



**Departamento de Microbiología  
Universidad de Granada**

**ANÁLISIS GLOBAL DE LAS PROTEÍNAS  
FOSFATASAS DE TIPO EUCARIOTA EN  
*Myxococcus xanthus***

**TESIS DOCTORAL  
RAQUEL GARCÍA HERNÁNDEZ**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Raquel García Hernández  
D.L.: GR. 2898-2008  
ISBN: 978-84-691-8332-8



**ANÁLISIS GLOBAL DE LAS PROTEÍNAS FOSFATASAS  
DE TIPO EUCARIOTA EN *Myxococcus xanthus***

Memoria presentada por la Licenciada  
Raquel García Hernández Para optar al  
título de Doctora en Biología.

Granada, Octubre de 2008

Raquel García Hernández



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

**José Muñoz Dorado**

Profesor Titular de Universidad

**Juana Pérez Torres**

Profesora Titular de Universidad



La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca de Formación de Investigadores del Plan Propio concedida por la Universidad de Granada. La investigación desarrollada ha sido financiada por los proyectos BMC 2003-02038 y BFU 2006-00972/BMC concedidos por el Ministerio de Educación y Ciencia y por el proyecto CVI 1377 concedido por la Junta de Andalucía.





**Aa.** Aminoácidos.  
**Ade<sup>-</sup>.** Carente de adenina.  
**ADN.** Ácido desoxirribonucleico.  
**ADNc.** Ácido desoxirribonucleico complementario.  
**AEE.** Actividad enzimática específica.  
**AMPc.** Adenosina monofosfato cíclico.  
**ARN.** Ácido ribonucleico.  
**ARNm.** Ácido ribonucleico mensajero.  
**ARNr.** Ácido ribonucleico ribosómico.  
**ARNt.** Ácido ribonucleico de transferencia.  
**ATP.** Adenosina trifosfato.  
**BCIP.** Sal 4-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato.  
**BSA.** Seroalbúmina bovina.  
**CCCP.** Carbonil cianida 3-cloro-fenil-hidrazona.  
**CPTP.** Proteína tirosina fosfatasa convencional.  
**dATP.** Desoxiadenosina trifosfato.  
**dCTP.** Desoxicitidina trifosfato.  
**DAPI.** 4', 6-diamidina-2-fenilindol dihidrocloro  
**DEPC.** Dietilpirocarbonato.  
**dGTP.** Desoxiguanosina trifosfato.  
**DIG\_dUTP.** Desoxiuridina trifosfato unida a digoxigenina.  
**DNAsa.** Desoxirribonucleasa.  
**DMSO.** Dimetil sulfóxido.  
**dNTP.** Desoxinucleótidos 5'-trifosfato.  
**DO<sub>600</sub>.** Densidad óptica medida a 600 nm.  
**DTT.** Ditioneitol.  
**dTTP.** Desoxitimidina trifosfato.  
**EDTA.** Ácido etilén diamino tetraacético.  
**ePKs.** Proteínas quinasas de tipo eucariota.  
**GDP.** Guanosina difosfato.  
**GTP.** Guanosina trifosfato.  
**h.** Horas.  
**His<sup>-</sup>.** Carente de histidina.  
**IPTG.** Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.  
**kb.** Kilobase.  
**kDa.** Kilodalton.  
**Leu<sup>-</sup>.** Carente de leucina.  
**LiAc.** Acetato de litio.  
**LMMPTP.** Proteína tirosina fosfatasa de bajo peso molecular.  
**Mb.** Megabase.  
**min.** Minutos.  
**ms.** Milisegundos.  
**MOPS.** Ácido 3-[N-morfolino]-propano sulfónico.  
**NBT.** Cloruro de nitroazul tetrazolium.  
**nm.** Nanometros.  
**ONP.** *o*-nitrofenol.  
**ONPG.** *o*-nitrofenil-β-D-galactósido.  
**ORF.** Pauta abierta de lectura.  
**pb.** Pares de bases.  
**PBS.** Tampón fosfato salino.



## *Abreviaturas*

**PCR.** Reacción en cadena de la DNA polimerasa.

**PEG.** Polietilenglicol.

**PFK.** Fosfofructoquinasa.

**Pkn.** Proteína quinasa.

**PMSF.** Fenil metil sulfonil fluoruro.

**pNPP.** *p*-nitrofenil fosfato.

**PPM.** Proteína fosfatasa dependiente de  $Mn^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ .

**PPP.** Fosfoproteína fosfatasa.

**(p)ppGpp.** Guanosina (tetra) penta fosfato.

**PTP.** Proteína tirosina fosfatasa.

**PVDF.** Fluoruro de polivinilideno.

**RNAsa.** Ribonucleasa.

**RT-PCR.** Reverso transcriptasa PCR.

**SDS.** Dodecil sulfato sódico.

**SDS-PAGE.** Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida.

**seg.** Segundos.

**TEM.** Microscopía electrónica de transmisión.

**TEMED.** N,N,N',N'-Tetrametil-etilenodiamino.

**Tm.** Temperatura de fusión de oligonucleótidos.

**Trp<sup>-</sup>.** Carente de triptófano.

**X- $\alpha$ -gal.** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\alpha$ -D-galactopiranosido.

**X-gal.** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido.



# ÍNDICE



<b>A. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>A.I. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MIXOBACTERIAS</b>	<b>1</b>
<b>A.II. ECOLOGÍA</b>	<b>2</b>
<b>A.III. TAXONOMIA Y FILOGENIA</b>	<b>3</b>
<b>A.IV. MOVILIDAD</b>	<b>4</b>
<b>A.IV.1. MOVILIDAD SOCIAL</b>	<b>5</b>
<b>A.IV.2. MOVILIDAD AVENTURERA</b>	<b>6</b>
<b>A.IV.3. REGULACIÓN DE LA MOVILIDAD</b>	<b>7</b>
<b>A.IV.4. QUIMIOTAXIAS</b>	<b>8</b>
<b>A.V. CICLO DE VIDA DE <i>M. xanthus</i></b>	<b>9</b>
<b>A.V.1. CICLO VEGETATIVO</b>	<b>10</b>
<b>A.V.2. CICLO DE DESARROLLO</b>	<b>10</b>
A.V.2.1. OSCILACIONES RÍTMICAS	12
A.V.2.2. FORMACIÓN DE CUERPOS FRUCTIFICANTES	12
A.V.2.3. ESPORULACIÓN	13
A.V.2.4. GERMINACIÓN	14
<b>A.V.3. INDUCCIÓN QUÍMICA DE LA ESPORULACIÓN</b>	<b>14</b>
<b>A.VI. SEÑALIZACIÓN CELULAR DURANTE EL CICLO DE DESARROLLO DE <i>M. xanthus</i></b>	<b>15</b>
<b>A.VI.1. SEÑALES IMPLICADAS EN EL CICLO DE DESARROLLO</b>	<b>16</b>
A.VI.1.1. SEÑAL A	16
A.VI.1.2. SEÑAL B	17
A.VI.1.3. SEÑAL C	17
A.VI.1.4. SEÑAL D	20
A.VI.1.5. SEÑAL E	20
<b>A.VI.2. RESPUESTA ESTRICTA</b>	<b>21</b>
<b>A.VII. GENOMAS DE MIXOBACTERIAS</b>	<b>22</b>
<b>A.VIII. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN BACTERIAS</b>	<b>24</b>
<b>A.VIII.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA SEÑALIZACIÓN EN BACTERIAS</b>	<b>24</b>
<b>A.VIII.2. SISTEMAS REGULADORES DE DOS COMPONENTES</b>	<b>26</b>
A.VIII.2.1. HISTIDINA QUINASAS	27
A.VIII.2.2. REGULADORES DE RESPUESTA	28
A.VIII.2.3. REGULACIÓN DE LOS SISTEMAS REGULADORES DE DOS COMPONENTES	28
<b>A.VIII.3. QUINASAS DE TIPO EUCARIOTA</b>	<b>29</b>
A.VIII.3.1. QUINASAS DE TIPO EUCARIOTA EN <i>M. xanthus</i>	30
<b>A.VIII.3.1.1. Pkn1</b>	<b>30</b>
<b>A.VIII.3.1.2. Pkn2</b>	<b>30</b>
<b>A.VIII.3.1.3. Pkn4</b>	<b>30</b>
<b>A.VIII.3.1.4. Pkn5 y Pkn6</b>	<b>31</b>



A.VIII.3.1.5. Pkn8 y Pkn14	31
A.VIII.3.1.6. Pkn9	31
A.VIII.3.1.7. MasK	31
A.VIII.3.1.8. PknD1 y PknD2	32
<b>A.VIII.4. FOSFATASAS DE TIPO EUCARIOTA</b>	<b>33</b>
A.VIII.4.1. DESCUBRIMIENTO, DISTRIBUCIÓN Y ORIGEN DE LAS FOSFATASAS	33
A.VIII.4.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS FOSFATASAS DE PROCARIOTAS	34
A.VIII.4.3. SUPERFAMILIA PPP	35
A.VIII.4.3.1. Estructura	35
A.VIII.4.3.2. Mecanismo catalítico y regulación de la actividad fosfatasa	37
A.VIII.4.3.3. Dominios adicionales	37
A.VIII.4.4. SUPERFAMILIA PPM	39
A.VIII.4.4.1. Estructura	39
A.VIII.4.4.2. Mecanismo catalítico y regulación de la actividad fosfatasa	40
A.VIII.4.4.3. Dominios adicionales	41
A.VIII.4.5. SUPERFAMILIA PTP	41
A.VIII.4.5.1. Estructura	41
A.VIII.4.5.2. Mecanismo catalítico y regulación de la actividad fosfatasa	43
A.VIII.4.5.3. Dominios adicionales	43
A.VIII.4.6. SUPERFAMILIA PHP	44
A.VIII.4.7. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES POR FOSFATASAS	44
A.VIII.4.8. FUNCIONES DE LAS FOSFATASAS EN PROCARIOTAS	46
A.VIII.4.8.1. Metabolismo	46
A.VIII.4.8.2. Diferenciación y esporulación	46
A.VIII.4.8.3. Respuesta a estrés	47
A.VIII.4.8.4. Patogénesis	48
A.VIII.4.8.5. Otras funciones celulares	49
<b>A.VIII.5. FOSFATASAS DE <i>M. xanthus</i></b>	<b>50</b>
<b>B. OBJETIVOS</b>	<b>53</b>
<b>C. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>57</b>
<b>C.I. MATERIAL</b>	<b>59</b>
<b>C.I.1. MICROORGANISMOS</b>	<b>59</b>
C.I.1.1. CEPAS DE <i>Escherichia coli</i>	59
C.I.1.2. CEPAS DE <i>Myxococcus xanthus</i>	59
C.I.1.3. CEPAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
<b>C.I.2. MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>61</b>
C.I.2.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>E. coli</i>	61
C.I.2.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>M. xanthus</i>	62

C.I.2.3. MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>S. cerevisiae</i>	63
<b>C.I.3. TAMPONES Y SOLUCIONES</b>	<b>64</b>
<b>C.I.4. MATERIAL PARA BIOLOGÍA MOLECULAR</b>	<b>66</b>
C.I.4.1. VECTORES Y PLÁSMIDOS	66
C.I.4.2. OLIGONUCLEÓTIDOS	68
C.I.4.3. REACTIVOS	70
C.I.4.4. INSTRUMENTACIÓN	71
<b>C.I.5. BASES DE DATOS Y SERVIDORES</b>	<b>73</b>
<b>C.I.6. NÚMEROS DE ACCESO DE PROTEÍNAS UTILIZADAS EN LOS ALINEAMIENTOS</b>	<b>74</b>
<b>C.II. MÉTODOS</b>	<b>74</b>
<b>C.II.1. CULTIVO DE MICROORGANISMOS</b>	<b>74</b>
C.II.1.1. <i>E. coli</i>	74
C.II.1.2. <i>M. xanthus</i>	75
C.II.1.3. <i>S. cerevisiae</i>	75
<b>C.II.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA</b>	<b>76</b>
<b>C.II.3. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y ELECTROCOMPETENTES</b>	<b>76</b>
C.II.3.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES	76
C.II.3.2. PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES	77
<b>C.II.4. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y ELECTROCOMPETENTES</b>	<b>77</b>
C.II.4.1. DE <i>E. coli</i>	77
C.II.4.2. DE <i>M. xanthus</i>	78
C.II.4.3. DE <i>S. cerevisiae</i>	78
<b>C.II.5. MANIPULACIÓN DE ADN</b>	<b>79</b>
C.II.5.1. EXTRACCIÓN DE ADN	79
C.II.5.2. ANÁLISIS DEL ADN AISLADO	79
C.II.5.2.1. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	79
C.II.5.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	80
C.II.5.2.3. Reacción de ligación de ADN	80
C.II.5.2.4. Tratamiento de ADN con fosfatasa alcalina	81
C.II.5.2.5. Secuenciación automática de ADN	81
C.II.5.3. ELECTROFORESIS DE ADN	81
C.II.5.3.1. En geles de agarosa	81
C.II.5.3.2. En geles de acrilamida	82
C.II.5.4. AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE ADN	82
<b>C.II.6. MANIPULACIÓN DE ARN</b>	<b>83</b>
C.II.6.1. EXTRACCIÓN DE ARN	83
C.II.6.2. ANÁLISIS DEL ARN AISLADO (RT-PCR)	83
<b>C.II.7. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b>	<b>84</b>

C.II.7.1. DETECCIÓN DE ADN CON SONDAS MARCADAS CON DIG_DUTP	84
<b>C.II.8. TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS</b>	<b>86</b>
C.II.8.1. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DESNATURALIZANTES DE SDS-PAGE	86
C.II.8.2. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	88
<b>C.II.8.2.1. Inducción de la proteína recombinante con IPTG</b>	<b>88</b>
<b>C.II.8.2.2. Preparación de los extractos crudos de bacterias</b>	<b>88</b>
<b>C.II.8.2.3. Purificación de la proteína recombinante</b>	<b>89</b>
C.II.8.3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	89
<b>C.II.8.3.1. Transferencia de proteínas, Western blot</b>	<b>89</b>
<b>C.II.8.3.2. Inmunodetección por colorimetría</b>	<b>90</b>
C.II.8.4. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	90
C.II.8.5. ENSAYO DE AUTOFOSFORILACIÓN DE PhoR1 (MXAN4778) Y DESFOSFORILACIÓN POR SixA (MXAN4780)	90
C.II.8.6. ENSAYO DE ACTIVIDAD FOSFATASA DE Pph2 (MXAN4779)	91
C.II.8.7. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE GlnA4 (MXAN5630)	92
<b>C.II.8.7.1. Actividad glutamina sintetasa determinada             por el método de transferencia</b>	<b>92</b>
<b>C.II.8.7.2. Actividad <math>\gamma</math>-isopropilamida sintetasa determinada             por el método de biosíntesis</b>	<b>92</b>
<b>C.II.9. INTERACCIONES PROTEICAS MEDIANTE EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO DE LEVADURA</b>	<b>93</b>
C.II.9.1. DETECCIÓN DE INTERACCIONES	93
C.II.9.2. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LAS INTERACCIONES PROTEICAS MEDIANTE EL SISTEMA DEL DOBLE HÍBRIDO DE LEVADURA	94
<b>C.II.9.2.1. Preparación de extractos de <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>94</b>
<b>C.II.9.2.2. Medida de actividad <math>\beta</math>-galactosidasa</b>	<b>95</b>
<b>C.II.10. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS</b>	<b>95</b>
<b>C.II.11. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES DE <i>M. xanthus</i></b>	<b>97</b>
C.II.11.1. CONSTRUCCIÓN DE UNA FUSIÓN ENTRE UN GEN DE <i>M. xanthus</i> Y EL GEN <i>lacZ</i> DE <i>E. coli</i>	97
C.II.11.2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA EN <i>M. xanthus</i>	98
C.II.11.3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA EN <i>M. xanthus</i>	98
<b>C.II.11.3.1. Preparación de extractos de <i>M. xanthus</i></b>	<b>98</b>
<b>C.II.11.3.2. Medida de actividad <math>\beta</math>-galactosidasa</b>	<b>99</b>
<b>C.II.12. COSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE DELECCIÓN</b>	<b>99</b>
C.II.12.1. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DE DELECCIÓN	99
C.II.12.2. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE DELECCIÓN	101
<b>C.II.12.2.1. Crecimiento vegetativo en medio líquido</b>	<b>101</b>
<b>C.II.12.2.2. Movilidad por deslizamiento</b>	<b>101</b>

C.II.12.2.3. Fenotipo durante el ciclo de desarrollo	101
C.II.12.2.4. Recuento de esporas	102
C.II.12.2.5. Germinación de esporas	102
<b>D. RESULTADOS</b>	<b>103</b>
<b>D.I. BÚSQUEDA Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS PROTEÍNAS FOSFATASAS CODIFICADAS EN EL GENOMA DE <i>Myxococcus xanthus</i></b>	<b>105</b>
D.I.1. SUPERFAMILIA PPP	105
D.I.2. SUPERFAMILIA PPM	106
D.I.3. SUPERFAMILIA PTP	108
D.I.4. SUPERFAMILIA PHP	108
<b>D.II. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN FOSFATASAS DE <i>M. xanthus</i></b>	<b>108</b>
<b>D.III. CARACTERIZACIÓN DE LA TIROSINA FOSFATASA MXAN0448</b>	<b>112</b>
D.III.1. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICA Y AMINOACÍDICA DE MXAN0448	112
D.III.2. ANÁLISIS DE LAS REGIONES GENÓMICAS SITUADAS EN TORNO AL GEN MXAN0448	114
D.III.3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE MXAN0448	115
D.III.4. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA FOSFATASA MXAN0448	116
D.III.5. IMPLICACIÓN DE LA FOSFATASA MXAN0448 EN EL CICLO DE VIDA DE <i>M. xanthus</i>	117
D.III.5.1. OBTENCIÓN DE UN MUTANTE DE DELECCIÓN PARA EL GEN MXAN0448	117
<b>D.IV. CARACTERIZACIÓN DE LA Ser/Thr FOSFATASA SpoIIE (MXAN4562)</b>	<b>119</b>
D.IV.1. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICA Y AMINOACÍDICA DE SpoIIE	119
D.IV.2. ANÁLISIS DE LAS REGIONES GENÓMICAS SITUADAS EN TORNO AL GEN <i>spoIIE</i>	121
D.IV.3. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE <i>spoIIE</i>	123
D.IV.4. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA FOSFATASA SpoIIE	123
D.IV.5. IMPLICACIÓN DE SpoIIE EN EL CICLO DE VIDA DE <i>M. xanthus</i>	124
D.IV.5.1. OBTENCIÓN DE UN MUTANTE DE DELECCIÓN PARA EL GEN <i>spoIIE</i>	124
D.IV.5.2. CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE $\Delta spoIIE$	125
D.IV.5.2.1. Crecimiento vegetativo	126
D.IV.5.2.2. Ciclo de desarrollo	126
D.IV.5.2.2.1. Fenotipo durante el ciclo de desarrollo	126
D.IV.5.2.2.2. Esporulación	127
D.IV.5.2.2.3. Germinación	128
<b>D.V. CARACTERIZACIÓN DE LA Ser/Thr FOSFATASA Pph2 (MXAN4779) Y DE PROTEÍNAS DEL MISMO OPERÓN</b>	<b>128</b>
D.V. 1. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICA Y AMINOACÍDICA DE Pph2	128

<b>D.V.2. ANÁLISIS DE LAS REGIONES GENÓMICAS SITUADAS EN TORNO AL GEN <i>pph2</i></b>	<b>131</b>
<b>D.V.3. PERFIL DE EXPRESIÓN DEL OPERÓN EN EL QUE SE LOCALIZA <i>pph2</i></b>	<b>134</b>
<b>D.V.4. AUTORREGULACIÓN DEL OPERÓN POR EL SISTEMA PhoPR1</b>	<b>135</b>
<b>D.V.5. CARACTERIZACIÓN DE LA FOSFOHISTIDINA FOSFATASA SixA (MXAN4780)</b>	<b>136</b>
D.V.5.1. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICA Y AMINOACÍDICA DE Pph2	137
D.V.5.2. IMPLICACIÓN DE SixA EN EL CICLO DE VIDA DE <i>M. xanthus</i>	138
<b>D.V.5.2.1. Obtención de un mutante de delección para el gen <i>sixA</i></b>	<b>138</b>
<b>D.V.5.2.2. Caracterización del mutante <math>\Delta sixA</math></b>	<b>140</b>
D.V.5.2.2.1. Crecimiento vegetativo	140
D.V.5.2.2.2. Ciclo de desarrollo	141
D.V.5.2.2.2.1. Fenotipo durante el ciclo de desarrollo	141
D.V.5.2.2.2.2. Esporulación	143
D.V.5.2.2.2.3. Germinación	143
D.V.5.3. DEMOSTRACIÓN DE QUE SixA ES UNA FOSFOHISTIDINA FOSFATASA	143
<b>D.V.5.3.1. Clonación de <i>sixA</i> y <i>phoR1</i> en el vector pET-28a(+) y sobreexpresión de las proteínas recombinantes en <i>E. coli</i></b>	<b>144</b>
<b>D.V.5.3.2. Purificación de las proteínas SixA y PhoR1</b>	<b>145</b>
<b>D.V.5.3.3. Autofosforilación de PhoR1 y desfosforilación por SixA</b>	<b>146</b>
<b>D.V.6. CONSTRUCCIÓN DE UN MUTANTE DE DELECCIÓN EN FASE PARA EL SISTEMA <i>phoPR1</i></b>	<b>147</b>
<b>D.V.7. IMPLICACIÓN DE LA FOSFATASA Pph2 EN EL CICLO DE VIDA DE <i>M. xanthus</i></b>	<b>148</b>
D.V.7.1. OBTENCIÓN DE UN MUTANTE DE DELECCIÓN PARA EL GEN <i>pph2</i>	148
D.V.7.2. CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE $\Delta pph2$	150
<b>D.V.7.2.1. Crecimiento vegetativo</b>	<b>150</b>
<b>D.V.7.2.2. Ciclo de desarrollo</b>	<b>150</b>
D.V.7.2.2.1. Fenotipo durante el ciclo de desarrollo	150
D.V.7.2.2.2. Esporulación	152
D.V.7.2.2.3. Germinación	153
D.V.7.3. EFECTO DEL CCCP, UN PROTONÓFORO, SOBRE LOS MUTANTES JM12IF Y $\Delta pph2$ DE <i>M. xanthus</i>	154
<b>D.V.7.3.1. Crecimiento vegetativo en presencia de CCCP</b>	<b>154</b>
<b>D.V.7.3.2. Efecto del CCCP sobre el ciclo de desarrollo</b>	<b>155</b>
<b>D.V.7.3.3. Efecto del CCCP sobre la expresión del operón</b>	<b>156</b>
<b>D.V.8. ACTIVIDAD FOSFATASA DE Pph2</b>	<b>158</b>
D.V.8.1. CLONACIÓN DE <i>pph2</i> EN EL VECTOR pET-200/D-TOPO Y SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE EN <i>E. coli</i>	158
D.V.8.2. PURIFICACIÓN DE Pph2	159

D.V.8.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA DE Pph2	160
<b>D.V.9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE <i>M. xanthus</i> QUE INTERACCIONAN CON LA FOSFATASA Pph2</b>	<b>161</b>
D.V.9.1. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO CEBO pGBK-Pph2	162
D.V.9.2. RASTREO DE LA GENOTECA DE EXPRESIÓN DE <i>M. xanthus</i> CON EL PLÁSMIDO CEBO pGBK-Pph2	162
D.V.9.3. SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS PRESA CONTENIDOS EN LAS CEPAS DE LEVADURA INTERACCIONANTES	165
D.V.9.4. ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA DESARROLLADA POR LAS CEPAS DE LEVADURA PORTADORAS DE LAS INTERACCIONES	165
D.V.9.5. INTERACCIÓN DE Pph2 CON GlnA	166
D.V.9.6. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HIPOTÉTICA (MXAN1875)	167
<b>D.V.9.6.1. Análisis de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de MXAN1875</b>	<b>167</b>
<b>D.V.9.6.2. Análisis de las regiones genómicas situadas en torno al gen MXAN1875</b>	<b>168</b>
<b>D.V.9.6.3. Determinación del perfil de expresión de MXAN1875</b>	<b>169</b>
<b>D.V.9.6.4. Implicación de MXAN1875 en el ciclo de vida de <i>M. xanthus</i></b>	<b>171</b>
D.V.9.6.4.1. Obtención de un mutante de delección para el gen MXAN1875	171
D.V.9.6.4.2. Caracterización del mutante de delección para el gen MXAN1875	172
D.V.9.6.4.2.1. Crecimiento vegetativo	172
D.V.9.6.4.2.2. Ciclo de desarrollo	172
D.V.9.7. CARACTERIZACIÓN DE LA GLUTAMINA SINTETASA GlnA4 (MXAN5630)	176
<b>D.V.9.7.1. Análisis de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de GlnA4</b>	<b>176</b>
<b>D.V.9.7.2. Análisis de las regiones genómicas situadas en torno al gen <i>glnA4</i></b>	<b>179</b>
<b>D.V.9.7.3. Determinación del perfil de expresión de <i>glnA4</i></b>	<b>180</b>
D.V.9.7.3.1. Inducción de la expresión del gen <i>glnA4</i> por CCCP	181
<b>D.V.9.7.4. Implicación de GlnA4 en el ciclo de vida de <i>M. xanthus</i></b>	<b>182</b>
D.V.9.7.4.1. Obtención de un mutante de delección para el gen <i>glnA4</i> y para los genes <i>pph2-glnA4</i>	183
D.V.9.7.4.2. Caracterización de los mutantes $\Delta glnA4$ y $\Delta pph2\Delta glnA4$	184
D.V.9.7.4.2.1. Crecimiento vegetativo	184
D.V.9.7.4.2.2. Ciclo de desarrollo	184
<b>D.V.9.7.5. Actividad de GlnA4 y efecto de Pph2 sobre ella</b>	<b>187</b>
D.V.9.7.5.1. Clonación de <i>glnA4</i> en el vector pET-200/D-TOPO y sobreexpresión de la proteína recombinante en <i>E. coli</i>	187
D.V.9.7.5.2. Purificación de GlnA4	188
D.V.9.7.5.3. Determinación de la actividad de GlnA4	189

## *Índice*

D.V.9.7.5.4. Demostración de la interacción Pph2-GlnA4	190
<b>E. DISCUSIÓN</b>	<b>193</b>
<b>F. CONCLUSIONES</b>	<b>211</b>
<b>G. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>215</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

### A. INTRODUCCIÓN

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de las mixobacterias	4
<b>Tabla 2.</b> Características principales de los genomas de mixobacterias	23
<b>Tabla 3.</b> Nombre, definición y Pfam de los dominos presentes en diferentes fosfatasas multidominio de organismos procariotas y eucariotas	38

### B. MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos diseñados para determinar los genes que forman parte del mismo operón que el sistema regulador de dos componentes <i>phoPRI</i>	68
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos diseñados para el análisis del perfil de expresión, mediante el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> , de diferentes genes de <i>M. xanthus</i>	68
<b>Tabla 6.</b> Oligonucleótidos diseñados para la construcción de mutantes de delección de <i>M. xanthus</i>	69
<b>Tabla 7.</b> Cebadores empleados para determinar la localización subcelular mediante fusión con el gen <i>EGFP</i> de proteínas fosfatasa de <i>M. xanthus</i>	69
<b>Tabla 8.</b> Oligonucleótidos utilizados para la sobreexpresión de proteínas de interés de <i>M. xanthus</i>	69
<b>Tabla 9.</b> Cebadores empleados para la clonación del gen codificante de la fosfatasa Pph2 (MXAN4779) y su utilización como cebo para el rastreo de interacciones proteicas en una genoteca de expresión de <i>M. xanthus</i> mediante el sistema del doble híbrido de levadura	70
<b>Tabla 10.</b> Oligonucleótido utilizado para la secuenciación de los insertos detectados durante el rastreo de la genoteca de expresión de <i>M. xanthus</i>	70
<b>Tabla 11.</b> Cebadores diseñados para el análisis de interacciones directas entre parejas de proteínas de <i>M. xanthus</i> empleando el sistema del doble híbrido de levadura	70
<b>Tabla 12.</b> Números de acceso de las proteínas empleadas en los alineamientos que se muestran en el apartado de Resultados	74

### C. RESULTADOS

<b>Tabla 13.</b> Proteínas fosfatasas en el genoma de <i>M. xanthus</i>	107
<b>Tabla 14.</b> Características principales de las fosfatasas seleccionadas para su análisis a lo largo del ciclo de vida de <i>M. xanthus</i>	109
<b>Tabla 15.</b> Genes situados en torno al gen de la fosfatasa Pph2 en el genoma de <i>M. xanthus</i>	132



## ÍNDICE DE FIGURAS

### A. INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>M. xanthus</i>	11
<b>Figura 2.</b> Esquema del funcionamiento de un sistema regulador de dos componentes	27
<b>Figura 3.</b> Estructura de la fosfatasa PP1 de conejo y $\lambda$ PP del fago $\lambda$ pertenecientes a la superfamilia PPP	36
<b>Figura 4.</b> Distribución de los motivos conservados de las fosfatasas PPM	39
<b>Figura 5.</b> Estructura del dominio catalítico de la fosfatasa PstP de <i>M. tuberculosis</i> perteneciente a la superfamilia PPM	40
<b>Figura 6.</b> Estructura de Wzb de <i>E. coli</i> perteneciente a la familia LMMPTP de tirosina fosfatasas	42

### B. MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Figura 7.</b> Construcción de una fusión entre un gen de <i>M. xanthus</i> y el gen <i>EGFP</i>	96
<b>Figura 8.</b> Construcción de una fusión entre un gen de <i>M. xanthus</i> y el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i>	97
<b>Figura 9.</b> Obtención de una cepa de <i>M. xanthus</i> portadora de una delección	100

### C. RESULTADOS

<b>Figura 10.</b> Análisis mediante Southern blot de las cepas portadoras de fusiones <i>lacZ</i> con los genes de las fosfatasas de <i>M. xanthus</i>	110
<b>Figura 11.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo de las cepas portadoras de fusiones <i>lacZ</i> con cinco genes para fosfatasas de <i>M. xanthus</i>	111
<b>Figura 12.</b> Secuencia nucleotídica del gen MXAN0448 de <i>M. xanthus</i>	112
<b>Figura 13.</b> Alineamiento de la porción C-terminal de la secuencia aminoacídica de la tirosina fosfatasa MXAN0448 de <i>M. xanthus</i> con otras tirosina fosfatasas convencionales	113
<b>Figura 14.</b> Genes situados en torno al gen de la fosfotirosina fosfatasa MXAN0448 en el genoma de <i>M. xanthus</i>	114
<b>Figura 15.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa específica de la cepa 448LZ desarrollada durante el crecimiento vegetativo y durante el ciclo de desarrollo	115
<b>Figura 16.</b> Análisis de la localización subcelular de MXAN0448 durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo	117
<b>Figura 17.</b> Southern blots para la identificación de la cepa mutante de delección para el gen MXAN0448	118

<b>Figura 18.</b> Secuencia nucleotídica del gen <i>spoIIE</i> de <i>M. xanthus</i>	119
<b>Figura 19.</b> Alineamiento de la porción C-terminal de la secuencia aminoacídica de la fosfatasa SpoIIE de <i>M. xanthus</i> con otras Ser/Thr fosfatasas pertenecientes a la superfamilia PPM	120
<b>Figura 20.</b> Genes situados en torno al gen <i>spoIIE</i> en el genoma de <i>M. xanthus</i>	122
<b>Figura 21.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa específica de la cepa SpoIIELZ durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo	123
<b>Figura 22.</b> Análisis de la localización subcelular de SpoIIE durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo	124
<b>Figura 23.</b> Southern blot para la identificación del mutante de delección para el gen <i>spoIIE</i>	125
<b>Figura 24.</b> Análisis fenotípico de las cepas silvestre DZF1 y mutante $\Delta spoIIE$ de <i>M. xanthus</i> a partir de cultivos concentrados a DO <sub>600</sub> inicial de 15	127
<b>Figura 25.</b> Recuento de mixósporas en medio TPM de las cepas DZF1 y $\Delta spoIIE$	128
<b>Figura 26.</b> Secuencias nucleotídica del gen <i>pph2</i> de <i>M. xanthus</i>	129
<b>Figura 27.</b> Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la Ser/Thr fosfatasa Pph2 de <i>M. xanthus</i> con otras Ser/Thr fosfatasas pertenecientes a la superfamilia PPP	130
<b>Figura 28.</b> Distribución de los motivos conservados de las metalofosfatasas (Pfam PF00149) en la proteína Pph2 de <i>M. xanthus</i>	131
<b>Figura 29.</b> Genes constituyentes del operón <i>phoPRI</i>	133
<b>Figura 30.</b> Estudio de la coexpresión de los genes MXAN4775, MXAN4776, <i>phoP1</i> , <i>phoR1</i> , <i>pph2</i> y <i>sixA</i> de <i>M. xanthus</i>	134
<b>Figura 31.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa específica de la cepa Pph2LZ durante el crecimiento vegetativo y durante el ciclo de desarrollo	135
<b>Figura 32.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa específica de la fusión <i>phoP1-lacZ</i> en el silvestre y en el mutante de delección del sistema <i>phoPRI</i>	136
<b>Figura 33.</b> Secuencia nucleotídica del gen <i>sixA</i> de <i>M. xanthus</i>	137
<b>Figura 34.</b> Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la fosfatasa SixA de <i>M. xanthus</i> con otras fosfohistidina fosfatasas	138
<b>Figura 35.</b> Estrategia seguida para la construcción de un mutante de delección para el gen <i>sixA</i> de <i>M. xanthus</i>	139
<b>Figura 36.</b> Southern blot para la identificación de la cepa mutante de delección para el gen <i>sixA</i>	140
<b>Figura 37.</b> Análisis fenotípico de las cepas silvestre DZF1 y mutante $\Delta sixA$ de <i>M. xanthus</i> utilizando cultivos concentrados a DO <sub>600</sub> inicial de 60	141
<b>Figura 38.</b> Análisis fenotípico de las cepas silvestre DZF1 y mutante $\Delta sixA$ de <i>M. xanthus</i> en medio CTT con distintas concentraciones de Bacto-casitona	142
<b>Figura 39.</b> Recuento de mixósporas en medio CF de las cepas silvestre y mutante $\Delta sixA$	143
<b>Figura 40.</b> Producción de las proteínas recombinantes SixA y PhoR1	144

## Índice

<b>Figura 41.</b> Purificación de las proteínas recombinantes PhoR1 y SixA	145
<b>Figura 42.</b> Autofosforilación de PhoR1 y desfosforilación por SixA	146
<b>Figura 43.</b> Southern blot para la identificación del mutante de delección para los genes <i>phoP1-phoR1</i> de <i>M. Xanthus</i>	147
<b>Figura 44.</b> Construcción del plásmido portador de la delección del gen <i>pph2</i> de <i>M. xanthus</i>	149
<b>Figura 45.</b> Southern blot para la identificación de la cepa mutante $\Delta pph2$ de <i>M. xanthus</i>	150
<b>Figura 46.</b> Análisis fenotípico en medio CF de las cepas silvestre DZF1 y mutante $\Delta pph2$ de <i>M. xanthus</i>	151
<b>Figura 47.</b> Análisis fenotípico en medio TPM a $DO_{600}$ de partida de 60 de las cepas silvestre DZF1 y mutante $\Delta pph2$ de <i>M. xanthus</i>	152
<b>Figura 48.</b> Recuento de esporas producidas por las cepas silvestre DZF1 y mutante $\Delta pph2$ de <i>M. xanthus</i> en medio CF	153
<b>Figura 49.</b> Mixósporas de las cepas DZF1 y $\Delta pph2$ de <i>M. xanthus</i>	153
<b>Figura 50.</b> $DO_{600}$ de las cepas silvestre DZF1 y mutantes JM12IF y $\Delta pph2$ de <i>M. xanthus</i> en presencia de diferentes concentraciones de CCCP	155
<b>Figura 51.</b> Análisis fenotípico de las cepas silvestre DZF1 y mutantes JM12IF y $\Delta pph2$ de <i>M. xanthus</i> en medio CF con 0, 0.05, 0.1 y 0.3 $\mu\text{g/ml}$ de CCCP	156
<b>Figura 52.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa desarrollada durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo con distintas concentraciones de CCCP por la cepa Pph2LZ	157
<b>Figura 53.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa específica desarrollada por la cepa Pph2LZ de <i>M. xanthus</i> durante el crecimiento vegetativo en medio CTT con 0, 0.6 y 0.75 $\mu\text{g/ml}$ de CCCP	158
<b>Figura 54.</b> Producción de la proteína recombinante Pph2	159
<b>Figura 55.</b> Purificación de la proteína recombinante Pph2 de <i>M. xanthus</i>	160
<b>Figura 56.</b> Actividad enzimática específica de Pph2 utilizando como sustrato <i>pNPP</i>	161
<b>Figura 57.</b> Crecimiento de las cepas de levadura obtenidas tras el rastreo de la genoteca de expresión de <i>M. xanthus</i> empleando la fosfatasa Pph2 como cebo	164
<b>Figura 58.</b> Análisis cuantitativo de la expresión del marcador enzimático <i>lacZ</i> en el estudio de la interacción de Pph2 con las proteínas detectadas durante el rastreo de la genoteca	166
<b>Figura 59.</b> Secuencia nucleotídica del gen MXAN1875 de <i>M. xanthus</i>	168
<b>Figura 60.</b> Genes situados en torno al gen de la proteína hipotética MXAN1875 en el genoma de <i>M. xanthus</i>	169
<b>Figura 61.</b> Southern blot para la identificación de la cepa portadora de la fusión entre el gen MXAN1875 de <i>M. xanthus</i> y el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> .	170
<b>Figura 62.</b> Southern blot para la identificación del mutante de delección para el gen MXAN1875 de <i>M. xanthus</i>	172
<b>Figura 63.</b> Análisis fenotípico en los medios CF y TPM, tras 24 horas de incubación, por las cepas silvestre DZF1 y mutante $\Delta\text{MXAN1875}$ de <i>M. xanthus</i>	173

<b>Figura 64.</b> Análisis fenotípico de las cepas silvestre DZF1 y mutante $\Delta$ MXAN1875 en medio CTT con distintas concentraciones de Bacto-casitona	<b>174</b>
<b>Figura 65.</b> Recuento de esporas producidas por las cepas silvestre DZF1 y mutante $\Delta$ MXAN1875 de <i>M. xanthus</i> en medio CF	<b>175</b>
<b>Figura 66.</b> Secuencia nucleotídica del gen <i>glnA4</i> de <i>M. xanthus</i>	<b>177</b>
<b>Figura 67.</b> Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la glutamina sintetasa GlnA4 de <i>M. xanthus</i> con otras glutamina sintetetas	<b>178</b>
<b>Figura 68.</b> Genes situados en torno al gen de la glutamina sintetasa GlnA4 en el genoma de <i>M. xanthus</i>	<b>179</b>
<b>Figura 69.</b> Southern blot para la identificación de la cepa portadora de la fusión entre el gen <i>glnA4</i> de <i>M. xanthus</i> y el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i>	<b>180</b>
<b>Figura 70.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa de la cepa GlnA4LZ	<b>181</b>
<b>Figura 71.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa específica desarrollada por la cepa GlnA4LZ de <i>M. xanthus</i> durante el crecimiento vegetativo en medio CTT con CCCP	<b>182</b>
<b>Figura 72.</b> Southern blot para la identificación del mutante de delección para el gen <i>glnA4</i> y para los genes <i>pph2</i> y <i>glnA4</i>	<b>183</b>
<b>Figura 73.</b> Análisis fenotípico en medio CF de las cepas silvestre DZF1 y mutantes $\Delta$ <i>glnA4</i> y $\Delta$ <i>pph2<math>\Delta</math><i>glnA4</i> de <i>M. xanthus</i></i>	<b>185</b>
<b>Figura 74.</b> Análisis fenotípico de las cepas silvestre DZF1 y mutantes $\Delta$ <i>glnA4</i> y $\Delta$ <i>pph2<math>\Delta</math><i>glnA4</i> de <i>M. xanthus</i> en medio CTT con cantidades decrecientes de Bacto-casitona</i>	<b>186</b>
<b>Figura 75.</b> Recuento de esporas producidas por la cepa silvestre DZF1 y los mutantes de delección $\Delta$ <i>glnA4</i> y $\Delta$ <i>pph2<math>\Delta</math><i>glnA4</i> de <i>M. xanthus</i> en medio CF</i>	<b>186</b>
<b>Figura 76.</b> Producción de la proteína recombinante GlnA4 a 15°C y Western blot de confirmación	<b>188</b>
<b>Figura 77.</b> Purificación de la proteína recombinante GlnA4 de <i>M. xanthus</i>	<b>189</b>
<b>Figura 78.</b> Actividad glutamina sintetasa determinada mediante el método de biosíntesis empleando isopropilamina como sustrato	<b>192</b>



## **A.INTRODUCCIÓN**



## A.I. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MIXOBACTERIAS

Las mixobacterias son bacterias Gram negativas, en su mayoría aerobias, móviles por deslizamiento, con forma de bacilo largo y delgado de dimensiones considerables (0.7-1.2  $\mu\text{m}$  de ancho por 3-12  $\mu\text{m}$  de largo). Estos microorganismos forman agregados multicelulares macroscópicos de colores brillantes, conocidos como cuerpos fructificantes, en respuesta al agotamiento de nutrientes. En el interior de los cuerpos fructificantes, las células se diferencian en estructuras de resistencia, denominadas mixósporas, que sobreviven en el medio hasta germinar una vez que las condiciones nutricionales son favorables para la bacteria de nuevo. Este complejo ciclo de vida desarrollado por las mixobacterias es único entre los procariotas (Reichenbach, 2005).

