la carga energética celular, ejerciendo un papel opuesto a la quinasa PksA. Por ello, en la ruta de señalización integrada por ambas proteínas, es de suponer que la interacción de la proteína PspA con el receptor PksA podría tener un efecto modulador de tipo inhibitorio sobre la actividad catalítica de la quinasa y/o sobre el acceso de la quinasa sobre sus sustratos, estimulando así la progresión de las células hacia el desarrollo.

Siguiendo el modelo propuesto, ante la presencia de nutrientes en el medio la quinasa receptora PksA se activaría mediante autofosforilación para estimular una cascada de fosforilación que promovería el crecimiento vegetativo de la célula. A medida que se consumen los nutrientes disponibles, por debajo de un umbral se genera en la célula un estado de estrés nutricional que estimularía la actividad del regulador PspA. Esta proteína normalmente soluble en el citoplasma al activarse accedería a la membrana, en donde podría contactar con la región reguladora intracelular de la quinasa receptora y en menor medida con el dominio catalítico. El reclutamiento de esta proteína hacia la membrana trataría de mantener al máximo los mecanismos de obtención de energía a partir de los escasos nutrientes restantes, pero a la vez produciría un acúmulo de esta proteína que favorecería su acceso a la quinasa. Una vez que el agotamiento de nutrientes continúa, se bloquearía la producción de energía, por lo que como mecanismo de supervivencia, la proteína PspA se uniría a la quinasa PksA para estimular la progresión hacia el desarrollo.

En esta ruta de señalización, mientras que la quinasa PksA se comportaría como un sensor del estatus nutricional extracelular, la proteína moduladora PspA se encontraría regulada por el estatus energético intracelular. La célula necesita disponer de una carga energética suficiente para completar los eventos que conforman el desarrollo, de forma que para progresar hacia el desarrollo es necesario que la carga energética no descienda por debajo de niveles críticos. Por ello, mientras que para mantener el crecimiento vegetativo basta con que la célula detecte suficientes nutrientes disponibles en el exterior, en el caso de la progresión hacia el desarrollo ha de primar la situación nutricional de la propia célula en ese instante para conseguir afrontar el transcurso del desarrollo con éxito. Por ello, la decisión entre ambas opciones dependería en parte del equilibrio existente entre la actividad de ambas proteínas en la ruta de señalización PksA-PspA.

La interacción entre el receptor PksA y la proteína PspA podría implicar la fosforilación del regulador por la quinasa. En este sentido, se ha comprobado que la unión de la proteína inhibidora KapB sobre la quinasa Pkn4, capaz de bloquear la fosforilación de la enzima sustrato PFK, conlleva la fosforilación del regulador (Nariya e Inouye, 2005a). Ante la posibilidad de que la proteína PspA actúe como un sustrato para la quinasa PksA, se está procediendo en este momento el análisis de la capacidad de fosforilación de la quinasa sobre este regulador. El resultado de este estudio permitirá concluir si la relación funcional entre ambas proteínas depende tan sólo del contacto proteína-proteína o bien requiere además de la fosforilación de la quinasa PksA sobre el regulador PspA.

II. 8. Integración de la ruta PksA-PspA en la red de señalización celular

La ruta de transducción de señales PksA-PspA es un sistema de señalización complejo en el que participan diferentes proteínas de señalización celular. Durante el rastreo de interacciones proteína-proteína en una genoteca de expresión de *M. xanthus* empleando como cebo la región intracelular de la quinasa se ha comprobado que esta proteína contacta con varios componentes celulares, como son las proteínas hipotéticas Pfl y Znf y las proteínas reguladoras KapA y KapC. La amplia diversidad de proteínas capaces de reconocer a la quinasa se correlaciona con el efecto regulador pleiotrópico ejercido por la ruta PksA-PspA, cuyo control ha de depender de la transmisión de la señal a diferentes proteínas capaces de dirigir la respuesta moduladora sobre diferentes actividades celulares.

En este sentido, la región reguladora intracelular de la quinasa determina el contacto de esta proteína con la región C-terminal de la proteína Pfl e igualmente es el determinante principal para la asociación con la porción central de la proteína Znf, aunque en este último caso participa también débilmente en la interacción el dominio catalítico de la quinasa. Al tratarse en ambos casos de proteínas hipotéticas carentes de similitud significativa con otras proteínas conocidas, no es posible establecer el significado biológico de ambas interacciones proteína-proteína. Sin embargo, los resultados obtenidos parecen indicar que Pfl y Znf son proteínas esenciales para la célula, cuya carencia resulta letal para la mixobacteria, por lo que la interacción de estas proteínas con el receptor PksA dentro de la ruta de señalización activada por la propia quinasa posiblemente influya en el transcurso de actividades celulares vitales para la célula.

La regulación del desarrollo de *M. xanthus* depende de un complejo mecanismo de señalización celular en donde participan varias ePKs, siendo necesaria la coordinación de todas estas rutas de señalización para integrar las señales recibidas por la célula, como se detalla ampliamente en la Introducción de este trabajo. En la ruta de transducción de señales PksA-PspA que controla el inicio del desarrollo, la quinasa receptora contacta con las proteínas reguladoras KapA y KapC en el sistema del doble híbrido. Ambas proteínas son capaces de interactuar con diferentes ePKs en la mixobacteria interconectando diferentes rutas de señalización basadas en ePKs en *M. xanthus*. En este sentido, se ha identificado que la proteína KapA se asocia con el dominio catalítico de la Pkn4 y la Pkn8 así como con la Pkn1, Pkn2 y Pkn9, mientras que KapC se une al dominio regulador de Pkn4 y Pkn8 (Nariya e Inouye, 2005a).

El reconocimiento de la quinasa receptora PksA por las proteínas KapA y KapC confirma la función moduladora de este tipo de proteínas dentro de la red de señalización de ePKs de *M. xanthus*. En este sentido, el anclaje de ambas proteínas sobre la PksA podría

regular la actividad de la quinasa o bien facilitar el reclutamiento de diferentes proteínas de señalización dentro de la ruta PksA-PspA. Por tanto, las proteínas Kap parecen actuar a modo de nexos de unión capaces de ajustar la actividad de la ruta de señalización PksA-PspA en relación a otras cascadas de señalización basadas en ePKs implicadas en el control del desarrollo, como la ruta Pkn8-Pkn14 (Nariya e Inouye, 2005b) o Pkn4-PFK (Nariya e Inouye, 2002), para conseguir un control preciso del transcurso del desarrollo en *M. xanthus*. La capacidad de estas proteínas para interactuar con múltiples ePKs demuestra la necesidad de integrar diferentes rutas de ePKs dentro de la compleja red de señalización desarrollada por *M. xanthus* para conseguir una regulación global sobre el ciclo de vida de la mixobacteria.

F. CONCLUSIONES



F. CONCLUSIONES

1. El rastreo e identificación de los genes que cifran ePKs contenidos en los 569 genomas procarióticos secuenciados hasta el momento revela que las especies de mixobacterias, actinobacterias y cianobacterias, todas ellas capaces de llevar a cabo procesos de desarrollo multicelular, codifican el número más elevado de Ser/Thr/Tyr quinasas.
2. En las seis especies de mixobacterias secuenciadas, el contenido y la proporción de genoma dedicada a ePKs se incrementa de forma exponencial a medida que crece el tamaño del genoma. Como consecuencia, la densidad génica de este tipo de proteínas alcanza los valores más elevados en las especies de mixobacterias.
3. El dominio catalítico N-terminal en las ePKs de las mixobacterias se acompaña con frecuencia de una región reguladora C-terminal, generando así proteínas multidominio cuya complejidad aumenta conforme crece el número de quinasas.
4. El estudio del perfil de expresión de un conjunto de ePKs de *M. xanthus* revela que estas proteínas participan de forma predominante en el control del desarrollo multicelular.
5. La proteína quinasa PksA se dispone a modo de receptor de membrana, con una región intracelular formada por el dominio catalítico y el dominio regulador rico en prolina, separado por un segmento transmembrana respecto a una región sensora periplásmica.
6. Esta proteína es capaz de catalizar la autofosforilación del segmento de activación, al igual que sucede en el resto de quinasas de tipo RD, gracias a la actividad Ser/Thr/Tyr quinasa desarrollada por el dominio catalítico.
7. La expresión de la proteína PksA presenta una dependencia inversa respecto a la cantidad de nutrientes disponibles en el medio, alcanzando niveles de expresión máximos justo tras su agotamiento y mínimos al ser cultivada sobre medio rico.
8. El análisis del *locus pksA* revela la presencia de un operón integrado por un conjunto de once genes, entre los que destaca el gen que codifica para el regulador PspA.
9. Las proteínas PksA y PspA modulan de forma contrapuesta el desarrollo multicelular y la movilidad social de *M. xanthus*. En este sentido, el mutante de delección para la quinasa se agrega de forma prematura y se desliza con rapidez, mientras que el mutante para el regulador se mueve más lentamente y fructifica de forma tardía.
10. Ambas proteínas colaboran en la respuesta adaptativa de la célula frente a condiciones de estrés energético y oxidativo.