Las mixobacterias presentan una pared celular de tipo Gram negativo y, a diferencia de otras bacterias, el peptidoglucano está constituido por parches conectados por material sensible a la tripsina y al SDS. Esta estructura parcheada podría facilitar el cambio de forma que experimenta la bacteria durante la conversión de células vegetativas bacilares en mixósporas esféricas o bien puede representar una característica común de las bacterias deslizantes (Dworkin, 1993).

El material genético se encuentra organizado en un nucleoide, mientras que en el citoplasma suelen aparecer cuerpos de inclusión de polifosfato o polisacáridos de reserva. Entre los apéndices extracelulares de estos microorganismos se diferencian pili de tipo IV polares y fibrillas peritricas, de naturaleza polisacáridica, en contacto con la matriz extracelular. Ambas estructuras son necesarias para la movilidad por deslizamiento y para la interacción célula-célula (Wu y Kaiser, 1995; Shimkets y Dworkin, 1997; Pelling *et al.*, 2005).

Las mixobacterias se alimentan cooperativamente de otros microorganismos mediante bacteriolisis por acción de un conjunto de exoenzimas secretadas por las células individuales para la destrucción de células vivas intactas y para la hidrólisis de almidón, xilano y quitina. El lisado originado representa la base nutricional de las mixobacterias, por lo que son conocidas como microdepredadores (Reichenbach y Dworkin, 1991; Reichenbach, 1993).

La mayoría de las mixobacterias presentan metabolismo aerobio quimiorganótrofo, empleando principalmente aminoácidos como fuente de energía y carbono (Bretscher y Kaiser, 1978). Estas bacterias obtienen los aminoácidos a partir de oligopéptidos liberados durante la hidrólisis de proteínas mediante proteasas secretadas por la propia bacteria. No suelen utilizar hidratos de carbono 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* metabolizan azúcares a partir de la degradación de celulosa.

Las mixobacterias producen un gran número de moléculas con actividades antifúngicas, antibióticas y antitumorales procedentes del metabolismo secundario, generando compuestos de enorme relevancia para su aplicación en la industria farmacéutica y agroquímica (Reichenbach y Höfle, 1993). Generan el 5% de los



## Introducción

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). Entre las sustancias producidas por las mixobacterias se encuentran sorafenos, mixovirescina y eptilonas (Gerth *et al.*, 1982; Gerth *et al.*, 1994; Gerth *et al.*, 1996; Krug *et al.*, 2008). El significado biológico de la síntesis de estos compuestos está relacionado con la presión competitiva ejercida en el hábitat natural de las bacterias. 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 bacterias degradadoras de materia orgánica (Gerth *et al.*, 2003).

También se ha descrito en mixobacterias la síntesis de carotenoides en respuesta a la incidencia de luz azul o la presencia de cobre en el entorno (Martínez-Laborda *et al.*, 1990; Moraleda-Muñoz *et al.*, 2005).

## A.II. ECOLOGÍA

Las mixobacterias son muy comunes en la naturaleza, dado que su enorme capacidad para desarrollar respuestas adaptativas frente a diferentes condiciones ambientales posibilita su crecimiento en una amplia diversidad de nichos ecológicos, de forma que es posible encontrarlas en casi cualquier hábitat (Reichenbach y Dworkin, 1992). Aparecen en todas las zonas climáticas, regiones de vegetación y altitudes, pero no con la misma frecuencia. La mayor riqueza en número de especies y densidad de población se encuentra en zonas situadas entre los trópicos y las zonas templadas, mientras que en ambientes fríos, como las zonas árticas, subárticas o situadas a gran altitud, la presencia y abundancia de mixobacterias es menor (Dawid, 2000; Shimkets *et al.*, 2005).

El principal hábitat de la mayoría de las especies de mixobacterias es la zona superficial del suelo, formando parte de la microbiota edáfica autóctona (Reichenbach, 1999; Dawid, 2000), pero constituyen menos del 1% de las bacterias presentes en ese ambiente (Wu *et al.*, 2005). No obstante, el número exacto de mixobacterias en un hábitat particular resulta muy difícil de determinar debido a que tienden a adherirse a las partículas y entre sí.

Estos microorganismos se encuentran en muchos tipos de suelos, principalmente en aquellos que presentan un rango de pH entre 5 y 8, pero también en suelos con pH extremos (Dawid, 2000). Las mixobacterias parecen preferir suelos ricos en materia orgánica y vida microbiana, actuando como colonizadores secundarios. No obstante, estos microorganismos también se encuentran presentes sobre arena o superficies rocosas (Dawid, 2000). En la microbiota del suelo, las mixobacterias actúan como microdepredadores ejerciendo un papel regulador de las poblaciones microbianas edáficas mediante la liberación de enzimas hidrolíticas y antibióticos capaces de lisar las bacterias situadas en su entorno.

Otro nicho ecológico habitual para las mixobacterias es el material vegetal en descomposición, en particular madera en estado de putrefacción, cortezas y líquenes, y excrementos de animales herbívoros. Estos hábitats contienen 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 especies aparecen igualmente en el suelo (Lampky, 1971).

La mayoría de los géneros de mixobacterias no suelen estar presentes en hábitats acuáticos, pero en ocasiones son capaces de crecer en esos ambientes. De esta forma, las mixobacterias pueden alcanzar las corrientes de agua tras ser lavadas a partir del suelo, sobreviviendo en este hábitat y siendo incluso empleadas como bioindicadores de contaminación de ríos (Gräf y Pelka, 1979). Sin embargo, 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. Sin embargo, se han aislado cepas psicrófilas en la Antártida que crecen a 4°C, y cepas termófilas moderadas a partir de ambientes semiáridos que lo hacen a 42-44°C (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 género *Anaeromyxobacter* a partir de suelos y sedimentos fluviales sometidos a condiciones anaerobias estrictas (Sanford *et al.*, 2002).

### A.III. TAXONOMÍA Y FILOGENIA

De acuerdo con los análisis de ARNr 16S, las mixobacterias se encuadran dentro de las  $\delta$ -proteobacterias, junto con los bdellovibrios, que también son depredadoras y las bacterias sulfatorreductoras (Shimkets *et al.*, 2005). Las diferencias de secuencia en las moléculas de ARNr 5S y 16S sugieren que la subdivisión  $\delta$  de las proteobacterias podría haberse originado hace 750-1100 millones de años, mientras que las mixobacterias aparecieron hace 650-800 millones de años (Shimkets, 1993).

Las mixobacterias presentan un genoma de tamaño comprendido entre 9.1 y 13.0 Mb (a excepción de las especies pertenecientes al género *Anaeromyxobacter*, con un genoma de en torno a 5 Mb), lo que duplica e incluso triplica al de las bacterias sulfatorreductoras y bdellovibrios. Sin embargo, la comparación de los genomas secuenciados de  $\delta$ -proteobacterias pone de manifiesto que estos microorganismos comparten varias características comunes (Karlín *et al.*, 2006).

Así, en las  $\delta$ -proteobacterias destaca la presencia de proteínas de señalización, como reguladores dependientes de  $\sigma^{54}$  y sistemas de dos componentes. Además, suelen presentar numerosas proteínas asociadas a secreción, así como múltiples proteínas de tipo chaperona. Igualmente, estos microorganismos producen numerosas lactamasas, proteínas de biosíntesis de diguanilato cíclico y receptores de tipo TonB. Finalmente, en relación a la síntesis proteica, en las  $\delta$ -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 sintetasa específico de este grupo (Karlín *et al.*, 2006).

## Introducción

Desde un punto de vista taxonómico, las mixobacterias se encuadran dentro del orden *Myxococcales*, en el que se diferencian 3 subórdenes y 5 familias, de acuerdo con la propuesta del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=29>), siguiendo la 2ª edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Tabla 1). *Myxococcus xanthus*, especie de mixobacteria empleada como modelo de este grupo y objeto de este trabajo de investigación, pertenece a la familia *Myxococcaceae* dentro del suborden *Cystobacterineae*.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de las mixobacterias.

ORDEN	SUBORDEN	FAMILIA	GÉNERO
<i>Myxococcales</i>	<i>Cystobacterineae</i>	<i>Myxococcaceae</i>	<i>Myxococcus</i> <i>Anaeromyxobacter</i> <i>Coralloccoccus</i> <i>Pyxicoccus</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>Byssovorax</i> <i>Chondromyces</i> <i>Polyangium</i> <i>Sorangium</i>
	<i>Nannocystineae</i>	<i>Nannocystaceae</i>	<i>Nannocystis</i> <i>Plesiocystis</i>
		<i>Haliangeaceae</i>	<i>Haliangium</i>

## A.IV. MOVILIDAD

Las mixobacterias llevan a cabo un complejo ciclo de vida que incluye la formación de enjambres, agrupaciones de miles de células que cooperan para nutrirse durante el crecimiento vegetativo, y de cuerpos fructificantes cuando las condiciones nutricionales son adversas. Estos comportamientos dependen de la capacidad de movimiento por deslizamiento sobre superficies sólidas, o bien en la interfase aire-agua, que poseen estas bacterias. El deslizamiento se define como el movimiento de células no flageladas en la dirección de su eje longitudinal sobre una superficie (Henrichsen, 1972). En *M. xanthus*, este movimiento es acompañado por el encorvamiento de las células (Spormann y Kaiser, 1995) y la secreción de mucílago, y se desarrolla a una velocidad variable, oscilando entre 1.5 y 6.0  $\mu\text{m}/\text{min}$ , aunque ocasionalmente se han observado velocidades de hasta 20  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Spormann y Kaiser, 1995). La velocidad de movimiento depende de la distancia entre células, siendo mayor cuando las células se encuentran en contacto (a una distancia inferior al diámetro celular) que cuando se hallan aisladas (Spormann y Kaiser, 1995).

Durante el deslizamiento las mixobacterias se desplazan siguiendo un recorrido lineal. Sin embargo, debido a su elevada flexibilidad, a medida que se desplazan se produce una curvatura, lo que conduce a la desviación moderada de la ruta de desplazamiento que facilita los cambios direccionales. De forma periódica, las células se detienen momentáneamente y reanudan el movimiento en la misma dirección, o bien sufren una reversión en el sentido del desplazamiento tras la conversión del extremo anterior de la célula en el posterior. La reversión celular es esencial para dirigir el movimiento de *M. xanthus*. La frecuencia de reversión se regula de forma estricta mediante sistemas de control quimiotácticos (Søgaard-Andersen, 2004).

Durante el desarrollo, en el proceso de agregación, las mixobacterias se desplazan por deslizamiento siguiendo movimientos dirigidos en la misma dirección, para la formación de cuerpos fructificantes. Durante este movimiento, el sistema regulador de la reversión 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).

*M. xanthus* presenta dos sistemas de movilidad por deslizamiento que cooperan entre sí: 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. Estos sistemas de movilidad son independientes genéticamente, lo que posibilita la obtención de mutantes para cada tipo. 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 social o aventurera, respectivamente.

#### A.IV.1. Movilidad social

La movilidad social permite el movimiento de grupos de células asociadas entre sí en estrecho contacto e implica a más de 80 genes. Este sistema de movilidad depende de tres grupos principales de genes: *pil*, *tgl* y *eps-eas*. Además, la movilidad social 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 genes *pil* están organizados en un grupo constituido por 17 genes implicados en la síntesis, procesamiento, transporte y ensamblaje de los constituyentes de los pili de tipo IV de *M. xanthus*, así como en la función de estos orgánulos celulares (Wu y Kaiser, 1995; Wu *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1998; Wall *et al.*, 1999). Los pili de tipo IV son apéndices extracelulares polares formados por subunidades de pilina PilA, sometidos a ciclos de extensión y retracción. PilA es una proteína soluble que se localiza en el polo delantero de la célula atravesando la membrana externa a través de un canal formado por la proteína PilQ (Wall *et al.*, 1999). PilQ forma parte de un complejo proteico que incluye al transportador PilC y a las ATPasas PilB y PilT implicadas en el ensamblaje y retracción de los pili, respectivamente (Jakovljevic *et al.*, 2008).

## Introducción

El gen *tgl* genera una lipoproteína constituida por unidades repetidas de tetratricopéptidos (Rodríguez-Soto y Kaiser, 1997). Esta proteína se localiza en un polo, probablemente, porque es esencial para el ensamblaje de PilQ en la membrana externa durante la formación de los pili (Nudleman *et al.*, 2005).

Las mutaciones para cualquiera de estos genes *pil* o *tgl* originan ausencia de pili de tipo IV y, por tanto, pérdida de la movilidad social.

Por su parte, los genes *eps-eas* generan proteínas de biosíntesis y transporte del exopolisacárido de las fibrillas, junto con proteínas reguladoras (Lu *et al.*, 2005). Las fibrillas de *M. xanthus* 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 están implicadas en procesos de interacción y cohesión célula-célula, promoviendo el comportamiento social de *M. xanthus* durante la movilidad y el desarrollo. También se ha detectado una metaloproteasa, denominada FibA, asociada a la matriz extracelular, importante para la respuesta quimiotáctica durante el desarrollo (Kearns *et al.*, 2002). Las mutaciones que afectan a estos genes generan ausencia de fibrillas y las células que las presentan pierden su capacidad de cohesión, no muestran comportamiento social y no forman cuerpos fructificantes.

La movilidad social se produce mediante la extensión y retracción de los pili por acción de PilT. Para ello, en primer lugar, la célula extiende los pili del polo delantero y los ancla sobre las fibrillas de la matriz extracelular de una bacteria próxima. A continuación, se produce la retracción de los apéndices, inducida por los polisacáridos de la matriz extracelular (Li *et al.*, 2003), propulsando el movimiento celular al impulsar la progresión de la bacteria hacia delante. 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 (Søgaard-Andersen, 2004), de tal manera que los pili no solo sirven para tirar de la célula hacia delante, sino también para detectar células vecinas y producir mayor número de fibrillas (Mauriello y Zusman, 2007).

La reversión periódica en el sentido del movimiento determina la desorganización de los pili de tipo IV en un polo y su reensamblaje en el polo opuesto. Durante este cambio, la proteína 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 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). A su vez, la frecuencia de oscilación de FrzS está controlada por el sistema quimiosensor Frz (Mignot *et al.*, 2007).

### A.IV.2. Movilidad aventurera

La movilidad aventurera es la responsable del movimiento de las células individuales. Este sistema depende de más de 30 genes, entre los que destacan los grupos de genes *cgl*, *agl* y *agm* (Hartzell *et al.*, 2008).

El gen *cglB* codifica una lipoproteína rica en cisteína que se localiza en la membrana externa. Su abundancia en dicha membrana sugiere que puede desempeñar un papel mecánico en la movilidad de las mixobacterias (Rodríguez y Spormann, 1999).

En *M. xanthus* existen complejos porosos concentrados en los extremos celulares que parecen secretar mucílago para propulsar a la bacteria durante la movilidad aventurera, tal como ocurre en cianobacterias (Hoiczky y Baumeister, 1998; Wolgemuth *et al.*, 2002). Estos complejos constan de varias proteínas de transporte de biopolímeros de tipo Tol codificadas por genes *agl* (Youdarian *et al.*, 2003), que en otras bacterias Gram negativas forman parte de complejos de transporte a través de las membranas interna y externa (Llamas *et al.*, 2003). La síntesis de 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 mucílago polielectrolítico necesaria para la secreción orientada del mismo. La adherencia de este mucílago sobre el sustrato proporciona 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).

En la movilidad aventurera de las células de *M. xanthus* también es esencial la proteína AglZ que 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 misma. Finalmente, cuando se revierte el sentido de movimiento, estos complejos se relocalizan con rapidez en el polo delantero (Mignot *et al.*, 2007; Sliusarenko *et al.*, 2007).

También se ha descrito un regulador de respuesta esencial para la movilidad aventurera, denominado RomR. Este regulador se distribuye en los dos polos de forma asimétrica y se va redistribuyendo durante el movimiento. Su localización dinámica es esencial para la reversión celular, sugiriendo que induce la polarización de la maquinaria implicada en la movilidad aventurera (Leonardy *et al.*, 2007).

### A.IV.3. Regulación de la movilidad

Se ha identificado un único *locus* esencial para ambos sistemas de movilidad, denominado *mgl*, cuya mutación suprime completamente la capacidad de deslizamiento de *M. xanthus*. Además, la formación de cuerpos fructificantes y la esporulación también se ven afectadas (Stephens y Kaiser, 1987; Kroos *et al.*, 1988; Stephens *et al.*, 1989). Los mutantes *mgl*, en realidad se mueven mediante brascas sacudidas oscilantes sin desplazamiento neto, debido a que presentan una elevada tasa de reversión de

## Introducción

movimiento, superior en más de diez veces a la de la cepa 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 el sentido del movimiento participando en el intercambio de GDP por GTP y su posterior hidrólisis mediante su actividad GTPasa (Hartzell y Kaiser, 1991a). MglA también interacciona con la quinasa de tipo eucariota MasK para controlar la movilidad social (Thomasson *et al.*, 2002). Por otra parte, MglB regula la cantidad de MglA en las células, lo que indica que MglB puede estabilizar a MglA o regular su función (Hartzell y Kaiser, 1991b).

Recientemente se ha propuesto que MglA se activa a través del sistema Frz para reclutar moléculas importantes para la reversión de los dos tipos de movilidad. Además, MglA es esencial para la localización de FrzS y AglZ y puede interactuar con ambas proteínas (Mauriello y Zusman, 2007).

### A.IV.4. Quimiotaxias

*M. xanthus* muestra respuestas quimiotácticas frente a ciertos compuestos. Este comportamiento se manifiesta por un cambio en la frecuencia de reversión del movimiento de las células, de tal modo que, en ausencia de estímulo, las células revierten su dirección de movimiento frecuentemente. En cambio, en presencia de sustancias atrayentes o repelentes, las células de *M. xanthus* incrementan su período de reversión lo que se traduce en un movimiento neto de acercamiento hacia la sustancia atrayente o de alejamiento respecto del compuesto repelente. En general, los nutrientes actúan como atrayentes, mientras que diversos alcoholes o el dimetilsulfóxido funcionan como repelentes (Shi *et al.*, 1993).

En *M. xanthus* se han caracterizado dos sistemas reguladores quimiotácticos, conocidos como Dif y Frz (frizzy), 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, dado que las células se deslizan hasta ciertos puntos para originar cuerpos fructificantes. Probablemente, estas células respondan a ciertos estímulos químicos y, por tanto, 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 en grupos sociales y de la coordinación de los movimientos de las células dentro de un grupo social (Yang *et al.*, 1998). Además, 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).

El sistema frizzy está constituido por 6 proteínas quimiosensoras codificadas por genes localizados en un mismo operón y que conforman una ruta de señalización reguladora de la reversión en el sentido 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 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 del sistema frizzy es el receptor citoplasmático FrzCD, una proteína aceptora de grupos metilos, cuya metilación, regulada por FrzF, una metil transferasa con repeticiones de tetratricopéptidos (Scott *et al.*, 2008), es necesaria para la adaptación a un estímulo. Durante la agregación, FrzCD detecta el estímulo químico de otras células, sufre cambios en su estado de metilación y promueve el movimiento de las células hacia los centros de agregación (Geng *et al.*, 1998). 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 (Bonner *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005).

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 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). Además, las rutas quimiosensoras Dif y Frz son requeridas en la quimotaxia de fosfatidiletanolamina para la excitación y adaptación, respectivamente. La proteína DifA del sistema Dif no se metila, pero la transmisión a través de ella estimula la metilación de FrzCD. Además, *M. xanthus* posee mecanismos de detección de fosfatidiletanolamina dependientes e independientes de Dif. El mecanismo sensor dependiente de Dif suprime el incremento de metilación de FrzCD en respuesta al atrayente y lo eleva cuando la estimulación es negativa. De manera que la detección de fosfatidiletanolamina independiente de Dif, pero dependiente de Frz, conduce a la metilación de FrzCD y la subsiguiente adaptación, mientras que la señalización de fosfatidiletanolamina dependiente de Dif suprime o disminuye el incremento de la metilación de FrzCD desacelerando o retrasando la adaptación. Estas interacciones antagonistas son cruciales para la quimiotaxia efectiva de esta bacteria deslizante para garantizar que la adaptación no se produzca demasiado rápido en relación con el lento movimiento de *M. xanthus* (Xu *et al.*, 2008).

## **A.V. CICLO DE VIDA DE *M. xanthus***

Las mixobacterias siguen un ciclo de vida vegetativo cuando en el medio hay abundancia de nutrientes y un ciclo de desarrollo cuando se produce ausencia de los mismos.



### A.V.1. Ciclo vegetativo

Durante el ciclo de vida vegetativo la bacteria dispone de nutrientes en el medio y, por tanto, los utiliza para el 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 al resto de bacterias (Fig. 1).

Las mixobacterias, durante el crecimiento vegetativo, se mantienen unidas y se desplazan coordinadamente formando agrupaciones, denominadas enjambres, compuestas por miles de células asociadas entre sí. En los 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) (Fig. 1). La eficiencia del 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 proteasas, lipasas, glucanasas y nucleasas que actúan destruyendo células vivas intactas y células muertas. Además, son capaces de degradar polímeros complejos para generar nutrientes asimilables. La colaboración del enjambre en la secreción de exoenzimas potencia la capacidad degradativa de las mixobacterias, incrementando la eficiencia en la obtención de nutrientes (Rosenberg *et al.*, 1977).

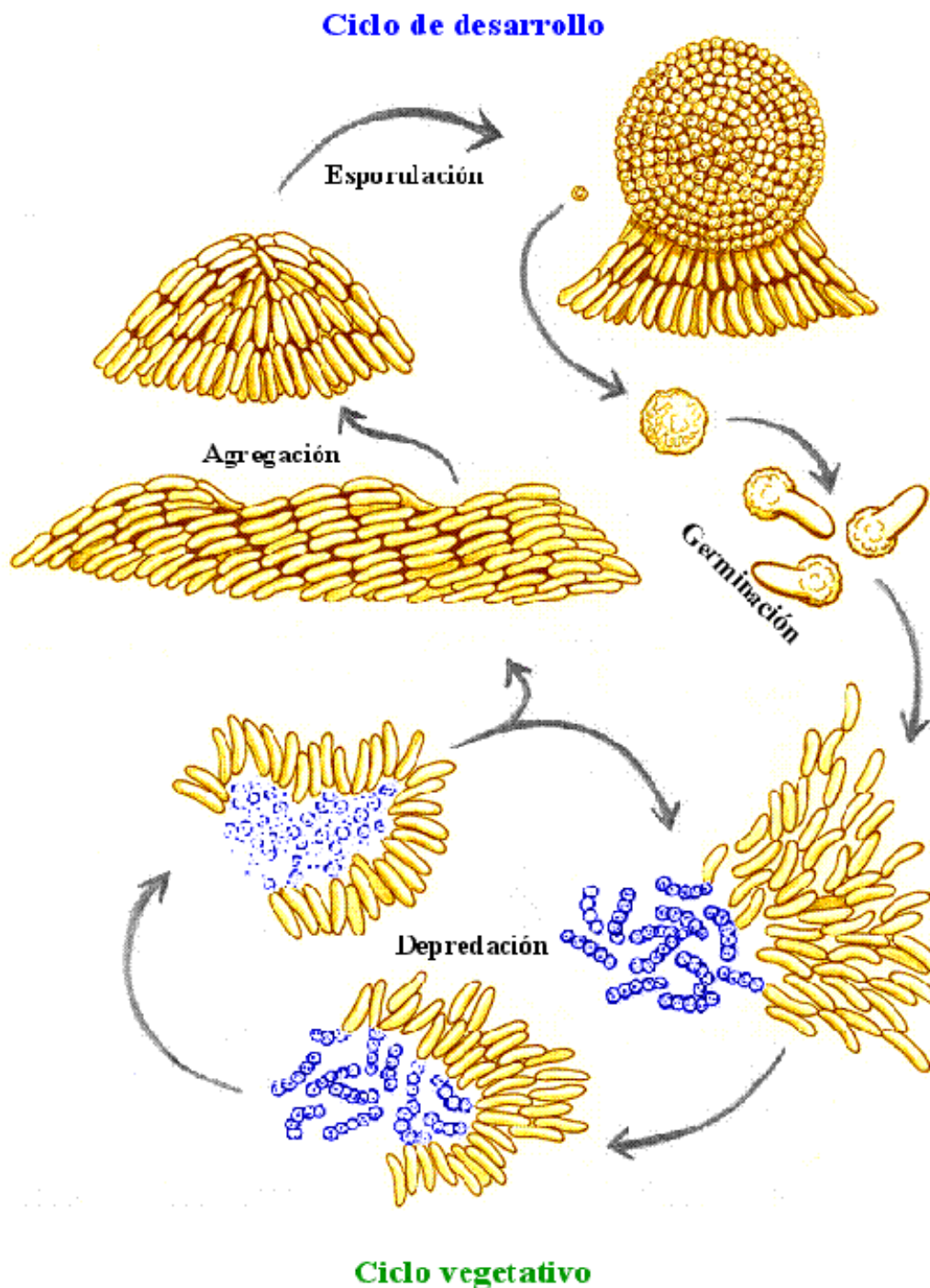
Durante el crecimiento vegetativo las mixobacterias desarrollan un movimiento relacionado con un comportamiento depredador que permite a la comunidad de mixobacterias consumir de forma eficiente los nutrientes disponibles. De hecho, este movimiento se induce en respuesta al contacto directo con otros microorganismos o con grandes macromoléculas biopoliméricas. En cambio, su inhibición conlleva una reducción drástica de la capacidad depredadora (Berleman *et al.*, 2006).

### A.V.2. Ciclo de desarrollo

El ciclo de desarrollo se induce cuando los nutrientes del medio se agotan (Dworkin, 1963; Hemphill y Zahler, 1968), en respuesta a la privación en el aporte de fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo (Manoil y Kaiser, 1980; Shimkets, 1984; Shimkets, 1987; Dworkin, 1996). Esta carencia de nutrientes constituye el estímulo inductor que desencadena los eventos necesarios que conducen hacia el ciclo de desarrollo, pero la progresión hacia el mismo requiere, además, una elevada densidad celular para el intercambio de señales entre las células (Wireman y Dworkin, 1975; Shimkets y Dworkin, 1981) y una superficie sólida para el movimiento de las células por deslizamiento (Wireman y Dworkin, 1975; Kroos *et al.*, 1988).

Cuando la densidad celular es suficiente, las células son móviles y los nutrientes del medio se han agotado, las células dentro del enjambre comienzan a moverse hacia ciertos puntos, denominados centros de agregación, donde 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 designados cuerpos fructificantes (Fig. 1). En el interior de los cuerpos fructificantes, las células vegetativas se diferencian en formas de resistencia denominadas mixósporas (Fig. 1). Este proceso requiere unas 48 horas y está mediado por una cascada temporal de genes reguladores que responden a señales intra y extracelulares (Higgs *et al.*, 2008). Cuando se restablecen las condiciones adecuadas, las mixósporas germinan generando células vegetativas que reanudan el ciclo vegetativo (Dworkin, 1996; Kaiser, 2004) (Fig. 1).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *M. xanthus* (Modificado de Goldman *et al.*, 2006).

## Introducción

La progresión del ciclo de desarrollo en *M. xanthus*, hasta el comienzo de la etapa de esporulación, ocurre en 3 fases: i) fase quiescente, con alguna movilidad pero poca agregación, que dura en torno a 8 horas, ii) periodo de movilidad vigorosa, con formación de cuerpos fructificantes, que va desde las 8 hasta las 16 horas y, iii) periodo de maduración de los cuerpos fructificantes, con inicio de esporulación, que transcurre desde las 16 a las 48 horas (Curtis *et al.*, 2007).

### A.V.2.1. Oscilaciones rítmicas

El ciclo de desarrollo comienza con la ejecución de un movimiento característico, denominado *rippling*, definido por la presencia de oscilaciones celulares rítmicas, que se traduce 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 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 mutantes capaces de completar el ciclo de desarrollo sin necesidad de generar ondulaciones (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 el sentido de movimiento. El contacto celular producido por la colisión entre ondulaciones adyacentes genera una señal que reajusta el reloj, induciendo la 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 (Igoshin *et al.*, 2004; Sliusarenko *et al.*, 2006).

### A.V.2.2. Formación de cuerpos fructificantes

La formación de cuerpos fructificantes requiere un estrecho contacto y el intercambio de un complejo programa de señales intercelulares entre las bacterias presentes.

Los cuerpos fructificantes presentan una disposición variada según el género de mixobacteria. De este modo, en *Myxococcus* aparecen como montículos desnudos con forma redondeada y de consistencia blanda, mientras que en *Coralloccoccus* son duros. Sin embargo, la mayoría de géneros forman cuerpos fructificantes más complejos, diferenciándose un pedúnculo que soporta uno o varios esporangiolos como en *Stigmatella* o *Chondromyces*, e incluso, en ocasiones, los esporangiolos se disponen directamente asociados al propio sustrato como en el género *Sorangium*.

En *M. xanthus* la formación de cuerpos fructificantes tiene lugar mediante el desplazamiento orientado de las mixobacterias hacia centros de agregación donde originan agrupaciones multicelulares macroscópicas. Estas agrupaciones se generan por colisión de grupos celulares organizados en disposición paralela que se desplazan en orientación opuesta. Las células quedan retenidas en el punto de colisión al encontrarse rodeadas de otras células. Cuando una corriente celular se aproxima a una agrupación, ésta actúa como un obstáculo mecánico que fuerza a la corriente a desplazarse sobre o alrededor de ella. En un principio, el agregado presenta forma elipsoidal, pero al

incorporarse más células en movimiento adquiere forma esférica. Tras un tiempo, las células que formaban el núcleo de cada agregación comienzan a dispersarse penetrando dentro de las corrientes celulares periféricas (Alber *et al.*, 2004; Kaiser y Welch, 2004; Kiskowski *et al.*, 2004; Sozinova *et al.*, 2005; Sozinova *et al.*, 2006).

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 mixósporas esféricas de resistencia (Sager y Kaiser, 1993). Tan sólo los bacilos contenidos dentro del cuerpo fructificante reciben las señales adecuadas para esporular, permaneciendo un conjunto de bacilos vegetativos periféricos en torno al cuerpo fructificante para proteger a las mixósporas frente a la depredación y colonización por otros microorganismos (O'Connor y Zusman, 1991), mientras que la mayoría de células muere mediante autólisis, principalmente al inicio del proceso de agregación (Zhang *et al.*, 2005a; Nariya e Inouye, 2008). 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; Nariya e Inouye, 2008).

### A.V.2.3. Esporulación

En el interior de los cuerpos fructificantes las células vegetativas se diferencian en mixósporas metabólicamente quiescentes, refráctiles y resistentes a la desecación, la radiación UV, el SDS, el calor moderado y la sonicación.

La diferenciación de bacilos vegetativos en mixósporas va normalmente acompañada de un cambio de forma en las células, puesto que la mayoría de las mixósporas son más cortas que las células vegetativas. En *Myxococcus* las mixósporas son cococideas, mientras que en otros géneros, tales como *Stigmatella*, son cilíndricas.

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, con similitud a 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.*, 1979b). Otras proteínas que forman parte de la espora son las proteínas S1 y U. Ambas se sintetizan durante la etapa tardía del desarrollo, pero mientras que S1 se acumula en el interior de las esporas (Downard y Zusman, 1985; Teintze *et al.*, 1985), la proteína U es secretada y ensamblada en la superficie de la misma (Inouye *et al.*, 1979a). Junto a ellas también se han identificado las proteínas estructurales C, MspA, MspB y MspC (McCleary *et al.*, 1991; Dahl *et al.*, 2007).

Por otra parte, 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).

#### **A.V.2.4. Germinación**

Al retornar las condiciones favorables, en presencia de nutrientes en el medio, las mixósporas germinan emergiendo bacilos que comienzan a crecer y a dividirse de nuevo, reanudando el crecimiento vegetativo. Como las mixósporas se encuentran agrupadas en el interior de los cuerpos fructificantes, tras la germinación, el ciclo vegetativo es reiniciado por una elevada densidad celular que originará un nuevo enjambre. De este modo, el ciclo de desarrollo garantiza, no sólo la supervivencia celular, sino también que la degradación de macromoléculas, mediante enzimas secretadas por las células vegetativas originadas a partir de la germinación de las mixósporas, sea eficaz.