-
11. La quinasa PksA interacciona con el regulador PspA en el sistema del doble híbrido de levadura. Asimismo, el rastreo de una genoteca de expresión de *M. xanthus* ha permitido detectar la interacción de la quinasa con las proteínas KapA, KapC, Pfl y Znf.

G. BIBLIOGRAFÍA



G. BIBLIOGRAFÍA

Adams H, Teertstra W, Demmers J, Boesten R, Tommassen J. (2003) Interactions between phage-shock proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **185**:1174-80.

Adams JA. (2001) Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem Rev.* **101**:2271-90.

Adams JA. (2003) Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: is there functional evidence for the autoinhibitor model? *Biochemistry.* **42**:601-7.

Adindla S, Inampudi KK, Guruprasad K, Guruprasad L. (2004) Identification and analysis of novel tandem repeats in the cell surface proteins of archaeal and bacterial genomes using computational tools. *Comparative and Functional Genomics.* **5**:2-16.

Adzhubei AA, Sternberg M J E. (1993) Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins. *J. Mol. Biol.* **229**:472-493.

Akamine P, Madhusudan , Wu J, Xuong NH, Ten Eyck LF, Taylor SS (2003) Dynamic features of cAMP-dependent protein kinase revealed by apoenzyme crystal structure. *J Mol Biol.* **327**:159-71.

Alber MS, Kiskowski MA, Jiang Y. (2004) Two-stage aggregate formation via streams in myxobacteria. *Phys Rev Lett.* **93**:068102.

Anderson AR, Vasiev BN. (2005) An individual based model of rippling movement in a myxobacteria population. *J Theor Biol.* **234**:341-9.

Astling DP, Lee JY, Zusman DR. (2006) Differential effects of chemoreceptor methylation-domain mutations on swarming and development in the social bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* **59**:45-55.

Ausubel M, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1988) Current protocols in molecular biology. Volúmenes 1 and 2. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA.

Baker DA, Kelly JM. (2004) Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. *Mol Microbiol.* **52**:1229-42.

Baker ME. (1994) *Myxococcus xanthus* C-factor, a morphogenetic paracrine signal, is similar to *Escherichia coli* 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase and human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem J.* **301**: 311-2.

Barford D. (1996) Protein phosphatases. *Curr Opin Struct Biol.* **5**:728-34.

Barford D, Das AK, Egloff MP. (1998) The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **27**:133-64.

Behmlander RM, Dworkin M. (1994) Integral proteins of the extracellular matrix fibrils of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **176**:6304-11.

Bekker M, Teixeira de Mattos MJ, Hellingwerf KJ. (2006) The role of two-component regulation systems in the physiology of the bacterial cell. *Sci Prog.* **89**:213-42.

Berleman JE, Chumley T, Cheung P, Kirby JR. (2006) Rippling is a predatory behavior in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **188**:5888-95.

Bhaduri A, Sowdhamini R. (2005) Genome-wide survey of prokaryotic O-protein phosphatases. *J Mol Biol.* **352**:736-52.

Bhattacharyya RP, Remenyi A, Yeh BJ, Lim WA. (2006) Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu Rev Biochem.* **75**:655-80.

Biondi RM, Nebreda AR. (2003) Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem J.* **372**: 1-13.

Black WP, Xu Q, Yang Z. (2006) Type IV pili function upstream of the Dif chemotaxis pathway in *Myxococcus xanthus* EPS regulation. *Mol Microbiol.* **61**:447-56.

Black WP, Yang Z. (2004) *Myxococcus xanthus* chemotaxis homologs DifD and DifG negatively regulate fibril polysaccharide production. *J Bacteriol.* **186**:1001-8.

Blackhart BD, Zusman DR. (1985a) Cloning and complementation analysis of the "Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus*. *Mol Gen Genet.* **198**:243-54.

Blackhart BD, Zusman DR. (1985b) "Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **82**:8767-70.

Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* **277**:1453-74.

Boitel B, Ortiz-Lombardia M, Duran R, Pompeo F, Cole ST, Cervenansky C, Alzari PM. (2003) PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* **49**:1493-508.

Bonner PJ, Black WP, Yang Z, Shimkets LJ. (2006) FibA and PilA act cooperatively during fruiting body formation of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* **61**:1283-93.

Bonner PJ, Shimkets LJ. (2001) Piecing together a puzzling pathway: new insights into C-signaling. *Trends Microbiol.* **9**:462-4.

Bonner PJ, Xu Q, Black WP, Li Z, Yang Z, Shimkets LJ. (2005) The Dif chemosensory pathway is directly involved in phosphatidylethanolamine sensory transduction in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* **57**:1499-508.

Bose R, Holbert MA, Pickin KA, Cole PA. (2006) Protein tyrosine kinase-substrate interactions. *Curr Opin Struct Biol.* **16**:668-75.

Boudeau J, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Alessi DR. (2006) Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol.* **16**:443-52.

Boysen A, Ellehaug E, Julien B, Søgaard-Andersen L. (2002) The DevT protein stimulates synthesis of FruA, a signal transduction protein required for fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **184**:1540-6.

Bray D. (1995) Protein molecules as computational elements in living cells. *Nature.* **376**:307-12.

Bretscher AP, Kaiser D. (1978) Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium. *J Bacteriol.* **133**:763-8.

Burnette WN. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* **112**:195-203.

Bustamante VH, Martínez-Flores I, Vlamakis HC, Zusman DR. (2004) Analysis of the Frz signal transduction system of *Myxococcus xanthus* shows the importance of the conserved C-terminal region of the cytoplasmic chemoreceptor FrzCD in sensing signals. *Mol Microbiol.* **53**:1501-13.

Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol.* **3**:3-8.

-
- Cadoret JC, Demouliere R, Lavaud J, van Gorkom HJ, Houmard J, Etienne AL. (2004)** Dissipation of excess energy triggered by blue light in cyanobacteria with CP43' (*isiA*). *Biochim Biophys Acta*. **1659**:100-4.
- Campos JM, Geisselsoder J, Zusman DR. (1978)** Isolation of bacteriophage MX4, a generalized transducing phage for *Myxococcus xanthus*. *J Mol Biol*. **119**:167-78.
- Cashin P, Goldsack L, Hall D, O'Toole R. (2006)** Contrasting signal transduction mechanisms in bacterial and eukaryotic gene transcription. *FEMS Microbiol Lett*. **261**:155-64.
- Cheng, YL, Kaiser D. (1989a)** *dsg*, a gene required for cell-cell interactions early in *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol*. **171**: 3719-3726.
- Cheng YL, Kaiser D. (1989b)** *dsg*, a gene required for *Myxococcus* development, is necessary for cell viability. *J. Bacteriol*. **171**: 3727-3731.
- Cheng YL, Kalman LV, Kaiser D. (1994)** The *dsg* gene of *Myxococcus xanthus* encodes a protein similar to translation initiation factor IF3. *J. Bacteriol*. **176**: 1427-1433.
- Cho K, Zusman DR. (1999a)** AsgD, a new two-component regulator required for A-signalling and nutrient sensing during early development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol*. **34**:268-81.
- Cho K, Zusman DR. (1999b)** Sporulation timing in *Myxococcus xanthus* is controlled by the *espAB* locus. *Mol Microbiol*. **34**:714-25.
- Cohen P. (2000)** The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci*. **25**:596-601.
- Cornelis GR. (2002)** *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol*. **158**:401-8.
- Cozzone AJ. (1998)** Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Microbiol*. **42**:97-125.
- Cozzone AJ, Grangeasse C, Doublet P, Duclos B. (2004)** Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. *Arch Microbiol*. **181**:171-81.
- Crawford EW, Shimkets LJ. (2000a)** The stringent response in *Myxococcus xanthus* is regulated by SocE and the CsgA C-signaling protein. *Genes Dev*. **14**:483-492.
- Crawford EW, Shimkets LJ. (2000b)** The *Myxococcus xanthus* *socE* and *csgA* genes are regulated by the stringent response. *Mol. Microbiol*. **37**:788-799.
- Cusick JK, Gill RE. (2005)** The *bcsA* gene influences multiple aspects of development in *Myxococcus xanthus*. *Curr Microbiol*. **51**:336-43.
- Cusick JK, Hager E, Gill RE. (2002)** Characterization of *bcsA* mutations that bypass two distinct signaling requirements for *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol*. **184**:5141-50.
- Dahl JL, Tengra FK, Dutton D, Yan J, Andacht TM, Coyne L, Windell V, Garza AG. (2007)** Identification of major sporulation proteins of *Myxococcus xanthus* using a proteomic approach. *J Bacteriol*. **189**:3187-97.
- D'Andrea LD, Regan L. (2003)** TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci*. **28**:655-62.
- Dardick C, Ronald P. (2006)** Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. *PLoS Pathog*. **2**(1): e2.
- Darwin AJ. (2005)** The phage-shock-protein response. *Mol Microbiol*. **57**:621-8.
- Das AK, Helps NR, Cohen PT, Barford D. (1996)** Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J*. **15**:6798-809.

-
- Davis JM, Mayor J, Plamann L. (1995)** A missense mutation in *rpoD* results in an A-signalling defect in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* **18**:943-52.
- Dawid W. (2000)** Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol Rev.* **24**:403-27.
- Delumeau O, Dutta S, Brigulla M, Kuhnke G, Hardwick SW, Volker U, Yudkin MD, Lewis RJ. (2004)** Functional and structural characterization of RsbU, a stress signaling protein phosphatase 2C. *J Biol Chem.* **279**:40927-37.
- Downard J, Ramaswamy SV, Kil KS. (1993)** Identification of *esg*, a genetic locus involved in cell-cell signaling during *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol.* **175**:7762-70.
- Downard J, Toal D. (1995)** Branched-chain fatty acids: the case for a novel form of cell-cell signalling during *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol.* **16**:171-5.
- Dukuzumuremyi JM, Rosqvist R, Hallberg B, Akerstrom B, Wolf-Watz H, Schesser K. (2000)** The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *J Biol Chem.* **275**:35281-90.
- Duran R, Villarino A, Bellinzoni M, Wehenkel A, Fernandez P, Boitel B, Cole ST, Alzari PM, Cervenansky C. (2005)** Conserved autophosphorylation pattern in activation loops and juxtamembrane regions of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* **333**:858-67.
- Dworkin J, Jovanovic G, Model P. (2000)** The PspA protein of *Escherichia coli* is a negative regulator of sigma(54)-dependent transcription. *J Bacteriol.* **182**:311-9.
- Dworkin M. (1963)** Nutritional regulation of morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **86**:67-72.
- Dworkin M. (1996)** Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol. Rev.* **60**:70-102.
- Dworkin M. y Gibson, SM. (1964)** A system for studying microbial morphogenesis: rapid formation of microcysts in *Myxococcus xanthus*. *Science* **146**: 243-244.
- Edmunds JW, Mahadevan LC. (2004)** MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. *J Cell Sci.* **117**:3715-23.
- Egloff MP, Cohen PT, Reinemer P, Barford D. (1995)** Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J Mol Biol.* **254**:942-59.
- Elderkin S, Bordes P, Jones S, Rappas M, Buck M. (2005)** Molecular determinants for PspA-mediated repression of the AAA transcriptional activator PspF. *J Bacteriol.* **187**:3238-48.
- Elderkin S, Jones S, Schumacher J, Studholme D, Buck M. (2002)** Mechanism of action of the *Escherichia coli* phage shock protein PspA in repression of the AAA family transcription factor PspF. *J Mol Biol.* **320**:23-37.
- Elías M. Murillo, FJ. (1991)** Induction of germination in *Myxococcus xanthus* fruiting body spores. *J. Gen. Microbiol.* **137**:381-388.
- Ellehaug E, Norregaard-Madsen M, Søgaard-Andersen L. (1998)** The FruA signal transduction protein provides a checkpoint for the temporal co-ordination of intercellular signals in *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol.* **30**:807-17.
- Evans PR, Farrants GW, Hudson PJ. (1981)** Phosphofructokinase: structure and control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **293**:53-62.
- Ferguson KM. (2004)** Active and inactive conformations of the epidermal growth factor receptor. *Biochem Soc Trans.* **32**:742-5.

-
- Foe LG, Kemp RG. (1982)** Properties of phospho and dephospho forms of muscle phosphofructokinase. *J Biol Chem.* **257**:6368-72.
- Gaidenko TA, Kim TJ, Price CW. (2002)** The PrpC serine-threonine phosphatase and PrkC kinase have opposing physiological roles in stationary-phase *Bacillus subtilis* cells. *J Bacteriol.* **184**:6109-14.
- Gallego M, Virshup DM. (2005)** Protein serine/threonine phosphatases: life, death, and sleeping. *Curr Opin Cell Biol.* **17**:197-202.
- Galperin MY. (2004)** Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol.* **6**:552-67.
- Galperin MY. (2005)** A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol.* **5**:35.
- Galperin MY. (2006)** Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol.* **188**:4169-82.
- Galyov EE, Hakansson S, Forsberg A, Wolf-Watz H. (1993)** A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature.* **361**:730-2.
- Gao R, Mack TR, Stock AM. (2007)** Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem Sci.* **32**:225-34.
- Garza AG, Harris BZ, Pollack JS, Singer M. (2000)** The *asgE* locus is required for cell-cell signalling during *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol.* **35**:812-24.
- Gerth K, Bedorf N, Hofle G, Irschik H, Reichenbach H. (1996)** Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot.* **49**:560-3.
- Gerth K, Bedorf N, Irschik H, Hofle G, Reichenbach H. (1994)** The soraphens: a family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). I. Soraphen A1 alpha: fermentation, isolation, biological properties. *J Antibiot.* **47**:23-31.
- Gerth K, Irschik H, Reichenbach H, Trowitzsch W. (1982)** The myxovirescins, a family of antibiotics from *Myxococcus virescens* (Myxobacterales). *J Antibiot.* **35**:1454-9.
- Gerth K, Muller R. (2005)** Moderately thermophilic Myxobacteria: novel potential for the production of natural products isolation and characterization. *Environ Microbiol.* **7**:874-80.
- Gerth K, Pradella S, Perlova O, Beyer S, Muller R. (2003)** Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities--past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J Biotechnol.* **106**:233-53.
- Gevers D, Vandepoele K, Simillon C, Van de Peer Y. (2004)** Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. *Trends Microbiol.* **12**:148-54.
- Gill RE, Karlok M, Benton D. (1993)** *Myxococcus xanthus* encodes an ATP-dependent protease which is required for developmental gene transcription and intercellular signaling. *J. Bacteriol.* **175**:4538-4544.
- Goldman BS, Nierman WC, Kaiser D, Slater SC, Durkin AS, Eisen JA, Ronning CM, Barbazuk WB, Blanchard M, Field C, Halling C, Hinkle G, Iartchuk O, Kim HS, Mackenzie C, Madupu R, Miller N, Shvartsbeyn A, Sullivan SA, Vaudin M, Wiegand R, Kaplan HB. (2006)** Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:15200-5.
- Gorski L, Kaiser D. (1998)** Targeted mutagenesis of sigma54 activator proteins in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **180**:5896-905.

-
- Göt P, Boos W. (1998)** The transmembrane topology of the *sn*-glycerol 3-phosphatase permease of *Escherichia coli* analysed by *phoA* and *lacZ* protein fusions. *Mol Microb.* **2**:655-663.
- Gottesman S, Maurizi MR. (2001)** Cell biology. Surviving starvation. *Science.* **293**:614-5.
- Graf W, Pelka G. (1979)** Aquatic myxobacteria as indicators in the evaluation of drinking water quality. *Zentralbl Bakteriol.* **169**:225-39.
- Grangeasse C, Cozzone AJ, Deutscher J, Mijakovic I. (2007)** Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem Sci.* **32**:86-94.
- Greenstein AE, Echols N, Lombana TN, King DS, Alber T. (2007)** Allosteric activation by dimerization of the PknD receptor Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* **282**:11427-35.
- Grefen C, Harter K. (2004)** Plant two-component systems: principles, functions, complexity and cross talk. *Planta.* **219**:733-42.
- Gronewold TM, Kaiser D. (2001)** The *act* operon controls the level and time of C-signal production for *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol.* **40**:744-56.
- Gronewold TM, Kaiser D. (2007)** Mutations of the *act* promoter in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **189**:1836-44.
- Guo D, Wu Y, Kaplan HB. (2000)** Identification and characterization of genes required for early *Myxococcus xanthus* developmental gene expression. *J Bacteriol.* **182**:4564-71.
- Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. (2006)** Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. *Biochem Pharmacol.* **72**:1538-46.
- Hagen DC, Bretscher AP, Kaiser D. (1978)** Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol.* **64**:284-96.
- Hager E, Tse H, Gill RE. (2001)** Identification and characterization of *spdR* mutations that bypass the BsgA protease-dependent regulation of developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* **39**:765-80.
- Hakansson S, Galyov EE, Rosqvist R, Wolf-Watz H. (1996)** The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane. *Mol Microbiol.* **20**:593-603.
- Hammet A, Pike BL, McNees CJ, Conlan LA, Tennis N, Heierhorst J. (2003)** FHA domains as phosphothreonine binding modules in cell signaling. *IUBMB Life.* **55**:23-7.
- Hanks SK. (2003)** Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol.* **4**:111.
- Hanks SK, Hunter H. (1995)** The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**:576-596.
- Hanlon WA, Inouye M, Inouye S. (1997)** Pkn9, a Ser/Thr protein kinase involved in the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* **23**(3):459-71.
- Hanson CW, Dworkin M. (1974)** Intracellular and extracellular nucleotides and related compounds during the development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **118**:486-96.
- Harris BZ, Kaiser D, Singer M. (1998)** The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev.* **12**:1022-35.