Para que tenga lugar el proceso de germinación se requieren diversos factores tales como  $\text{Ca}^{2+}$  y serina proteasas. Además, numerosas proteínas se sintetizan específicamente durante la fase inicial de la germinación (Otani *et al.*, 1995).

Durante la germinación, las mixósporas pierden sus características en un orden secuencial: resistencia al calor, resistencia al SDS, refractibilidad y forma esférica (Elías 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).

#### **A.V.3. Inducción química de la esporulación**

La esporulación puede ser inducida por ciertos compuestos químicos como glicerol, etilenglicol o dimetilsulfóxido (Dworkin y Gibson 1964; Komano *et al.*, 1980). Estas sustancias desencadenan una rápida conversión de los bacilos vegetativos en mixósporas, de forma sincrónica, con una elevada eficiencia, aún en presencia de nutrientes.

Las mixósporas inducidas son capaces de germinar, aunque presentan ciertas diferencias con respecto a las mixósporas del ciclo de desarrollo, ya que son menos resistentes, con una cubierta más delgada carente de las proteínas S y C, y contienen tan sólo un único cromosoma sin replicar. Además, 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 bloqueo de la síntesis o ensamblaje del peptidoglicano de la pared celular por acción de agentes químicos. De hecho, durante la conversión de bacilo a espora, la presencia de glicerol activa la enzima  $\beta$ -lactamasa, implicada en el recambio de peptidoglicano de la pared, y los 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).

Las mixósporas producidas como consecuencia de inducción química tan sólo desarrollan de forma parcial el programa genético activado durante el proceso de esporulación que ocurre durante el ciclo de desarrollo. De hecho, mutantes incapaces de esporular durante el ciclo de desarrollo pueden ser inducidos a esporular por adición de agentes químicos, lo que refleja la diferencia entre ambos procesos (Hagen *et al.*, 1978; LaRossa *et al.*, 1983). Estos eventos confluyen en el *locus*  $\Omega 7536$  cuya expresión se ajusta al momento de cambio de forma celular y cuya mutación inhibe de forma simultánea ambos procesos de esporulación (Licking *et al.*, 2000).

## **A.VI. SEÑALIZACIÓN CELULAR DURANTE EL CICLO DE DESARROLLO DE *M. xanthus***

El ciclo de desarrollo de las mixobacterias requiere la coordinación de un número muy elevado de células mediante el intercambio de varias señales extracelulares. Se han identificado cinco tipos diferentes de señales, denominadas señal A, B, C, D y E, a partir de mutantes defectivos para cada una de ellas designados como mutantes *asg*, *bsg*, *csg*, *dsg* y *esg*, respectivamente (Hagen *et al.*, 1978; Downard *et al.*, 1993, Kaiser y Kroos, 1993). Todas estas cepas mutantes son incapaces de completar el ciclo de desarrollo por sí mismas, pero se recuperan mediante complementación al adicionar células silvestres o mutantes para cualquiera de las otras señales, ya que son defectivos en la producción de la señal en sí y no en su recepción o procesamiento.

Durante el ciclo de desarrollo, la comunicación entre células mediante el intercambio programado de señales determina la expresión secuencial de un conjunto de genes regulados de forma específica (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 los genes con respecto a las distintas señales intercelulares (Kroos y Kaiser, 1984; Kroos *et al.*, 1986; Kuspa *et al.*, 1986).

El análisis del perfil de expresión de los marcadores del desarrollo en los diferentes mutantes de señalización permite deducir la progresión de las señales a lo largo del ciclo de desarrollo. 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 máximo tras 12 horas de inanición.

## A.VI.1. Señales implicadas en el ciclo de desarrollo

### A.VI.1.1. Señal A

La señal A está constituida por una mezcla de aminoácidos y péptidos originados por acción de proteasas extracelulares que hidrolizan proteínas presentes en el exterior (Kuspa *et al.*, 1992a; Kuspa *et al.*, 1992b; Plamann *et al.*, 1992). El análisis de la actividad de los aminoácidos durante la transmisión de la señal A ha permitido determinar que aquellos que poseen una actividad más elevada son tirosina, prolina, triptófano, fenilalanina, leucina e isoleucina (Kuspa *et al.*, 1992a).

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

La producción de señal A depende de cinco genes, denominados *asgA*, *asgB*, *asgC*, *asgD* y *asgE*, que codifican proteínas integradas en la misma ruta de transducción de señales. *AsgA* y *AsgD* son proteínas híbridas, con un dominio histidina quinasa junto con un dominio regulador de respuesta (Plamann *et al.*, 1995; Li y Plamann, 1996; Cho y Zusman, 1999a). *AsgB* es un regulador transcripcional con un dominio de unión al ADN (Plamann *et al.*, 1994), mientras que *AsgC* es el factor  $\sigma$  principal de la ARN polimerasa, necesario para la unión al promotor durante el inicio de la transcripción (Davis *et al.*, 1995), y *AsgE* es una proteína aminohidrolasa situada en la membrana plasmática (Garza *et al.*, 2000). Los mutantes para estos genes no forman cuerpos fructificantes ni esporas, pero estas capacidades pueden ser restablecidas mediante la adición de mezclas apropiadas de aminoácidos y péptidos (Kuspa *et al.*, 1992a; Kuspa *et al.*, 1992b).

Se ha propuesto un modelo funcional para la ruta de señalización necesario para originar señal A. Según este modelo, el agotamiento de nutrientes es captado por una proteína sensora y transmitido hasta la histidina quinasa *AsgA*, que se autofosforila. A continuación, la señal se transfiere a una o varias proteínas a través de fosfotransferencia mediada por *AsgD* (Cho y Zusman, 1999a) hasta alcanzar el regulador transcripcional *AsgB* y la aminohidrolasa *AsgE*. Ambas proteínas reconocen las señales procedentes de *AsgA* y actúan de manera independiente. Por un lado, *AsgB* fosforilada actúa como 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 proteasas extracelulares. *AsgE*, por su parte, controla otra señal aún no identificada (Garza *et al.*, 2000).

Entre los genes cuya expresión es dependiente de la señal A se encuentran *sasB*, *sasA* y *rodK*. El locus *sasB* incluye los genes *sasSR*, que forman un sistema regulador de dos componentes, y *sasN*, que es un regulador negativo (Kaufman y Nixon, 1996; Yang y Kaplan, 1997). La histidina quinasa *SasS* detecta el nivel extracelular de señal A y, si es adecuado, fosforila al regulador de respuesta de tipo NtrC, *SasR*. La

activación de SasR induce la expresión de genes dependientes de la señal A que se encuentran reprimidos por la proteína SasN durante el crecimiento vegetativo (Keseler y Kaiser, 1995; Xu *et al.*, 1998). Por su parte, el *locus sasA* incluye los genes *rfbABC*, importantes para la síntesis del lipopolisacárido antígeno O (Guo *et al.*, 1996), aunque no está claro el papel del lipopolisacárido antígeno O en la recepción de la señal A. Finalmente, el producto del gen *rodK* es un temporizador del ciclo de desarrollo que se encarga de inhibir la señal A durante el desarrollo tardío (Rasmussen *et al.*, 2005; Rasmussen *et al.*, 2006).

### A.VI.1.2. Señal B

La señal B, junto con la señal A, son esenciales para el inicio del ciclo de desarrollo en *M. xanthus*, 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 son defectivos en la agregación, no forman cuerpos fructificantes y no esporulan (Kroos y Kaiser, 1987). Sin embargo, no se conoce la naturaleza de la señal B, ni tampoco el mecanismo de complementación extracelular (Gill y Bornemann, 1988).

Los mutantes incapaces de generar señal B se encuentran afectados en un único *locus* denominado *bsgA* (Gill *et al.*, 1993). Este gen codifica la proteína BsgA, una proteasa de tipo Lon con 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 que activa la expresión del regulador del desarrollo FruA de la señal C durante el desarrollo (Nariya e Inouye, 2006).

Existen mutaciones que suprimen los defectos que presentan en el desarrollo los mutantes *bsg*. Estas mutaciones se localizan en los genes *spdRS* (Hager *et al.*, 2001; Tse y Gill, 2002) y *bcsA* (Cusick *et al.*, 2002; Cusick y Gill, 2005), que se asocian con dos rutas de señalización diferentes e independientes entre sí, relacionadas con la señal B. En la primera ruta intervienen la histidina quinasa SpdS y el regulador de respuesta, de tipo NtrC, SpdR, regulando negativamente la expresión de los genes del desarrollo dependientes de la señal B y ejerciendo un efecto represor suprimido por la proteasa BsgA en presencia de señal B (Hager *et al.*, 2001; Tse y Gill, 2002). En la otra ruta de señalización participa la proteína BcsA, una enzima monooxigenasa dependiente de flavina, que igualmente actúa como represor sobre el desarrollo en función de la densidad celular (Cusick *et al.*, 2002; Cusick y Gill, 2005).

### A.VI.1.3. Señal C

La señal C es una proteína que se asocia a la superficie celular de *M. xanthus* (Shimkets y Rafiee, 1990) dado que estas bacterias presentan sobre su membrana este factor. Por ello, la transmisión de esta señal requiere el contacto directo entre células, actuando sólo si las bacterias se encuentran densamente empaquetadas y alineadas de forma regular (Kim y Kaiser, 1990a). Los mutantes en la señal C tienen afectado el *locus csgA* (Shimkets y Asher, 1988), ya que la pérdida de este gen bloquea la producción de la señal C en respuesta al agotamiento de nutrientes y, en consecuencia, no se agregan ni esporulan.



## Introducción

El gen *csgA* codifica una proteína de 25 kDa que presenta homología con alcohol deshidrogenasas de cadena corta que poseen, en su extremo N-terminal, un sitio de unión al NAD<sup>+</sup> (Baker, 1994; Lee y Shimkets, 1994; Lee *et al.*, 1995), junto con un dominio catalítico deshidrogenasa en la región C-terminal. Esta proteína es procesada en la superficie celular por una serina proteasa (Lobedanz y Sogaard-Andersen, 2003), perdiendo el sitio de unión al NAD<sup>+</sup> y originando un polipéptido de 17 kDa que queda adherido a la superficie celular (Kim y Kaiser, 1990a; Shimkets y Raffie, 1990; Kruse *et al.*, 2001), lo que asegura que la señal C se transmita a otras células en contacto y no hacia sí misma (Lobedanz y Sogaard-Andersen, 2003).

Los niveles crecientes de señal C regulan los eventos que tienen lugar a medida que progresa el ciclo de desarrollo. Conforme avanza el desarrollo se requieren concentraciones crecientes de factor C, de forma que bajas concentraciones inducen oscilaciones rítmicas, concentraciones intermedias se asocian con agregación y altas concentraciones desencadenan la esporulación en *M. xanthus* (Kim y Kaiser, 1991; Li *et al.*, 1992; Kruse *et al.*, 2001).

La 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). El gen *csgA* se expresa durante el crecimiento vegetativo, pero incrementa su expresión en respuesta al agotamiento de nutrientes por acción de RelA, la respuesta estricta (Crawford y Shimkets, 2000a) y 4 proteínas codificadas por el operón *act*, que incluye el sistema regulador de dos componentes ActAB y las proteínas ActC y ActD (Gronewold y Kaiser, 2001). En esta ruta de señalización, la presencia de señal C estimula al regulador de respuesta ActA, que a su vez activa al regulador ActB para potenciar la expresión del operón *act* y la completa expresión de *csgA* (Gronewold y Kaiser, 2007). Por su parte, ActC y ActD están implicados en la temporalidad de la expresión del gen *csgA*, es decir, en que su expresión ocurra en el momento correcto (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 de estas vías es el regulador de respuesta, de tipo FixJ, FruA. Este regulador posee un motivo hélice-giro-hélice de unión al ADN, cuya actividad transcripcional se regula mediante fosforilación en respuesta a la señal C, mediada por una histidina quinasa sensora desconocida. La delección del gen *fruA* da lugar a mutantes que presentan agregación anormal y son incapaces de formar cuerpos fructificantes y de esporular. La expresión del gen *fruA* es totalmente dependiente del desarrollo y se encuentra controlada por las señales A y E (Ogawa *et al.*, 1996; Ellehauge *et al.*, 1998).

La transcripción de *fruA* (Ogawa *et al.*, 1996; Ellehauge *et al.*, 1998), así como la del regulador transcripcional MrpC y la proteína DevT (Boysen *et al.*, 2002) se induce, a través de un mecanismo desconocido, por la señal A. MrpC contiene un dominio de unión a nucleótidos cíclicos seguido de un dominio HTH de unión al ADN, de manera que se une al promotor de *fruA* induciendo su transcripción (Ueki e Inouye, 2003). La expresión de *mrpC* se induce a partir del sistema de dos componentes MrpA/MrpB, tras ser éste estimulado por la señal A y la respuesta estricta (Sun y Shi, 2001a; Sun y Shi, 2001b). Al comenzar el desarrollo, MrpC es procesado mediante el corte del extremo N-terminal por la proteasa BsgA 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, 2005).

FruA controla la expresión de un conjunto de genes inducidos de forma selectiva durante el desarrollo. Entre ellos se encuentran genes que se expresan de forma independiente de la señal C, como *tps* o *dofA* (Ueki e Inouye, 2006), mientras que otros, como *devTRS*, son totalmente dependientes de ella.

Se ha propuesto un modelo global para la ruta de transducción de señales de la señal C. Según el modelo propuesto, ante el agotamiento de nutrientes, la señal C es percibida por una proteína sensora de tipo histidina quinasa desconocida que 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 frizzy, que controla la agregación y fructificación, y el sistema *dev* que determina la esporulación (Bonner y Shimkets, 2001).

Al inicio del ciclo de desarrollo, cuando los niveles de señal C son bajos, la proteína FruA está poco fosforilada y tan sólo es capaz de activar la ruta de señalización frizzy que conduce a la agregación celular. La señal C induce la metilación de la proteína FrzCD, perteneciente al sistema frizzy, de forma dependiente de FruA, y de la metiltransferasa FrzF (Ellehaug *et al.*, 1998; Søgaaard-Andersen y Kaiser, 1996; Ueki e Inouye, 2006), para controlar el movimiento por deslizamiento durante la agregación celular en respuesta a la señal C. De este modo, 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 (Søgaaard-Andersen y Kaiser, 1996; Jelsbak y Søgaaard-Andersen, 1999). En un principio, se producen reversiones periódicas en el sentido 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 el mismo sentido. 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 (Søgaaard-Andersen y Kaiser, 1996; Jelsbak y Søgaaard-Andersen, 2002). A medida que las células se agregan formando el cuerpo fructificante, se incrementan 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 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, pero ésta sólo se produce cuando la agregación se ha completado (Kaplan, 2003). La proteína FruA controla la expresión del operón *dev*, formado por cinco genes donde al menos tres, *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). Un producto de este sistema, la proteína DevT, estimula a su vez la síntesis del regulador FruA durante el desarrollo (Boysen *et al.*, 2002).

### A.VI.1.4. Señal D

La identidad de la señal D se desconoce, aunque mezclas de ácidos grasos, incluyendo el 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 avanzada del desarrollo, puesto que su ausencia bloquea la expresión de los genes tardíos del mismo. Los mutantes carentes de señal D son resultado de la alteración de un único *locus* denominado *dsgA*. Los mutantes de inserción de *dsgA* son letales (Cheng y Kaiser, 1989b), mientras que mutaciones puntuales en *dsg* generan deficiencias en el desarrollo como agregación anormal y retrasada, y esporulación reducida (Cheng y Kaiser, 1989a), pero no tienen efecto en la viabilidad de las células que crecen vegetativamente. Estos hechos reflejan la posibilidad de que las mutaciones puntuales sigan permitiendo la producción de proteínas ligeramente modificadas que mantienen alguna función, mientras que las inserciones de material genético exógeno originan mutaciones inviables (Dworkin, 1996).

El gen *dsgA* codifica el factor IF3 de iniciación de la traducción de *M. xanthus*, cuyo producto es 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 vegetativo y el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*, de manera que su actividad es necesaria para completar la producción de proteínas que tiene lugar durante el desarrollo (Cheng y Kaiser, 1989b). Como se ha indicado, los mutantes puntuales para *dsgA* parecen retener cierta actividad de InfC, la cual resulta insuficiente para completar la síntesis de proteínas del desarrollo (Cheng y Kaiser, 1989a).

### A.VI.1.5. Señal E

La señal E parece estar constituida por uno o varios ácidos grasos ramificados, liberados a partir de los componentes fosfolípidicos presentes en la membrana bacteriana (Downard y Toal, 1995). De hecho, *M. xanthus* es capaz de aceptar ácidos grasos a partir de fosfolípidos procedentes de una suspensión (Kearns y Shimkets, 2001), lo que implica que estos ácidos grasos pueden ser transferidos entre células por contacto. Los mutantes para la señal E poseen afectado un único *locus*, denominado *esg*, cuya alteración bloquea el desarrollo en una fase muy temprana. Estas cepas sólo conservan 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 las subunidades proteicas E1 $\alpha$  y E1 $\beta$  de la deshidrogenasa de cetoácidos ramificados de *M. xanthus*, 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).

## A.VI.2. Respuesta estricta

Los aminoácidos son la principal fuente de carbono, nitrógeno y energía de *M. xanthus* (Dworkin, 1962), por lo que su limitación juega un papel central en la iniciación del ciclo de desarrollo (Dworkin, 1963). La principal decisión que afrontan las células durante la limitación de nutrientes es desviar el carbono hacia el crecimiento o hacia la producción de macromoléculas del desarrollo. La carencia de aminoácidos activa la respuesta estricta al detener la síntesis proteica debido a la incapacidad del ribosoma de leer un codón que carece de su respectivo ARNt cargado. Entonces, la (p)ppGpp sintetasa RelA se asocia al ribosoma y comienza a sintetizar nucleótidos altamente fosforilados, de tipo guanosina tetra y penta fosfato [(p)ppGpp], que actúan como alarmona (Singer y Kaiser, 1995). La capacidad de acumular (p)ppGpp es absolutamente dependiente de la proteína RelA y del sensor del nivel de nutrientes Nsd (Brenner *et al.*, 2004).

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 *relA* son incapaces de expresar ninguno de los genes dependientes del desarrollo ante la privación de nutrientes (Harris *et al.*, 1998). En este sentido, la acumulación de (p)ppGpp por la respuesta estricta induce la producción de las señales A y 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 producción de un 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. 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).

Como se ha indicado, ante la limitación de nutrientes *M. xanthus* presenta dos alternativas. Por un lado, mantener un crecimiento vegetativo reducido, adecuado a los nutrientes restantes presentes en el medio o, por otra parte, progresar hacia el desarrollo. Ambos procesos implican la muerte de una elevada proporción de bacterias. 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 agoten totalmente los nutrientes esenciales (Kaiser, 2004). Además, las células deben controlar y responder a dos niveles diferentes de inanición, el de la célula individual y el de la población. La respuesta de la población incluye la activación de los genes *asg* y la producción de señal A, así como la expresión de *csgA* y *fruA* necesarios para la detección y producción de la señal C (Harris *et al.*, 1998), mientras que la respuesta al agotamiento de nutrientes a nivel celular incluye la activación de genes tales como *sigD* (Viswanathan *et al.*, 2006), *mrpAB*, *sdeK* (Sun y Shi, 2001a) y *brgE* (Pham *et al.*, 2005) que contribuyen a mantener elevados niveles de (p)ppGpp.

## Introducción

Finalmente, las células tomarán la decisión de crecer vegetativamente o de iniciar el ciclo de desarrollo en función de la relación entre dos proteínas reguladoras esenciales, SocE y CsgA. La proteína SocE mantiene el crecimiento vegetativo y actúa como represor del desarrollo al inhibir la respuesta estricta. 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).

De esta manera, si la densidad celular es suficientemente alta, la señal C será transmitida al mismo tiempo que disminuye el nivel de SocE como resultado de la respuesta estricta. Como CsgA estimula a RelA, la respuesta estricta será prolongada a lo largo del desarrollo. Si la señal de agotamiento de nutrientes se mantiene indefinidamente, las proteínas TodK y RodK modulan los aspectos espaciales y temporales de la esporulación (Rasmussen y Søgaard-Andersen, 2003; Rasmussen *et al.*, 2005). Pero si la densidad celular no es lo suficientemente elevada como para generar un cuerpo fructificante, la concentración interna de CsgA no alcanzará el nivel que permita mantener la respuesta estricta, los niveles de SocE aumentarán de nuevo y las células se decantarán por el crecimiento en lugar del desarrollo (Crawford y Shimkets, 2000a).

## A.VII. GENOMAS DE MIXOBACTERIAS

El genoma de la cepa DK1622 de *M. xanthus* ha sido secuenciado recientemente (Número de acceso NC\_008095) (Goldman *et al.*, 2006) por Monsanto y TIGR (The Institute for Genomic Research; <http://www.tigr.org>), mientras que la secuenciación de los genomas de *Sorangium cellulosum* So ce56 (Número de acceso NC\_010162) (Schneiker *et al.*, 2007) y *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-C (Número de acceso NC\_007760) (Thomas *et al.*, 2008) ha sido llevada a cabo por la Universidad de Bielefeld (<https://www.uni-bielefeld.de>) y DOE Joint Genome Institute (<http://genome.jgi-psf.org>), respectivamente. También se ha completado la secuenciación del genoma de otras 2 mixobacterias, *Anaeromyxobacter* sp. Fw109-5 y *Anaeromyxobacter* sp K, que no han sido objeto de publicación hasta el momento. Además, se está efectuando la secuenciación de otros genomas de mixobacterias que se encuentran disponibles en forma de fragmentos genómicos (Tabla 2).

Las mixobacterias poseen los genomas de mayores dimensiones entre los procariontes, con un tamaño comprendido entre 9.1 y 13.0 Mb, a excepción de las especies de *Anaeromyxobacter* cuyos genomas presentan un tamaño de 5.0 a 5.3 Mb (Tabla 2). De forma comparativa, el tamaño promedio del genoma de estas bacterias duplica ampliamente al de *Escherichia coli* (Blattner *et al.*, 1997) y es considerablemente más grande que el de otras  $\delta$ -proteobacterias.

El contenido en G+C de todos los genomas de mixobacterias es muy elevado, estando comprendido entre 67 y 74% (Tabla 2). El número de genes oscila entre 4346 de *A. dehalogenans* 2CP-C y 9367 en *S. cellulosum*, en concordancia con el tamaño del genoma de cada especie, dado que la porción de cromosoma destinada a codificar estos genes se sitúa en todos los casos entre el 86 y 90% (Tabla 2).

La expansión del tamaño del genoma de las mixobacterias se ha originado mediante duplicación génica y posterior divergencia de las nuevas copias a partir de un progenitor ancestral, proporcionando el material necesario para la adquisición de nuevas funciones génicas (Gevers *et al.*, 2004; Pushker *et al.*, 2004). De hecho, más del 15% de los genes de mixobacterias se han duplicado de forma específica y selectiva originando familias de parálogos. Pero la duplicación de genes no ha ocurrido al azar, ya que algunos genes no se han duplicado, mientras que los genes relacionados con la comunicación intercelular, detección de pequeñas moléculas y control de la expresión génica se han amplificado preferentemente. Entre los genes que presentan múltiples copias también se encuentran ampliamente representados los genes implicados en el metabolismo secundario, siendo probable que sean importantes para la actividad depredadora de las mixobacterias, aunque pueden haberlos recibido por transferencia horizontal de genes (Goldman *et al.*, 2006; Goldman *et al.*, 2007).

**Tabla 2.** Características principales de los genomas secuenciados, o en proceso de secuenciación, de mixobacterias.

Mixobacteria	Suborden	Tamaño (Mb)	Genes	% GC	% codificante	Estado
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C	Cystobacterinae	5.0	4346	74	90	Completo
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-1	Cystobacterinae	5.0	4538	75		75 fragmentos
<i>Anaeromyxobacter</i> sp. Fw109-5	Cystobacterinae	5.3	4562	73	89	Completo
<i>Anaeromyxobacter</i> sp K	Cystobacterinae	5.1	4457	75	90	Completo
<i>Haliangium ochraceum</i> DMS 14365	Nannocystineae			67		
<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	Cystobacterinae	9.1	7388	68	90	Completo
<i>Myxococcus fulvus</i> HW-1	Cystobacterinae			68		
<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1	Nannocystineae	10.6	8450	71	89	237 fragmentos
<i>Sorangium cellulosum</i> So ce56	Soranginae	13.0	9367	71	86	Completo
<i>Stigmatella aurantica</i> DW4/3-1	Cystobacterinae	10.3	8543	67		579 fragmentos

El genoma de *M. xanthus* está compuesto por un único cromosoma circular que contiene 7388 genes putativos que representan más del 90% del genoma. Junto a genes asociados al metabolismo energético, transcripción y traducción, aparecen numerosos genes que codifican enzimas degradativas, así como proteínas de señalización (Goldman *et al.*, 2006). De hecho, se ha propuesto que las bacterias con genomas de mayores dimensiones, como es el caso de las mixobacterias, poseen elevadas capacidades adaptativas a ambientes muy variables (Lynch y Conery, 2003; Konstantinidis y Tiedje, 2004).

En este sentido, *M. xanthus* es capaz de detectar una amplia variedad de señales ambientales 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 proteínas implicadas en estas rutas, como activadores dependientes de  $\sigma^{54}$ , sistemas de dos componentes y Ser/Thr/Tyr quinasas (Goldman *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2008). Debido al predominio de las rutas reguladoras de tipo multicomponente en esta bacteria, la proporción de genes reguladores transcripcionales de un único componente se encuentra sensiblemente reducida, siendo su número inferior a la mitad del esperado en relación al tamaño del genoma de *M. xanthus*.

Entre los reguladores dependientes de  $\sigma^{54}$  se han identificado 53, de los cuales al menos la mitad son específicos del grupo de las mixobacterias y en muchos casos se expresan a niveles considerables (Goldman *et al.*, 2006; Karlin *et al.*, 2006). Una elevada proporción de estos reguladores parece participar en rutas de señalización implicadas en la detección de cambios medioambientales, siendo claves para el desarrollo, puesto que numerosos genes se inducen durante este período a partir de promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  en presencia de la proteína activadora adecuada. De hecho, la mutación de algunos de estos reguladores bloquea el desarrollo e incluso la supresión del factor  $\sigma^{54}$  es letal para *M. xanthus*, a diferencia de lo que ocurre en otros microorganismos (Jakobsen *et al.*, 2004; Jelsbak *et al.*, 2005; Kroos, 2005).

*M. xanthus* es resistente a varios antibióticos como las cefalosporinas, que pueden inhibir el crecimiento de sus competidores (Fiegna y Velicer, 2005) y debilitar a sus presas (Chater y Hopwood, 1989). Esta bacteria es incapaz de sintetizar aminoácidos de cadena ramificada, por lo que la depredación es una alternativa a la biosíntesis. Para ello, sintetiza proteasas periplásmicas y extracelulares y, mediante el contacto directo con su presa, las ataca y lleva a cabo la proteólisis en el periplasma para evitar destruir sus propias proteínas (Karlin *et al.*, 2006). Por ello, estos genes también se encuentran altamente representados en el genoma de *M. xanthus* y se expresan a niveles elevados.

## A.VIII. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN BACTERIAS

### A.VIII.1. Características generales de la señalización en bacterias

Con frecuencia, las bacterias se enfrentan a cambios medioambientales, dado que los niveles de nutrientes y toxinas, acidez, temperatura, osmolaridad, humedad y otras condiciones del entrono pueden cambiar rápida e inesperadamente. Por ello, disponen de numerosos sistemas de transducción de señales esenciales para generar diversas respuestas adaptativas frente a estímulos ambientales específicos (Parkinson, 1995).

El análisis de los genomas microbianos secuenciados indica que los microorganismos sometidos a condiciones variables, como bacterias del suelo o acuáticas, así como patógenos facultativos, han desarrollado y mantenido sistemas de señalización mucho más diversos y complejos que los organismos especializados en explotar eficientemente ambientes más estables, los cuales, con frecuencia, contienen sistemas de señalización escasos y bastante primitivos como es el caso de los patógenos

intracelulares obligados (Shi *et al.*, 1998; Konstantinidis y Tiedje, 2004; Galperin, 2005).

En una especie bacteriana la relación entre el número de macromoléculas implicadas en la señalización y el tamaño de su genoma permite valorar el potencial adaptativo de este organismo al ambiente (Galperin, 2005). Las bacterias en las que esta relación es elevada son microorganismos pertenecientes a medios edáficos o acuáticos, con formas de vida muy versátiles, capaces de emplear sustratos diversos y con movilidad muy activa. En ocasiones, las redes de señalización varían ampliamente entre organismos muy próximos debido a la adquisición o pérdida de genes de señalización a lo largo de la evolución durante la adaptación de la bacteria a un nicho ecológico específico, ya que estos genes son los primeros candidatos a modificación génica (Kennelly, 2002).

A pesar de la gran diversidad de estímulos y respuestas, para la señalización se utiliza un número relativamente pequeño de estrategias moleculares, aunque muy diversas (West y Stock, 2001). Las rutas de señalización más sencillas constan de una única proteína reguladora capaz de acoplar de forma directa una región sensora y otra efectora. Estos sistemas 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).

En bacterias son frecuentes los sistemas de señalización basados en la producción de segundos mensajeros. Estos sistemas están constituidos por enzimas de tipo adenilato y guanilato ciclasa junto con fosfodiesterasas implicadas en el control de la síntesis y degradación de nucleótidos cíclicos, respectivamente (Baker y Kelly, 2004; Jenal y Malone, 2006; Linder, 2006).

Un proceso habitualmente empleado en la transmisión de señales es la fosfotransferencia. Las proteínas de señalización propias de las rutas de transducción de señales son modulares, combinando motivos de diferente naturaleza en una misma proteína, de forma que 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).

Las rutas de señalización más comunes en procariotas son aquellas en las que intervienen los sistemas reguladores de dos componentes (Parkinson y Kofoid, 1992; Parkinson, 1993; Hoch y Silhavy, 1995). Estos sistemas constan de dos proteínas de señalización conservadas, una histidina quinasa sensora que se autofosforila en respuesta a un estímulo, y su correspondiente regulador de respuesta, relacionadas entre sí mediante fosfotransferencia (Hoch, 2000; Stock *et al.*, 2000; Kim y Forst, 2001; West y Stock, 2001). La fosforilación del regulador de respuesta controla su actividad, lo que se traduce en un cambio metabólico en la célula. Los sistemas reguladores de dos componentes representan una ruta relativamente simple y eficiente en la que sólo dos pasos de fosforilación de proteínas son suficientes para transmitir una señal (Cozzzone *et al.*, 2004).

Una versión más compleja de este proceso lo constituyen los fenómenos de fosfotransferencia His-Asp-His-Asp que implican múltiples etapas de transferencia de fosfato y, a menudo, más de dos proteínas (Perraud *et al.*, 1999). Estos sistemas de



## Introducción

señalización son más frecuentes en eucariotas, mientras que los sistemas de dos componentes “clásicos” predominan entre los procariotas (West y Stock, 2001).

Por último, en bacterias también existen quinasas homólogas a las enzimas de eucariotas implicadas en procesos de fosforilación asociados a la transducción de señales. Estas quinasas catalizan la fosforilación de grupos hidroxilo de serina, treonina y tirosina de sus proteínas sustrato, lo que conduce a la formación de fosfomonoésteres (Hanks y Hunter, 1995). Como la fosforilación de proteínas es una modificación reversible, las fosfoproteínas pueden ser desfosforiladas específicamente por fosfatasas que, en general, hidrolizan alquil fosfomonoésteres de fosfoserina y fosfotreonina o aril fosfoésteres de fosfotirosina y, a veces, son capaces de desfosforilar ambos tipos de residuos (Kennelly y Potts, 1999). De este modo, los procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas constituyen un mecanismo importante de regulación de procesos moleculares en respuesta a estímulos intra y extracelulares debido a tres de sus características (Fischer y Krebs, 1989):

i) Su impacto funcional. La alta densidad de carga y la propensión para formar puentes salinos fuertes y puentes de hidrógeno, convierte a los grupos fosfato en potentes agentes para alterar la estructura de proteínas (Johnson y Barford, 1993). En consecuencia, la probabilidad de que un evento de fosforilación altere las propiedades funcionales de una proteína es relativamente alta (Kennelly, 2002). En eucariotas, los residuos de serina, treonina o tirosina de aproximadamente un tercio de las proteínas son objeto de fosforilación (Pullen *et al.*, 2004).

ii) La facilidad con que pueden producirse. La superficie de casi todas las proteínas está cubierta con numerosos aminoácidos aceptores de grupos fosfato. Las cadenas laterales funcionales incluyen grupos hidroxilo de serina, treonina y tirosina, el anillo imidazol de histidina y el carboxilato del ácido aspártico. Los determinantes necesarios para el reconocimiento de las quinasas responsables de la fosforilación, en muchos casos, consisten en breves secuencias consenso fácilmente reconocibles (Kennelly y Krebs, 1991). Por lo tanto, la transformación de una proteína en fosfoproteína puede ser conseguida mediante la alteración de sólo uno o dos residuos (Kennelly, 2002).

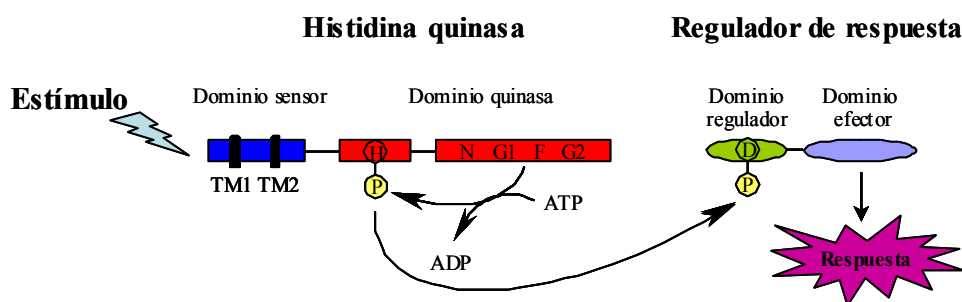
iii) Su reversibilidad. A diferencia de los productos de muchas otras modificaciones covalentes, las fosfoproteínas pueden volver fácilmente a su estado original mediante desfosforilación mediada por fosfatasas. La capacidad de pasar de un estado a otro, física y funcionalmente distinguible, permite que los sitios de fosforilación sirvan como elementos reguladores que posibilitan estrategias sofisticadas para la integración de señales (Kennelly, 2002).

## A.VIII.2. Sistemas reguladores de dos componentes

Los sistemas reguladores de dos componentes constituyen el mecanismo más extendido de transducción de señales en bacterias (Hoch, 2000). Un sistema regulador de dos componentes típico consta de una histidina quinasa y un regulador de respuesta entre las cuales se produce la transferencia de fosfato generando respuestas adaptativas. Estas rutas se emplean para la regulación de una amplia variedad de procesos celulares como metabolismo, movilidad, quimiotaxias, transporte de nutrientes, adaptación a

agentes de estrés, virulencia, diferenciación y desarrollo (Bekker *et al.*, 2006), lo que explica la extensa variedad de dominios sensores diferentes que aparecen en las histidina quinasa.

Cuando la histidina quinasa detecta una señal o un cambio medioambiental se autofosforila en un residuo de histidina conservado (Fig. 2). A continuación, transfiere directamente el grupo fosfato a su regulador de respuesta afín que queda fosforilado en un residuo de aspártico conservado (Fig. 2). La respuesta frente al estímulo inductor está determinada por el estado de fosforilación del regulador de respuesta que controla la actividad de esta proteína (Hoch, 2000; Stock *et al.*, 2000; Kim y Forst, 2001; West y Stock, 2001).



**Figura 2.** Esquema del funcionamiento de un sistema regulador de dos componentes.

El número de sistemas reguladores de dos componentes en los diferentes microorganismos varía, siendo excepcionalmente abundantes en las mixobacterias, como es el caso de *M. xanthus* que posee 133 histidina quinasa y 139 reguladores de respuesta, así como 36 quinasa híbridas (Shi *et al.*, 2008). Los genes que codifican histidinas quinasa y reguladores de respuesta afines suelen encontrarse adyacentes en el genoma (Mizuno, 1997; Fabret *et al.*, 1999).

Los sistemas reguladores de dos componentes se agrupan en subfamilias en función de su organización génica, arquitectura de los dominios y relaciones filogenéticas. En este sentido, las 4 grandes subfamilias de sistemas de dos componentes presentes en *M. xanthus* son las de tipo CheAY, PhoBR, NtrBC y NarXL.

### A.VIII.2.1. Histidina quinasa

Las histidina quinasa constituyen una amplia familia de proteínas de señalización capaces de catalizar la fosforilación de residuos de histidina a partir de ATP. La mayoría de estas proteínas son homodiméricas y se encuentran unidas a la membrana, diferenciándose en ellas un dominio sensor N-terminal periplásmico, acoplado a un dominio quinasa C-terminal citoplasmático, que contiene el residuo de histidina fosforilable. Los dominios sensores son variables en secuencia, en concordancia con la diversidad de estímulos medioambientales que deben ser detectados (Mascher *et al.*, 2006), mientras que los dominios quinasa están más conservados entre los miembros de esta familia de proteínas. Las histidina quinasa se dividen en 11 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).