-
- Hartzell P, Kaiser D. (1991a)** Function of MglA, a 22-kilodalton protein essential for gliding in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **173**:7615-24.
- Hartzell P, Kaiser D. (1991b)** Upstream gene of the *mgl* operon controls the level of MglA protein in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **173**:7625-35.
- Hellingwerf KJ. (2005)** Bacterial observations: a rudimentary form of intelligence? *Trends Microbiol.* **13**:152-8.
- Hendrickson WA. (2006)** Transduction of biochemical signals across cell membranes. *Q Rev Biophys.* **38**:321-30.
- Henrichsen J. (1972)** Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev.* **36**:478-503.
- Hillesland KL, Lenski RE, Velicer GJ. (2007)** Ecological Variables Affecting Predatory Success in *Myxococcus xanthus*. *Microb Ecol.* **53**: 571-8.
- Hoch JA. (2000)** Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol.* **3**(2):165-70.
- Hodgkin J, Kaiser D. (1977)** Cell-to-cell stimulation of movement in nonmotile mutants of *Myxococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**:2938-2942.
- Hodgkin J, Kaiser, D. (1979a)** Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): genes controlling movement of single cells. *Mol. Gen. Genet.* **171**:167-176.
- Hodgkin J, Kaiser, D. (1979b)** Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): two gene systems control movement. *Mol. Gen. Genet.* **171**:177-191.
- Hohmann S. (2002)** Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66**:300-72
- Hoiczky E, Baumeister W. (1998)** The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. *Curr Biol.* **8**:1161-8.
- Holland PM, Cooper JA. (1999)** Protein modification: docking sites for kinases. *Curr Biol.* **9**:R329-31.
- Horinouchi S. (2003)** AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Ind Microbiol Biotechnol.* **30**:462-7.
- Horiuchi T, Taoka M, Isobe T, Komano T, Inouye S. (2002)** Role of *fruA* and *csgA* genes in gene expression during development of *Myxococcus xanthus*. Analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem.* **277**:26753-60.
- Hubbard SR, Till JH. (2000)** Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem.* **69**:373-98.
- Huitema E, Viollier PH. (2006)** A myxobacterial S-motility protein dances with poles. *Trends Microbiol.* **14**:247-8.
- Hunter T. (2000)** Signaling-2000 and Beyond. *Cell.* **100** (1):113-127.
- Huse M, Kuriyan J. (2002)** The conformational plasticity of protein kinases. *Cell.* **109**:275-82.
- Hussain H, Branny P, Allan E. (2006)** A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* **188**:1628-32.
- Igoshin OA, Goldbeter A, Kaiser D, Oster G. (2004)** A biochemical oscillator explains several aspects of *Myxococcus xanthus* behavior during development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**:15760-5.

-
- Iizuka T, Jojima Y, Fudou R, Hiraishi A, Ahn JW, Yamanaka S. (2003)** *Plesiocystis pacifica* gen. nov., sp. nov., a marine myxobacterium that contains dihydrogenated menaquinone, isolated from the Pacific coasts of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol.* **53**:189-95.
- Iizuka T, Jojima Y, Fudou R, Yamanaka S. (1998)** Isolation of myxobacteria from the marine environment. *FEMS Microbiol Lett.* **169**:317-22.
- Imlay JA. (2003)** Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol.* **57**:395-418.
- Inouye M, Inouye S, Zusman DR. (1979)** Biosynthesis and self-assembly of protein S, a development-specific protein of *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**:209-13.
- Inouye S, Jain R, Ueki T, Nariya H, Xu CY, Hsu MY, Fernández-Luque BA, Muñoz-Dorado J, Fárez-Vidal E, Inouye M. (2000)** A large family of eukaryotic-like protein Ser/Thr kinases of *Myxococcus xanthus*, a developmental bacterium. *Microb Comp Genomics.* **5**:103-20.
- Iyer GH, Garrod S, Woods VL Jr, Taylor SS. (2005)** Catalytic independent functions of a protein kinase as revealed by a kinase-dead mutant: study of the Lys72His mutant of cAMP-dependent kinase. *J Mol Biol.* **351**:1110-22.
- Jain R, Inouye S. (1998)** Inhibition of development of *Myxococcus xanthus* by eukaryotic protein kinase inhibitors. *J. Bacteriol.* **180**:6544-6550.
- Jain V, Kumar M, Chatterji D. (2006)** ppGpp: stringent response and survival. *J Microbiol.* **44**:1-10.
- Jakobsen JS, Jelsbak L, Jelsbak L, Welch RD, Cummings C, Goldman B, Stark E, Slater S, Kaiser D. (2004)** Sigma54 enhancer binding proteins and *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *J Bacteriol.* **186**:4361-8.
- James P, Halladay J, Craig EA. (1996)** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.* **144**:1425-36.
- Jelsbak L, Givskov M, Kaiser D. (2005)** Enhancer-binding proteins with a forkhead-associated domain and the sigma54 regulon in *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:3010-5.
- Jelsbak L, Søgaard-Andersen L. (1999)** The cell surface-associated intercellular C-signal induces behavioral changes in individual *Myxococcus xanthus* cells during fruiting body morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:5031-6.
- Jelsbak L, Søgaard-Andersen L. (2002)** Pattern formation by a cell surface-associated morphogen in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:2032-7.
- Jenal U, Malone J. (2006)** Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet.* **40**:385-407.
- Johnson LN, Barford D. (1993)** The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **22**:199-232.
- Johnson LN, Lowe ED, Noble ME, Owen DJ. (1998)** The Eleventh Datta Lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett.* **430**:1-11.
- Johnson LN, Noble ME, Owen DJ. (1996)** Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell.* **85**:149-58.
- Johnson SA, Hunter T. (2005)** Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat Methods.* **2**:17-25.
- Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. (2003)** Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res.* **284**:31-53.

-
- Jovanovic G, Lloyd LJ, Stumpf MP, Mayhew AJ, Buck M. (2006)** Induction and function of the phage shock protein extracytoplasmic stress response in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **281**:21147-61.
- Julien B, Kaiser AD, Garza A. (2000)** Spatial control of cell differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:9098-103.
- Juris SJ, Rudolph AE, Huddler D, Orth K, Dixon JE. (2000)** A distinctive role for the *Yersinia* protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:9431-6.
- Kaiser C, Michaelis S, Mitchell A. (1994)** Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Kaiser D. (1979)** Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**:5952-6.
- Kaiser D. (1986)** Control of multicellular development: *Dictyostelium* and *Myxococcus*. *Annu Rev Genet* **20**:539-66.
- Kaiser D. (2004)** Signaling in myxobacteria. *Annu Rev Microbiol.* **58**:75-98.
- Kaiser D, Kroos L. (1993)** Intercellular signaling. En:Myxobacteria II (Dworkin, M., and Kaiser, D., eds.) American Society for Microbiology Press. Washington D.C. pp: 257-283.
- Kaiser D, Welch R. (2004)** Dynamics of fruiting body morphogenesis. *J Bacteriol.* **186**:919-27.
- Kalman LV, Cheng YL, Kaiser D. (1994)** The *Myxococcus xanthus* *dsg* gene product performs functions of translation initiation factor IF3 *in vivo*. *J Bacteriol.* **176**:1434-42.
- Kamei A, Yuasa T, Geng X, Ikeuchi M. (2002)** Biochemical examination of the potential eukaryotic-type protein kinase genes in the complete genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *DNA Res.* **9**:71-8.
- Kanacher T, Schultz A, Linder JU, Schultz JE. (2002)** A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch. *EMBO J.* **21**:3672-80.
- Kannan N, Neuwald AF. (2005)** Did protein kinase regulatory mechanisms evolve through elaboration of a simple structural component? *J Mol Biol.* **351**:956-72.
- Kannan N, Taylor SS, Zhai Y, Venter JC, Manning G. (2007)** Structural and functional diversity of the microbial kinome. *PLoS Biol.* **5**:e17.
- Kaplan HB. (2003)** Multicellular development and gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Curr Opin Microbiol.*:572-7.
- Kaplan HB, Plamann L. (1996)** A *Myxococcus xanthus* cell density-sensing system required for multicellular development. *FEMS Microbiol Lett.* **139**:89-95.
- Karlin S, Brocchieri L, Mrazek J, Kaiser D. (2006)** Distinguishing features of delta-proteobacterial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:11352-7.
- Kashefi K, Hartzell PL. (1995)** Genetic suppression and phenotypic masking of a *Myxococcus xanthus* *frzF*-defect. *Mol Microbiol.* **15**:483-94.
- Kay BK, Williamson MP, Sudol M. (2000)** The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* **14**:231-41.
- Kearns DB, Bonner PJ, Smith DR, Shimkets LJ. (2002)** An extracellular matrix-associated zinc metalloprotease is required for dilauroyl phosphatidylethanolamine chemotactic excitation in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **184**:1678-84.

-
- Kearns DB, Shimkets LJ. (1998)** Chemotaxis in a gliding bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:11957-62.
- Kearns DB, Shimkets LJ. (2001)** Lipid chemotaxis and signal transduction in *Myxococcus xanthus*. *Trends Microbiol.* **9**:126-9.
- Kennelly PJ. (2002)** Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiol Lett.* **206**(1):1-8.
- Keseler IM, Kaiser D. (1995)** An early A-signal-dependent gene in *Myxococcus xanthus* has a sigma 54-like promoter. *J Bacteriol.* **177**(16):4638-44.
- Khorchid A, Ikura M. (2006)** Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *Int J Biochem Cell Biol.* **38**(3):307-12.
- Kim C, Xuong NH, Taylor SS. (2005)** Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (R1alpha) subunits of PKA. *Science.* **307**(5710):690-6.
- Kim D, Forst S. (2001)** Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology.* **147**:1197-212.
- Kim SK, Kaiser D. (1990a)** C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *Myxococcus xanthus*. *Cell.* **61**:19-26.
- Kim SK, Kaiser D. (1990b)** Purification and properties of *Myxococcus xanthus* C-factor, an intercellular signaling protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:3635-3639.
- Kim SK, Kaiser D. (1991)** C-factor has distinct aggregation and sporulation thresholds during *Myxococcus* development. *J. Bacteriol.* **173**:1722-1728.
- Kim YH, Park YM, Kim SJ, Park YI, Choi JS, Chung YH. (2004)** The role of Slr1443 in pilus biogenesis in *Synechocystis sp.* PCC 6803: involvement in post-translational modification of pilins. *Biochem Biophys Res Commun.* :179-86.
- Kiskowski MA, Jiang Y, Alber MS. (2004)** Role of streams in myxobacteria aggregate formation. *Phys Biol.* **1**:173-83.
- Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM. (1991)** Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science.* **253**:407-14.
- Kobayashi R, Suzuki T, Yoshida M. (2007)** *Escherichia coli* phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. *Mol Microbiol.* **66**:100-9.
- Kobe B, Kampmann T, Forwood JK, Listwan P, Brinkworth RI. (2005)** Substrate specificity of protein kinases and computational prediction of substrates. *Biochim Biophys Acta.* **1754**:200-9.
- Komano T, Inouye S, Inouye M. (1980)** Patterns of protein production in *Myxococcus xanthus* during spore formation induced by glycerol, dimethyl sulfoxide, and phenethyl alcohol. *J Bacteriol.* **144**:1076-82.
- Konstantinidis KT, Tiedje JM. (2004)** Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**:3160-5.
- Kornev AP, Haste NM, Taylor SS, Eyck LF. (2006)** Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:17783-8.
- Kroos L. (2005)** Eukaryotic-like signaling and gene regulation in a prokaryote that undergoes multicellular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:2681-2.

-
- Kroos L, Kaiser D. (1984)** Construction of Tn5 *lac*, a transposon that fuses *lacZ* expression to exogenous promoters, and its introduction into *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81**:5816-20.
- Kroos L, Kaiser D. (1987)** Expresión of many developmentally regulated genes in *Myxococcus* depends on a sequence of cell interactions. *Genes Dev.* **1**:840-54.
- Kroos L, Kaiser D. (1987)** Expression of many developmentally regulated genes in *Myxococcus* depends on a sequence of cell interactions. *Genes Dev.* **1**:840-54.
- Kroos L, Kuspa A, Kaiser D. (1986)** A global analysis of developmentally regulated genes in *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol.* **117**:252-66.
- Kroos L, Kuspa A, Kaiser D. (1990)** Defects in fruiting body development caused by Tn5 *lac* insertions in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **172**:484-7.
- Krupa A, Preethi G, Srinivasan N. (2004)** Structural modes of stabilization of permissive phosphorylation sites in protein kinases: distinct strategies in Ser/Thr and Tyr kinases. *J Mol Biol.* **339**:1025-39.
- Krupa A, Srinivasan N. (2005)** Diversity in domain architectures of Ser/Thr kinases and their homologues in prokaryotes. *BMC Genomics.* **6**:129.
- Kruse T, Lobedanz S, Berthelsen NM, Søgaard-Andersen L. (2001)** C-signal: a cell surface-associated morphogen that induces and co-ordinates multicellular fruiting body morphogenesis and sporulation in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* **40**:156-68.
- Kuroda A, Nomura K, Ohtomo R, Kato J, Ikeda T, Takiguchi N, Ohtake H, Kornberg A. (2001)** Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science.* **293**:705-8.
- Kuspa A, Kroos L, Kaiser D. (1986)** Intercellular signaling is required for developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Dev Biol.* **117**:267-76.
- Kuspa A, Plamann L, Kaiser D. (1992a)** A-signalling and the cell density requirement for *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol.* **174**:7360-9.
- Kuspa A, Plamann L, Kaiser D. (1992b)** Identification of heat-stable A-factor from *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **174**:3319-26.
- Lampky JR. (1971)** Distribution of *Sorangium cellulosum*. *Appl Microbiol.* **22**:937-8.
- LaRossa R, Kuner J, Hagen D, Manoil C, Kaiser D. (1983)** Developmental cell interactions of *Myxococcus xanthus*: analysis of mutants. *J Bacteriol.* **153**:1394-404.
- Latifi A, Jeanjean R, Lemeille S, Havaux M, Zhang CC. (2005)** Iron starvation leads to oxidative stress in *Anabaena sp.* strain PCC 7120. *J Bacteriol.* **187**:6596-8.
- Lechno-Yossef S, Fan Q, Ehira S, Sato N, Wolk CP. (2006)** Mutations in four regulatory genes have interrelated effects on heterocyst maturation in *Anabaena sp.* strain PCC 7120. *J Bacteriol.* **188**:7387-95.
- Lee BU, Lee K, Méndez J, Shimkets LJ. (1995)** A tactile sensory system of *Myxococcus xanthus* involves an extracellular NAD(P)⁺-containing protein. *Genes Dev.* **9**:2964-2973.
- Lee PC, Umeyama T, Horinouchi S. (2001)** *afsS* is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* **43**:1413-30.
- Leonard CJ, Aravind L, Koonin EV. (1998)** Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. *Genome Res.* **8**:1038-47.

-
- Lewin B. (2003)** Genes VIII. Addison-Wesley eds. Prentice-Hall
- Li E, Hristova K. (2006)** Role of receptor tyrosine kinase transmembrane domains in cell signaling and human pathologies. *Biochemistry*. **45**:6241-51.
- Li S, Lee BU, Shimkets LJ. (1992)** *csgA* expression entrains *Myxococcus xanthus* development. *Genes Dev*. **6**:401-10.
- Li SS. (2005)** Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J*. **390**:641-53.
- Li Y, Bustamante VH, Lux R, Zusman D, Shi W. (2005)** Divergent regulatory pathways control A and S motility in *Myxococcus xanthus* through FrzE, a CheA-CheY fusion protein. *J Bacteriol*. **187**:1716-23.
- Li Y, Plamann L. (1996)** Purification and in vitro phosphorylation of *Myxococcus xanthus* AsgA protein. *J Bacteriol*. **178**:289-92.
- Li Y, Rivera D, Ru W, Gunasekera D, Kemp RG. (1999)** Identification of allosteric sites in rabbit phosphofructo-1-kinase. *Biochemistry*. **38**:16407-12.
- Li Y, Sun H, Ma X, Lu A, Lux R, Zusman D, Shi W. (2003)** Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**:5443-8.
- Licking E, Gorski L, Kaiser D. (2000)** A common step for changing cell shape in fruiting body and starvation-independent sporulation of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol*. **182**:3553-8.
- Linder JU. (2006)** Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation. *Cell Mol Life Sci*. **63**:1736-51.
- Llamas MA, Rodríguez-Herva JJ, Hancock RE, Bitter W, Tommassen J, Ramos JL. (2003)** Role of *Pseudomonas putida tol-oprL* gene products in uptake of solutes through the cytoplasmic membrane. *J Bacteriol*. **185**:4707-16.
- Lobedanz S, Søgaard-Andersen L. (2003)** Identification of the C-signal, a contact-dependent morphogen coordinating multiple developmental responses in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev*. **17**:2151-61.
- Loshon CA, Setlow P. (1982)** *Bacillus megaterium* spore protease: purification, radioimmunoassay, and analysis of antigen level and localization during growth, sporulation, and spore germination. *J Bacteriol*. **150**:303-11.
- Lu A, Cho K, Black WP, Duan XY, Lux R, Yang Z, Kaplan HB, Zusman DR, Shi W. (2005)** Exopolysaccharide biosynthesis genes required for social motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol*. **55**:206-20.
- Lynch M, Conery JS. (2003)** The origins of genome complexity. *Science*. **302**:1401-4.
- Macias MJ, Wiesner S, Sudol M. (2002)** WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett*. **513**:30-7.
- Madec E, Laszkiewicz A, Iwanicki A, Obuchowski M, Seror S. (2002)** Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol Microbiol*. **46**:571-86.
- Madec E, Stensballe A, Kjellstrom S, Cladiere L, Obuchowski M, Jensen ON, Seror SJ. (2003)** Mass spectrometry and site-directed mutagenesis identify several autophosphorylated residues required for the activity of PrkC, a Ser/Thr kinase from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*. **330**:459-72.