El dominio quinasa consta de dos subdominios: de fosforilación/dimerización y catalítico. El subdominio de fosforilación/dimerización contiene un motivo, denominado caja H, donde se encuentra el residuo de histidina fosforilable. Además, favorece los contactos proteicos necesarios para la dimerización de la proteína. El subdominio catalítico, por su parte, contiene varias secuencias altamente conservadas denominadas cajas N, G1, F y G2 (Parkinson y Kofoid, 1992; Swanson *et al.*, 1994; Stock *et al.*, 1995; Zhu e Inouye, 2002), implicados en la unión de ATP y en la fosfotransferencia hasta el residuo aceptor de histidina. La autofosforilación de las histidina quinasa 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).

### A.VIII.2.2. Reguladores de respuesta

Los reguladores de respuesta catalizan la transferencia del grupo fosfato desde la histidina quinasa hasta un residuo de aspártico conservado presente en el propio regulador. Normalmente, en estas proteínas se diferencia un dominio regulador en el extremo N-terminal, donde se encuentra el residuo de aspártico aceptor, y un dominio efector C-terminal, mucho más variable, que es el encargado de mediar la respuesta al estímulo recibido.

Los dominios reguladores interactúan con las histidina quinasa fosforiladas, catalizan la transferencia de un grupo fosfato a uno de sus propios residuos de aspártico, catalizan la autodesfosforilación y regulan las actividades de sus dominios efectores asociados de una manera dependiente de fosfato (West y Stock, 2001).

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 (Galperin, 2006; Gao *et al.*, 2007).

Los reguladores de respuesta controlan las actividades celulares frente al estímulo percibido. Para ello, en muchas ocasiones, actúan como factores transcripcionales controlando 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 metilesterasa, ciclasa o fosfodiesterasa, mientras que en otros casos presentan motivos de interacción proteína-proteína, todos ellos capaces de regular las funciones celulares sin alterar la expresión génica (Galperin, 2006; Gao *et al.*, 2007).

### A.VIII.2.3. Regulación de los sistemas de dos componentes

El estado de fosforilación de las proteínas que componen el sistema regulador de dos componentes determina la intensidad de la señal a través de esta ruta, de manera que existen diferentes estrategias para regular estos sistemas. Además de las propias histidina quinasa y los reguladores de respuesta, muchos sistemas presentan proteínas reguladoras auxiliares. En última instancia, el objetivo directo o indirecto de todas las

estrategias reguladoras es controlar el nivel de fosforilación del regulador, que es el que determina la respuesta.

Por una parte, la regulación de los sistemas de dos componentes se puede llevar a cabo regulando el grado de fosforilación de la histidina quinasa o el proceso de fosfotransferencia. En este sentido, las histidina quinasas modulan la tasa de fosforilación del regulador de respuesta controlando la disponibilidad de donador fosforilado y mediante contactos proteína-proteína entre las quinasas y sus reguladores afines, lo que incrementa la tasa de fosforilación y determina la especificidad de la fosforilación del regulador. Muchas histidina quinasas, además de proporcionar grupos fosfato a los reguladores de respuesta, también poseen actividad fosfatasa hacia sus reguladores de respuesta afines regulada por estímulos externos, los cuales van a determinar el estado quinasa o fosfatasa de estas proteínas (Igo *et al.*, 1989; Makino *et al.*, 1989; Zhu *et al.*, 2000). Además, también existen proteínas con actividad fosfohistidina fosfatasa, como las proteínas de tipo SixA, que pueden desfosforilar el residuo de histidina conservado fosforilado de las histidina quinasas (Matsubara y Mizuno, 2000).

Por otro lado, el estado de fosforilación del regulador de respuesta puede ser regulado por el propio regulador a través de su actividad autofosfatasa (West y Stock, 2001) o mediante fosfatasa auxiliares que limitan la duración de su estado activo, causando un cambio conformacional en el regulador fosforilado que estimula su actividad autofosfatasa (Stock *et al.*, 1995).

### A.VIII.3. Quinasas de tipo eucariota

Mientras que en procariotas predominan las rutas de transducción de señales basadas en histidina quinasas, 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 quinasas. Histidina quinasas y Ser/Thr y Tyr quinasas presentan especificidades de sustrato diferentes condicionadas por la ausencia de similitud de secuencia entre ellas (Zhang, 1996). Durante mucho tiempo se consideró que las quinasas que fosforilan residuos de serina, treonina o tirosina se encontraban confinadas de forma exclusiva en organismos eucariotas, por lo que este tipo de proteínas se denominó proteínas quinasas de tipo eucariota (ePKs).

Sin embargo, mediante estudios bioquímicos se identificaron proteínas fosforiladas en serina, treonina y tirosina en bacterias y arqueas, lo que sugería la existencia de este tipo de quinasas 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 quinasas en procariotas (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991). A partir de ese momento, se han descrito y caracterizado numerosas proteínas quinasas de tipo eucariota en distintos microorganismos, tanto en bacterias como en arqueas, que participan en rutas de señalización implicadas en el control de diversos procesos celulares. Así, se ha podido determinar que los procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas se extienden entre los tres dominios de vida: *Eucarya*, *Bacteria* y *Archaea*. Numerosas bacterias y arqueas contienen quinasas y fosfatasas de tipo eucariota e histidina quinasas pertenecientes a los sistemas reguladores de dos componentes (Cozzone, 1993; Kennelly y Potts, 1996; Zhang,

## Introducción

1996; Leonard *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998a; Zhang *et al.*, 1998b; Pérez *et al.*, 2008). Inversamente, homólogos de histidina quinasa y reguladores de respuesta bacterianos han sido identificados en varios eucariotas (Alex y Simon, 1994; Harris *et al.*, 1995; Loomis *et al.*, 1997).

Las proteínas Ser/Thr y Tyr quinasa de tipo eucariota poseen un dominio catalítico donde reside la capacidad de fosforilación de la proteína (Hanks y Hunter, 1995). Esta región contiene 12 subdominios conservados, formados por secuencias cortas muy constantes, que presentan varios residuos directamente implicados en la actividad de la enzima (Taylor *et al.*, 1993; Hanks y Hunter, 1995; Hanks, 2003). Entre ellos destacan tres residuos esenciales para la funcionalidad de la quinasa: el residuo de lisina del subdominio II de unión al ATP (Iyer *et al.*, 2005), el residuo de aspártico catalítico del subdominio VIb, que cataliza la fosforilación del sustrato (Kannan y Neuwald, 2005) y, finalmente, otro residuo de aspártico en el subdominio VII que coordina iones  $Mg^{2+}$  esenciales para la reacción (Taylor *et al.*, 1993).

El dominio catalítico de las quinasa de tipo eucariota presenta un plegamiento bilobular con una región N-terminal pequeña, formada principalmente por láminas  $\beta$ , y una región C-terminal de mayor tamaño plegada, constituida fundamentalmente por hélices  $\alpha$ . Entre ambos lóbulos aparece una profunda cavidad donde se sitúa el centro activo con el sitio de unión al sustrato y al ATP, hacia donde se dirigen todos los residuos necesarios para la actividad de la enzima. Frente al centro activo se localiza el segmento de activación, que contiene uno o varios residuos aceptores cuya fosforilación es clave para estimular la actividad de la quinasa (Young *et al.*, 2003).

Las rutas de señalización basadas en quinasa de tipo eucariota se activan generalmente a partir de una quinasa receptora de membrana. Esta proteína detecta el estímulo mediante la unión de un ligando específico a través de la región sensora extracelular, lo que a su vez estimula la actividad de la propia quinasa mediante autofosforilación. A partir del receptor se desencadena una cascada de quinasa activadas de forma jerárquica mediante fosforilación en serie dentro de la misma ruta. Finalmente, la última de estas quinasa fosforila a una proteína efectora, que en muchos casos es un regulador transcripcional, capaz de generar una respuesta apropiada frente al estímulo recibido (Hendrickson, 2006).

El control de las rutas en las que intervienen quinasa suele ser muy complejo, dependiendo de uno o varios mecanismos reguladores específicos, entre los que se encuentran la fosforilación de la propia quinasa (Nolen *et al.*, 2004), la interacción con proteínas activadoras e inhibidoras (Shi *et al.*, 2006) e incluso, en ocasiones, la respuesta frente a segundos mensajeros (Schenk y Snaar-Jagalska, 1999).

El número de quinasa de muchas bacterias es bastante considerable, de forma que las rutas de señalización basadas en este tipo de proteínas parecen tener una relevancia notable para la transducción de señales en estos microorganismos. Entre los grupos bacterianos con un número elevado de quinasa destacan mixobacterias, actinobacterias, cianobacterias, chloroflexi, planctomicetos y acidobacterias. Todos estos microorganismos presentan un genoma de tamaño considerable y comparten comportamiento multicelular asociado a procesos de diferenciación y comunicación intercelular, junto con metabolismo secundario muy activo (Pérez *et al.*, 2008).

### A.VIII.3.1. Quinasas de tipo eucariota en *M. xanthus*

*M. xanthus* es la bacteria que posee un número más elevado de quinasas caracterizadas con un total de 11. Estas proteínas están implicadas en metabolismo, desarrollo y movilidad de esta mixobacteria. A continuación, se detallan las principales características de cada una de ellas:

#### A.VIII.3.1.1. Pkn1

Pkn1 es la primera quinasa descrita en una bacteria (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991). El gen que codifica esta proteína se expresa sólo durante el ciclo de desarrollo, alcanzando un máximo de expresión en el momento de diferenciación de las mixósporas de *M. xanthus*. La delección del gen *pkn1* origina un desarrollo prematuro de la cepa mutante, con un descenso en la producción de esporas, ejerciendo por tanto un papel clave en la diferenciación celular durante el desarrollo (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991).

#### A.VIII.3.1.2. Pkn2

Se trata de una Ser/Thr quinasa de membrana dispuesta en la superficie celular que actúa como receptor. El gen *pkn2* tan sólo se expresa durante el crecimiento vegetativo, alcanzado un máximo al comienzo de la fase estacionaria. No obstante, los mutantes de delección para el gen *pkn2* no muestran un fenotipo diferente durante el crecimiento vegetativo, mientras que en el ciclo de desarrollo manifiestan una agregación prematura originando cuerpos fructificantes poco empaquetados que producen un número reducido de mixósporas que, no obstante, germinan al mismo nivel que las mixósporas silvestres (Udo *et al.*, 1995).

La expresión de esta proteína en *E. coli* ha permitido identificar dos sustratos para esta quinasa, la  $\beta$ -lactamasa y la proteína HU (Udo *et al.*, 1995; Udo *et al.*, 2000).

#### A.VIII.3.1.3. Pkn4

Esta quinasa asociada a membrana participa en el control del metabolismo, regulando la actividad de la enzima fosfofructoquinasa (PFK) (Nariya e Inouye, 2003). PFK es una enzima glucolítica que cataliza la fosforilación de fructosa 6-fosfato para generar fructosa 1,6-bisfosfato (Evans *et al.*, 1981). En *M. xanthus* Pkn4 activa la enzima PFK mediante la fosforilación de un residuo de treonina situado en el sitio alostérico de la proteína (Nariya e Inouye, 2002).

Pkn4, junto con PFK, se encuentran implicadas en el metabolismo del glucógeno, un polímero de glucosa empleado como reserva de energía y carbono. Ambas proteínas son esenciales para el consumo del glucógeno de reserva durante el desarrollo, puesto que una cepa mutante para *pfk-pkn4* acumula más glucógeno que la cepa silvestre, pero es incapaz de consumirlo a medida que progresa el desarrollo (Nariya e Inouye, 2003).

#### **A.VIII.3.1.4. Pkn5 y Pkn6**

Ambas Ser/Thr quinasas ejercen un efecto opuesto durante el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*. Los genes *pkn5* y *pkn6* se disponen en el genoma adyacentes con orientación divergente compartiendo una misma región promotora, lo que sugiere una regulación coordinada de la expresión de ambos. Estos genes se expresan a niveles muy bajos durante el crecimiento vegetativo, incrementando de forma considerable su expresión al comienzo del desarrollo. El fenotipo mostrado durante el desarrollo por cada una de las cepas de delección indica que Pkn5 y Pkn6 desempeñan un papel regulador opuesto en el control del ciclo de desarrollo de *M. xanthus*, de forma que Pkn5 se encarga de reprimir el inicio del desarrollo, mientras que Pkn6 estimula la progresión hacia el desarrollo en condiciones de inanición (Zhang *et al.*, 1996a).

#### **A.VIII.3.1.5. Pkn8 y Pkn14**

Estas proteínas se encuentran relacionadas a nivel funcional en una misma ruta de señalización celular, formando una cascada de quinasas que regula de forma esencial el ciclo de vida de *M. xanthus*. Ambos componentes del sistema interactúan mediante fosforilación de forma que, en respuesta a una señal adecuada, la quinasa receptora Pkn8 fosforila en residuos de treonina a Pkn14 soluble. Pkn14 activada a su vez fosforila dos residuos de treonina del extremo N-terminal del activador transcripcional MrpC, un regulador positivo de *fruA* (Nariya e Inouye, 2005; Nariya e Inouye, 2006).

Durante el crecimiento vegetativo, la ruta de quinasas Pkn8-Pkn14 reprime la expresión de los genes *mrpC* y *fruA*, evitando el inicio del ciclo de desarrollo, una vez que la fosforilación de MrpC reduce notablemente su afinidad de unión al ADN (Nariya e Inouye, 2006). Durante el ciclo de desarrollo el regulador MrpC es procesado mediante proteólisis dando lugar a la forma MrpC2. 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, ya que carece de sitios de fosforilación (Nariya e Inouye, 2006).

#### **A.VIII.3.1.6. Pkn9**

El gen que codifica esta quinasa de membrana se expresa de forma moderada durante la fase de crecimiento exponencial, pero sus niveles de expresión se incrementan de forma apreciable durante la fase estacionaria y al comienzo del desarrollo. La delección de este gen produce un acusado retraso en el proceso de fructificación, reducción en la producción de esporas e, igualmente, una reducción en la expresión de los genes codificantes de las proteínas de membrana KREP9-(1-4) (Hanlon *et al.*, 1997).

#### **A.VIII.3.1.7. MasK**

Esta tirosina quinasa de membrana controla la movilidad de *M. xanthus* a través de la interacción con el modulador MglA (Thomasson *et al.*, 2002). MglA es necesaria para coordinar la movilidad social y aventurera, interviniendo en la reversión del sentido de movimiento en ambos sistemas (Hartzell y Kaiser, 1991a; Hartzell y Kaiser,

1991b). La actividad catalítica de 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 regular la movilidad de *M. xanthus* (Thomasson *et al.*, 2002).

#### A.VIII.3.1.8. PknD1 y PknD2

Las Ser/Thr quinasas PknD1 y PknD2 están relacionadas funcionalmente con las proteínas EspAB, implicadas en la regulación de la progresión de los distintos eventos del desarrollo (Cho y Zusman, 1999b). En el genoma, los genes que codifican estas quinasas flanquean a *espAB* y, además, tanto PknD1 como PknD2 son capaces de interaccionar con la histidina quinasa sensora EspA durante el desarrollo (Stein *et al.*, 2006). Finalmente, los mutantes sencillos para *pknD1* y *pknD2* presentan alteraciones considerables durante la fructificación y la esporulación, exhibiendo un fenotipo similar al mutante para *espB* (Cho y Zusman, 1999b; Stein *et al.*, 2006).

### A.VIII.4. Fosfatasas de tipo eucariota

Las fosfatasas de tipo eucariota ejercen un papel inverso al de las proteínas quinasa de tipo eucariota en la transducción de señales. Estas proteínas catalizan la desfosforilación de sustratos proteicos mediante la eliminación del grupo fosfato incorporado a residuos de serina, treonina o tirosina, previamente fosforilados por una quinasa, o bien pueden actuar desfosforilando a la propia quinasa (Shi *et al.*, 1998).

#### A.VIII.4.1. Descubrimiento, distribución y origen de las fosfatasas

El primer indicio de la existencia de proteínas fosfatasas similares a las de eucariotas en otros organismos fue proporcionado por el descubrimiento de las Ser/Thr fosfatasas codificadas por los bacteriófagos  $\lambda$  y  $\Phi 80$  (Cohen *et al.*, 1988; Cohen y Cohen, 1989). Poco después, se descubrió la tirosina fosfatasa YopH codificada por el plásmido de virulencia presente en las cepas patógenas de *Yersinia* (Guan y Dixon, 1990).

Las siguientes investigaciones ampliaron el número de organismos procariontes en los que se identificaron fosfatasas de tipo eucariota. De esta manera, se determinó la presencia de la fosfatasa IphP en *Nostoc commune* UTEX584 (Potts *et al.*, 1993) y, posteriormente, de las fosfatasas SpoIIE de *Bacillus subtilis* (Duncan *et al.*, 1995) y PtpA de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Li y Strohl, 1996). Con el descubrimiento de la fosfatasa PP1-arch1 en *Sulfolobus sulfataricus* se puso de manifiesto la presencia de proteínas fosfatasas en arqueas (Leng *et al.*, 1995).

La publicación de la secuencia completa del genoma de la bacteria *Haemophilus influenzae* en 1995 marcó el comienzo de lo que se ha convertido en una avalancha virtual de información de secuencias. A medida que se secuenciaban nuevos genomas se comenzó a rastrear la distribución de ORFs que codifican proteínas quinasas y fosfatasas en todo el espectro filogenético (Shi *et al.*, 1998; Leonard *et al.*, 1998; Ponting *et al.*, 1999). No obstante, no todos los procariontes poseen proteínas fosfatasas. Por ejemplo, la arquea *Thermoplasma acidophilum* y las bacterias *Buchnera* sp. y *Rickettsia prowazekii*, carecen de ORFs que codifiquen fosfatasas de algún tipo (Kennelly, 2002).



## Introducción

En procariotas no existe correlación entre el número de fosfatasa y quinasas presentes en un organismo. Ejemplos de ello son *Caulobacter crescentus* y *Xylella fastidiosa* que no poseen ORFs que codifiquen quinasas, pero sí múltiples ORFs para fosfatasas homólogas a las eucariotas (Kennelly, 2002).

Mientras que prácticamente todos los organismos eucariotas estudiados hasta el momento cuentan con fosfatasas pertenecientes a tres superfamilias, denominadas PPP, PPM y PTP (ver A.VIII.4.2.), para prestar servicio a su gran y diversa población de fosfoproteínas, la mayoría de los procariotas sólo contienen un número reducido de estas proteínas, a veces tan sólo una o dos fosfatasas (Shi *et al.*, 1998). El análisis de los genomas secuenciados sugiere que la distribución de fosfatasas entre los procariotas ha ocurrido al azar, ya que no hay un solo tipo de proteína fosfatasa común a todos los procariotas, ni en bacterias ni en arqueas. Por el contrario, parece que los prototipos han sido tratados como unidades relativamente intercambiables que pueden adaptarse para satisfacer las necesidades de cada organismo (Kennelly y Potts, 1999).

La distribución en mosaico de las fosfatasas pertenecientes a las 3 superfamilias PPP, PPM y PTP, puesta de manifiesto por análisis filogenéticos, indica que las redes de fosforilación de proteínas de los procariotas contemporáneos han sido moldeadas por la interacción de múltiples fuerzas, que incluyen: i) herencia a partir de un antecesor común (un proceso amplificado por duplicación génica), ii) reducción evolutiva a través de la eliminación de genes y, iii) proliferación mediante transferencia horizontal de genes (Kennelly, 2002).

Las fosfatasas pertenecientes a la superfamilia PPM parecen ser de antigüedad intermedia. La escasez de este tipo de fosfatasas en arqueas sugiere que el progenitor de esta superfamilia se originó después de la aparición del dominio *Archaea*. Análisis filogenéticos sugieren que las fosfatasas pertenecientes a la superfamilia PPM surgieron en los primeros eucariotas y, posteriormente, fueron exportadas a las bacterias a través de transferencia horizontal de genes (Ponting *et al.*, 1999). Presumiblemente, la única fosfatasa de tipo PPM encontrada hasta el momento en arqueas fue adquirida a partir de una bacteria mediante transferencia horizontal de genes.

Los análisis de fosfatasas pertenecientes a la superfamilia PPP indican que surgieron con anterioridad a la divergencia de los tres dominios filogenéticos y, por tanto, son las fosfatasas más antiguas (Shi *et al.*, 1999b). El alto grado de identidad de secuencia compartida entre los miembros de la superfamilia PPP de arqueas y eucariotas indica que el inmediato antecesor de estas proteínas se había convertido en una Ser/Thr fosfatasa especializada antes de la divergencia de los dos dominios (Leng *et al.*, 1995).

### A.VIII.4.2. Características generales de las fosfatasas de procariotas

Las proteínas fosfatasas de eucariotas pertenecen a tres superfamilias, denominadas PPP (fosfoproteína fosfatasa), PPM (proteína fosfatasa dependiente de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ ) y PTP (proteína tirosina fosfatasa), que se diferencian en secuencia, sensibilidad frente a inhibidores, requerimientos metálicos y homología genética, entre otros aspectos (Cohen, 1989; Barford *et al.*, 1998; Jackson y Denu, 2001). Las superfamilias PPP y PPM incluyen Ser/Thr fosfatasas (Das *et al.*, 1998; Jackson y Denu, 2001), ya que hidrolizan específicamente fosfoésteres de serina/treonina. Por su

parte, la superfamilia PTP alberga tirosina fosfatasas. En esta superfamilia se diferencian tres familias de fosfatasas: LMMPTP (tirosina fosfatasa de bajo peso molecular), CPTP (tirosina fosfatasa convencional), dentro de las cuales se incluyen fosfatasas específicas de tirosina y con especificidad dual, y Cdc25 (Barford, 1996; Denu *et al.*, 1996b; Fauman *et al.*, 1996; Barford *et al.*, 1998). Los procariotas carecen de la familia Cdc25, un conjunto de proteínas altamente especializadas dedicadas al control del ciclo celular en eucariotas (Nilsson y Hoffmann, 2000). Por otro lado, en procariotas se ha descrito una nueva superfamilia de tirosina fosfatasa, denominada PHP (polimerasa e histidinol fosfatasa) cuyos miembros se han identificado principalmente en bacterias Gram positivas (Morona *et al.*, 2002).

Todas las fosfatasas de procariotas pertenecientes a la superfamilia PPP requieren la adición de metales exógenos para su actividad, sobre todo  $Mn^{2+}$  (Missiakas y Raina, 1997), salvo la fosfatasa SynPPP1 de *Synechocystis* sp PCC6803 que se comporta como sus homólogos eucariotas (Renhui *et al.*, 2005). Las fosfatasas de tipo PPP eucariotas también son metaloenzimas (Chu *et al.*, 1996), pero unen los iones metálicos con la suficiente tenacidad como para que no sea necesaria su adición. Por otro lado, todos los miembros procariotas y eucariotas de la superfamilia PPM requieren la adición de metales divalentes, por lo general  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ , para su actividad (Shi *et al.*, 1998). Por el contrario, las tirosina fosfatasas eucariotas y procariotas no requieren iones metálicos para su actividad, salvo las tirosina fosfatasas de la superfamilia PHP que son dependientes de  $Mn^{2+}$  (Morona *et al.*, 2002).

Los miembros eucariotas de las superfamilias PPP y PPM se consideran, casi exclusivamente, específicos de residuos fosforilados en serina y treonina (Shenolikar, 1994), los de la familia LMMPTP son específicos de tirosina (Ramponi y Stefani, 1997), mientras que sólo la familia CPTP incluye algunas enzimas con especificidad dual (Guan *et al.*, 1991; Millar y Russell, 1992; Dunphy, 1994; Taylor *et al.*, 1997). Por tanto, estas enzimas fosfatasas de eucariotas se caracterizan por una gran especificidad de sustrato. Por el contrario, la capacidad catalítica de las fosfatasas de procariotas caracterizadas indica una frecuencia mucho mayor de especificidad dual y, tal vez, incluso multifuncional. Esta característica está más extendida entre las fosfatasas pertenecientes a la superfamilia PPP, ya que casi todas las fosfatasas pertenecientes a esta superfamilia descritas en procariotas exhiben actividad hacia residuos de fosfotirosina y fosfohistidina, además de su actividad Ser/Thr fosfatasa característica (Zhuo *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1999b).

La menor especificidad por el sustrato de las fosfatasas de procariotas, unido a que un sólo tipo de actividad fosfatasa puede resultar suficiente para contrarrestar el limitado espectro de actividades de fosfotransferencia presentes en estos organismos, pueden ser las razones por las que el número de quinasas presentes en procariotas suele ser superior al de fosfatasas (Kennelly, 2002).

### **A.VIII.4.3. Superfamilia PPP**

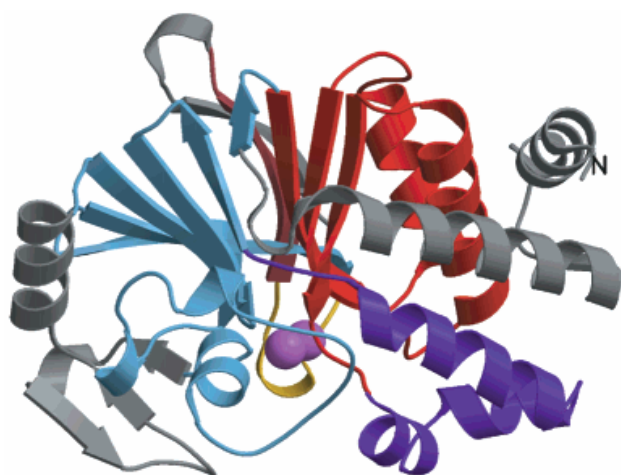
#### **A.VIII.4.3.1. Estructura**

La superfamilia PPP de proteínas fosfatasas representa cuantitativamente la fuente más importante de actividad Ser/Thr fosfatasa en eucariotas superiores (Cohen, 1991; Olsen *et al.*, 2006). Los miembros de esta superfamilia presentan un dominio

## Introducción

catalítico de, aproximadamente 35 kDa, que cubre una región de unos 220 aminoácidos y se caracteriza por la presencia y espaciamiento de los motivos conservados GDXHG(X)<sub>25-30</sub>GDXXDRG(X)<sub>25-30</sub>GNHE/D (Barton *et al.*, 1994; Zhuo *et al.*, 1994). En algunas fosfatasas de eucariotas este dominio está contenido en una subunidad catalítica cuya localización y actividad está modulada por la unión de subunidades de orientación y regulación importantes para las funciones biológicas de estas proteínas (Hubbard y Cohen, 1993; Mumby y Walter, 1993; Shenolikar, 1994). Además de en Ser/Thr fosfatasas de la superfamilia PPP, este dominio catalítico también aparece en nucleotidasas, esfingomielina fosfodiesterasas, 2'-3' AMPc fosfodiesterasas y nucleasas (Aravind y Koonin, 1998), lo que dificulta su identificación mediante técnicas bioinformáticas.

Los miembros procariotas de la superfamilia PPP pueden ser expresados como monómeros activos de aproximadamente 25-35 kDa, semejantes a la subunidad catalítica de las fosfatasas de eucariotas, pero a diferencia de ellas, no existen pruebas de la existencia de subunidades reguladoras o de orientación (Leng *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1998). Además, entre las fosfatasas de tipo PPP de procariotas se pueden encontrar sustituciones conservadas y no conservadas en la secuencia de los tres motivos característicos de esta superfamilia que pueden afectar seriamente a su actividad catalítica (Shi *et al.*, 1998).



**Figura 3.** Estructura de la fosfatasa PP1 de conejo y  $\lambda$ PP del fago  $\lambda$  pertenecientes a la superfamilia PPP. Los elementos coloreados en gris no están presentes en  $\lambda$ PP (Voegtli *et al.*, 2000).

El dominio catalítico plegado de las fosfatasas PPP de eucariotas consiste en un sándwich central formado por 2 láminas, constituidas por 5 y 6 hojas  $\beta$  cada una, rodeado por un lado de 7 hélices  $\alpha$  y por el otro de un subdominio que comprende 3 hélices  $\alpha$  y 3 hojas  $\beta$  (Fig. 3). La zona de contacto de las tres hojas  $\beta$  en la parte superior del sándwich crea un canal poco profundo que constituye el sitio catalítico. Los aminoácidos presentes en los bucles que parten de este sándwich se encargan de coordinar un par de iones metálicos formando un centro metálico dinuclear (Barford *et al.*, 1998). Los iones metálicos que unen el centro activo pueden ser  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$  (King y Huang, 1984; Egloff *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1995).

La estructura general de la única fosfatasa no perteneciente a eucariotas cuya estructura se ha determinado hasta el momento corresponde a la fosfatasa  $\lambda$ PP del fago  $\lambda$ . El plegamiento de  $\lambda$ PP se conserva en sus equivalentes eucariotas. Sin embargo,  $\lambda$ PP carece de los 50 residuos N-terminales de las fosfatasas de eucariotas, así como del

subdominio adicional formado por 3 hojas  $\beta$  y 3 hélices  $\alpha$  (Egloff *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1995). Además, también carece de una de las 5 hojas  $\beta$  que conforman una de las láminas del sándwich  $\beta$  central de las proteínas PPP de eucariotas (Fig. 3) (Voegtli *et al.*, 2000). Al igual que las fosfatasa PPP de eucariotas, la fosfatasa  $\lambda$ PP une en su centro activo dos iones metálicos necesarios para su actividad (Rusnak *et al.*, 1996; Voegtli *et al.*, 2000).

#### A.VIII.4.3.2. Mecanismo catalítico y regulación de la actividad fosfatasa

La mayoría de los residuos conservados que forman parte de los tres motivos característicos de la superfamilia PPP están implicados en la unión de metales y/o en la actividad fosfatasa (Zhuo *et al.*, 1994; Shi, 2004).

En estas fosfatasa el grupo fosfato del sustrato se une directamente a los iones metálicos a través del oxígeno de los residuos fosforilados y la desfosforilación ocurre en un único paso (Jackson y Denu, 2001). Durante la reacción, una molécula de agua activada por metal actúa como nucleófilo para atacar al átomo de fósforo. La función de los iones metálicos en la catálisis es, por un lado, actuar como ácido Lewis para aumentar la nucleofilicidad de la molécula de agua activada por metal y, por otra parte, intensificar la electrofilicidad del átomo de fósforo. La cadena lateral del residuo de histidina conservado del motivo III colabora en la reacción mediante la donación de un protón al oxígeno del grupo fosfato unido a los residuos de serina/treonina fosforilados (Barford, 1996; Barford *et al.*, 1998; Shi, 2004).

Los residuos de arginina conservados están relacionados con la estabilización del sustrato en el sitio activo (Zhuo *et al.*, 1994; Egloff *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1995; Griffith *et al.*, 1995; Kissinger *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996b; Huang *et al.*, 1997; Mondragon *et al.*, 1997), así como en el reconocimiento y posicionamiento del mismo para la hidrólisis (Voegtli *et al.*, 2000; Jackson y Denu, 2001).

No se conocen con exactitud los mecanismos de regulación de la actividad fosfatasa de estas proteínas, habiéndose propuesto la oxidación del centro metálico dinuclear, como consecuencia de cambios en el potencial redox durante estrés oxidativo, como uno de ellos (Wang *et al.*, 1996).

La inhibición de las fosfatasa PPP de eucariotas por microcistina LR y otros inhibidores tales como el ácido ocadaico, caliculina A, tautomiocina y motuporina (Kissinger *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996b), ocurre por la interacción de los inhibidores con un bucle determinado de la fosfatasa (Barford *et al.*, 1998) que bloquea la unión directa de los sustratos (Bagu *et al.*, 1995). Diferencias en la estructura de dicho bucle son responsables de la resistencia a esos inhibidores por parte de algunas fosfatasa de tipo PPP de procariotas (Zhuo *et al.*, 1993).

#### A.VIII.4.3.3. Dominios adicionales

La variedad y especificidad de sustrato de las fosfatasa eucariotas pertenecientes a esta superfamilia se logra principalmente a través de la asociación con subunidades de regulación y orientación que controlan, temporal y espacialmente, la actividad catalítica, en lugar de a través de la discriminación en el sitio activo (Hubbard y Cohen, 1993; Gallego y Virshup, 2005). En algunos casos, los dominios auxiliares se

## Introducción

fusionan directamente al dominio fosfatasa. De esta manera, algunas fosfatasas contienen tres dominios de repeticiones de tetratricopéptidos (Chen *et al.*, 1994), fusionados al extremo N-terminal del dominio fosfatasa e implicados en la interacción proteína-proteína y en la regulación de la actividad fosfatasa de la proteína (Chen y Cohen, 1997). También aparecen dominios FHA (Tabla 3) dentro de la cadena polipeptídica de estas fosfatasas que están implicados en el reconocimiento de residuos de fosfotreonina (Hofmann y Bucher, 1995; Durocher *et al.*, 2000; Pallen *et al.*, 2002). Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones los dominios auxiliares se incorporan en forma de subunidades disociables. Este es el caso de algunas fosfatasas de eucariotas que poseen una gran variedad de subunidades auxiliares que les permiten adoptar gran cantidad de isoformas catalíticas conservadas (Kennelly, 2001).

No está claro si las fosfatasas de procariontes miembros de esta superfamilia poseen subunidades reguladoras funcionalmente similares a las de eucariotas (Shi, 2004). De este modo, las fosfatasas de procariontes podrían reconocer sus sustratos y ejercer su función a través de dominios auxiliares presentes en la misma cadena polipeptídica, pero la mayoría de estas proteínas poseen sólo el dominio fosfatasa (Bhaduri y Sowdhamini, 2005).

**Tabla 3.** Nombre, definición y Pfam de los dominios presentes en diferentes fosfatasas multidominio de organismos procariontes y eucariotas.

<b>Dominio</b>	<b>Definición</b>	<b>PFAM</b>
ARM	Repeticiones de tipo armadillo/ $\beta$ -catenina	PF00514
FHA	Dominio de unión a fosfotreonina	PF00498
GPA	Dominio de anclaje a bacterias Gram positivas	PF00746
HAMP	Dominio común a histidina quinasa, adenilato ciclasas, proteínas que unen grupos metilos y fosfatasas	PF00672
HTH	Hélice-giro-hélice	PF01381
LacAB	Subunidades A/B de galactosa isomerasa	PF02502
LysM	Motivo de lisina	PF01476
NMD3	Dominio de descomposición de ARNm sin sentido	PF04981
5' nucleotidasa	Dominio C-terminal 5' nucleotidasa	PF02872
PAP2	Fosfatasa tipo 2 de ácido fosfatídico	PF01569
PAS	Dominio común a proteínas del período circadiano	PF00989
RTX	Dominio N-terminal de toxinas bacterianas RTX	PF02382
SBTrans	Transportador simporter sodio/ácido biliar	PF01758
SH2	Dominio 2 homólogo a Src	PF00017
SH3	Dominio 3 homólogo a Src	PF00018
SNasa	Nucleasa homóloga a la estafilococal	PF00565
TRAM	ARNt metil transferasa asociada a membrana	PF01938

Entre los dominios presentes en las proteínas fosfatasas de tipo PPP de procariontes, en conjunción con el dominio fosfatasa característico PPP, aparecen dominios con afinidad hacia ácidos nucleicos como los dominios 5' nucleotidasa, SNasa, TRAM, LysM y GPA (Tabla 3), haciendo que la proteína pueda reconocer sustratos no proteicos y desfosforilarlos (Bhaduri y Sowdhamini, 2005). Las fosfatasas de tipo PPP también presentan dominios que les sirven de guía dentro de las rutas de señalización en las que intervienen. Este es el caso de los dominios ARM y SH3 (Tabla 3). Este último se une selectivamente a regiones ricas en prolina y sólo coexiste en fosfatasas de procariontes (Bhaduri y Sowdhamini, 2005).

Las fosfatasa de la superfamilia PPP también aparecen asociadas a dominios que contribuyen a su estimulación como son los dominios laminina G, de manera que la reacción de desfosforilación se inicia por estímulos externos. Así mismo, la función de los dominios fosfatasa de tipo PPP puede ser estimulada por dominios RTX (Tabla 3), que aparecen en toxinas citolíticas y son importantes factores de virulencia. También existen casos en los que el dominio fosfatasa se encuentra asociado a dominios quinasa o a varios dominios fosfatasa de la misma o diferente superfamilia (Bhaduri y Sowdhamini, 2005).

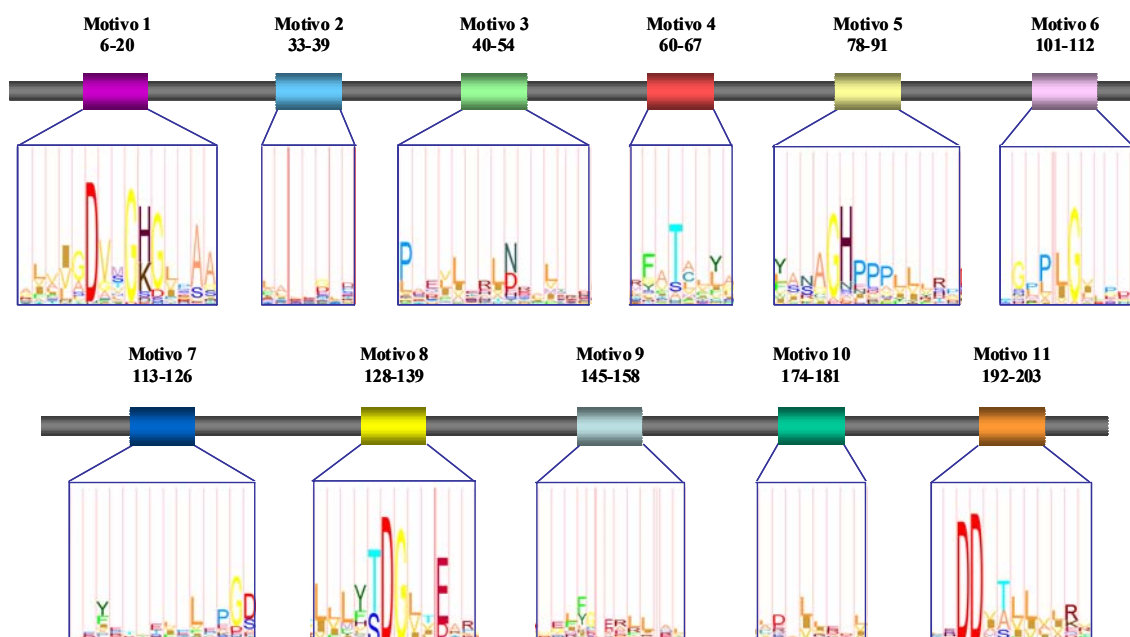
#### A.VIII.4.4. Superfamilia PPM

##### A.VIII.4.4.1. Estructura

Esta superfamilia de proteínas fosfatasa incluye a las familias PP2C y SpoIIE (Bork *et al.*, 1996; Das *et al.*, 1998).

A diferencia de los miembros eucariotas de la superfamilia PPP, las fosfatasa de tipo PPM no se han identificado en asociación con subunidades reguladoras o de orientación (Jackson y Denu, 2001).

El dominio catalítico de estas proteínas abarca una región de aproximadamente 290 residuos (Das *et al.*, 1998) en la que se diferencian 11 motivos (Bork *et al.*, 1996), que contienen 8 residuos absolutamente conservados (Fig. 4). Estos aminoácidos son los residuos de aspártico de los motivos 1 y 2, treonina del motivo 4, glicina de los motivos 5 y 6, aspártico y glicina del motivo 8 y aspártico del motivo 11 (Shi *et al.*, 1998). La mayoría de estos residuos se encuentran representados en el logo perteneciente a esta superfamilia de fosfatasa (Fig. 4).



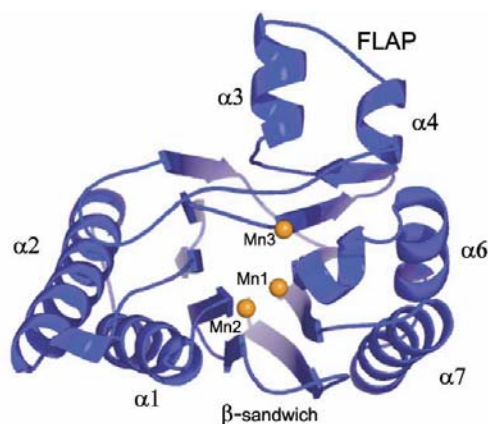
**Figura 4.** Distribución de los motivos conservados de las fosfatasa PPM (PP2C: Pfam PF00481 y SpoIIE: Pfam07228). Los motivos se han representado como HMM Logos utilizando fosfatasa descritas en procariontes (Schuster-Boeckler *et al.*, 2004). No se muestran los submotivos 5a y 5b ausentes en la mayoría de las fosfatasa de eucariotas.

## Introducción

Las principales variaciones en la secuencia establecida para los miembros procariontes de esta superfamilia se refieren a la ausencia de los submotivos 5a y 5b en la mayoría de los casos y a sustituciones conservadas funcionalmente, aunque también se han encontrado fosfatasa de procariontes con sustituciones no conservadas y, en casos más extremos la ausencia de parte del motivo 6, incluyendo el residuo invariable de glicina, y de todo el motivo 7 (Shi *et al.*, 1998).

A pesar de que las fosfatasa pertenecientes a la superfamilia PPM no comparten similitud de secuencia con los miembros de la superfamilia PPP, la estructura de ambas es sorprendentemente similar (Das *et al.*, 1998) (Fig.4). Pero las fosfatasa de tipo PPM requieren la adición de iones  $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  para su actividad, que unen al centro activo antes de que se produzca la unión del sustrato fosforilado, constituyendo un centro metálico dinuclear (Egloff *et al.*, 1995; Goldberg *et al.*, 1995; Griffith *et al.*, 1995; Kissinger *et al.*, 1995; Fjeld y Denu, 1999).

El núcleo de la estructura secundaria y su topología se conserva en los dominios catalíticos de las fosfatasa procariontes pertenecientes a esta superfamilia, pero en algunas de las proteínas procariontes cristalizadas se han observado importantes diferencias en el tamaño e incluso, en ocasiones, la ausencia de alguno de los elementos estructurales (Fig. 5) (Das *et al.*, 1998; Pullen *et al.*, 2004). El centro metálico dinuclear del sitio activo también se conserva, pero a diferencia de las fosfatasa de eucariotas, las bacterianas contienen un tercer ión metálico en el centro activo (Fig. 5) (Pullen *et al.*, 2004). Los tres iones metálicos pueden ser  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ , así como  $Ca^{2+}$  (Rantanen *et al.*, 2007).



### A.VIII.4.4.2. Mecanismo catalítico y regulación de la actividad fosfatasa

La similitud estructural entre los dominios catalíticos de las fosfatasa pertenecientes a las superfamilias PPM y PPP determina que posean un mecanismo catalítico similar (Barford, 1996; Barford *et al.*, 1998).

Las fosfatasa de tipo PPM, de forma general, unen el sustrato indirectamente a través de la interacción, mediante puentes de hidrógeno, entre el grupo fosfato y las moléculas de agua unidas a los iones metálicos. Una vez unidos los iones metálicos y el sustrato, estas enzimas eliminan el grupo fosfato del sustrato mediante una reacción similar a la llevada a cabo por las fosfatasa pertenecientes a la superfamilia PPP (Das *et al.*, 1998; Jackson y Denu, 2001; Jackson *et al.*, 2003).

La actividad enzimática de las fosfatasa pertenecientes a la superfamilia PPM de eucariotas puede estar regulada por fosforilación (Jackson y Denu, 2001) y mediante potencial redox. Este último sistema de regulación es más eficaz y específico que el primero, siendo la identidad de los iones presentes en el centro metálico dinuclear clave para llevar a cabo este proceso (Pato y Kerc, 1991). En procariontes, la unión del tercer metal en el sitio activo colabora en la regulación de la actividad enzimática de las fosfatasa de tipo PPM (Pullen *et al.*, 2004).

#### A.VIII.4.4.3. Dominios adicionales

Algunas de las fosfatasa de eucariotas y procariontes pertenecientes a esta superfamilia poseen dominios adicionales en la misma cadena polipeptídica. Este es el caso de las proteínas Kapp y ABI1 de *Arabidopsis*. La primera posee una región N-terminal transmembrana, un dominio de interacción con quinasa y un dominio C-terminal con actividad fosfatasa, mientras que ABI1 posee un dominio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  cerca de su extremo N-terminal, junto con el dominio fosfatasa (Shi, 2004).

En muchos microorganismos el dominio catalítico de las fosfatasa de tipo PPM se encuentra formando parte de polipéptidos quimera que incluyen otros dominios implicados en la transducción de señales (Zhuo *et al.*, 1993). Entre ellos destacan los dominios adenilato ciclasa, quinasa, SciT (implicado en la interacción de proteínas), HAMP, HTH y NMD3 (que regulan el estado de fosforilación de factores de transcripción), así como dominios PAS (implicados en la detección de cambios en el potencial redox intracelular) (Tabla 3) (Shi, 2004; Bhaduri y Sowdhamini, 2005).

#### A.VIII.4.5. Superfamilia PTP

##### A.VIII.4.5.1 Estructura

Las tres familias de tirosina fosfatasa de eucariotas comparten un motivo en el sitio activo caracterizado por la secuencia  $\text{C(X)}_5\text{R}$ . Las familias CPTP y LMMPTP comparten, además, un residuo de aspártico conservado implicado en la catálisis (Taddei *et al.*, 1994; Denu y Dixon, 1995; Jackson y Denu, 2001). Por su parte, la familia Cdc25 se distingue por la presencia de residuos glicina-prolina a continuación del residuo de arginina conservado del motivo (Strausfeld *et al.*, 1991; Kennelly y Potts, 1999).

En procariontes únicamente se han identificado tirosina fosfatasa pertenecientes a las familias CPTP y LMMPTP que comparten la presencia del motivo conservado  $\text{C(X)}_5\text{R}$  en el sitio activo (Kennelly y Potts, 1999). Sin embargo, ambas familias difieren en puntos importantes tales como (Shi *et al.*, 1998): i) la secuencia consenso del sitio activo, ii) el número de aminoácidos entre el residuo de aspártico y el motivo del sitio activo, iii) la localización relativa del motivo del sitio activo respecto al residuo de aspártico conservado, como se refleja en la secuencia de las proteínas de la familia CPTP  $\text{D}_{24-41}\text{HCXXGXXR(S/T)}$  donde el motivo  $\text{C(X)}_5\text{R}$  se encuentra en el centro del dominio catalítico, mientras que en las fosfatasa de tipo LMMPTP se trata de la secuencia  $\text{LFVCLGNICRSP}_{79-104}\text{DIEDPY}$  donde el mismo motivo se localiza muy cerca del extremo N-terminal del dominio catalítico, y iv) el tamaño del dominio catalítico, siendo de alrededor de 250 aminoácidos en los miembros de la familia CPTP, mientras que el de los representantes de la familia LMMPTP es significativamente más



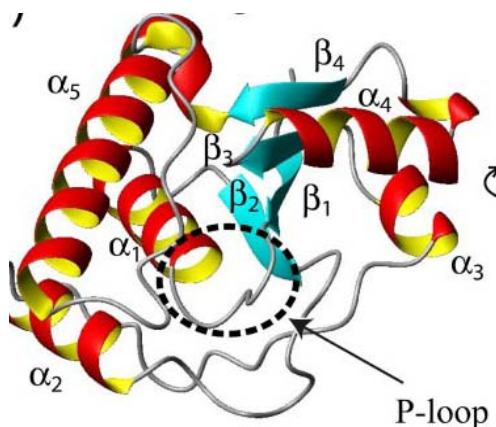
## Introducción

pequeño, estando constituido por 140 aminoácidos o menos (Shi *et al.*, 1998; Cozzone *et al.*, 2004).

La secuencia global y la estructura de las tirosina fosfatasas varía mucho de una familia a otra. A pesar de ello, las fosfatasas pertenecientes a la superfamilia PTP comparten un dominio catalítico central formado por 4 hojas  $\beta$  paralelas rodeadas por hélices  $\alpha$ , en el caso concreto de la proteína Wzb de *E. coli*, 3 por un lado y 2 por el lado opuesto (Fig. 6). En esta estructura se distinguen tres bucles esenciales: el bucle P que alberga la cisteína catalítica del motivo conservado del sitio activo, el bucle WPD que contiene residuos importantes para la catálisis, así como el residuo de aspártico conservado, y el bucle Q implicado en el reconocimiento de fosfotirosina (Barford *et al.* 1998; Jackson y Denu, 2001; Lescop *et al.*, 2006; Grundner *et al.*, 2007).

Las fosfatasas pertenecientes a la familia CPTP con especificidad dual comparten la misma estructura general, pero tienen sólo una de las hojas  $\beta$  antiparalelas flanqueantes. Las hojas  $\beta$  ausentes son reemplazadas por una o dos hélices  $\alpha$  cortas. También carecen del bucle Q de reconocimiento de fosfotirosina, lo que determina que la hendidura del sitio catalítico de estas enzimas sea mucho menos profunda que el de las fosfatasas específicas de tirosina y esté abierta, permitiendo la hidrólisis de residuos más cortos como fosfoserina y fosfotreonina (Jia *et al.*, 1995; Yuvaniyama *et al.*, 1996; Barford *et al.*, 1998).

Por otro lado, las fosfatasas de tipo LMMPTP de eucariotas, por su parte, reconocen el sustrato por medio de dos residuos aromáticos conservados que interaccionan con el anillo aromático de la fosfotirosina (Zhang *et al.*, 1998c; Wang *et al.*, 2000). Sin embargo, uno de estos residuos aromáticos no está presente en algunas fosfatasas de procariontas, las cuales reconocen cadenas laterales hidrofóbicas y un grupo carbonilo del esqueleto de sus sustratos, en lugar de los anillos aromáticos de los mismos (Lescop *et al.*, 2006). Además, su centro catalítico sólo es accesible para residuos de larga cadena lateral, como son los residuos de fosfotirosina. Ello explica por qué las proteínas de tipo LMMPTP no son capaces de desfosforilar residuos de fosfoserina y fosfotreonina (Vincent *et al.*, 1999). Por otro lado, las secuencias reconocidas por las fosfatasas pertenecientes a la familia LMMPTP en eucariotas suelen contener un único residuo de tirosina flanqueado por aminoácidos cargados (Lescop *et al.*, 2006), mientras que las dianas de las proteínas de tipo LMMPTP de procariontas incluyen extremos C-terminal ricos en tirosina que contienen menos aminoácidos cargados y son más hidrofóbicos (Vicent *et al.*, 2000; Grangeasse *et al.*, 2003).



**Figura 6.** Estructura de Wzb de *E. coli* perteneciente a la familia LMMPTP de tirosina fosfatasas (Lescop *et al.*, 2006).

#### A.VIII.4.5.2. Mecanismo catalítico y regulación de la actividad fosfatasa

En la reacción catalizada por las fosfatasas pertenecientes a esta superfamilia el grupo fosfato de la proteína fosforilada es coordinado por el residuo de arginina del motivo del sitio activo para situarlo junto al residuo de cisteína catalítico (Jia *et al.*, 1995). La unión de fosfopéptidos produce un importante cambio conformacional del bucle WPD permitiendo que el residuo de aspártico conservado se sitúe en el sitio activo y actúe como ácido general en la reacción catalítica (Barford *et al.*, 1998). En esta situación, la cisteína del sitio activo actúa como nucleófilo atacando al grupo fosfato de la proteína sustrato (Guan y Dixon, 1991; Zhou *et al.*, 1994). La rotura del enlace se ve facilitada por la protonación, mediante el residuo de aspártico conservado, del oxígeno fenólico de la tirosina fosforilada, con la consiguiente formación de un intermediario fosfocisteína y el desplazamiento de la proteína desfosforilada (Barford *et al.*, 1998). El ciclo se completa cuando una molécula de agua, activada por el residuo de aspártico conservado, entra en la región que ha dejado la proteína desfosforilada e hidroliza la cisteína fosforilada del intermediario, regenerando la enzima y liberando fosfato inorgánico (Denu *et al.*, 1996a; Jackson y Denu, 2001).

No existe un mecanismo universal para regular la actividad fosfatasa de las proteínas pertenecientes a la superfamilia PTP. En general, la regulación de la actividad de estas fosfatasas no depende de modificaciones posttraduccionales, sino de regulación negativa. De este modo, se distinguen dos mecanismos de regulación: i) regulación oxidativa de la cisteína del sitio activo por oxidantes biológicos (Knebel *et al.*, 1996; Denu y Tanner, 1998), tales como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reversible por la adición de compuestos que contienen grupos tiol tales como ditioneitol y glutatión reducido (Hecht y Zick, 1992; Sullivan *et al.*, 1994), y ii) regulación por fosforilación, como en el caso de las tirosina fosfatasas que regulan el ciclo celular, Cdc25A, Cdc25B y Cdc25C (Autero y Gahmberg, 1987; Ostergaard y Trowbridge, 1991; Stover *et al.*, 1991), aunque se desconoce si la modificación de la actividad fosfatasa ejercida por la fosforilación se debe a que origina una enzima más estable o si la protege de la degradación por proteasas que degradan proteínas no fosforiladas (Jackson y Denu, 2001).

#### A.VIII.4.5.3. Dominios adicionales

El dominio catalítico de las fosfatasas pertenecientes a la superfamilia PTP está altamente conservado, por lo que la diversidad estructural y funcional dentro de esta superfamilia se genera a través de dominios de regulación y orientación que aparecen junto al dominio catalítico. Tales dominios funcionan no sólo para regular la actividad catalítica de estas proteínas, sino también para dirigir a la enzima hacia determinadas localizaciones subcelulares. El efecto neto de estos dominios es conferir especificidad por el sustrato (Neel y Tonks, 1997). Entre ellos se encuentra el dominio SH2 (Tabla 3), que se une a péptidos que contienen fosfotirosina, regulando vías de señalización y actuando en la orientación y regulación de la enzima (Neel y Tonks, 1997). Otros dominios de este tipo presentes en las tirosina fosfatasas son los dominios SH3 (Tabla 3) (Barford *et al.*, 1998). Además, varias tirosina fosfatasas con especificidad dual contienen motivos CH2 en el extremo N-terminal que muestran cierta similitud con el dominio catalítico de las fosfatasas de la familia Cdc25 (Keyse y Ginsburg, 1993; Kwak *et al.*, 1994).

Entre las fosfatasas miembros de la superfamilia PTP de procariotas, junto al dominio fosfatasa, aparecen dominios SBTrans (implicados en la reducción de arseniato), dominios fosfatasa adicionales, lacAB (presentes en ribosa 5-fosfato isomerasa) y PAP2 (encargados de la unión de sustratos fosforilados no específicos) (Tabla 3) (Bhaduri y Sowdhamini, 2005).

### A.VIII.4.6. Superfamilia PHP

La superfamilia PHP está formada por fosfoesterasas, la mayoría de las cuales no son fosfatasas, excepto la proteína CpsB y sus homólogos en *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *B. subtilis* y *Lactococcus lactis* que son tirosina fosfatasas dependientes de metal. Los miembros de la superfamilia PHP no muestran similitud de secuencia con las proteínas pertenecientes a las otras familias de PTP (Morona *et al.*, 2002).

Estas fosfatasas presentan 4 motivos con algunos residuos absolutamente conservados esenciales para su función. Así, el motivo I contiene dos residuos de histidina separados por un único aminoácido, el motivo II posee residuos de aspártico e histidina uno a continuación del otro, mientras que el motivo III presenta un residuo de histidina y, finalmente, el motivo IV posee un residuo de aspártico y otro de histidina separados por un solo aminoácido. El último motivo está ausente en algunas proteínas de arqueas y bacterias (Aravind y Koonin, 1998).

Los residuos de histidina conservados de estos motivos participan en la unión del metal, ya que estas proteínas coordinan dos cationes metálicos para la actividad enzimática. El ácido aspártico conservado del motivo IV es esencial para la catálisis participando en la transferencia de electrones y en la coordinación de los metales (Aravind y Koonin, 1998).

### A.VIII.4.7. Transducción de señales por fosfatasas

Las células son capaces de percibir cambios en su entorno mediante receptores de membrana de diversa naturaleza con sensibilidad selectiva frente a diversos estímulos. Al interactuar con un estímulo adecuado, estos sensores sufren un cambio conformacional que transmite la señal al interior celular (Hendrickson, 2006).

La capacidad de muchas quinasas y fosfatasas de actuar sobre diferentes proteínas determina la creación de redes de señalización capaces de integrar múltiples señales para coordinar de forma conjunta un amplio espectro de procesos celulares y conseguir así una adaptación adecuada frente a 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).

Entre los componentes de señalización que pueden actuar como receptores de membrana se encuentran las tirosina fosfatasas de tipo receptor (RPTP) de eucariotas. Estas fosfatasas presentan uno o dos dominios intracelulares (D1 y/o D2), pero sólo D1 es responsable de la actividad catalítica (den Hertog *et al.*, 1993; Desai *et al.*, 1994; Kokel *et al.*, 1998).

Las fosfatasa de tipo RPTP pueden comunicar señales transmembrana por modulación de la actividad de sus dominios catalíticos intracelulares y producir cambios en la fosforilación en tirosina celular (Barford *et al.*, 1998). También están implicadas en la regulación del contacto célula-célula y la adhesión entre células adyacentes (Sap *et al.*, 1994; Brady-Kalnay *et al.*, 1995; Fuchs *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1997).

Numerosas fosfatasa de procariotas actúan de la misma manera que sus homólogos eucariotas, catalizando la desfosforilación de los sustratos previamente fosforilados por una quinasa. 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 opuestos. En este sentido, se han caracterizado varios ejemplos de función opuesta entre quinasas y fosfatasa en bacterias, incluyendo SpoIIAB/SpoIIE (Duncan *et al.*, 1995), RsbT/RsbX y RsbW/RsbU de *B. subtilis* (Yang *et al.*, 1996) y Slr1861/IcfG de *Synechocystis* PCC6803 (Shi *et al.*, 1999a).

Por otro lado, en varias especies bacterianas existen pares quinasa/fosfatasa en los que la quinasa constituye el sustrato de la fosfatasa correspondiente. Ejemplos de ello son los pares quinasa/fosfatasa Wzc/Wcb y Etk/Etp de *E. coli* o CpsD/CpsB y StkP/PphP de *S. pneumoniae* (Cozzone *et al.*, 2004).

También es posible que la fosfatasa desfosforile los sustratos fosforilados por una quinasa y a la propia quinasa, inactivándola, como ocurre con la fosfatasa Mstp de *Mycobacterium tuberculosis* que controla la ruta PknH-EmbR (Sharma *et al.*, 2006).

Algunas bacterias patógenas utilizan las fosfatasa como misiles moleculares (Bliska *et al.*, 1991; Kaniga *et al.*, 1996). Estas enzimas son secretadas en el hospedador infectado, donde intervienen en la iniciación o progresión de la infección a través de la alteración del estado de fosforilación y, por tanto, del estado funcional de las proteínas del hospedador o del funcionamiento del citoesqueleto de actina, tales como SptP de *Salmonella typhimurium* (Kaniga *et al.*, 1996; Fu y Galan, 1998). Algunas cianobacterias utilizan una estrategia alternativa ya que atacan las redes de fosforilación de otros organismos mediante la elaboración de polipéptidos inhibidores de las fosfatasa como microcistina LR, altamente tóxica y, a menudo, mortal para el hombre y otros animales (Carmichael, 1997).

Las proteínas que se encuentran reguladas por fosfatasa son muy variadas, predominando factores sigma cuya actividad depende del estado de fosforilación de proteínas reguladoras, sustrato de las fosfatasa. Este es el caso de la activación del factor  $\sigma^B$  por desfosforilación de su anti sigma, RsbW, por la fosfatasa RsbU en *B. subtilis* (Agrigoni *et al.*, 1996). Junto a los sustratos de las fosfatasa también se encuentran proteínas enzimáticas o estructurales sobre todo en el caso de bacterias patógenas. Así, la fosfatasa YopH de las especies patógenas de *Yersinia* desfosforila proteínas fosforiladas en tirosina localizadas en los focos de adhesión del hospedador (Black y Bliska, 1997; Black *et al.*, 1998; Hamid *et al.*, 1999).

Las fosfatasa pueden contener diversos motivos de interacción proteína-proteína que dirigen el contacto de la fosfatasa con otras proteínas de señalización. En este sentido, algunas fosfatasa de eucariotas poseen dominios SH2 (Tabla 3) que les permiten interactuar específicamente con residuos de tirosina fosforilados de las

proteínas (Pawson y Gish, 1992). Estos dominios no se han descrito en bacterias. Sin embargo, dominios FHA (Tabla 3), que reconocen proteínas que contienen residuos de fosfotreonina, están presentes en eucariotas (Hofmann y Bucher, 1995), clostridios, micobacterias, *Streptomyces* y varias bacterias Gram negativas (Durocher *et al.*, 2000; Pallen *et al.*, 2002). También se producen en bacterias interacciones proteína-proteína que no requieren la presencia de un dominio específico, sino ciertos tipos de residuos acil fosforilados en una de las dos proteínas. Un ejemplo de ello es la formación del complejo represor/corepresor que regula la represión catabólica en bacterias Gram positivas (Deutscher *et al.*, 1995).

### A.VIII.4.8. Funciones de las fosfatasa en procariotas

#### A.VIII.4.8.1. Metabolismo

Las fosfatasa participan en la regulación de diversos aspectos del metabolismo primario y secundario en procariotas. Por ejemplo, *Synechocystis* PCC6803 contiene un gen que codifica la fosfatasa IcfG perteneciente a la superfamilia PPM (Beuf *et al.*, 1994). Esta proteína está implicada en la regulación del metabolismo del carbono controlando la actividad de otras proteínas mediante interacción proteína-proteína (Shi *et al.*, 1999a) o modulando la disponibilidad del factor sigma responsable de desencadenar el programa específico de expresión génica que remodele el metabolismo de crecimiento heterótrofo (Kennelly, 2001).

En *N. commune* UTEX584 existe una tirosina fosfatasa con especificidad dual, denominada IphP, que contiene una secuencia líder que la dirige a regiones extracitoplasmáticas como el lumen del tilacoide o el espacio periplásmico (Howell *et al.*, 1996). Al tratarse de un microorganismo de vida libre, IphP está implicada en el metabolismo y en funciones sensoriales en esta cianobacteria (Shi *et al.*, 1998).

También en cianobacterias, la proteína sensora P<sub>II</sub>, implicada en la asimilación del nitrógeno en bacterias, arqueas y, posiblemente, en plantas superiores, se modifica por fosforilación reversible de un residuo de serina conservado (Forchhammer y Tandeau de Marsac, 1994), mientras que en la mayoría de las bacterias lo hace por uridilación de un residuo de tirosina conservado (Ninfa y Atkinson, 2000; Arcondeguy *et al.*, 2001). La Ser/Thr fosfatasa PphA de *Synechocystis* PCC6803 está implicada en la asimilación de nitrógeno ya que es la proteína encargada de desfosforilar a P<sub>II</sub> (Ruppert *et al.*, 2002). Por otro lado, *Anabaena* PCC7120 posee la fosfatasa PrpS que está implicada, junto con la proteína sensora P<sub>II</sub>, en la distribución de reservas de nitrógeno entre los heteroquistes y las células vegetativas que realizan fotosíntesis oxigénica (Wolk, 2000; Laurent *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006).

Por último, *S. coelicolor* A3(2) posee una tirosina fosfatasa de bajo peso molecular, denominada PtpA, que controla la producción de metabolitos secundarios, tales como factor A y los antibióticos actinorrodina y undecilprodigiosina (Umeyama *et al.*, 1996).

#### A.VIII.4.8.2. Diferenciación y esporulación

Algunas de las proteínas fosfatasa procariotas caracterizadas intervienen en procesos de diferenciación celular. De este modo, la fosfatasa PrpA y la quinasa PknE

de *Anabaena* PCC7120 están implicadas en la formación de heteroquistes. La mutación en los genes codificantes de alguna de estas proteínas no afecta al crecimiento de la bacteria cuando la concentración de nitrato es elevada. Por el contrario, si la concentración de nitrato llega a ser limitante y el dinitrógeno debe ser usado, los mutantes crecen mucho más lentamente que el silvestre y forman heteroquistes morfológicamente anormales (Zhang *et al.*, 1998b).

Los actinomicetos presentan un complejo proceso de diferenciación morfológica que implica la formación de micelio con filamentos aéreos productores de esporas. En este sentido, en *S. coelicolor* A3(2) la interrupción del gen *sppA*, que codifica una fosfatasa, conduce a una grave alteración del crecimiento vegetativo y a una notable disminución de la formación de hifas aéreas y esporas (Umeyama *et al.*, 2000).

Como se ha indicado, en *M. xanthus* el agotamiento de nutrientes induce la progresión de la bacteria hacia el ciclo de desarrollo. La fosfatasa Pph1 actúa durante el crecimiento vegetativo y en la formación de cuerpos fructificantes, ya que los mutantes carentes de esta proteína muestran un menor crecimiento en medio líquido, reducida movilidad en medio sólido, agregación ralentizada y formación de cuerpos fructificantes inmaduros (Treuner-Lange *et al.*, 2001).

La fosfatasa SpoIIE de *B. subtilis* está implicada en la esporulación de esta bacteria ya que ayuda a la formación de un septo asimétrico que separa célula madre y preespora durante el temprano estado de esporulación y activa a  $\sigma^F$  en la preespora que regula a otros factores de transcripción específicos de la esporulación (Duncan *et al.*, 1995; Agrigoni *et al.*, 1996; Barák y Youngman, 1996; Errington, 1996; Feucht *et al.*, 1996; Stragier y Losick, 1996; Losick y Dwork, 1999).

#### A.VIII.4.8.3. Respuesta a estrés

Se han descrito fosfatasas que forman parte de rutas de transducción de señales desencadenadas por estreses que conducen a la activación de factores sigma. Ejemplos de ello los representan la fosfatasa SpoIIE de *B. subtilis* comentada anteriormente y las fosfatasas RsbP, RsbU y RsbX también de *B. subtilis*, que participan en una compleja cascada de transducción de señales en la que también interviene  $\sigma^B$ . Esta cascada posee dos rutas, una en la que intervienen RsbX y RsbU, y otra en la que actúa RsbP, que convergen sobre la fosfoproteína RsbV (Yang *et al.*, 1996; Vijay *et al.*, 2000). La primera vía detecta señales de estrés ambiental tales como ácidos, etanol, calor o sales, mientras que la segunda detecta señales de estrés energético tales como limitación de carbono, fósforo y oxígeno, a través del dominio PAS de RsbP. La desfosforilación de RsbV por estas fosfatasas libera a la quinasa RsbW del complejo que forma con  $\sigma^B$ . La liberación de este factor sigma desencadena la expresión de un amplio espectro de genes implicados en la respuesta al estrés general (Boylan *et al.*, 1993; Hecker *et al.*, 1996; Redfield y Price, 1996; Yang *et al.*, 1996).

Otro caso lo constituyen las fosfatasas PrpA y PrpB de *E. coli* que participan en la misma ruta que el regulón de  $\sigma^E$ , que codifica la proteasa periplásmica HtrA responsable de la degradación de proteínas mal plegadas como consecuencia de choque térmico u otros estreses. En esta ruta también interviene el sistema de dos componentes CpxA/CpxR. PrpA y PrpB aumentan la expresión de *htrA* a través de CpxA/CpxR por cambios en el nivel de fosforilación de este sistema. PrpA también es una proteína del

choque térmico, ya que su expresión se incrementa en estas condiciones y su sobreexpresión induce la respuesta al choque térmico (Missiakas y Raina, 1997).

*S. typhimurium* también posee dos fosfatasa denominadas PrpA y PrpB relacionadas con estreses, ya que cuando los mutantes de estas fosfatasa son cultivados a 47°C su tasa de crecimiento es significativamente más baja que la de la cepa silvestre. Comparadas con la cepa silvestre, las cepas mutantes también son más sensibles al choque térmico o cambios en la concentración de peróxidos. Al igual que en el caso de *prpA* de *E. coli*, el cultivo de *S. typhimurium* a 42°C incrementa la actividad del promotor del gen *prpA*, pero no el de *prpB* (Shi *et al.*, 2001).

### A.VIII.4.8.4. Patogénesis

Existen pocos ejemplos en los que las Ser/Thr fosfatasa están implicadas en patogénesis. Este es el caso de las fosfatasa PrpB de *E. coli*, que interviene en la supervivencia de la bacteria dentro del hospedador (Khan e Isaacson, 2002), PrpB de *S. typhimurium*, que se sitúa cerca de la isla de patogenicidad SPI-1 (Pancetti y Galan, 2001; Kotewicz *et al.*, 2002), y SP-STP de *Streptococcus* del grupo A (Jin y Pancholi, 2006). En este último caso, el gen de la fosfatasa se contraescribe con el gen de una quinasa. Ambas proteínas son esenciales para la supervivencia de la bacteria y juegan un papel fundamental en patogénesis, ya que los mutantes para estos genes tienen afectado el crecimiento, la morfología de la colonia, la división y septación celular, la expresión de proteínas de superficie y de factores de virulencia, la capacidad de adhesión e invasión y la resistencia a la fagocitosis por los neutrófilos humanos, así como la modulación de la expresión de los principales factores de virulencia (Jin y Pancholi, 2006).

El resto de fosfatasa implicadas en patogénesis son tirosina fosfatasa, ya que la regulación de proteínas por fosforilación en tirosina es una estrategia seguida por varios patógenos bacterianos para entrar y sobrevivir en las células del hospedador, alterando los mecanismos responsables de la fosforilación de tirosina, al inducir la desfosforilación de algunas proteínas específicas del hospedador o al activar ciertas tirosina quinasa del mismo (Bliska y Falkow, 1993).

La fosforilación en tirosina está relacionada con la producción y el transporte de exopolisacáridos y polisacáridos capsulares. Estos polímeros son importantes factores de virulencia, por lo que parece que existe un estrecho vínculo entre fosforilación en tirosina y patogenicidad bacteriana (Cozzone *et al.*, 2004). Así, *Porphyromonas gingivalis* posee una tirosina fosfatasa de bajo peso molecular, Ltp1, implicada en el desarrollo de enfermedades periodontales causadas por esta bacteria, ya que los mutantes *ltp1* forman reducidas biopelículas y tienen afectados múltiples genes implicados en la biosíntesis y transporte de exopolisacáridos (Maeda *et al.*, 2008).

Existen múltiples ejemplos en los que la interrupción de los genes que codifican las parejas tirosina quinasa/fosfatasa conduce a una reducción drástica en la producción de polisacáridos y/o del peso molecular de los mismos. Así, en *Streptococcus pneumoniae*, la autofosforilación de la quinasa CpsD en presencia de la proteína CpsC atenúa su actividad y reduce el nivel de encapsulación por control negativo de la producción de polisacáridos capsulares (Morona *et al.*, 2002). La fosfatasa CpsB actúa como modulador de la actividad de CpsD y, por tanto, contribuye en el proceso (Bender

y Yother, 2001). De manera análoga, la quinasa CpsD, junto con la fosfatasa CpsB y la proteína CpsC, son necesarias para el mantenimiento de la síntesis de polisacáridos de alto peso molecular en *Streptococcus agalactiae* (Cieslewicz *et al.*, 2001). Del mismo modo, en cepas patógenas de *E. coli* la producción de diversos exopolisacáridos es dependiente de la actividad de la quinasa Etk y la fosfatasa Etp (Ilan *et al.*, 1999).

Las tirosina quinasa son mucho más activas en la síntesis de polisacáridos en su estado desfosforilado como ocurre, por ejemplo, en el caso de *E. coli* K-12 donde la quinasa Wzc y la fosfatasa Wzb están directamente relacionadas con la producción del exopolisacárido ácido colánico (Vincent *et al.*, 2000).

Las tirosina fosfatasas también pueden contribuir a la patogenicidad bacteriana siendo exportadas por los microorganismos patógenos en los que se expresan. Una vez liberadas, estas fosfatasas actúan en el hospedador anulando las redes de transducción de señales. La actividad fosfatasa de estas enzimas es esencial para la virulencia del patógeno (Bliska *et al.*, 1991; Fu y Galan, 1998). De este modo actúa la fosfatasa YopH de diversas cepas patógenas de *Yersinia*, que es secretada para asaltar a su hospedador. Una vez dentro, desfosforila a proteínas fosforiladas en tirosina localizadas en los focos de adhesión, desactivando las defensas del hospedador (Black y Bliska, 1997; Black *et al.*, 1998; Hamid *et al.*, 1999). La delección de *yopH* no ocasiona alteración del crecimiento de *Yersinia*, lo que sugiere que esta fosfatasa no actúa sobre las proteínas endógenas de la bacteria (Bliska *et al.*, 1991). YopH está codificada por un plásmido de virulencia que también contiene un gen para una quinasa (Gaylov *et al.*, 1993).

Ejemplos similares los constituyen las fosfatasas SptP de *S. typhimurium* y MPtpA y MPtpB de *M. tuberculosis*, pero en este caso están codificadas por el cromosoma bacteriano. SptP es secretada y altera el funcionamiento del citoesqueleto de actina del hospedador infectado (Kaniga *et al.*, 1996; Fu y Galan, 1998). Su actividad es necesaria y, una vez dentro de las células, suficiente para perturbar el citoesqueleto (Kaniga *et al.*, 1996). Por su parte, MPtpA y MPtpB representan determinantes de virulencia de *M. tuberculosis* (Koul *et al.*, 2000).