-
- Mahmud T, Bode HB, Silakowski B, Kroppenstedt RM, Xu M, Nordhoff S, Hofle G, Muller R. (2002)** A novel biosynthetic pathway providing precursors for fatty acid biosynthesis and secondary metabolite formation in myxobacteria. *J Biol Chem.* **277**:32768-74.
- Malumbres M, Barbacid M. (2005)** Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.* **30**:630-41.
- Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. (2002a)** Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci.* **27**:514-20.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002b)** The protein kinase complement of the human genome. *Science.* **298**:1912-34.
- Manoil C, Kaiser D. (1980a)** Accumulation of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate in *Myxococcus xanthus* during starvation and myxospore formation. *J Bacteriol.* **141**:297-304.
- Manoil C, Kaiser D. (1980b)** Guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate accumulation and induction of *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *J Bacteriol.* **141**:305-15.
- Marshall MS. (1995)** Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J.* **9**:1311-8.
- Mascher T, Helmann JD, Uden G. (2006)** Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* **70**:910-38.
- Mayer BJ. (2006)** Protein-protein interactions in signaling cascades. *Methods Mol Biol.* **332**:79-99.
- McCleary WR, Esmon B, Zusman DR. (1991)** *Myxococcus xanthus* protein C is a major spore surface protein. *J Bacteriol.* **173**:2141-5.
- Mignot T, Merlie JP Jr, Zusman DR. (2005)** Regulated pole-to-pole oscillations of a bacterial gliding motility protein. *Science.* **310**:855-7.
- Mignot T, Shaevitz JW, Hartzell PL, Zusman DR. (2007)** Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. *Science.* **315**:853-6.
- Miller JH. (1972)** Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Model P, Jovanovic G, Dworkin J. (1997)** The *Escherichia coli* phage-shock-protein (*psp*) operon. *Mol Microbiol.* **24**:255-61.
- Molle V, Kremer L, Girard-Blanc C, Besra GS, Cozzone AJ, Prost JF. (2003)** An FHA phosphoprotein recognition domain mediates protein EmbR phosphorylation by PknH, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry.* **42**:15300-9.
- Molle V, Soulat D, Jault JM, Grangeasse C, Cozzone AJ, Prost JF. (2004)** Two FHA domains on an ABC transporter, Rv1747, mediate its phosphorylation by PknF, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* **234**:215-23.
- Morrison CE, Zusman DR. (1979)** *Myxococcus xanthus* mutants with temperature-sensitive, stage-specific defects: evidence for independent pathways in development. *J Bacteriol.* **140**:1036-42.
- Motley ST, Lory S. (1999)** Functional characterization of a serine/threonine protein kinase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* **67**:5386-94.
- Mougous JD, Gifford CA, Ramsdell TL, Mekalanos JJ. (2007)** Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Cell Biol.* **9**:797-803.
- Muñoz-Dorado J, Inouye S, Inouye M. (1991)** A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell.* **67**:995-1006.

-
- Nadvornik R, Vomastek T, Janecek J, Technikova Z, Branny P. (1999)** Pkg2, a novel transmembrane protein Ser/Thr kinase of *Streptomyces granaticolor*. *J Bacteriol.* **181**:15-23.
- Nariya H, Inouye S. (2002)** Activation of 6-phosphofructokinase via phosphorylation by Pkn4, a protein Ser/Thr kinase of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* **46**:1353-66.
- Nariya H, Inouye S. (2003)** An effective sporulation of *Myxococcus xanthus* requires glycogen consumption via Pkn4-activated 6-phosphofructokinase. *Mol Microbiol.* **49**:517-28.
- Nariya H, Inouye S. (2005a)** Modulating factors for the Pkn4 kinase cascade in regulating 6-phosphofructokinase in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* **56**:1314-28.
- Nariya H, Inouye S. (2005b)** Identification of a protein Ser/Thr kinase cascade that regulates essential transcriptional activators in *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol.* **58**:367-79.
- Nariya H, Inouye S. (2006)** A protein Ser/Thr kinase cascade negatively regulates the DNA-binding activity of MrpC, a smaller form of which may be necessary for the *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol.* **60**:1205-17.
- Nejedlik L, Pierfelice T, Geiser JR. (2004)** Actin distribution is disrupted upon expression of *Yersinia* YopO/YpkA in yeast. *Yeast.* **21**:759-68.
- Neu JM, MacMillan SV, Nodwell JR, Wright GD. (2002)** StoPK-1, a serine/threonine protein kinase from the glycopeptide antibiotic producer *Streptomyces toyocaensis* NRRL 15009, affects oxidative stress response. *Mol Microbiol.* **44**:417-30.
- Neu JM, Wright GD. (2001)** Inhibition of sporulation, glycopeptide antibiotic production and resistance in *Streptomyces toyocaensis* NRRL 15009 by protein kinase inhibitors. *FEMS Microbiol Lett.* **199**:15-20.
- Nizet V. (2002)** Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends Microbiol.* **10**:575-80.
- Nolen B, Taylor S, Ghosh G. (2004)** Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol Cell.* **15**:661-75.
- Nudleman E, Wall D, Kaiser D. (2005)** Cell-to-cell transfer of bacterial outer membrane lipoproteins. *Science.* **309**:125-7.
- O'Connor KA, Zusman DR. (1991)** Behavior of peripheral rods and their role in the life cycle of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **173**:3342-55.
- O'Connor KA, Zusman DR. (1997)** Starvation-independent sporulation in *Myxococcus xanthus* involves the pathway for beta-lactamase induction and provides a mechanism for competitive cell survival. *Mol Microbiol.* **24**:839-50.
- O'Connor KA, Zusman DR. (1999)** Induction of beta-lactamase influences the course of development in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **181**:6319-31.
- Ogawa M, Fujitani S, Mao X, Inouye S, Komano T. (1996)** FruA, a putative transcription factor essential for the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* **22**:757-67.
- Ortiz-Lombardia M, Pompeo F, Boitel B, Alzari PM. (2003)** Crystal structure of the catalytic domain of the PknB serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* **278**:13094-100.
- Otani M, Inouye M, Inouye S. (1995)** Germination of myxospores from the fruiting bodies of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **177**:4261-5.
- Otani M, Kozuka S, Xu C, Umezawa C, Sano K, Inouye S. (1998)** Protein W, a spore-specific protein in *Myxococcus xanthus*, formation of a large electron-dense particle in a spore. *Mol Microbiol.* **30**:57-66.

-
- Pallen M, Chaudhuri R, Khan A. (2002)** Bacterial FHA domains: neglected players in the phosphothreonine signalling game? *Trends Microbiol.* **10**:556-63.
- Panichkin VB, Arakawa-Kobayashi S, Kanaseki T, Suzuki I, Los DA, Shestakov SV, Murata N. (2006)** Serine/threonine protein kinase SpkA in *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 is a regulator of expression of three putative *pilA* operons, formation of thick pili, and cell motility. *J Bacteriol.* **188**:7696-9.
- Pellicena P, Miller WT. (2002)** Coupling kinase activation to substrate recognition in Src-family tyrosine kinases. *Front Biosci.* **7**:256-67.
- Pelling AE, Li Y, Shi W, Gimzewski JK. (2005)** Nanoscale visualization and characterization of *Myxococcus xanthus* cells with atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:6484-9.
- Petricková K, Petricek M. (2003)** Eukaryotic-type protein kinases in *Streptomyces coelicolor*: variations on a common theme. *Microbiology.* **149**:1609-21
- Phalip V, Li JH, Zhang CC. (2001)** HstK, a cyanobacterial protein with both a serine/threonine kinase domain and a histidine kinase domain: implication for the mechanism of signal transduction. *Biochem J.* **360**:639-44.
- Plamann L, Davis JM, Cantwell B, Mayor J. (1994)** Evidence that *asgB* encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **176**(7):2013-20.
- Plamann L, Kuspa A, Kaiser D. (1992)** Proteins that rescue A-signal-defective mutants of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **174**:3311-8.
- Plamann L, Li Y, Cantwell B, Mayor J. (1995)** The *Myxococcus xanthus asgA* gene encodes a novel signal transduction protein required for multicellular development. *J Bacteriol.* **177**:2014-20.
- Pomposiello PJ, Demple B. (2001)** Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.* **19**:109-14.
- Preiss J, Romeo T. (1989)** Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. *Adv Microb Physiol.* **30**:183-238.
- Pushker R, Mira A, Rodriguez-Valera F. (2004)** Comparative genomics of gene-family size in closely related bacteria. *Genome Biol.* **5**:R27.
- Rajagopal L, Clancy A, Rubens CE. (2003)** A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. *J Biol Chem.* **278**:14429-41.
- Rajagopal L, Vo A, Silvestroni A, Rubens CE. (2006)** Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol.* **62**:941-57.
- Reichenbach, H. (1993)** Biology of the Myxobacteria: Ecology and Taxonomy en Myxobacteria II. (Dworkin, M., and Kaiser, D., eds.), *American Society for Microbiology Press*, Washington D.C. pp: 13-62.
- Reichenbach H. (1999)** The ecology of the myxobacteria. *Environ Microbiol.* **1**(1):15-21.
- Reichenbach H. (2005)** *Myxococcales*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2ª edición. Volumen 2 (The Proteobacteria). pp: 1059-1144.
- Reichenbach H, Dworkin M. (1992)** The myxobacteria. En: The Prokaryotes (2ª edición) (Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin. M., Harder, W. y Scheleifer, K.H., eds.) A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications., Springer-Verlag, New York. pp: 3416-3487.

-
- Reichenbach H, Hofle G. (1993)** Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. *Biotechnol Adv.* **11**:219-77.
- Rhie HG, Shimkets LJ. (1989)** Developmental bypass suppression of *Myxococcus xanthus* *csgA* mutations. *J Bacteriol.* **171**:3268-76.
- Robzyk K, Kassir Y. (1992)** A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res.* **20**:3790.
- Rosenberg E, Keller KH, Dworkin M. (1977)** Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein. *J. Bacteriol.* **129**: 770-777.
- Rosenbluh A, Rosenberg E. (1989a)** Autocide AMI rescues development in *dsg* mutants of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **171**:1513-8.
- Rosenbluh A, Rosenberg E. (1989b)** Sporulation of *Myxococcus xanthus* in liquid shake flask cultures. *J. Bacteriol.* **171**: 4521-4524.
- Rubenstein EM, Schmidt MC. (2007)** Mechanisms regulating the protein kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* **6**:571-83
- Sager B, Kaiser D. (1993)** Spatial restriction of cellular differentiation. *Genes Dev.* **7**:1645-53.
- Sambrook J, Russell DW. (2001)** Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanford RA, Cole JR, Tiedje JM. (2002)** Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halorespiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl Environ Microbiol.* **68**:893-900.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**:5463-7.
- Santos JL, Shiozaki K. (2004)** Phosphorelay signaling in yeast in response to changes in osmolarity. *Sci STKE.* **2004**:tr12.
- Schenk PW, Snaar-Jagalska BE. (1999)** Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta.* **1449**:1-24.
- Schwartz MA, Madhani HD. (2004)** Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet.* **38**:725-48.
- Sharma K, Gupta M, Krupa A, Srinivasan N, Singh Y. (2006a)** EmbR, a regulatory protein with ATPase activity, is a substrate of multiple serine/threonine kinases and phosphatase in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS J.* **273**:2711-21.
- Sharma K, Gupta M, Pathak M, Gupta N, Koul A, Sarangi S, Baweja R, Singh Y. (2006b)** Transcriptional control of the mycobacterial *embCAB* operon by PknH through a regulatory protein, EmbR, *in vivo*. *J Bacteriol.* **188**:2936-44.
- Shi L, Potts M, Kennelly PJ. (1998)** The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS Microbiol Rev.* **22**:229-53.
- Shi W, Kohler T, Zusman DR. (1993)** Chemotaxis plays a role in the social behaviour of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* **9**(3):601-11.
- Shi W, Kohler T, Zusman DR. (1994)** Motility and chemotaxis in *Myxococcus xanthus*. En: Molecular Microbiology Techniques. Adolph, K.W. (ed.) Vol. 3, Academic Press, San Diego, CA. pp: 258-269.

-
- Shi W, Yang Z, Sun H, Lancero H, Tong L. (2000)** Phenotypic analyses of *frz* and *dif* double mutants of *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiol Lett.* **192**:211-5.
- Shi Y, Massague J. (2003)** Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* **113**:685-700.
- Shi Z, Resing KA, Ahn NG. (2006)** Networks for the allosteric control of protein kinases. *Curr Opin Struct Biol.* **16**:686-92.
- Shimkets LJ. (1993)** The myxobacterial genome. En: *Myxobacteria II*. Dworkin, M. and Kaiser, D., eds., American Society for Microbiology Press, Washington D.C. pp: 85-107.
- Shimkets LJ. (1999)** Intercellular signaling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*. *Annu Rev Microbiol.* **53**:525-49.
- Shimkets LJ, Asher SJ. (1988)** Use of recombination techniques to examine the structure of the *csg* locus of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* **211**:63-71.
- Shimkets LJ, Rafiee H. (1990)** CsgA, an extracellular protein essential for *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol.* **172**:5299-306.
- Singer M, Kaiser D. (1995)** Ectopic production of guanosine penta- and tetraphosphate can initiate early developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev.* **9**:1633-44.
- Skamnaki VT, Owen DJ, Noble ME, Lowe ED, Lowe G, Oikonomakos NG, Johnson LN. (1999)** Catalytic mechanism of phosphorylase kinase probed by mutational studies. *Biochemistry.* **38**:14718-30.
- Skorko R. (1984)** Protein phosphorylation in the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur J Biochem.* **145**:617-22.
- Sliusarenko O, Neu J, Zusman DR, Oster G. (2006)** Accordion waves in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:1534-9.
- Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ. (1999)** The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci.* **24**:181-5.
- Søgaard-Andersen L. (2004).** Cell polarity, intercellular signalling and morphogenetic cell movements in *Myxococcus xanthus*. *Curr Opin Microbiol.* **7**:587-93.
- Søgaard-Andersen L, Kaiser D. (1996)** C factor, a cell-surface-associated intercellular signaling protein, stimulates the cytoplasmic Frz signal transduction system in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:2675-9.
- Southern EM. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **98**:503-517.
- Sozinova O, Jiang Y, Kaiser D, Alber M. (2005)** A three-dimensional model of myxobacterial aggregation by contact-mediated interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:11308-12.
- Sozinova O, Jiang Y, Kaiser D, Alber M. (2006)** A three-dimensional model of myxobacterial fruiting-body formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:17255-9.
- Spormann AM, Kaiser AD. (1995)** Gliding movements in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **177**:5846-52.
- Spormann AM, Kaiser D. (1999)** Gliding mutants of *Myxococcus xanthus* with high reversal frequencies and small displacements. *J Bacteriol.* **181**:2593-601.
- Stapley BJ, Creamer TP. (1999)** A survey of left-handed polyproline II helices. *Protein Sci.* **8**:587-595.

-
- Stein EA, Cho K, Higgs PI, Zusman DR. (2006)** Two Ser/Thr protein kinases essential for efficient aggregation and spore morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* **60**:1414-31.
- Stephens K, Kaiser D. (1987)** Genetic of gliding motility in *Myxococcus xanthus*: molecular cloning of the *mgl* locus. *Mol Gen Genet.* **207**:256-266.
- Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. (2000)** Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* **69**:183-215.
- Strom MS, Lory S. (1993)** Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu Rev Microbiol.* **47**:565-96.
- Studier FW, Moffatt BA. (1986)** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* **189**:113-30.
- Sun H, Shi W. (2001a)** Analyses of *mrp* genes during *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol.* **183**:6733-9.
- Sun H, Shi W. (2001b)** Genetic studies of *mrp*, a locus essential for cellular aggregation and sporulation of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **183**:4786-95.
- Taylor SS, Knighton DR, Zheng J, Sowadski JM, Gibbs CS, Zoller MJ. (1993)** A template for the protein kinase family. *Trends Biochem Sci.* **18**:84-89.
- Taylor SS, Radzio-Andzelm E, Hunter T. (1995)** How do protein kinases discriminate between serine/threonine and tyrosine? Structural insights from the insulin receptor protein-tyrosine kinase. *FASEB J.* **9**:1255-66.
- Teintze M, Thomas R, Furuichi T, Inouye M, Inouye S. (1985)** Two homologous genes coding for spore-specific proteins are expressed at different times during development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **163**:121-5.
- Ten Dijke P, Hill CS. (2004)** New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci.* **29**:265-73.
- Thomasson B, Link J, Stassinopoulos AG, Burke N, Plamann L, Hartzell PL. (2002)** MglA, a small GTPase, interacts with a tyrosine kinase to control type IV pili-mediated motility and development of *Myxococcus xanthus*. *Mol Microbiol.* **46**:1399-413.
- Thony-Meyer L, Kaiser D. (1993)** *devRS*, an autoregulated and essential genetic locus for fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **175**:7450-62.
- Tibbles LA, Woodgett JR. (1999)** The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci.* **55**:1230-54.
- Toal DR, Clifton SW, Roe BA, Downard J. (1995)** The *esg* locus of *Myxococcus xanthus* encodes the E1 alpha and E1 beta subunits of a branched-chain keto acid dehydrogenase. *Mol Microbiol.* **16**:177-89.
- Tomono A, Mashiko M, Shimazu T, Inoue H, Nagasawa H, Yoshida M, Ohnishi Y, Horinouchi S. (2006)** Self-activation of serine/threonine kinase AfsK on autophosphorylation at threonine-168. *J Antibiot (Tokyo).* **59**:117-23.
- Treuner-Lange A, Ward MJ, Zusman DR. (2001)** Pph1 from *Myxococcus xanthus* is a protein phosphatase involved in vegetative growth and development. *Mol Microbiol.* **40**:126-40.
- Tzeng L, Ellis TN, Singer M. (2006)** DNA replication during aggregation phase is essential for *Myxococcus xanthus* development. *J Bacteriol.* **188**:2774-9.
- Tzeng L, Singer M. (2005)** DNA replication during sporulation in *Myxococcus xanthus* fruiting bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:14428-33.