#### **A.VIII.4.8.5. Otras funciones celulares**

Se han descrito fosfatasas que participan en procesos celulares diferentes a los mencionados en los apartados anteriores. Así, la fosfatasa PrpC y la quinasa PrkC de *B. subtilis* están implicadas en la fisiología de la fase estacionaria (Gaidenko *et al.*, 2002), mientras que la Ser/Thr fosfatasa Mstp de *M. tuberculosis* lo está en procesos de división celular, ya que es capaz de desfosforilar a las quinasa PknA y PknB que participan en este proceso (Boitel *et al.*, 2003; Chopra *et al.*, 2003). Además, Mstp regula el estado de fosforilación del regulador transcripcional EmbR, que participa en la regulación del operón *embCAB* implicado en la síntesis de la pared celular, a través de la desfosforilación de la quinasa PknH que lo fosforila, o bien desfosforilando al propio regulador EmbR (Sharma *et al.*, 2006).

La fosfatasa Stp1 de *S. agalactiae* se cotranscribe junto al gen de una quinasa. Esta fosfatasa se requiere para una segregación celular normal, ya que las cepas mutantes forman cadenas anormalmente largas (Rajagopal *et al.*, 2003).



## Introducción

El gen de la fosfatasa Py-PP1 de *Pyrodictium abyssi* TAG11 se cotranscribe con el gen *canB*, implicado en la formación de la cánula, hueco tubular formado entre las redes extracelulares de esta arquea, sugiriendo que la fosfatasa también participa en la formación de la misma (Mai *et al.*, 1998).

En *S. pneumoniae* la quinasa StkP es sustrato de la fosfatasa PhpP. La quinasa puede fosforilar a la enzima fosfoglucoamina mutasa que cataliza el primer paso en la ruta de biosíntesis de UDP-N-acetilglucosamina, un precursor esencial común de los componentes de la envuelta celular (Nováková *et al.*, 2005).

### A.VIII.5. Fosfatasas de *M. xanthus*

A diferencia de las quinazas de *M. xanthus* las proteínas fosfatasa de esta mixobacteria no han sido estudiadas en detalle. No obstante, a partir de extractos celulares se han identificado cinco actividades fosfatasa diferentes, dos de las cuales están presentes durante el crecimiento vegetativo, mientras que las otras tres se detectan tan sólo en determinadas etapas del desarrollo (Weinberg y Zusman, 1990). Las dos actividades vegetativas tienen pH óptimos de 5.2 y 8.5, por lo que se denominan actividades fosfatasa ácida y alcalina, respectivamente. Ambas actividades son dependientes de magnesio. Por su parte, las actividades fosfatasa del ciclo de desarrollo presentan pH óptimos de 5.2, 7.2 y 8.5, lo que da origen a su denominación como actividades fosfatasa ácida, neutra y alcalina, respectivamente. A diferencia de las anteriores, estas tres actividades son independientes de magnesio.

La actividad fosfatasa ácida es inducida muy pronto (2 a 4 horas) en el desarrollo, mientras que las actividades fosfatasa neutra y alcalina son inducidas mucho más tarde, en torno al momento en el que las mixósporas se hacen evidentes (24 a 30 horas del desarrollo). Estas tres actividades del ciclo de desarrollo disminuyen enormemente tras la germinación, aunque la cinética de la disminución es distinta para las tres. La actividad fosfatasa ácida declina muy rápidamente, la actividad neutra comienza a hacerlo sólo después de que las mixósporas comienzan a convertirse en bacilos, y la actividad fosfatasa alcalina permanece con valores elevados hasta el momento en el que las células comienzan a dividirse (Weinberg y Zusman, 1990).

Hasta el momento, no obstante, se desconoce la naturaleza y el número de fosfatasa responsables de estas actividades y si son originadas como consecuencia de la acción de una única proteína o de varias, ya que tan sólo se ha caracterizado una proteína fosfatasa específica en *M. xanthus*, denominada Pph1 (Treuner-Lange *et al.*, 2001).

La fosfatasa Pph1 de *M. xanthus* pertenece a la superfamilia PPM y desfosforila de forma predominante residuos de fosfotreonina, aunque también actúa sobre residuos fosforilados en serina. El pH de actuación de Pph1 se encuentra en torno a la neutralidad, de modo que la actividad de esta proteína forma parte de la actividad fosfatasa neutra inespecífica detectada en extractos celulares de *M. xanthus* (Treuner-Lange *et al.*, 2001).

El gen *pph1* se expresa durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo, alcanzando un máximo al comienzo de la agregación (2 a 6 horas) y retornando a los valores iniciales durante las siguientes 16 horas (Treuner-Lange *et al.*, 2001).

Los mutantes de delección para el gen *pph1* son viables pero presentan: i) defectos en el crecimiento vegetativo durante la fase exponencial, ya que las células entran en fase estacionaria a una densidad celular más baja que en el caso de la cepa silvestre, ii) expansión reducida de las colonias en agar blando, mostrando 70-90% de reducción con respecto a la bacteria silvestre, iii) defectos en el control de los movimientos de reversión de las células, iv) agregación defectuosa durante el ciclo de desarrollo, más lenta que la agregación de la bacteria silvestre y con formación de cuerpos fructificantes anormales, v) fallo parcial en la producción de mixósporas y en la viabilidad de las mismas, ya que produce un 50% del número de mixósporas y estas células de resistencia presentan 0.02% de viabilidad respecto a la esporulación de la bacteria silvestre, vi) fallo en la producción de mixósporas inducidas con glicerol, y vii) defectos en la metilación de FrzCD (Treuner-Lange *et al.*, 2001).

Mediante el sistema del doble híbrido de levadura se determinó que la fosfatasa Pph1 interacciona con el extremo C-terminal de la proteína FrzZ, perteneciente al sistema regulador de movilidad Frz de *M. xanthus*, que regula los movimientos directos de las células en el enjambre durante el crecimiento vegetativo y la agregación en el ciclo de desarrollo (Treuner-Lange *et al.*, 2001).

Además, la fosfatasa Pph1 de *M. xanthus* interacciona 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 de un mismo sustrato, ya que la expresión de ambas proteínas coincide en el tiempo y el fenotipo de los mutantes es contrario, o que Pph1 desfosforile la quinasa, previamente activada mediante autofosforilación (Treuner-Lange *et al.*, 2001).

No obstante, el elevado tamaño del genoma de *M. xanthus*, propio de microorganismos con gran capacidad de adaptación a las condiciones variables del entorno (Lynch y Conery, 2003; Konstantinidis y Tiedje, 2004), junto con el gran número de proteínas quinasas presentes en esta mixobacteria, son indicadores de que *M. xanthus* debe poseer igualmente un número considerable de proteínas fosfatasas. Por esta razón, en nuestro laboratorio se propuso abordar la identificación de genes de *M. xanthus* que codificaran proteínas con actividad fosfatasa. El procedimiento seguido permitió la identificación de genes constituyentes de los sistemas reguladores de dos componentes PhoPR1 (Carrero-Lérida *et al.*, 2005) y PhoRP2 (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2003) pero no de fosfatasas propiamente dichas. Adicionalmente, en el transcurso de la caracterización del sistema PhoRP2 fue identificado el sistema regulador de dos componentes PhoRP3 (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2003). Estos tres sistemas regulan en parte la expresión de las proteínas fosfatasas responsables de las actividades inespecíficas ácida y neutra que se detectan durante el ciclo de desarrollo de *M. xanthus* (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2003; Carrero-Lérida *et al.*, 2005).

Por otro lado, el sistema PhoPR1 también está implicado en la diferenciación de los bacilos en mixóspora y es responsable de la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo energético y en la síntesis de proteínas

## *Introducción*

(Carrero-Lérdia, 2004). Además, en las proximidades de dicho sistema se localizan genes que codifican dos proteínas fosfatasa, de modo que estos genes podrían contribuir en las actividades fosfatasa inespecíficas detectadas en *M. xanthus*.

La secuenciación del genoma de *M. xanthus* y su disponibilidad para nuestro grupo desde el año 2003 ha permitido realizar esta Tesis Doctoral, encaminada a determinar las proteínas fosfatasa codificadas por esta bacteria y a caracterizar alguna de ellas.

## **B. OBJETIVOS**



## B. OBJETIVOS

*Myxococcus xanthus* lleva a cabo un complejo ciclo de vida, único entre los procariotas, con una fase de crecimiento vegetativo donde la bacteria se multiplica empleando los nutrientes del medio y un ciclo de desarrollo multicelular inducido por el agotamiento de los mismos. Para que el ciclo de desarrollo culmine con éxito es necesario que las células detecten una serie de cambios medioambientales y se comuniquen entre sí, lo que asegura que actúen de manera cooperativa y, finalmente, originen cuerpos fructificantes macroscópicos. Para ello requieren mecanismos de transducción de señales muy variados.

El análisis de la secuencia del genoma de *M. xanthus* ha revelado la existencia de un elevado número de proteínas de señalización, esenciales para integrar las señales recibidas y emitidas. La fosforilación de determinadas proteínas desempeña un papel crucial en el ciclo de desarrollo de las mixobacterias. Esta fosforilación es llevada a cabo tanto por sistemas reguladores de dos componentes como por proteínas quinasas similares a las de eucariotas.

Como contrapartida, deben existir fosfatasas capaces de desfosforilar las proteínas fosforiladas por las quinasas, revertiendo su acción, garantizando de esta forma que las quinasas/fosfatasas funcionen a modo de interruptores biológicos. Sin embargo, las fosfatasas de *M. xanthus* no han sido objeto de una investigación tan exhaustiva como las quinasas. Tan solo hace unos años se identificó y caracterizó la única proteína fosfatasa específica de *M. xanthus* descrita hasta el momento, Pph1 (Treuner-Lange *et al.*, 2001). Acorde con el gran número de quinasas identificadas en el genoma de *M. xanthus*, es de esperar que el número de fosfatasas codificadas por esta mixobacteria sea igualmente elevado.

Por todo ello, para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos, encaminados a identificar las proteínas fosfatasas de *M. xanthus* y profundizar en el conocimiento de algunas de ellas:

1. Identificación de genes que cifran proteínas fosfatasas en el genoma de *M. xanthus*.
2. Estudio del perfil de expresión de algunos genes que codifican fosfatasas de *M. xanthus*.
3. Caracterización bioquímica y molecular de proteínas fosfatasas de *M. xanthus* pertenecientes a diferentes familias.
4. Determinación de la ruta de transducción de señales en la que interviene una de ellas, a la que hemos denominado Pph2.



## **C. MATERIAL Y MÉTODOS**





## C.I. MATERIAL

### C.I.1. Microorganismos

#### C.I.1.1. Cepas de *Escherichia coli*

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

**DH5 $\alpha$**  (Hanahan, 1983)

*supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

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

*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi*  $\Delta$ (*lac-proAB*) F'*[traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ*  $\Delta$ M15]

**TOP10** (Invitrogen)

F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*

Estas cepas son deficientes en la recombinación, lo que favorece la estabilidad de los plásmidos y las convierte en hospedadores adecuados para la clonación. Por ello fueron utilizadas para realizar transformaciones y electroporaciones en *E. coli*.

**BL21(DE3) Star** (Invitrogen)

F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>* (*r<sub>B</sub>-m<sub>B</sub>*) *gal dcm rne131* (DE3)

Esta cepa posee una copia de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, que se activa por isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG), un análogo de la lactosa. Carece de las proteasas *lon* y *OmpT*, lo cual reduce la degradación de las proteínas heterólogas expresadas en esta cepa y posee el gen *rne* mutado, lo cual se traduce en un incremento en la estabilidad del ARNm. Esta cepa se empleó para la sobreexpresión de proteínas recombinantes en los vectores de expresión pET200/D-TOPO y pET28a(+).

**DH10B** (Gibco BRL)

F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr hsdRMS mcrBC*) $\Phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 endA1 recA1 deoR*  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 *araD139 galU galK nupG rpsL*

La cepa DH10B es deficiente en la recombinación, por ello fue utilizada como hospedador capaz de albergar de forma estable los plásmidos que conforman la genoteca de *M. xanthus* generada para el rastreo de interacciones proteicas mediante el sistema del doble híbrido de levadura.

#### C.I.1.2. Cepas de *Myxococcus xanthus*

Las cepas de *M. xanthus* utilizadas fueron:

**DZF1** (Morrison y Zusman, 1979)

*pilQ1*

## Material y Métodos

Esta cepa fue 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 ligeramente a la movilidad social, lo cual facilita su cultivo en medio líquido. Todas las cepas de *M. xanthus* obtenidas durante este estudio derivan de ella, salvo las relacionadas con la localización subcelular de proteínas.

### **DK1622** (Kaiser, 1979)

Se trata de la cepa silvestre ya que carece de la mutación *pilQ1* por lo que no es defectiva para la movilidad social. Se empleó para confirmar la duplicación de un gen en la cepa DZF1.

### **DK10415** (Wu y Kaiser, 1996)

*ΔpilS*

Se empleó para los estudios de localización subcelular de proteínas, para lo cual la proteína de interés se fusiona a una variante mejorada de la proteína verde fluorescente (EGFP). El vector en el que se lleva a cabo la construcción posee el promotor y la secuencia de unión al ribosoma del gen *pilA* de *M. xanthus*. El gen *pilA* se expresa a niveles muy altos durante el crecimiento vegetativo en un fondo genético *ΔpilS*. Por ello se usó esta cepa, ya que posee la delección del gen *pilS*.

### **JM12** (Carrero-Lérida *et al.*, 2005)

*ΔphoP1-ΔphoR1*

Mutante de delección para el sistema regulador de dos componentes PhoPR1. En este mutante se ha delecionado el 92% del sistema en la cepa DZF1 de *M. xanthus* y se ha sustituido por el sistema KG3 (Ueki *et al.*, 1996), por lo que es sensible a la kanamicina. Se he empleado para determinar si el sistema PhoPR1 controla la expresión de su propio operón.

## **C.I.1.3 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae***

### **AH109** (James *et al.*, 1996)

*MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3*, *GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2*, *URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ*, *MEL1*

Se trata de una cepa derivada de la cepa PJ69-2A. Esta levadura se ha utilizado en el sistema del doble híbrido de levadura para el rastreo de interacciones proteína-proteína. Dispone de cuatro marcadores nutricionales, *TRP1* y *LEU2*, empleados para seleccionar la incorporación de los plásmidos portadores de las proteínas cebo y presa, y *ADE2* e *HIS3* para la selección de las interacciones. Además, dispone de un sistema de detección fenotípica necesario para verificar las interacciones, basado en la expresión de las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasa, codificadas por los genes *MEL1* y *lacZ*, respectivamente.

## C.I.2. Medios de cultivo

### C.I.2.1. Medios de cultivo para *E. coli*

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

10 g/l Triptona (Difco)  
5 g/l Extracto de levadura (Difco)  
10 g/l NaCl  
15 g/l Bacto-agar (Difco) para medio sólido  
pH 7.2

**Medio líquido SOC** (Sambrook y Russel, 2001)

20 g/l Triptona (Difco)  
5 g/l Extracto de levadura (Difco)  
0.5 g/l NaCl  
2.5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
20 mM Glucosa

### Compuestos adicionados a los medio de cultivo

- Ampicilina (50 µg/ml) (Sigma)

Para seleccionar bacterias portadoras de plásmidos que contienen el gen de la β-lactamasa. El producto de este gen confiere resistencia a los antibióticos β-lactámicos.

- Kanamicina (25 µg/ml) (Sigma)

Utilizado como marcador para seleccionar las bacterias portadoras de plásmidos que confieren resistencia a este antibiótico.

- Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) (1 mM) (Promega)

Compuesto utilizado para inducir la sobreexpresión de los genes clonados bajo el control de promotores de tipo *lac* en los sistemas de expresión pET-28a(+) y pET200/D-TOPO (Invitrogen).

- 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosido (X-gal) (40 µg/ml) (Biosynth AG)

Este compuesto es utilizado por la β-galactosidasa originando un producto azulado. Fue utilizado para efectuar selección blanco/azul de las colonias originadas en la transformación, en las etapas iniciales de clonación de fragmentos, por α-complementación. Permite diferenciar aquellas bacterias que no han incorporado el inserto, azules, de las que si lo han hecho, blancas.

## **C.I.2.2. Medios de cultivo para *M. xanthus***

### **Crecimiento vegetativo**

#### **Medio CTT (Hodgkin y Kaiser, 1977)**

10 g/l Bacto-casitona (Difco)  
2 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
10mM Tris-HCl (pH 7.6)  
1mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.6)  
15 g/l Bacto-agar (Difco) para medio sólido  
8 g/l Bacto-agar (Difco) para medio semisólido

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

10 g/l Bacto-casitona (Difco)  
5 g/l Extracto de levadura (Difco)  
1 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
15 g/l Bacto-agar (Difco) para medio sólido  
pH 7.6

### **Ciclo de desarrollo**

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

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)  
1 mM K<sub>2</sub>NaPO<sub>4</sub> (pH 6.8)  
8 mM MgSO<sub>4</sub>  
0.02% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
0.015% Bacto-casitona (Difco)  
0.2% Citrato sódico  
0.1% Piruvato sódico  
15 g/l Bacto-agar (Difco)

#### **Medio TPM (Kroos *et al.*, 1986)**

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)  
1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.5)  
5 mM MgSO<sub>4</sub>  
15 g/l Bacto-agar (Difco)

#### **Medio TM (Kroos *et al.*, 1986)**

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)  
5 mM MgSO<sub>4</sub>  
15 g/l Bacto-agar (Difco)

### Compuestos adicionados a los medios de cultivo:

- Kanamicina (40 u 80 µg/ml) (Sigma)

Se utilizó como marcador selectivo para el aislamiento de mixobacterias portadoras de fusiones *lacZ* o EGFP, así como para la obtención de intermediarios merodiploides durante el proceso de delección de un gen diana. Para ello se emplearon plásmidos que conferían resistencia a dicho antibiótico, gracias a que las cepas DZF1 y DK10415 son sensibles al mismo.

- 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) (100 µg/ml) (Biosynth AG)

La acción de la enzima β-galactosidasa sobre este compuesto origina un producto azulado como consecuencia de su degradación. Se adicionó a los medios de cultivo para efectuar un análisis cualitativo inicial de la actividad β-galactosidasa de las bacterias portadoras de fusiones *lacZ*.

- Galactosa (10 mg/ml) (Fluka)

Se le incorporó a los medios de cultivo para la obtención de mutantes de delección en fase. Las mixobacterias que crecieran en los medios con galactosa debían haber eliminado el casete kanamicina-*galk*. El gen *galk* codifica la galactoquinasa de *E. coli* que transforma la galactosa en un análogo no metabolizable, impidiendo el crecimiento del microorganismo (Ueki *et al.*, 1996).

- Carbonil cianida m-cloro fenil hidrazona (CCCP) (Sigma)

Se añadió a los medios CTT y CF en concentraciones adecuadas para estudiar su efecto sobre el crecimiento y el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*. Destruye el potencial de membrana tras introducirse repetidamente en forma protonada en el citoplasma, donde libera los protones captados en el periplasma.

### C.I.2.3. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*

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

2% Bacto-Peptona (Difco)  
1% Extracto de levadura (Difco)  
2% Bacto-Agar (Difco) en medio sólido  
pH 5.8  
Tras la esterilización, añadir: 2% Glucosa (Sigma)  
0.003% Adenina (Sigma)

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

2% Bacto-Agar (Difco) en medio sólido  
pH 5.8  
Tras la esterilización, añadir: 2% Glucosa  
5% Base de nitrógeno con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20X  
5% Mezcla SDC 20X

## Material y Métodos

### 20X Base nitrogenada con sulfato de amonio:

3.8% Base nitrogenada (Difco)

5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 20X SDC

Mezcla concentrada de aminoácidos y bases nitrogenadas necesarios para el crecimiento de la levadura. Por cada 100 ml, se mezclan y homogenizan:

40 mg de cada uno de los siguientes compuestos: adenina, arginina, histidina, metionina, triptófano y uracilo

60 mg de cada uno de los siguientes compuestos: isoleucina, leucina, lisina y tirosina

100 mg de fenilalanina

300 mg de valina

400 mg de treonina

Para la preparación de medio mínimo selectivo se omitió uno o varios de los componentes de la mezcla.

### **Compuestos adicionados a los medios de cultivo:**

- 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\alpha$ -D-galactopiranosido (X- $\alpha$ -Gal) (40  $\mu$ g/ml) (Clontech)

Se incorporó al medio SDC ya que es sustrato de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa. Su degradación genera un producto azulado que permite valorar, de forma cualitativa, la actividad  $\alpha$ -galactosidasa de las cepas de levadura analizadas.

## C.I.3. Tampones y soluciones

### **Tampones generales: lavado, resuspensión y lisis**

Tampón TM: 10 mM Tris-HCl pH (7.6), 1 mM MgSO<sub>4</sub>

Tampón TPM: 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.5), 5 mM MgSO<sub>4</sub>

Tampón TE: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA (pH 8)

Tampón STET: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM EDTA, 8% sacarosa, 5% Tritón X-100

Solución de lisis de levaduras: 0.1 M Tris-HCl (pH 8), 1 mM DTT, 20% glicerol

Solución 1X LiAc-TE-H<sub>2</sub>O (1:1:8): 1 M LiAc:10X TE:H<sub>2</sub>O

Solución 1X LiAc-TE-PEG (1:1:8): 1 M LiAc:10X TE: 50%PEG-3350

### **Purificación de proteínas**

Preparación de extractos: Tampón fosfato 1X (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 80 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 M NaCl)

### **Electroforesis de ADN**

TAE 1X (Sambrook y Russell, 2001): 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA (pH 8)

TBE 0.5X (Sambrook y Russell, 2001): 45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA (pH 8)

Tampón de carga 5X (Sambrook y Russell, 2001): 0.25% (p/v) azul de bromofenol,  
0.25% (p/v) xileno cianol, 30% glicerol

### Southern blot

Solución de despurinización: 0.25 N HCl

Solución de desnaturalización: 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH

Solución de neutralización: 3 M acetato sódico (pH 5.5).

Para hibridación 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)

Solución de prehibridación e hibridación: DigEasy Hyb Granules (Roche)

Tampón maleico: 150 mM NaCl, 100 mM ácido maleico (pH 7.5)

Solución equilibrado I: 2X SSC, 0.1% SDS

Solución equilibrado II: 0.1X SSC, 0.1% SDS

Solución de lavado: 3% Tween 20 en tampón maleico

Solución de bloqueo: 1g reactivo de bloqueo del *DIG DNA Detection and Labeling Kit* en 100 ml de tampón maleico

Tampón de detección: 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, (pH 9.5)

Solución de desarrollo del color: 200 µl de la solución de NBT/BCIP del *DIG DNA Detection and Labeling Kit* en 10 ml de tampón de detección

### 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

### Tinción/destinción de geles de proteínas

Solución I: 25% Isopropanol, 10% ácido acético glacial, 0.003% azul Coomassie

Solución II: 10% Isopropanol, 10% ácido acético glacial, 0.003% azul Coomassie

Solución III: 10% ácido acético glacial, 0.003% azul Coomassie

Solución IV: 10% ácido acético glacial

### Ensayo de actividades enzimáticas

#### Autofosforilación de PhoR1 y desfosforilación por SixA

Tampón de diálisis I: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl

Tampón fosforilación: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1mM DTE

Tampón de diálisis II: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl

#### Actividad fosfatasa frente al *p*-nitrofenil fosfato (pNPP):

0.1 M acetato sódico (pH 5.2), 10 mM MgCl<sub>2</sub>/ CaCl<sub>2</sub>/NiNO<sub>3</sub>/MnCl<sub>2</sub>

0.1 M Imidazol (pH 6.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub> ó 10 mM NiNO<sub>3</sub> ó 10 mM MnCl<sub>2</sub>

0.5 M Tris-HCl (pH 7.2), 10 mM MgCl<sub>2</sub> ó 10 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM MOPS (pH 7.5), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> y 1 mM ZnCl<sub>2</sub>

0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub> ó 10 mM NiNO<sub>3</sub> ó 10 mM MnCl<sub>2</sub>

0.5 M Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub> ó 10 mM CaCl<sub>2</sub>

#### Actividad Glutamina sintetasa:

Transferencia:

Mezcla de reacción:

1 M Imidazol (pH 7.0)

0.1 M Glutamina (pH 7.0)

0.1 M MnCl<sub>2</sub>

0.01 M Na-ADP (pH 7.0)

1 M Arseniato potásico (pH 7.0)

2 M Hidroxilamina



## Material y Métodos

### Solución de parada:

10% FeCl<sub>3</sub>, 24% TCA, 6N HCl

### Biosíntesis:

#### Mezcla de reacción:

1 M Imidazol (pH 7.0)  
1 M Glutamato sódico (pH 7.0)  
0.1 M MnCl<sub>2</sub>  
70 mM NaCl  
0.06 M Na-ATP (pH 7.0)  
0.2 M Isopropilamina

#### Solución de parada:

0.8% FeSO<sub>4</sub> disuelto en 15 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### Solución desarrollo del color:

6.6% (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> en 7.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### Actividad β-galactosidasa:

Tampón Z: 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01 M KCl, 0.001 MgSO<sub>4</sub>, 0.05 M β-mercaptoetanol pH 7.0

Tampón Z/ME: 16.1 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.5 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.75 g/l KCl, 0.246 g/l MgSO<sub>4</sub>, 400 μl β-mercaptoetanol (pH 7.0).

## Western blot

Solución de transferencia: 0.025 M Tris-HCl, 0.15 M glicina, 20% metanol (pH 8.1-8.4)

PBS 1X: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4)

Reactivo de bloqueo: 5% leche desnatada, 0.02% azida sódica en PBS

TBS 1X: 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl (pH 7.5)

Solución de lavado: TBST 1X (TBS 1X, 0.1% (v/v) Tween-20)

Tampón de dilución: TBST 1X, 1% (p/v) leche desnatada en polvo

Tampón de detección: 0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, (pH 9.5)

Solución de desarrollo del color: 200 μl de la solución de NBT/BCIP del *DIG DNA Detection and Labeling Kit* en 10 ml de tampón de detección

## C.I.4. Material para biología molecular

### C.I.4.1. Vectores y plásmidos

- **pBJ113** (Julien *et al.*, 2000): vector de 5000 pb, derivado del pUC118, utilizado para la obtención de los mutantes de delección en fase. Contiene el gen de resistencia a kanamicina del transposón Tn5 (1300 pb) y el gen *galK* de *E. coli* (1500 pb) que confiere sensibilidad a la galactosa.
- **pUC19** (Vieira y Messing, 1982): vector de 2686 pb, utilizado para la clonación de diversos fragmentos. Confiere resistencia a ampicilina.
- **pUC7SKm(Pst<sup>r</sup>)** (Inouye, 1990): plásmido de 4000 pb portador de un fragmento de 1300 pb que codifica para un gen de resistencia a kanamicina, procedente del transposón Tn5, insertado en el sitio *SmaI* de un vector pUC7.
- **pKY481** (Cho y Zusman, 1999a): vector de 8300 pb empleado para la construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales entre el gen *lacZ* de *E. coli* y un gen diana cuyo perfil de expresión se desea conocer. Posee un marcador de resistencia a

kanamicina que permite la selección de presuntos positivos. Tras la integración del vector en el cromosoma, la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa depende del promotor que regula la expresión del gen diana fusionado.

- **P1** (Martínez-Cañamero *et al.*, 2003): plásmido de 7200 pb en el que se encuentran los genes *phoR1*, *pph2* y *sixA* de *M. xanthus* (MXAN4778, 4779 y 4780, respectivamente) clonados en pUC19.
- **pJC1BElacK** (Carrero-Lérida *et al.*, 2005): plásmido portador de la fusión entre el gen *phoP1* de *M. xanthus* y el gen *lacZ* de *E. coli*. Posee resistencia a kanamicina.
- **pET200/D-TOPO** (Invitrogen): vector de expresión de 5741 pb que permite la sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. La selección de presuntos positivos se realizó en base a la resistencia a kanamicina conferida por este vector. Los productos de expresión presentaban fusionada, en su extremo N-terminal, una cola de 6 residuos de histidina que permitió la purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad en columnas de agarosa-níquel.
- **pET-28a (+)** (Novagen): Vector de expresión de 5369 pb que permite la sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. La utilización de este vector confiere resistencia a la kanamicina. Los productos de expresión presentaban fusionadas a sus extremos N y C-terminales sendas colas de 6 residuos de histidina.
- **pMR2917** (Peñalver *et al.*, 2006): plásmido de 6000 pb empleado para determinar la localización subcelular de proteínas. Contiene un fragmento de 1380 pb de *M. xanthus* que carece de actividad promotora y permite dirigir la integración del plásmido por recombinación homóloga. Además, contiene el promotor y la secuencia de unión al ribosoma del gen *pilA* de *M. xanthus*. El gen *pilA* se expresa a niveles elevados durante el crecimiento vegetativo, especialmente en un fondo genético  $\Delta pilS$ . Este vector también porta un gen de resistencia a kanamicina que permite la selección de presuntos positivos. Se empleó para la construcción de fusiones entre el extremo C-terminal de la proteína diana y el extremo N-terminal de EGFP, una variante mejorada de la proteína verde fluorescente.
- **pGBKT7** (Clontech): vector de 7300 pb, 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*. Posee un origen de replicación autónomo, un marcador de resistencia a kanamicina para la selección en *E. coli* y un marcador nutricional *TRP1* empleado en *S. cerevisiae*. Se utilizó para la expresión del cebo en el rastreo de interacciones proteicas.
- **pGADT7** (Clontech): vector de 8000 pb, 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. Dispone de un origen de replicación autónomo, un marcador de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli* y un marcador nutricional *LEU2* para *S. cerevisiae*. Se utilizó para la expresión de proteínas presa.

### C.I.4.2. Oligonucleótidos

En las siguientes tablas se describen los cebadores empleados en este trabajo de investigación. Junto a la denominación de los oligonucleótidos se detalla su secuencia en orientación 5'→3' y su aplicación. Los nucleótidos destacados en negrita indican la secuencia reconocida por la enzima de restricción utilizada para la clonación de los productos de PCR. Subrayados se indican los nucleótidos incorporados al oligonucleótido para efectuar las clonaciones en el vector pET200/D-TOPO. Todos los oligonucleótidos fueron suministrados por la casa comercial Sigma- Genosys.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados para determinar los genes que forman parte del mismo operón que el sistema regulador de dos componentes *phoPR1* de *M. xanthus*.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Aplicación
RTP1C	TCTCGCGCAGCCGCTTGATG	Síntesis de ADNc desde el regulador de respuesta <i>phoP1</i>
RTSC	AGGTCGACGATGCGCTTGTG	Síntesis de ADNc desde la fosfohistidina fosfatasa <i>sixA</i>
RTP1F	CATCCTGATTATCGAGGACG	Amplificación de una región de <i>phoP1</i> (PCR1 y PCR4)
RTP1R	ACTTCCTCGCCCTTCACACG	
RTR1A	TCTTCCACGACGTCACCGAG	Amplificación de una región de <i>phoR1</i> (PCR2)
RTR1B	TGCTCGTACTCACCGTAAAC	
RTF2	TACCGGGAGAAGGACCACTG	Amplificación de una región de <i>pph2</i> (PCR3)
RTF2C	TCCATCAGCGCGTTGTGGTG	
ORF01177F	GTTCGACCAGGGCGAATTCG	Amplificación de una región de MXAN4775 (PCR5)
ORF01177R	CCTCGCTCACGTGCGAAGTC	

**Tabla 5.** Oligonucleótidos diseñados para el análisis del perfil de expresión, mediante el gen *lacZ* de *E. coli*, de diferentes genes de *M. xanthus*.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Aplicación
Pph2LZXhoF	TCCTCGAGACGCCGCTGGCCAAGGATTT	Fusión <i>lacZ</i> de la fosfatasa Pph2 (MXAN4779)
Pph2LZBamR	CGGGATCCATGGTCACTCCATCCTACCC	
888XhoLZF	CGCTCGAGCGCCGCCGTCCTTGCCCAGC	Fusión <i>lacZ</i> de la fosfatasa MXAN0888
888BamLZR	CCGGATCCATGATGGCGGGAACGCGCCG	
SpoIIEKpn	GCGGTACCGGCCAGACGGTGGGGCAGAC	Fusión <i>lacZ</i> de la fosfatasa SpoIIE (MXAN4562)
SpoIIEBam	GCGGATCCATCAGCGCGGCCCGGAACCAC	
448KpnLZF	CTGGTACCTGAAGATGGGGCCGTGCTCG	Fusión <i>lacZ</i> de la fosfatasa MXAN0448
448BamLZR	CCGGATCCATGTTTCAGCCCGCGCCCGG	
1665KpnBF	CGGGTACCTCTCGCTCTCCATCATGCCG	Fusión <i>lacZ</i> de la fosfatasa MXAN1665
1665BamBR	GCGGATCCATGATGCCGTGCGGAAGCTC	
1875Bam	CGGGATCCATCGATTGAGCGTGGCATG	Fusión <i>lacZ</i> de la proteína hipotética MXAN1875
1875Kpn	CAGGTACCCGCCGCTCTTGCGGGCACC	
5630Bam	CCGGATCCATCTTCTGGACGCCCTTCTC	Fusión <i>lacZ</i> de la glutamina sintetasa GlnA4 (MXAN5630)
5630Sma	CGCCCGGCACGCCGTCGAAGAGTGGGT	

**Tabla 6.** Oligonucleótidos diseñados para la construcción de mutantes de delección de *M. xanthus*.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Aplicación
448KpnLZF	CTGGTACCTGAAGATGGGGCCGTGCTCG	Amplificación de un fragmento 5' respecto a MXAN0448
448BamLZR	CCGGATCCATGTTTCAGCCCGCGCCCCGG	
448BamIFR	CGGGATCCGTAGGCCGCGCCAGCTCAG	Amplificación de un fragmento 3' respecto a MXAN0448
448PstIFF	CCCTGCAGCTCCCAGGAGGAAGAAAGTC	
SpoIIEIF1Hin	GGAAGCTTCGTGGTGACGCCCTCCAGC	Amplificación de un fragmento 5' respecto a SpoIIIE (MXAN4562)
SpoIIEIF1Bam	CCGGATCCCTGACTTCTTCTGGGACTC	
SpoIIEIF2Bam	TAGGATCCATGGGCGGGCCGGGGTGGGG	Amplificación de un fragmento 3' respecto a SpoIIIE (MXAN4562)
SpoIIEIF2Kpn	CGGGTACCTGGCCAGCCCCAGCACCACC	
SixA1E	TGGAATTCTCCGTGCGCTAC	Amplificación de un fragmento 5' respecto a SixA (MXAN4780)
SixA1B	GAGGATCCCCGGGCGTTC	
SixA2B	GTGGATCCGGTCTTCTG	Amplificación de un fragmento 3' respecto a SixA (MXAN4780)
SixA2H	CGAAGCTTACTGGGATGAG	
PhoP1HindIII	GGAAGCTTAGATGGAGTACTACTTCGAG	Amplificación de un fragmento 5' respecto a PhoP1 (MXAN4777)
PhoP1BamHI	TCGGATCCAATCAGGATGCGCGACATGA	
PhoR1BamHI	CGGGATCCTCGAGCGCGGCGACAGGGTA	Amplificación de un fragmento 3' respecto a PhoR1 (MXAN4778)
PhoR1EcoRI	GTGAATTCAGCGCGCTCCACCAGCTTG	
Pph2ER	GGAGAATTCGCTGCTCCATCCGGAGC	Amplificación de un fragmento 3' respecto a Pph2 (MXAN4779)
Pph2XF	GCGCAACCTCGAGGAGTCCG	
1875Bam	CGGGATCCATCGATTTCGAGCGTGGCATG	Amplificación de un fragmento 5' respecto a MXAN1875
1875Kpn	CAGGTACCCGCCGCTCTTGGCGGGCACC	
1875IFHin	GCAAGCTTGGCCTGGAGGCCCTCCAACG	Amplificación de un fragmento 3' respecto a MXAN1875
1875IFBam	GGGGATCCCTGAGGGAAGGCATGGCCCA	
5630Bam	CCGGATCCATCTTCTGGACGCCCTTCTC	Amplificación de un fragmento 5' respecto a GlnA4 (MXAN5630)
5630Sma	CGCCCGGGCACGCCGTCAAGAGTGGGT	
5630IFHin	TCAAGCTTCGCCACCATCATGTCCGTGC	Amplificación de un fragmento 3' respecto a GlnA4 (MXAN5630)
5630IFBam	GAGGATCCCTGATGAGCGCAAATGAGGC	

**Tabla 7.** Cebadores empleados para determinar la localización subcelular mediante fusión con el gen *EGFP* de proteínas fosfatasa de *M. xanthus*.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Aplicación
PpilAF	AATCCCATCCGCGGGCGCAG	Comprobación de fusiones entre el gen <i>EGFP</i> y genes de fosfatasas de <i>M. xanthus</i>
SecEGFPR	CCGTTTACGTCCCGTCCAG	
448GFNheF	GCGCTAGCCGCCCGCTCGGACGTCC	Fusión <i>EGFP</i> del gen MXAN448
448GFNheR	GGGCTAGCATGAGTTTTGCTTTGCTGCG	
SpoIIENheF	GGGCTAGCGGCGGGGCTGAACCTCGG	Fusión <i>EGFP</i> del gen SpoIIIE (MXAN4562)
SpoIIENheR	GCGCTAGCATGTCCAGTACGAATACGCG	

**Tabla 8.** Oligonucleótidos utilizados para la sobreexpresión de proteínas de interés de *M. xanthus*.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Aplicación
SixANcoIF	TCACCATGGCTGCACGCGAGCTGCCGCTG	Obtención de la proteína SixA recombinante (MXAN4780)
SixAXhoR	GGCCTCGAGGCGCAGGTCGCCGGGGCGCT	
PhoR1NdeF	CGGCATATGGACCTGCTGGCCCGCCACAC	Obtención de la proteína PhoR1 recombinante (MXAN4778)
PhoR1XhoR	TCCCTCGAGCCCTGTCGCCGCGCTCGATG	
pTOP-Pph2F	CACCATGCGGGTCGCCATCCT	Obtención de la proteína Pph2 recombinante (MXAN4779)
pTop2-Pph2R	CTACCCTTCGAAATCGTTGAG	
pETTopo2-GlnNF	CACCGTGGACACGCTGCGCCGCTG	Obtención de la proteína GlnA4 recombinante (MXAN5630)
pETTopo2-GlnR	TCAGATGAGCTCCAGGTAAC	

**Tabla 9.** Cebadores empleados para la clonación del gen codificante de la fosfatasa Pph2 (MXAN4779) y su utilización como cebo para el rastreo de interacciones proteicas en una genoteca de expresión de *M. xanthus* mediante el sistema del doble híbrido de levadura.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
Pph2Eco2HF	GAGAATTCATGCGGGTCGCCATCCTCGC
Pph2Pst2HR	GACTGCAGCTACCCTTCGAAATCGTTGA

**Tabla 10.** Oligonucleótido utilizado para la secuenciación de los insertos detectados durante el rastreo de la genoteca de expresión de *M. xanthus*.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
pGADSecF	TAACTATCTATTCGATGATGA

**Tabla 11.** Cebadores diseñados para el análisis de interacciones directas entre parejas de proteínas de *M. xanthus* empleando el sistema del doble híbrido de levadura.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Aplicación
GlnAEco2HF	ACGAATTCATGCGTGGCAGGCTGAAGCTGCT	Utilización de GlnA (MXAN0912) como presa
GlnAXho2HR	CTCTCGAGCGGCGAACTTGCTCTGCACG	

### C.I.4.3. Reactivos

Las casas comerciales que suministraron los reactivos utilizados para las técnicas de Biología Molecular fueron las siguientes:

**Ambion:** *DNA-free<sup>TM</sup>*.

**Amersham Pharmacia Biotech:** Membrana de nylon *Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>* para la transferencia de ADN (Southern blot) y *HisTrap<sup>TM</sup> Kit*, para la purificación de las proteínas recombinantes.

**Applied Biosystems:** Polimerasa *AmpliTaq Gold<sup>TM</sup>*.

**Bio-Rad:** *Bio-Rad Protein Assay*, para determinar la concentración de proteínas. Pesos moleculares estándares de proteínas para SDS-PAGE.

**Biosinth AG:** X-gal.

**Fermentas:** Fosfatasa alcalina de gamba.

**Invitrogen:** Sistema de clonaje y expresión *pET200/D-TOPO vector<sup>®</sup>* y *Superscript<sup>TM</sup> II RNasaH Reverse transcriptase*.

**Millipore:** Filtros VSWP02500 para diálisis de muestras, filtros Millex-HA de 0.45 µm para la filtración de los extractos de proteínas y membrana de PVDF *Immobilon<sup>TM</sup>-P* para la transferencia de proteínas (Western blot).

**Promega (Biological Research Products):** *Wizard<sup>®</sup> Plus SV Midipreps DNA Purification System* para el aislamiento de ADN plasmídico a mediana escala e IPTG.

**Roche Molecular Biochemicals:** Endonucleasas de restricción, seroalbúmina bovina (BSA), lisozima, ARNasa, ADN ligasa del bacteriófago T4, desoxirribonucleótidos, *High Pure<sup>™</sup> PCR Product Purification Kit* para purificar fragmentos de ADN sintetizados mediante PCR, *High Pure Plasmid Isolation Kit* para el aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala, *High Pure RNA Isolation Kit* para la extracción de ARN, *DIG Easy Hyb Granules* como solución de prehibridación e hibridación, *DIG DNA Detection and Labeling Kit* para marcaje de sondas de ADN y revelado de hibridaciones, marcadores de peso molecular de ADN *Molecular Weight Marker II y VIII*.

**Scheleicher & Schuell:** Membranas de nylon *Nytran Supercharge* para hibridación de colonias.

**Serva:** Agarosa, acrilamida, Bis-acrilamida y azul Coomassie<sup>®</sup>.

**Sigma (Molecular Biology Reagents):** N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), persulfato amónico, fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), bolas de vidrio para la sonicación de muestras, dietilpirocarbonato (DEPC) y (DAPI). Así como la mayoría de los reactivos utilizados en la preparación de las distintas soluciones y tampones.

**Whatman:** 3MM Chr *Chromatography Paper*.

#### C.I.4.4. Instrumentación

##### Para incubaciones de los cultivos

**HT:** Agitador orbital *Infors AG*.

**MMM Medcenter GmbH:** Estufa refrigerada *Friocell 222*.

**MMM Medcenter GmbH:** Estufa *Incucell*.

**New Brunswick Scientific Co. Inc.:** Agitador orbital *Gyrotory<sup>®</sup> Shaker-Model G2*.

##### Para electroforesis y transferencia de proteínas

**Biometra:** *Biometra Fastblot fast semi-dry blotting* para la transferencia de proteínas.

**Bio-Rad:** Fuente de alimentación *Power Pac 300*, sistema de electroforesis vertical *Mini-Protean<sup>®</sup> 3 Cell* y cubetas para electroforesis vertical.

**Cosmo Bio Co. Ltd.:** Sistema ultracompacto de electroforesis horizontal *Mupid-2<sup>®</sup>*.

**Jordan Scientific Co.:** Cubetas de electroforesis *Gel-o-Submarine Electrophoresis Systems*.

**Pharmacia:** Fuentes de alimentación *Electrophoresys Power Supply (EPS) 600 y 3500*.

**Sigma:** Cubetas para electroforesis vertical.

## *Material y Métodos*

### Centrífugas

**Beckman:** Centrífuga refrigerada *Avanti™ 30*, rotores F0850 y F3602.

**Eppendorf:** Centrífuga refrigerada *Centrifuge 5415 R*.

**DuPont Instruments:** Centrífuga refrigerada *Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge*, rotor *GSA*.

### Para electroporación

**Bio-Rad:** Cubetas *Gene Pulser® Cuvette E. coli Pulser® Cuvette*, 2mm gap y de 1 mm y sistema de electroporación *Gene Pulser Xcell™ electroporation System*.

### Baños

**Heto Lab Equipment:** Baño termostático DT.

**P Selecta:** Baños *Precisdig* y *Precistern*.

**Thermolyne:** Baño de bloques *Type 17600 Dri-Bath*.

### Otros

**Bio-Rad:** Secador de geles *Gel Dryer 583*, transiluminador con tratamiento de imágenes *Gel Doc XR System* y termociclador *MJ MINI Personal Thermal Cycler*.

**Crison:** pHmetro *GLP 22*.

**Hausser Scientific:** Cámara de recuento Petroff Hausser 3900.

**Hewlett Packard:** Escáner. *HP Scanjet 8300*.

**Leitz:** Microscopio de contraste de fases *Dialux 22*.

**Misonix Inc.:** Sonicator *Microson™ Ultrasonic Homogenizer XL2007*.

**Nikon:** Microscopio de epifluorescencia (Melville, NY) *Eclipse E600*, equipado con filtro Nikon Chroma 41017 Endow y cámara digital Nikon Coolpix 5000.

**Olympus:** Cámara fotográfica digital *Camedia C-5060* y microscopio de epifluorescencia *Cell R IX81*.

**RoveBloc:** Selladora térmica *FUTURA-Jr*.

**Sartorius:** balanza *PT 10* y balanza de precisión *BP 61S*.

**S.B.S. Instruments:** Agitador orbital *AOS-O*.

**Spectronic Instruments:** Espectrofotómetro *Spectronic 20D+*.

**Stuart Scientific:** Horno de hibridación *Hybridisation Oven/Shaker SI 20H*.

**Thermo Electron Corporation:** arcón de -80°C *Forma -86C ULT Freezer*.

**Varian:** Espectrofotómetro *Cary 50 Conc UV-Visible Spectrophotometer* conectado a un ordenador *PC Pentium III*.

**Wild Heerbrugg:** Lupa *M8*.

**Zeiss:** Microscopio electrónico de transmisión *TEM902*.

### C.I.5. Bases de datos y servidores

En el curso de este trabajo de investigación se utilizaron los siguientes servidores y/o bases de datos:

**“DAS” Transmembrane Prediction Server, TMHMM y SOSUI:** para la predicción de dominios transmembrana y péptido señal en proteínas de procariontas.  
(<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>), (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) y  
(<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)

**ESPrpt 2.2:** para visualizar los alineamientos y resaltar aminoácidos.  
(<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>)

**ExpASY:** Identificación y caracterización de las proteínas de *M. xanthus* comparando su homología frente a proteínas depositadas en la base de datos (BLAST y BLASTP).  
(<http://expasy.org/tools/blast/>)

**Myxococcus xanthus DK 1622 Genome Page:** genoma de *M. xanthus*.  
(<http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org=gmx>)

**HMM Logos:** para la visualización de familias de proteínas.  
Schuster-Boeckler B, Schultz J, Rahmann S: BMC Bioinformatics 2004, 5:7

**NPS@ (Network Protein Sequence Analysis):** Desarrollo de alineamientos frente a otras proteínas (Clustalw y MULTALIN).  
([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align\\_clustalw.pl](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align_clustalw.pl))  
(<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)

**PDB (Protein Data Bank):** Base de datos donde se encuentran depositados modelos tridimensionales de proteínas cristalizadas.  
(<http://www.rcsb.org/pdb/>)

**PFAM:** para la identificación de los dominios presentes en las proteínas de *M. xanthus*.  
(<http://pfam.sanger.ac.uk>)

**Pubmed:** Búsqueda de información bibliográfica y de secuencias aminoacídicas de proteínas depositadas en la base de datos.  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)

**Science Direct:** Búsqueda de información bibliográfica.  
(<http://www.sciencedirect.com/>)

**xanthusBase :** Base de datos acerca de *M. xanthus*.  
(<http://www.xanthusbase.org>).



## C.I.6. Números de acceso de proteínas utilizadas en alineamientos

En la Tabla 12 se encuentran recogidos los números de acceso de las proteínas que se han utilizado para realizar los alineamientos del apartado de Resultados entre diferentes proteínas de *M. xanthus* y proteínas homólogas a ellas depositadas en las bases de datos.

**Tabla 12.** Números de acceso de las proteínas empleadas en los alineamientos que se muestran en el apartado de Resultados.

Alineamientos	Proteína	Microorganismo	Nº Acceso
<b>Tyr fosfatasa MXAN0448</b>	MPTpB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	NP_21667
	IphP	<i>Nostoc commune</i> UTEX584	AAA255111
	SptP	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> LT2	NP_461799
	YopH	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> PB1/+	YP_001874621
<b>Ser/Thr fosfatasa SpoIIIE</b>	SpoIIIE	<i>Bacillus subtilis</i> subsp <i>subtilis</i> sp 168	NP_387945
	RsbU	<i>Bacillus subtilis</i> subsp <i>subtilis</i> sp 168	NP_388351
	RsbX	<i>Bacillus subtilis</i> subsp <i>subtilis</i> sp 168	NP_388355
	IcfG	<i>Synechocystis</i> sp PCC6803	NP_440974
<b>Ser/Thr fosfatasa Pph2</b>	PPasa	Bacteriofago $\lambda$	P03772
	PrpA	<i>Eschericia coli</i> sp. K-12 subsp MG1655	NP_416352
	PrpB	<i>Eschericia coli</i> sp. K-12 subsp MG1655	NP_417214
	PrpA	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> LT2	AY049950
<b>Foafohistidina fosfatasa SixA</b>	SixA	<i>Eschericia coli</i> sp. K-12 subsp MG1655	NP_416842
	SixA	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP	YP_249119
	SixA	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	NP_760851
	SixA	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> sp DC3000	NP_792036
<b>Glutamina sintetasa GlnA4</b>	GlnA	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> LT2	NP_462887
	GlnA	<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	YP_629173
	GlnA4	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	NP_625889
	IpuC	<i>Pseudomonas</i> KIE171	CAC81335

## C.II. MÉTODOS

### C.II.1. Cultivo de microorganismos

#### C.II.1.1. *E. coli*

Los cultivos líquidos se inocularon a partir de una colonia aislada de medio sólido para asegurar la existencia de una población homogénea. Se incubaron en medio LB a 37°C y 200 rpm de agitación. Los medios utilizados fueron LB y SOC para permitir el reinicio de la actividad metabólica y la expresión del carácter de resistencia a los antibióticos conferidos por los plásmidos introducidos mediante electroporación o transformación. El cultivo en medio sólido se realizó en medio LB con 1.5% de Bacto-agar (Difco). Cuando fue necesario, los medios fueron suplementados con ampicilina o kanamicina, así como con X-gal.

Para la conservación de las cepas de *E. coli*, alícuotas de 0.8 ml de cultivo líquido fueron suplementadas con 25% (p/v) de glicerol y mantenidas a -80°C.

### C.II.1.2. *M. xanthus*

#### Crecimiento vegetativo

El cultivo de la bacteria en CTT o CYE líquido se efectuó a 30°C y 300 rpm. En el caso del cultivo en medio sólido se suplementaron con 1.5% de Bacto-agar (Difco) y se incubaron a 30°C. El medio CTT se utilizó para el crecimiento vegetativo de las bacterias en todos los casos salvo en los experimentos de movilidad donde, además, se empleó el medio CYE, y en los de localización subcelular de proteínas. En el caso del mutante de deleción para el gen *sixA* (MXAN4780) se suplementó con kanamicina al igual que para las fusiones *lacZ* y EGFP. Este medio también se utilizó para obtener extractos de la bacteria correspondientes al crecimiento vegetativo a partir de medio sólido.

Las células fueron conservadas a -80°C, en alícuotas de 1 ml en medio suplementado con 25% (p/v) de glicerol.

#### Ciclo de desarrollo

La inducción del ciclo de desarrollo se consiguió mediante la utilización de tres medios pobres en nutrientes: CF, TPM y TM. Para ello, la bacteria se plaqueó a una DO<sub>600</sub> de 15 ó 60 en gotas de 10 µl y se incubó a 30°C. La diferencia en el contenido en nutrientes entre los tres medios condiciona la progresión de la mixobacteria hacia el ciclo de desarrollo. Así, el medio CF presenta una pequeña cantidad de nutrientes que permite varias etapas de división celular antes de que se desencadene el ciclo de desarrollo, mientras que en los medios TPM y TM la inducción de la fructificación tiene lugar rápidamente al carecer de nutrientes. Además, el medio TM carece de fuente de fosfato, necesaria para el microorganismo. Estas diferencias fueron utilizadas en el análisis fenotípico.

### C.II.1.3. *S. cerevisiae*

El cultivo de la cepa AH109 de *S. cerevisiae* se llevó a cabo en el medio YPDA. Los cultivos líquidos se incubaron a 30°C y 250 rpm. El cultivo en medio sólido se realizó suplementando el medio con un 2% de Bacto-agar (Difco) y se incubó a 30°C durante 2 días.

El medio mínimo SDC, sin el marcador nutricional correspondiente, se empleó para el crecimiento de las cepas portadoras de los plásmidos del sistema del doble híbrido de levadura. Los cultivos líquidos se incubaron como se ha comentado antes y en los sólidos, que llevaban un 2% de de Bacto-agar (Difco), la incubación se prolongó entre 2 y 10 días a 30°C dependiendo del grado de selección ejercido por el medio sobre la levadura.

## C.II.2. Preparación de muestras para microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las mixobacterias fueron cultivadas en medio CTT líquido como se ha comentado anteriormente hasta una  $DO_{600}$  en torno a 1, momento en el que se procedió a concentrarlas por centrifugación y resuspensión en tampón TM (C.I.3.) a una  $DO_{600}$  de 15. Posteriormente, se indujo el ciclo de desarrollo depositando una gota de 10  $\mu$ l de la suspensión bacteriana en una placa Petri de 5.5 cm de diámetro que contenía 8 ml de medio CF o TPM sólido. Estas placas se incubaron a 30°C durante 72 h.

Las posteriores etapas de tratamiento y observación de las muestras fueron realizadas en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada siguiendo un tratamiento similar al utilizado por Mueller y Dworkin (1991), aunque con ligeras modificaciones.

Transcurridas 72 horas de incubación a 30°C, las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0.1 M (pH 7.4) durante 2 horas a 4°C. Seguidamente, las muestras fueron sometidas a 3 lavados de 15 minutos cada uno de ellos en tampón cacodilato 0.1 M (pH 7.4). A continuación, las muestras fueron postfijadas con tetróxido de osmio ( $OsO_4$ ) al 1% durante 2 horas y, posteriormente, se deshidrataron con gradientes crecientes de etanol (50, 70, 90 y 100%) durante 15 minutos en cada uno de ellos. En la etapa siguiente, las muestras fueron infiltradas en una mezcla 1:1 de etanol absoluto y resina Epon durante 2 horas en agitación para, más tarde, ser incluidas en resina pura Epon durante un día. Finalmente, tras llevar a cabo un proceso de polimerización a 60°C, se realizaron cortes semifinos de una micra teñidos con toluidina y cortes ultrafinos de 500-700 Å teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo utilizando un ultramicrotomo Ultracut E.

La observación de las rejillas que contenían las muestras se efectuó utilizando un microscopio electrónico de transmisión Zeiss TEM902 a 80 Kv.

## C.II.3. Preparación de células competentes y electrocompetentes

### C.II.3.1. Preparación de células competentes

#### De *E. coli*

Se utilizó el método del  $CaCl_2$  ya que tiene la capacidad de hacer permeables las paredes celulares, lo que posibilita que el ADN presente pueda atravesarlas con facilidad. Para la obtención de células competentes, el cultivo en medio líquido LB de *E. coli* a una  $DO_{600}$  de 0.5 a 1 fue centrifugado y enfriado introduciéndolo en hielo durante 10 min. A continuación, las células se recogieron mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 min a 4°C. Después, las células fueron resuspendidas en un volumen de 10 mM  $MgSO_4$  previamente enfriado y se mantuvieron en hielo durante 15 min. En la siguiente etapa, las células fueron recogidas mediante centrifugación en las mismas condiciones y resuspendidas en 0.5 volúmenes de 50 mM  $CaCl_2$ , 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) previamente enfriado, e incubadas en hielo durante 15 min. Posteriormente, las muestras se recogieron en las mismas condiciones anteriores y se resuspendieron en 0.05 volúmenes de 50 mM  $CaCl_2$ , 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20%

glicerol. Finalmente, las células competentes obtenidas se repartieron en alícuotas de 100 µl que se conservaron a -80°C hasta su utilización.

#### **De *S. cerevisiae***

Se realizó tomando como muestra de partida un cultivo de *S. cerevisiae* crecido en medio YPDA hasta una DO<sub>600</sub> de 0.5 a 0.7. Las células se recogieron por centrifugación a 2500 rpm durante 5 min a 4°C y se lavaron con 0.5 volúmenes de agua estéril. Tras eliminar el agua y volver a centrifugar en las mismas condiciones, las células se resuspendieron en 0.05 volúmenes de 1X LiAc-TE-agua (1:1:8) recién preparado y se mantuvieron en hielo hasta ser empleadas.

### **C.II.3.2 Preparación de células electrocompetentes**

#### **De *E. coli***

Las células fueron crecidas en medio líquido LB hasta una DO<sub>600</sub> de 0.5 a 1, momento en el que fueron recogidas mediante centrifugación a 4000xg durante 15 min a 4°C y lavadas en 1 volumen de agua destilada estéril a 4°C. A continuación, las células se recogieron en las mismas condiciones anteriores y se lavaron dos veces con 0.5 volúmenes de agua destilada estéril a 4°C y una vez más con 0.02 volúmenes de agua destilada fría. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 0.002-0.003 volúmenes de glicerol estéril en frío al 10% (p/v) y repartidas en alícuotas de 40 µl que se conservaron a -80°C hasta su utilización.

#### **De *M. xanthus***

Se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Kashefi y Hartzell (1995). Las células fueron crecidas en medio líquido CTT a 30°C y 300 rpm hasta que alcanzaron una DO<sub>600</sub> de 0.5 a 0.8. Se centrifugaron 1.5 ml del cultivo a temperatura ambiente durante 2 min a 10000 rpm. A continuación, las células fueron lavadas dos veces con 1 ml de agua Milli Q<sup>®</sup> estéril a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 40 µl de agua Milli Q<sup>®</sup> estéril, de modo que la densidad celular era de aproximadamente  $1.5 \times 10^{10}$  células/ml, y se procedió a su electroporación inmediata.

### **C.II.4. Introducción de plásmidos en células competentes y electrocompetentes**

#### **C.II.4.1. De *E. coli***

##### **Mediante transformación por el método del choque térmico**

Este método (Hanahan, 1983) se utilizó para transformar *E. coli* con plásmidos que presentan un origen de replicación y un marcador de resistencia a antibiótico. Se mezclaron 45 µl de células competentes con 1-10 ng de plásmido y se mantuvieron en hielo durante 30 min. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico manteniéndolas durante 2 min a 42°C. Después, se recuperaron en 0.4 ml de SOC o LB sin antibiótico durante 1 hora a 200 rpm de agitación, para permitir el reinicio de la

actividad metabólica y la expresión del carácter de resistencia al antibiótico conferido por el plásmido. Finalmente, las células fueron sembradas en medio LB sólido o líquido suplementado con el antibiótico para el cual el plásmido confiere resistencia.

### **Mediante electroporación**

Se mezclaron 40  $\mu$ l de células electrocompetentes de *E. coli* con 1  $\mu$ g de ADN plasmídico dializado durante 30 min en un filtro *Millipore* de 0.025  $\mu$ m de tamaño de poro. La mezcla obtenida se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm de ancho, previamente enfriada en hielo. Las condiciones de electroporación fueron 2.5 kV; 200  $\Omega$  y 25  $\mu$ Fd, con una longitud de pulso de 5-6 ms. Tras el choque eléctrico, las células fueron recuperadas rápidamente en 1 ml de SOC o LB sin antibiótico e incubadas durante 1 hora a 37°C y 200 rpm de agitación para recuperar su actividad metabólica. Finalmente, las células transformadas fueron sembradas en LB sólido suplementado con ampicilina o kanamicina.

### **C.II.4.2. De *M. xanthus***

#### **Mediante electroporación**

Se siguió el procedimiento descrito por Kashefi y Hartzell (1995). A las células electrocompetentes de *M. xanthus* se les adicionó 1  $\mu$ g del ADN que se quería electroporar, previamente dializado durante 30 min en un filtro *Millipore*. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 1 mm de ancho. Las células fueron electroporadas bajo las siguientes condiciones de pulso eléctrico: 0.65 kV; 400  $\Omega$ ; 12.25kV/cm; 25  $\mu$ Fd, con una longitud de pulso de 8.6-9.5 ms. Rápidamente, las células fueron recuperadas en 1 ml de CTT líquido sin antibiótico. A continuación, fueron transferidas a un tubo de vidrio estéril que contenía 1.5 ml de CTT sin antibiótico, de manera que los 2.5 ml resultantes se incubaron de 6 a 8 h a 30°C y 300 rpm de agitación para permitir la expresión del marcador que se iba a seleccionar. Finalmente, alícuotas de distintos volúmenes fueron mezcladas con 4.5 ml de agar CTT blando (0.8% Bacto-agar) y sembradas en CTT sólido con kanamicina. Estas placas fueron incubadas a 30°C hasta la aparición de colonias (5-7 días).

### **C.II.4.3. De *S. cerevisiae***

#### **Mediante transformación con acetato de litio por choque térmico**

Se siguió el método descrito por Schiestl y Gietz (1989). Para ello se mezclaron 50  $\mu$ l de células competentes de levadura con 1  $\mu$ g de ADN plasmídico en presencia de 50  $\mu$ g de ADN de salmón (BD Biosciences) desnaturalizado. A esta mezcla, se le incorporaron 300  $\mu$ l de 1X LiAc-TE-PEG (1:1:8) recién preparado y se incubó a 30°C y 200 rpm durante 30 min. Seguidamente, a cada muestra se le añadió dimetil sulfóxido (DMSO) al 10% y se sometió a un choque térmico a 42°C durante 10 min, incubando las muestras posteriormente en hielo durante 10 min. Finalmente, 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.

## C.II.5. Manipulación de ADN

### C.II.5.1. Extracción de ADN

#### ADN cromosómico de *M. xanthus*

El aislamiento de ADN cromosómico a partir de esta mixobacteria se consiguió mediante la utilización del kit de purificación de ADN cromosómico de Promega *Wizard® Genomic DNA purification kit*. En este sistema se centrifugaron 5 ml de cultivo crecido en medio CTT líquido hasta una  $DO_{600}$  de 1. Posteriormente, las células se rompieron con la solución de lisis proporcionada por el kit. Después, se procedió a la separación y purificación del ADN cromosómico, tras degradar el ARN con ARNasa y eliminar las proteínas mediante precipitación. El material genético obtenido se precipitó con isopropanol y fue lavado con etanol al 70%, para finalmente ser rehidratado en 30-50  $\mu$ l.

#### ADN plasmídico de *E. coli*

Para conseguir este fin se siguió el procedimiento propuesto por el kit de purificación de plásmidos *High Pure Plasmid Isolation Kit* de Roche. En este proceso se recogieron las células crecidas en medio LB sólido o de 5 ml de LB líquido suplementado con el antibiótico adecuado, y se lisaron en un medio fuertemente alcalino que se neutralizó tras 5 min. El cromosoma precipitó y se eliminó al sedimentar por centrifugación, mientras que el ADN plasmídico permaneció en suspensión. Finalmente, el plásmido se purificó en un filtro con una matriz capaz de retenerlo y se recuperó tras proceder a su elución en condiciones adecuadas.

#### ADN plasmídico de *S. cerevisiae*

La extracción de ADN plasmídico a partir de levadura se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Robzyk y Kassir (1992). En este proceso se recogieron 1.5 ml de cultivo crecido en medio SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup> durante una noche mediante centrifugación a 5000xg durante 5 min a temperatura ambiente. La lisis se llevó a cabo una vez que las células estaban resuspendidas en STET (C.I.3.) y se sometieron a una agitación vigorosa en el *vortex* durante 5 min con 0.2 g de bolas de vidrio de 0.45 mm. Después, las muestras se calentaron a 100°C durante 3 min y se enfriaron en hielo durante el mismo tiempo. El extracto resultante se centrifugó a 10000xg durante 10 min a 4°C para eliminar los restos celulares. A partir del sobrenadante, se eliminó el ADN cromosómico mediante la precipitación con 7.5 M de acetato amónico durante 1 hora a -20°C. A continuación, tras centrifugar, se recuperó el sobrenadante con el ADN plasmídico y se precipitó con etanol, para finalmente ser resuspendido en 20  $\mu$ l de agua. Se emplearon 10  $\mu$ l A partir de esta preparación para transformar células competentes de *E. coli* mediante choque térmico.

### C.II.5.2. Análisis del ADN aislado

#### C.II.5.2.1. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión del ADN con una única enzima de restricción se realizó mediante una reacción que incorpora 5-10 unidades de endonucleasa por cada microgramo de

ADN que se quiere digerir, en el tampón adecuado para la enzima, suministrado por la casa comercial. La digestión del ADN con dos enzimas de restricción se llevó a cabo de forma simultánea en un tampón compatible para la actividad de ambas enzimas. En los casos en los que no fue posible realizar la reacción de forma conjunta por incompatibilidad entre ambas enzimas, se digirió de forma secuencial con cada una de ellas, procediendo a precipitar el material genético entre ambas digestiones. Tanto las temperaturas como los tiempos de incubación empleados para las reacciones de digestión fueron los indicados por la casa comercial.

### C.II.5.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El método descrito por Saiki *et al.* (1988) posibilita la obtención 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 que se quiere amplificar.

La reacción de síntesis, que presentaba un volumen final de 100  $\mu$ l, estaba compuesta:

- 100 pmoles de cada cebador
- 0.2 mM de cada uno de los dNTPs (dNATP, dCTP, dGTP y dTTP)
- 10  $\mu$ l de tampón *Taq* polimerasa 10X
- 1 mM de MgCl<sub>2</sub>
- 10% de DMSO
- 2.5 unidades de *Taq* polimerasa
- 15-30 ng de ADN molde (plasmídico o cromosómico)

En general, las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- 1 ciclo: Desnaturalización a 94°C durante 10 min
- 30 ciclos:
  - Desnaturalización a 94°C durante 1 min
  - Anillamiento a una temperatura adecuada en función de la T<sub>m</sub> de cada cebador durante 1 min
  - Extensión a 72°C durante 1 min/kb
- 1 ciclo: Elongación a 72°C durante 12 min

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% o acrilamida al 5%. Cuando el ADN amplificado fue correcto, la mezcla de reacción se purificó con el kit *High Pure<sup>TM</sup> PCR Product Purification Kit* de Roche, siguiendo sus instrucciones.

### C.II.5.2.3. Reacción de ligación de ADN

La reacción de ligación de fragmentos de ADN a vectores fue llevada a cabo por la enzima ADN ligasa procedente del bacteriófago T4 de Roche. La reacción de ligación incorpora 20 ng de vector junto con 40 ng del fragmento que se quiere clonar, en un volumen final de 20  $\mu$ l que contenía el tampón ligasa suministrado por la casa comercial. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 5 min y posteriormente se enfrió en hielo durante 10 min. A continuación, se añadió 1 unidad de la enzima ADN ligasa (Roche). La mezcla de ligación se incubó durante una noche a 16°C. Transcurrido ese tiempo, la ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* competentes o electrocompetentes sembradas en un medio selectivo con el antibiótico correspondiente.

Los transformantes positivos fueron seleccionados mediante aislamiento y análisis de restricción del plásmido purificado. En los casos en los que resultó necesario, se procedió a la transferencia de colonias de células transformadas a filtros de nylon y posterior hibridación con sondas específicas para la identificación de presuntos positivos.

#### **C.II.5.2.4. Tratamiento de ADN con fosfatasa alcalina**

Para hidrolizar los grupos fosfato en posición 5' del ADN se utilizó fosfatasa alcalina de gamba (Fermentas) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Este procedimiento se utilizó para el tratamiento del vector pMR2917 digerido con la endonucleasa de restricción *NheI* en la construcción de fusiones entre proteínas de *M. xanthus* y EGFP.

#### **C.II.5.2.5. Secuenciación automática de ADN**

El ADN fue secuenciado en el servicio técnico del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (CSIC) y en el Departamento de Genética de la Universidad de Granada. El procedimiento utilizado se basó en la técnica descrita por Sanger *et al.* (1977) modificada.

En cada reacción de secuenciación se utilizaron de 300 a 600 ng de ADN puro como molde y de 1.6 a 3.2 picomoles de oligonucleótido en un volumen final de 6 µl. La polimerasa empleada fue *AmpliTaq*<sup>®</sup> FS y los terminadores marcados con fluorescencia *BigDye*<sup>TM</sup> constituyentes del kit *ABI PRISM BigDye*<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction de Perkin Elmer Biosystems. El equipo utilizado para la secuenciación estaba constituido por el secuenciador *ABI 373 XL Stretch DNA sequencer* de Applied Biosystems y el termociclador *PE 9600* de Perkin Elmer.

#### **C.II.5.3. Electroforesis de ADN**

La separación de fragmentos de ADN en función de su peso molecular se consiguió mediante electroforesis, basada en la migración diferencial de estas moléculas durante su desplazamiento a través de una matriz polimérica por la acción de un campo eléctrico.

##### **C.II.5.3.1. En geles de agarosa**

Permite separar fragmentos de ADN con un tamaño comprendido entre 0.5 y 25 kb. Para efectuar la electroforesis se utilizaron geles de agarosa al 0.7 % en tampón 1X TAE (C.I.3.) y se sometieron a un campo eléctrico en un tanque horizontal con el mismo tampón. Las electroforesis que se realizaron con el objetivo de comprobar los fragmentos se realizaron a un voltaje de 100 V durante 25-30 min utilizando el sistema ultracompacto de electroforesis horizontal *Mupid-2*<sup>®</sup>. En cambio, cuando la electroforesis se efectuó para recuperar ADN de los geles de agarosa o para analizar el ADN cromosómico mediante Southern blot, se empleó la cubeta de electroforesis *Gel-o Submarine electrophoresis Systems*, junto con la fuente de alimentación *Electrophoresis Power Supply (EPS) 600*, desarrollando la electroforesis durante toda la noche a 20 V. En todos los casos, el marcador de peso molecular utilizado fue el ADN del fago λ



## Material y Métodos

digerido con la enzima de restricción *HindIII* (*Molecular Weight Marker II* de Roche). Una vez desarrollada la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml en 1X TAE) durante 10 min. Este compuesto se intercala entre las hebras de ADN y posibilita la observación de los diferentes fragmentos cuando el gel es expuesto a luz ultravioleta

### C.II.5.3.2. En geles de acrilamida

La electroforesis de ADN en geles de acrilamida se llevó a cabo para separar fragmentos de peso molecular inferior a 0.5 kb. Para ello, se utilizaron geles de acrilamida:bisacrilamida (29:1) al 5%. Los componentes, así como los volúmenes, utilizados para 50 ml fueron:

Acrilamida 29:1	8.30 ml
H <sub>2</sub> O Milli Q <sup>®</sup>	36.28 ml
0.5X TBE	5.00 ml
10% Persulfato amónico	0.40 ml
TEMED	0.02 ml

Tras su polimerización, el gel fue transferido a un tanque de electroforesis vertical que contenía tampón 0.5X TBE y la electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 100 V durante 30-60 min. Los fragmentos separados en la electroforesis se observaron con luz ultravioleta tras teñir el gel en bromuro de etidio (0.5 µg/ml en 1X TAE). El marcador de peso molecular utilizado fue una mezcla de ADN del plásmido pUCBM21 digerido con *HpaII* y del ADN del plásmido pUCBM21 digerido con *DraI* y *HindII* (*Molecular Weight Marker VIII* de Roche).

### C.II.5.4. Aislamiento de fragmentos de ADN

Se ha empleado la técnica de electroelución para el aislamiento de fragmentos de ADN puros, de más de 0.5 kb, a partir de una mezcla de fragmentos obtenida como producto de digestiones con enzimas de restricción o de PCRs inespecíficas. Para ello, la muestra fue cargada en un gel preparativo de agarosa que se corrió a voltaje constante durante toda la noche. La separación de los diferentes fragmentos fue verificada mediante la breve tinción del gel con bromuro de etidio y su posterior observación con luz ultravioleta. A continuación, se cortó la porción de gel que contenía el fragmento de ADN de interés y se introdujo en una membrana de diálisis (previamente tratada y conservada en frío en etanol al 50%) lavada con agua Milli Q<sup>®</sup>, cerrada y llenada con tampón 0.5X TBE (C.I.3.). La membrana se introdujo en un tanque de electroforesis horizontal *Mupid-2*<sup>®</sup> llenado con tampón 0.5X TBE y se electroeluyó en oscuridad durante una hora a un voltaje constante de 100 V. A continuación, se extrajo todo el volumen de tampón de la membrana de diálisis y se pasó a un tubo eppendorf. El volumen se repartió en dos tubos cuando fue superior a 400 µl. Posteriormente, la muestra fue purificada con el kit *High Pure*<sup>™</sup> *PCR Product Purification Kit* de Roche y su concentración fue comprobada en un gel de agarosa.

## C.II.6. Manipulación de ARN

### C.II.6.1. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN se utilizó el kit de Roche *High Pure RNA Isolation Kit*. Puesto que este kit está diseñado para el tratamiento de  $1 \times 10^9$  células bacterianas, la toma de muestras se adaptó a ello. De este modo, las cepas fueron cultivadas a 30°C y 300 rpm de agitación en medio CTT líquido hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 1. A continuación, se recogieron 3 ml del cultivo mediante centrifugación a 10000xg durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron en tampón TM (C.I.3.) y se concentraron en el mismo tampón a una  $DO_{600}$  de 15. Una vez obtenida la muestra, ésta fue tratada siguiendo las indicaciones del kit consistentes en una lisis en un medio fuertemente desnaturalizante. Finalmente, el ARN celular se purificó mediante un filtro que contenía una matriz capaz de unir el ARN de forma selectiva, y se eluyó en un volumen de 50 µl con agua libre de ARNasas.

Para eliminar el ADN contaminante de la preparación se utilizó el kit *DNA-free<sup>TM</sup>* de Ambion. Para ello se adicionaron 0.1 volúmenes del tampón 10X *DNase I*, 2 unidades de *DNase I* y se incubó a 37°C durante 20-30 min. A continuación, se adicionaron 0.1 volúmenes de *DNase Inactivation Reagent* y se incubó durante 2 min a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 10000xg durante 1 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo.