-
- Udo H, Inouye M, Inouye S. (1996)** Effects of overexpression of Pkn2, a transmembrane protein serine/threonine kinase, on development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **178**(22):6647-9.
- Udo H, Inouye M, Inouye S. (1997)** Biochemical characterization of Pkn2, a protein Ser/Thr kinase from *Myxococcus xanthus*, a Gram-negative developmental bacterium. *FEBS Lett.* **400**:188-92.
- Udo H, Lam CK, Mori S, Inouye M, Inouye S. (2000)** Identification of a substrate for Pkn2, a protein Ser/Thr kinase from *Myxococcus xanthus* by a novel method for substrate identification. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **2**:557-63.
- Udo H, Muñoz-Dorado J, Inouye M, Inouye S. (1995)** *Myxococcus xanthus*, a gram-negative bacterium, contains a transmembrane protein serine/threonine kinase that blocks the secretion of beta-lactamase by phosphorylation. *Genes Dev.* **9**:972-83.
- Ueki T, Inouye S. (2003)** Identification of an activator protein required for the induction of *fruA*, a gene essential for fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**:8782-7.
- Ueki T, Inouye S. (2006)** A novel regulation on developmental gene expression of fruiting body formation in Myxobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* **72**:21-9.
- Ueki T, Inouye S, Inouye M. (1996)** Positive-negative KG cassettes for construction of multi-gene deletions using a single drug marker. *Gene.* **183** :153-7
- Ulrich LE, Koonin EV, Zhulin IB. (2005)** One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* **13**:52-6.
- Umeyama T, Horinouchi S. (2001)** Autophosphorylation of a bacterial serine/threonine kinase, AfsK, is inhibited by KbpA, an AfsK-binding protein. *J Bacteriol.* **183**:5506-12.
- Umeyama T, Lee PC, Horinouchi S. (2002)** Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **59**:419-25.
- Umeyama T, Lee PC, Ueda K, Horinouchi S. (1999)** An AfsK/AfsR system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in *Streptomyces griseus*. *Microbiology.* **145** :2281-92.
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. (2001)** Plant histidine kinases: an emerging picture of two-component signal transduction in hormone and environmental responses. *Sci STKE.*2001(109):RE18
- Villarino A, Duran R, Wehenkel A, Fernandez P, England P, Brodin P, Cole ST, Zimny-Arndt U, Jungblut PR, Cerveñansky C, Alzari PM. (2005)** Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. *J Mol Biol.* **350**:953-63.
- Viswanathan P, Murphy K, Julien B, Garza AG, Kroos L. (2007a)** Regulation of *dev*, an Operon That Includes Genes Essential for *Myxococcus xanthus* Development and CRISPR-Associated Genes and Repeats. *J Bacteriol.* **189**:3738-50.
- Viswanathan P, Ueki T, Inouye S, Kroos L. (2007b)** Combinatorial regulation of genes essential for *Myxococcus xanthus* development involves a response regulator and a LysR-type regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**:7969-74.
- Walburger A, Koul A, Ferrari G, Nguyen L, Prescianotto-Baschong C, Huygen K, Klebl B, Thompson C, Bacher G, Pieters J. (2004)** Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science.* **304**:1800-4.
- Wall D, Kaiser D. (1999)** Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol.* **32**:1-10.

-
- Wang J, Li C, Yang H, Mushegian A, Jin S. (1998)** A novel serine/threonine protein kinase homologue of *Pseudomonas aeruginosa* is specifically inducible within the host infection site and is required for full virulence in neutropenic mice. *J Bacteriol.* **180**:6764-8.
- Wang L, Sun YP, Chen WL, Li JH, Zhang CC. (2002)** Genomic analysis of protein kinases, protein phosphatases and two-component regulatory systems of the cyanobacterium *Anabaena sp.* strain PCC 7120. *FEMS Microbiol Lett.* **217**:155-65
- Ward CW, Lawrence MC, Streltsov VA, Adams TE, McKern NM. (2007)** The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation. *Trends Biochem Sci.* **32**:129-37.
- Ware JC, Dworkin M. (1973)** Fatty acids of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **115**:253-61.
- Watson BF, Dworkin M. (1968)** Comparative intermediary metabolism of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **96**:1465-73.
- Weiner L, Model P. (1994)** Role of an *Escherichia coli* stress-response operon in stationary-phase survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:2191-5.
- West AH, Stock AM. (2001)** Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci.* **26**:369-76.
- White D. (1993)** Myxospore and fruiting body morphogenesis. En: Myxobacteria II. Dworkin, M., and Kaiser, D., eds., American Society for Microbiology Press, Washington D.C. pp: 307-332.
- Wiley DJ, Nordfeldth R, Rosenzweig J, DaFonseca CJ, Gustin R, Wolf-Watz H, Schesser K. (2006)** The Ser/Thr kinase activity of the *Yersinia* protein kinase A (YpkA) is necessary for full virulence in the mouse, mollifying phagocytes, and disrupting the eukaryotic cytoskeleton. *Microb Pathog.* **40**:234-43.
- Williamson MP. (1994)** The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* **297**:249-260.
- Wolanin PM, Thomason PA, Stock JB. (2002)** Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* **3**:3013
- Wolgemuth C, Hoiczky E, Kaiser D, Oster G. (2002)** How myxobacteria glide. *Curr Biol.* **12**:369-77.
- Wolk CP. (1996)** Heterocyst formation. *Annu Rev Genet.* **30**:59-78.
- Wu SS, Kaiser D. (1997)** Regulation of expression of the *pilA* gene in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol.* **179**:7748-58.
- Wu ZH, Jiang DM, Li P, Li YZ. (2005)** Exploring the diversity of myxobacteria in a soil niche by myxobacteria-specific primers and probes. *Environ Microbiol.* **7**:1602-10.
- Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ, Cobb MH. (2000)** WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II. *J Biol Chem.* **275**:16795-801.
- Xu WL, Jeanjean R, Liu YD, Zhang CC. (2003)** *pkn22* (alr2502) encoding a putative Ser/Thr kinase in the cyanobacterium *Anabaena sp.* PCC 7120 is induced by both iron starvation and oxidative stress and regulates the expression of *isiA*. *FEBS Lett.* **553**:179-82.
- Xu D, Yang C, Kaplan HB. (1998)** *Myxococcus xanthus sasN* encodes a regulator that prevents developmental gene expression during growth. *J Bacteriol.* **180**:6215-23.
- Xu WL, Jeanjean R, Liu YD, Zhang CC. (2003)** *pkn22* (alr2502) encoding a putative Ser/Thr kinase in the cyanobacterium *Anabaena sp.* PCC 7120 is induced by both iron starvation and oxidative stress and regulates the expression of *isiA*. *FEBS Lett.* **553**:179-82.
- Yaffe MB. (2002)** Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**:177-86.

-
- Yaffe MB, Elia AE. (2001)** Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Biol.* **13**:131-8.
- Yang C, Kaplan HB. (1997)** *Myxococcus xanthus sasS* encodes a sensor histidine kinase required for early developmental gene expression. *J Bacteriol.* **179**:7759-67.
- Yang Z, Geng Y, Xu D, Kaplan HB, Shi W. (1998)** A new set of chemotaxis homologues is essential for *Myxococcus xanthus* social motility. *Mol Microbiol.* **30**:1123-30.
- Yang Z, Ma X, Tong L, Kaplan HB, Shimkets LJ, Shi W. (2000)** *Myxococcus xanthus dif* genes are required for biogenesis of cell surface fibrils essential for social gliding motility. *J Bacteriol.* **182**:5793-8.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. (1985)** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**:103-19.
- Youderian P, Burke N, White DJ, Hartzell PL. (2003)** Identification of genes required for adventurous gliding motility in *Myxococcus xanthus* with the transposable element mariner. *Mol Microbiol.* **49**:555-70.
- Youderian P, Hartzell PL. (2006)** Transposon insertions of magellan-4 that impair social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Genetics.* **172**:1397-410.
- Young TA, Delagoutte B, Endrizzi JA, Falick AM, Alber T. (2003)** Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nat Struct Biol.* **10**:168-74.
- Yu R, Kaiser D. (2007)** Gliding motility and polarized slime secretion. *Mol Microbiol.* **63**:454-67.
- Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, Lim WA. (2003)** The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE.* **2003**:RE8.
- Zhang CC. (1993)** A gene encoding a protein related to eukaryotic protein kinases from the filamentous heterocystous cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**:11840-4.
- Zhang CC. (1996)** Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. *Mol Microbiol.* **20**:9-15.
- Zhang CC, Friry A, Peng L. (1998)** Molecular and genetic analysis of two closely linked genes that encode, respectively, a protein phosphatase 1/2A/2B homolog and a protein kinase homolog in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol.* **180**:2616-22.
- Zhang CC, Libs L. (1998)** Cloning and characterisation of the *pknD* gene encoding an eukaryotic-type protein kinase in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *Mol Gen Genet.* **258**:26-33.
- Zhang H, Dong H, Zhao J, Hu W, Li YZ. (2005a)** Characterization of developmental autolysis in myxobacterial fruiting body morphogenesis with profiling of amino acids using capillary electrophoresis method. *Amino Acids.* **28**:319-25.
- Zhang W, Inouye M, Inouye S. (1996)** Reciprocal regulation of the differentiation of *Myxococcus xanthus* by Pkn5 and Pkn6, eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases. *Mol Microbiol.* **20**:435-47.
- Zhang YQ, Li YZ, Wang B, Wu ZH, Zhang CY, Gong X, Qiu ZJ, Zhang Y. (2005b)** Characteristics and living patterns of marine myxobacterial isolates. *Appl Environ Microbiol.* **71**:3331-6.
- Zhang ZY. (2003)** Mechanistic studies on protein tyrosine phosphatases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **73**:171-220.
- Zhu G, Liu Y, Shaw S. (2005)** Protein kinase specificity. A strategic collaboration between kinase peptide specificity and substrate recruitment. *Cell Cycle.* **4**:52-6.
- Zusman DR, Scott AE, Yang Z, Kirby JR. (2007)** Chemosensory pathways, motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Nat Rev Microbiol.* **5**:862-72.