Puesto que el ARN es degradado con facilidad por ARNasas contaminantes, resulta necesario el tratamiento de todas las soluciones y del material con un inhibidor de ARNasa, el DEPC. Este inhibidor se empleó al 1% (v/v) para el agua Milli Q<sup>®</sup> y al 0.1% (v/v) en el agua para el tratamiento del material, durante 1 hora a 37°C, o bien durante toda la noche a temperatura ambiente.

### C.II.6.2. Análisis del ARN aislado (RT-PCR)

Para el desarrollo de esta técnica se utilizó el kit *SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase* de Invitrogen, donde se mezclaron 5 µg de ARN purificado, con 2 pmol del cebador reverso y 0.5 mM de cada uno de los dNTPs hasta un volumen final de 20 µl. 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 1X y 10 mM de DTT, y se volvió a calentar a 42°C durante 2 min. Finalmente, se incorporaron 200 unidades de la enzima *SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase* 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 µl de ADNc molde, procedente de la reacción de reversotranscripción, siguiendo el protocolo descrito en C.II.3.2.

Los productos de RT-PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de acrilamida al 5%.

## C.II.7. Hibridación de ácidos nucleicos

### C.II.7.1. Detección de fragmentos de ADN con sondas marcadas con DIG\_dUTP

La detección de secuencias específicas de ADN mediante el empleo de sondas marcadas con DIG\_dUTP (desoxiuridina trifosfato unida a digoxigenina) implica un proceso que comprende cuatro etapas: 1) transferencia del ADN a filtros de nylon, 2) prehibridación de los filtros portadores del ADN fijado, 3) hibridación de las membranas con la sonda marcada, 4) detección de positivos mediante el uso de un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina.

#### Marcaje de sondas de ADN con DIG\_dUTP

Previamente al marcaje, la concentración de la sonda se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. Para el marcaje del ADN se utilizó el kit *DIG DNA Labeling and Detection Kit* de Roche Molecular Biochemicals. En este procedimiento se utilizó un fragmento específico de ADN desnaturalizado como molde para la síntesis de hebras complementarias por parte del fragmento Klenow de la ADN polimerasa, en presencia de cebadores que hibridan al azar con el molde y añadiendo a la mezcla de dNTPs el DIG\_dUTP. El DIG\_dUTP es incorporado cada 20-25 nucleótidos en el ADN sintetizado. Las sondas fueron sintetizadas durante 1-20 h a 37°C. En un volumen de 20 µl se marcaron de 10 ng a 3 µg de ADN en presencia de 2 µl de la mezcla 10X de hexanucleótidos, 2 µl de la mezcla 10X de dNTPs que contiene el DIG\_dUTP (1 mM de dATP, 1mM GTP, 1 mM dCTP, 0.65 mM dTTP, 0.35 mM DIG\_dUTP, pH 7.5) y 2 unidades de polimerasa *Klenow*. La reacción de marcado fue detenida adicionando 2 µl de 0.2 M EDTA (pH 8.0). El ADN marcado fue precipitado añadiendo 2 µl de 4 M LiCl y 60 µl de etanol, incubando a -70°C durante 30 min. Tras centrifugar en frío durante 15 min, se procedió a lavar con etanol al 70% y se dejó secar. El ADN marcado fue resuspendido en tampón TE (C.I.3.) y mantenido hasta su utilización a -20°C.

#### 1) Transferencia de ADN a filtros de nylon

La transferencia de ADN a filtros de nylon se realizó para llevar a cabo hibridaciones de colonias o bien Southern blot.

#### Hibridación de colonias

Esta técnica se aplicó para analizar un gran número de colonias de *E. coli* resultante de una reacción de transformación o electroporación de una mezcla ligada cuando se trataba de clonar algún fragmento. Para ello, las colonias fueron picadas sobre una membrana cuadrículada de nylon situada en una placa Petri que contenía medio LB con el antibiótico adecuado. En paralelo, y manteniendo el mismo orden, las colonias también fueron picadas sobre otra placa Petri con el mismo medio utilizada como placa madre. Tras incubar las placas a 37°C durante una noche, las placas madre fueron guardadas a 4°C, mientras que los filtros fueron tratados. En la primera etapa, los filtros fueron colocados con las células hacia arriba, sobre papel Whatman 3MM humedecido en solución de desnaturalización de ADN (C.I.3.). Esta incubación, prolongada durante 3 min, se realizó a temperatura ambiente. Tras repetir el

procedimiento una segunda vez, los filtros fueron transferidos sobre papel Whatman 3MM humedecido en solución de neutralización para hibridación de colonias (C.I.3.) e incubados durante 5 min a temperatura ambiente. Este paso de desnaturalización también fue repetido una segunda vez antes de enjuagar el filtro en 2X SSC (C.I.3.). A continuación, la membrana se dejó secar a temperatura ambiente para, seguidamente, fijar el ADN a la membrana incubándola a 80°C durante 2 h. Posteriormente, la membrana fue sometida a prehibridación e hibridación.

### Southern blot

Para efectuar esta transferencia se siguió la técnica descrita por Southern (1975) basada en la transferencia de ADN desnaturalizado desde un gel de agarosa a una membrana de nylon. Para ello, el ADN cromosómico que se quería analizar fue digerido con la endonucleasa de restricción adecuada y cargado en un gel preparativo de agarosa al 0.7% que se corrió a voltaje constante durante toda la noche. Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio. Una vez teñido, se fotografió junto a una regla para identificar posteriormente el tamaño de las bandas aparecidas. A continuación, fue sometido a una serie de tratamientos que, en todos los casos, fueron efectuados en agitación a temperatura ambiente. De este modo, en una primera etapa, el gel fue incubado durante 3 min en 200 ml de solución de despurinización (C.I.3.). Seguidamente, el gel fue enjuagado dos veces en agua destilada antes de pasar a ser incubado en 200 ml de solución de desnaturalización (C.I.3.) durante 15 min. Tras eliminar esta solución, el gel fue mantenido nuevamente durante 15 min en otros 200 ml de solución de desnaturalización. Posteriormente, el gel fue enjuagado una vez en agua destilada para después ser incubado en 200 ml de solución de neutralización (C.I.3.) durante 30 min. Finalmente, el gel fue enjuagado una vez en agua destilada e incubado en 2X SSC (C.I.3.) antes de iniciar la transferencia. Para efectuar la transferencia, se preparó una bandeja que contenía 20X SSC. Sobre ella se colocó una placa de cristal en la que descansaban tres piezas de papel de Whatman 3MM, previamente humedecidas con 20X SSC, de tal modo que ambos extremos del papel estuviesen sumergidos en el tampón contenido en el recipiente. A continuación, se colocó el gel y sobre éste se situó una membrana de nylon de un tamaño ligeramente superior, que previamente había sido sumergida en agua Milli Q<sup>®</sup> y, más tarde, en 2X SSC. Seguidamente, sobre el filtro de nylon se depositaron, una a una, tres piezas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño que la membrana humedecidas en 2X SSC. Finalmente, se depositaron servilletas de papel secas que fueron sustituidas periódicamente. Para asegurar la transferencia, sobre las servilletas de papel se colocó un peso de unos 500 g. La transferencia se prolongó durante una noche y, a continuación, se recuperó el filtro y sobre él se señaló el contorno del gel. Posteriormente, la membrana fue lavada en agitación durante 10 min en 200 ml de 2X SSC y dejada secar a temperatura ambiente. Cuando se secó, se fijó el ADN a la membrana mediante la incubación de la misma a 80°C durante 2 h. A continuación, el filtro fue sometido a los tratamientos de prehibridación e hibridación con una sonda marcada que hibridó con su cadena de ADN complementaria.

### **2) Prehibridación de filtros portadores de ADN fijado**

Tras la fijación del ADN, las membranas fueron humedecidas en 2X SSC (C.I.3.). Posteriormente, fueron incubadas en solución de prehibridación *Dig Easy Hyb* de Roche a 42°C durante al menos 2 h en un horno de hibridación. Para esta etapa de prehibridación se utilizaron 200 µl de solución por cada cm<sup>2</sup> de membrana.

### 3) Hibridación de membranas con sondas marcadas con DIG\_dUTP

La hibridación se realizó en el mismo horno que la prehibridación incubándose las membranas a 42°C durante una noche. La solución de hibridación fue la misma que la de prehibridación a diferencia de que en esta ocasión se utilizaron 40 µl de solución por cm<sup>2</sup> de filtro y se le adicionaron de 5 a 25 ng de sonda marcada por cada mililitro de solución. La sonda fue hervida durante 10 min para lograr su desnaturalización y, a continuación, pasada rápidamente a hielo antes de ser incorporada a la solución de hibridación. Tras la incubación, los filtros fueron lavados a temperatura ambiente dos veces durante 5 min con la solución de equilibrado I (C.I.3.) y dos veces con la solución de equilibrado II (C.I.3.) durante 15 min para eliminar el exceso de sonda no unida específicamente.

### 4) Detección con fosfatasa alcalina

Este procedimiento se realizó siguiendo las indicaciones del protocolo del *DIG DNA Labeling and Detection Kit* de Roche Molecular Biochemicals para realizar la detección inmunológica de los fragmentos de ADN donde se había unido la sonda marcada con DIG\_dUTP. Todas las incubaciones y lavados descritos a continuación fueron efectuados en agitación a temperatura ambiente. De este modo, la membrana fue sumergida de 1 a 5 min en 100 ml de tampón de lavado (C.I.3.). A continuación, fue incubada durante 30 min en 100 ml de 1X solución de bloqueo (C.I.3.). En la siguiente etapa, el filtro fue incubado durante 30 min con agitación vigorosa en 50 ml de 1X solución de bloqueo a la que se habían añadido 5 µl (dilución 1:10000) de anticuerpo *anti-DIG-AP* (anticuerpo policlonal ovino antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina). Transcurrida esta incubación, la membrana fue lavada dos veces durante 15 min en 100 ml de tampón de lavado para eliminar el exceso de anticuerpo no unido a la sonda marcada. Posteriormente, el filtro fue equilibrado de 2-5 min en 20 ml de tampón de detección (C.I.3.). Por último, la membrana fue incubada, en oscuridad, en una bolsa de plástico sellada que contenía la solución de desarrollo del color (C.I.3.). Como consecuencia de la reacción enzimática, se formó un compuesto violeta unido a la sonda ligada a la secuencia de ADN complementaria. Cuando el precipitado coloreado alcanzó la intensidad deseada, la reacción se detuvo lavando la membrana en agua Milli Q®.

## C.II.8. Técnicas para el estudio de proteínas

### C.II.8.1. Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE

La electroforesis en geles desnaturalizantes de SDS permite separar las proteínas presentes en un extracto en función de su peso molecular. Una vez desarrollada la electroforesis, la tinción del gel se realiza utilizando azul Coomassie que forma complejos fuertes, aunque no covalentes, con las proteínas. La cantidad que se une de este compuesto coloreado y, por tanto, la intensidad de color de las bandas aparecidas es, aproximadamente, proporcional a la cantidad de proteína.

## **Preparación y corrida del gel**

Los geles desnaturalizantes de SDS están constituidos por dos porciones diferenciadas que deben ser preparadas secuencialmente. La porción inferior, gel separador, se prepara en primer lugar y representa la fracción del gel donde se producirá la separación electroforética de las proteínas presentes en la muestra analizada y, por tanto, es el segmento que se someterá al proceso de tinción. Por su parte, la porción superior, gel concentrador, constituye la zona del gel donde se produce el apilamiento de las proteínas contenidas en el extracto para que se produzca una separación homogénea de las mismas en el gel separador. En este estudio, los geles de SDS-PAGE utilizados para el análisis de proteínas constaban de un gel separador al 17.5% de acrilamida junto con un gel concentrador al 5% de acrilamida:

<u>Componentes</u>	<u>Gel separador (ml)</u>	<u>Gel concentrador (ml)</u>
30% Acrilamida	11.7	1.67
1% Bisacrilamida	1.47	1.3
1M Tris-HCl	6.7 (pH 8.7)	0.625 (pH 6.8)
10% SDS	0.2	0.1
Agua Milli Q <sup>®</sup>	0	6.28
10% Persulfato amónico	0.067	0.050
TEMED	0.0067	0.005

Los componentes de la solución fueron mezclados en el orden indicado e inmediatamente después de la adición de los catalizadores de la polimerización (TEMED y persulfato amónico) la mezcla correspondiente al gel separador fue vertida hasta que su nivel se situó a 2-3 cm del borde de las placas utilizadas para la electroforesis. A continuación, se adicionó suavemente agua Milli Q<sup>®</sup> para que el menisco superior del gel quedase convexo. Una vez que el gel separador polimerizó, se retiró el agua que se había incorporado y se adicionó la mezcla del gel concentrador. Tras la polimerización de la porción superior, el gel se transfirió a un tanque de electroforesis vertical relleno con tampón de carrera (C.I.3.) y se cargaron las muestras hervidas durante 10 min en el tampón de carga (C.I.3.). La electroforesis de los geles desnaturalizantes de SDS-PAGE se realizó a un amperaje constante de 30 mA, hasta que el azul de bromofenol se salió del gel.

## **Tinción de geles desnaturalizantes de SDS con azul Coomassie**

Finalizada la separación electroforética de las proteínas, los geles fueron incubados de un modo secuencial, en agitación y a temperatura ambiente, en cuatro soluciones para llevar a cabo su tinción. De este modo, el gel se mantuvo en la solución I (C.I.3.) durante una noche. A continuación, se procedió al cambio de la solución I por la II (C.I.3.) y el gel se incubó en ella durante 8 h, momento en el que la solución II fue sustituida por la solución III (C.I.3.) en la que se mantuvo durante una noche. Posteriormente, la solución III fue cambiada por la solución IV (C.I.3.) en la que el gel se destiñó hasta que las zonas donde no había proteínas quedaron transparentes. Finalmente, los geles fueron secados sobre papel Whatman 3MM a 80°C durante 3 h en un secador de geles.

## C.II.8.2. Obtención de proteínas recombinantes

### C.II.8.2.1. Inducción de las proteínas recombinantes con IPTG

Las células de *E. coli* BL21(DE3) Star fueron transformadas, como indica el manual de Invitrogen *Champion<sup>TM</sup> pET Direccional TOPO<sup>®</sup> Expression kit*, con los plásmidos de expresión cuyos genes están bajo el control de la ARN polimerasa del fago T7 que a su vez está bajo el control del promotor *lacUV5*. La utilización de este sistema permite obtener el producto de expresión del gen clonado en los vectores de la serie pET como una proteína fusionada a una o a dos colas de 6 histidinas en el extremo N y/o C-terminal. La presencia de la cola de histidina facilita la posterior purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a través de agarosa-níquel.

Se usó 1 ml de cultivo transformado por cada 50 ml de cultivo que se quería inducir en medio LB con kanamicina, que fue incubado a 37°C y 200 rpm de agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.5-0.8, momento en el que el cultivo se mantuvo durante 15 min a la temperatura a la que se iba a realizar la inducción, antes de adicionar IPTG a una concentración final de 1 mM. Cuando tiene lugar la inducción, la ARN polimerasa del bacteriófago T7 es tan selectiva y activa que prácticamente todos los recursos de la célula hospedadora son destinados a la expresión del gen diana. Tras la adición del IPTG, el cultivo se incubó durante el tiempo y la temperatura adecuados, de acuerdo con las condiciones óptimas de expresión establecidas en cada caso.

### C.II.8.2.2. Preparación de los extractos crudos de bacterias

Para la purificación de las proteínas recombinantes se adaptó el protocolo propuesto por el kit de Novagen para la purificación de las proteínas recombinantes. Dada la poca cantidad de proteína presente en la fracción soluble, para obtener un rendimiento adecuado fue necesario procesar 1 litro de cultivo en el caso de SixA y PhoR1, mientras que se requirieron 6.5 y 10 litros de cultivo en el caso de Pph2 y GlnA4, respectivamente.

A partir de cada cultivo de *E. coli* BL21(DE3) Star inducido con 1 mM de IPTG, las células se recogieron por centrifugación a 10000xg durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en tampón fosfato 1X (C.I.3.), 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. Seguidamente se adicionó a las muestras 1 mM de PMSF y 1 mM de benzamidina para, a continuación, pasar a ser sonicadas durante 5 min en pulsos de 30 seg, manteniéndolas siempre en hielo. Tras este proceso, se obtuvo un extracto proteico crudo formado por una mezcla de proteínas celulares entre las que se encontraba la proteína inducida. Las muestras se centrifugaron a 14000xg 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 y se conservó a -20°C hasta proceder a la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad.

### C.II.8.2.3. Purificación de la proteína recombinante

La purificación de la proteína recombinante se realizó por cromatografía de afinidad en una columna suministrada por el kit *HisTrap Kit* de Amersham. Esta columna porta cationes metálicos de níquel 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  $\mu\text{m}$  de Millipore, que retuvo y eliminó 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 en la columna a través de una jeringa, 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 presentaban concentraciones crecientes de imidazol (40 mM, 60 mM, 100 mM, 300 mM y 500 mM) preparadas en tampón fosfato 1X (C.I.3.). La presencia de las proteínas purificadas se analizó mediante SDS-PAGE.

### C.II.8.3. Detección de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes expresadas a partir de los vectores pET28a(+) o pET200/D-TOPO portan una o dos colas de histidina en las regiones C y/o N-terminal, lo que permite su detección 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 y posteriormente se inmunodetectaron por colorimetría.

#### C.II.8.3.1. Transferencia de proteínas, *Western blot*

Esta transferencia se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Burnette (1981). Para la realización del Western blot se utilizaron membranas de difluoropolivinilideno (PVDF) que presentan un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y son capaces de retener proteínas de más de 10 kDa. Las incubaciones del gel y la membrana en las distintas soluciones empleadas en esta técnica fueron realizadas, salvo en los casos en los que se indica lo contrario, a temperatura ambiente y en agitación.

Como primer paso de esta técnica, el gel desnaturizante de SDS, que contenía las muestras proteicas que se querían analizar, fue incubado durante 30 min a temperatura ambiente en solución de transferencia (C.I.3.). Mientras tanto, la membrana de PVDF, de un tamaño ligeramente superior que el gel, fue sumergida en metanol absoluto durante 15 seg y, seguidamente, lavada durante 2 min con agua Milli-Q<sup>®</sup>. A continuación, la membrana fue incubada durante 5 min en la solución de transferencia. Posteriormente, sobre la placa correspondiente al polo positivo del dispositivo de transferencia, se depositaron cuatro piezas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño que la membrana, previamente humedecidas en solución de transferencia. Sobre ellas se depositó la membrana de PVDF y, a continuación, se situó el gel de SDS-PAGE. Seguidamente, fueron colocadas otras cuatro piezas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño que la membrana, también humedecidas en la solución de transferencia. Finalmente, se colocó la placa correspondiente al polo negativo del dispositivo de



transferencia. La transferencia se realizó a  $0.8 \text{ mA/cm}^2$  durante 90 min. A continuación, para comprobar la eficiencia de la transferencia, la membrana fue incubada durante 5 min en la solución de transferencia y, seguidamente, teñida con una solución de Rojo Ponceau (5%) y ácido acético (1%) durante 1 min. Posteriormente, la membrana se lavó con agua Milli-Q<sup>®</sup> hasta visualizar las proteínas y anotar las posiciones de los pesos moleculares estándares. Seguidamente, para desteñir la membrana, se utilizó una solución de 0.1 N NaOH. En la siguiente etapa, la membrana fue bloqueada en agitación en el reactivo de bloqueo (C.I.3.) durante 2 h a temperatura ambiente o bien a 4°C durante toda la noche. Tras lavar la membrana tres veces durante 5 min con la solución de lavado (C.I.3.) se procedió a realizar la inmunodetección utilizando un método colorimétrico.

### **C.II.8.3.2. Inmunodetección por colorimetría**

Para detectar las proteínas fijadas a la membrana de PVDF, ésta se incubó durante 2 h en tampón de dilución (C.I.3.) con el anticuerpo *Anti-His G-AP* cuando la cola estaba fusionada en el extremo N-terminal o con el anticuerpo *Anti-His (C-term)/AP* cuando lo estaba en el C-terminal (Invitrogen), ambos conjugados con fosfatasa alcalina. A continuación, el filtro se lavó 4 veces durante 5 min utilizando solución de lavado (C.I.3.). Seguidamente, la membrana se lavó una vez más durante 5 min en TBS (C.I.3.) para eliminar los restos del detergente. A continuación, la membrana fue equilibrada durante 10 min en tampón de detección (C.I.3.). Finalmente, para efectuar el velado, la membrana se incubó en una bolsa de plástico sellada que contenía la solución de desarrollo del color (C.I.3.) y fue mantenida en oscuridad. Como consecuencia de la reacción enzimática, se formó un compuesto violeta unido al anticuerpo ligado a la proteína con la cola de His en la región N o C-terminal. Cuando el precipitado coloreado alcanzó la intensidad deseada, la reacción se detuvo lavando la membrana en agua Milli Q<sup>®</sup>.

### **C.II.8.4. Medida de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas presente en una muestra se determinó mediante el método de Bradford utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* de Bio-Rad. Para ello, se adicionaron los volúmenes adecuados de proteína o extracto a un volumen final de 1 ml de reactivo de Bio-Rad diluido cinco veces en agua Milli Q<sup>®</sup>. Las medidas espectrofotométricas de estas muestras se efectuaron a 595 nm tras 15 min de incubación. La concentración de las muestras analizadas se determinó frente a una curva patrón de BSA. Para la obtención de la curva patrón y la determinación de la concentración proteica se utilizó la aplicación *Cary Win UV Concentration Application* del espectrofotómetro.

### **C.II.8.5. Ensayo de autofosforilación de PhoR1 (MXAN4778) y desfosforilación por SixA (MXAN4780)**

El análisis de la fosforilación de PhoR1 se llevó a cabo mediante la autofosforilación *in vitro* de la proteína purificada en presencia de ATP radiactivo marcado con P<sup>32</sup> en posición  $\gamma$ . Para ello se mezclaron 35  $\mu\text{l}$  de PhoR1 purificada, concentrada y dializada en el tampón de diálisis I (C.I.3.) con 10  $\mu\text{l}$  del tampón de fosforilación (C.I.3.), incorporando 5  $\mu\text{l}$  de ATP marcado (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ), en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . Cuando se trató del extracto procedente de la fracción soluble con

PhoR1 inducido, se tomaron 10  $\mu$ l de extracto, dializado en tampón de diálisis I, con 2  $\mu$ l del tampón de fosforilación y 1  $\mu$ l de ATP marcado (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l), en un volumen final de 20  $\mu$ l. En ambos casos, las muestras se incubaron a 30°C durante 10 min. En el caso del extracto de PhoR1, la reacción se detuvo mediante la incorporación de 20  $\mu$ l de tampón de carga 2X (control 1), mientras que cuando se trató de la muestra correspondiente a PhoR1 purificada, se dializó en tampón de diálisis II (C.I.3.). A continuación, se tomaron 10  $\mu$ l de la mezcla y se le añadieron 10  $\mu$ l de tampón de carga 2X (control 2). Después se tomaron otros 10  $\mu$ l de la mezcla fosforilada de PhoR1 y se incubaron durante 30 min a 30°C. Transcurrida esa incubación se añadieron 10  $\mu$ l de tampón de carga 2X (control 3). Al resto de mezcla de fosforilación procedente de PhoR1 purificada se le añadieron 20  $\mu$ l de SixA y se fueron tomando muestras de 12.5  $\mu$ l a los 5, 10, 15 y 30 min de incubación. A cada 12,5  $\mu$ l de muestra extraídos se le fueron añadiendo 12.5  $\mu$ l de tampón de carga.

Las muestras así obtenidas se cargaron en un gel SDS-PAGE. Tras finalizar la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se procedió a realizar la autorradiografía. Para ello, se colocó una película fotográfica sobre la membrana dentro de un compartimento metálico sellado en oscuridad. A continuación, se introdujo a -80°C para minimizar la dispersión de la emisión radiactiva y se dejó impresionar la película durante una noche. Finalmente, se procedió al revelado de la película en oscuridad para detectar el marcaje de la proteína con P<sup>32</sup>. La incorporación de este grupo fosfato a PhoR1, a partir del ATP, conduce a la emisión específica de una señal radiactiva que impresiona la película justo encima de la posición que ocupa la histidina quinasa PhoR1 en el filtro.

#### **C.II.8.6. Ensayo de actividad fosfatasa de Pph2 (MXAN4779)**

Para efectuar la medida de la actividad fosfatasa de Pph2 se siguió el método descrito por Weinberg y Zusman (1990) con ligeras modificaciones.

El procedimiento aplicado para las distintas determinaciones efectuadas fue el mismo en todos los casos, diferenciándose únicamente en el tampón utilizado en función de las condiciones analizadas. Los tampones utilizados para la determinación de las distintas actividades fosfatasa se detallan en C.I.3. De este modo, a 100  $\mu$ l del tampón correspondiente se adicionaron 50  $\mu$ l de pNPP [40 mM en tampón TM (C.I.3.)] y 1-2.5  $\mu$ g de Pph2 ó 150  $\mu$ g de extracto de *E. coli* correspondiente a la fracción soluble con Pph2 inducida. En algunos casos, a la proteína purificada se le añadió extracto de *M. xanthus* concentrado correspondiente al crecimiento vegetativo. En todos los casos, la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 30 min y, transcurrido el período de incubación, la reacción se detuvo adicionando 3 ml de 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 800  $\mu$ l de 0.5 M de tetraborato sódico. Este último se empleó en los casos en los que el metal utilizado para la reacción fue manganeso. A continuación, se realizó la lectura colorimétrica a 410 nm de las muestras frente a un blanco sometido al mismo tratamiento pero en el que el volumen de la proteína purificada o del extracto había sido sustituido por un volumen igual de tampón TM. Estas lecturas se realizaron utilizando la aplicación *Cary Win UV Advanced Reads Application* de la versión 2.0 del software del espectrofotómetro.

Teniendo en cuenta el valor de absorbancia de la muestra analizada y la concentración de la proteína, cuantificada según el protocolo desarrollado en C.II.8.4., los valores de actividad fosfatasa específica se determinaron según la siguiente fórmula:

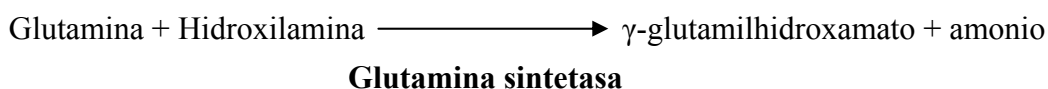
$$\text{Actividad específica} = \frac{172 \cdot A_{410}}{(\text{ml}) \cdot (\text{mg/ml}) \cdot (\text{min})}$$

donde 172 deriva del coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol y convierte la densidad óptica medida a 410 nm obtenida en los ensayos de las diferentes actividades fosfatasa en nanomoles de *p*-nitrofenol producidos; *ml* es el volumen de muestra empleado para la cuantificación de la actividad; *mg/ml* es la concentración de proteínas; y *min* representa el número de minutos durante los cuales la muestra fue incubada a 37°C antes de detener la reacción. En todas las medidas realizadas para determinar esta actividad, esta etapa de incubación se prolongó durante 30 min. Finalmente, por tanto, la actividad fosfatasa se expresa como nanomoles de *p*-nitrofenol producidos por min por miligramo de proteína.

### C.II.8.7. Ensayo de actividad de GlnA4 (MXAN5630)

#### C.II.8.7.1. Actividad glutamina sintetasa determinada mediante el método de transferencia

Para efectuar la medida de la actividad glutamina sintetasa de GlnA4 se utilizó la reacción de transferencia siguiendo el método descrito por Shapiro y Stadtman (1970). Esta reacción consiste en la producción de  $\gamma$ -glutamihidroxamato y amonio, a partir de glutamina e hidroxilamina, en presencia de ADP y arseniato potásico siguiendo la siguiente reacción:



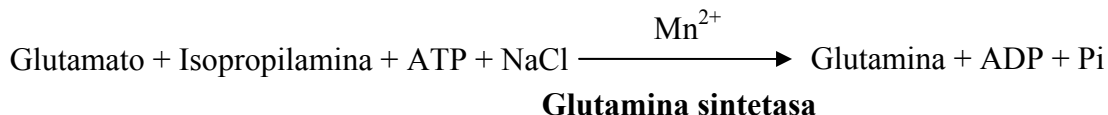
En el procedimiento empleado se preparó una mezcla de reacción dos veces concentrada por adición de los siguientes compuestos en un volumen final de 25 ml: 2 ml de imidazol, 15 ml de glutamina, 1.5 ml de  $\text{MnCl}_2$ , 2 ml de Na-ADP, 1 ml arseniato potásico y 1.5 ml hidroxilamina (neutralizada, antes de ser adicionada a los otros componentes de la mezcla, con 1.5 ml de 2 N NaOH) (C.I.3.). Una vez preparada, se tomaron 0.5 ml de la mezcla 2X y se añadió la proteína GlnA4 y agua hasta un volumen final de 1 ml. La mezcla así preparada se incubó a 37°C durante 15 min y a continuación, la reacción se detuvo mediante la adición de 2 ml de solución de parada (C.I.3.). Finalmente, las muestras se midieron espectrofotométricamente a 540 nm.

La actividad glutamina sintetasa se expresa en nanomoles de hidroxamato formados, por referencia de una curva estándar obtenida con  $\gamma$ -glutamihidroxamato. La concentración de proteínas se determina según el método indicado en C.II.8.5., para expresar la actividad específica como unidades por minuto por miligramo de proteína.

#### C.II.8.7.2. Actividad $\gamma$ -isopropilamida sintetasa determinada mediante el método de biosíntesis

Para la medida de actividad de GlnA4 utilizando como sustrato isopropilamina se empleó el método de biosíntesis, mediante el cual la enzima produce glutamina y

libera ADP y fosfato inorgánico, a partir de glutamato y amonio, en presencia de iones manganeso y de ATP. No obstante, en este caso la determinación de la actividad se llevó a cabo sustituyendo el amonio por isopropilamina y añadiendo NaCl a la mezcla de reacción siguiendo las recomendaciones descritas por de Azevedo *et al.* (2002).



Para efectuar esta medida se preparó 1 ml de mezcla de reacción dos veces concentrada compuesta de: 0.1 ml de imidazol, 0.25 ml de Na-ATP, 0.2 ml de glutamato sódico, 0.1 ml de MnCl<sub>2</sub> y 0.05 ml de NaCl (C.I.3.). A continuación se tomaron 90 µl de la mezcla de reacción 2X y se adicionan 10 µl de isopropilamina (C.I.3.). Seguidamente, se añadió GlnA4 (200 ng) y se completó el volumen de reacción hasta 200 µl con agua. Después, la mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 15 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 1.8 ml de reactivo de sulfato ferroso y, a continuación, se adicionaron 0.15 ml del reactivo de molibdato amónico (C.I.3.), la mezcla se agitó vigorosamente y, finalmente, a los 2 min se determinó el color desarrollado a 660 nm.

La hidrólisis no enzimática de ATP, así como la contaminación con fosfato inorgánico se analizó mediante una muestra que contenía todos los componentes de la reacción salvo el sustrato, es decir, isopropilamina.

La determinación de la actividad se expresa en milimoles de fosfato inorgánico formados, por comparación con una curva estándar de fosfato potásico, por mililitro de reacción.

## C.II.9. Interacciones proteicas mediante el sistema del doble híbrido de levadura

### C.II.9.1. Detección de interacciones

El sistema del doble híbrido de levadura *Matchmaker* (Clontech) está basado en GAL4 y permite identificar interacciones entre proteínas *in vivo*. En este sistema, la proteína cebo se fusiona con el dominio de unión al ADN de GAL4, mientras que la proteína presa se fusiona al dominio activador de la transcripción de GAL4. Si las proteínas de fusión interactúan entre sí, se restablece el contacto entre los dominios de GAL4 y, por tanto, esta reconstrucción quimérica del activador transcripcional estimula la expresión de los genes testigo, lo que permite su identificación.

El sistema se basa en una selección de tipo nutricional para detectar la interacción entre proteínas, mediante el empleo de medios mínimos deficientes en histidina y/o adenina. La cepa de *S. cerevisiae* 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 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 ambos.

En primer lugar, se transformó la cepa AH109 con los plásmidos que expresan el cebo y la presa. Cada uno de estos vectores dispone de un marcador nutricional esencial para seleccionar su incorporación en la levadura. Así, el vector pGBKT7 posee un gen *TRP1* y el vector pGADT7 un gen *LEU2*. En el caso de las interacciones por parejas entre dos proteínas conocidas, se cotransformó de forma simultánea la levadura con los plásmidos pGBK-cebo y pGAD-presa, y se sembró en un medio mínimo SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup> para seleccionar la incorporación conjunta de ambos plásmidos. Los transformantes aparecieron tras incubar las placas a 30°C de 2 a 3 días. En cambio, para el rastreo de la genoteca se realizó una transformación secuencial, incorporando primero el plásmido cebo pGBK y, tras seleccionar la cepa resultante en un medio mínimo SDC Trp<sup>-</sup>, se transformó a gran escala con los plásmidos pGAD, que portan los fragmentos cromosómicos procedentes de la genoteca de *M. xanthus*, en un medio mínimo SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>His<sup>-</sup>. Los transformantes que habían incorporado ambos plásmidos, y que presuntamente interactuaban, crecieron en este medio generando colonias al cabo de unos 5 días de incubación a 30°C.

Para identificar interacciones proteicas, los transformantes seleccionados en los medios mínimos SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup> o SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>His<sup>-</sup>, se picaron en medio líquido SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup> y se incubaron durante una noche a 30°C. A continuación, se hicieron diluciones decimales en 0.9% de NaCl hasta la dilución 10<sup>-4</sup> y se pusieron gotas de 10 µl correspondientes a cada dilución en los medios SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>His<sup>-</sup>, SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>Ade<sup>-</sup> y SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Ade<sup>-</sup>. Estas placas se incubaron a 30°C durante al menos una semana. 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.

Para validar la interacción entre las dos proteínas a partir de una cepa de levadura presuntamente positiva, se recurrió al análisis de las actividades enzimáticas  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasa desarrolladas por ella. Dado que la interacción proteica activa también la expresión de los genes *lacZ* y *MEL1*, igualmente dependientes de GAL4, los presuntos positivos se picaron en placas de medio SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup> adicionado con el sustrato X- $\alpha$ -Gal y se incubaron a 30°C durante al menos 2 días. La producción de una tonalidad azulada por efecto de la actividad  $\alpha$ -galactosidasa confirmó la veracidad de las interacciones proteicas detectadas. La intensidad la interacción entre ambas proteínas se estableció a partir de la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa siguiendo el procedimiento descrito a continuación.

### **C.II.9.2. Determinación cuantitativa de las interacciones proteicas mediante el sistema del doble híbrido de levadura**

#### **C.II.9.2.1. Preparación de extractos de *S. cerevisiae***

Las cepas de *S. cerevisiae* portadoras de los plásmidos con las proteínas interaccionantes se inocularon en 5 ml de medio SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup> y se incubaron a 30°C con 250 rpm de agitación durante una noche. A continuación, se añadieron los 5 ml de cultivo a un matraz de 50 ml con el mismo medio que se incubó durante 8 h hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> próxima a 0.5. Las células fueron recogidas tras centrifugar a 10000xg durante 10 min a 4°C. Seguidamente, se resuspendieron en 200 µl de solución

de lisis de levaduras (C.I.3.) y se añadieron 12.5  $\mu$ l de 40 mM de PMSF. Posteriormente, las células se rompieron por sonicación durante 5 min en pulsos de 30 seg en presencia de 0.2 g de bolas de vidrio de 0.45 mm de diámetro (Sigma). 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  $\mu$ l de solución de lisis de levaduras y se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación a 13000 rpm durante 15 min a 4°C. Finalmente, se recuperó el sobrenadante para el ensayo de actividad enzimática.

### C.II.9.2.2. Medida de actividad $\beta$ -galactosidasa

La valoración de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se llevó a cabo añadiendo 100  $\mu$ l del extracto obtenido a 0.9 ml de tampón Z/ME (C.I.3.). En el caso de la muestra utilizada como control se sustituyeron los 100  $\mu$ l del extracto por 100  $\mu$ l de tampón de lisis (C.I.3.). La reacción se inició tras añadir 0.2 ml de tampón Z/ME con ONPG (*o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido; 4 mg/ml) y se incubó la mezcla a 33°C durante el tiempo necesario para que la muestra adquiriera una tonalidad amarilla. Seguidamente, la reacción se detuvo adicionando 0.5 ml de 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A continuación, se realizó la lectura espectrofotométrica a 420 nm de las muestras frente al blanco sometido al mismo tratamiento.

Finalmente, teniendo en cuenta la concentración de proteínas, determinada siguiendo el procedimiento descrito en C.II.8.4., la actividad se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

donde 377.77 deriva del coeficiente de extinción molar del *o*-nitrofenol para las condiciones ensayadas y convierte la densidad óptica medida a 420 nm obtenida en los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en nanomoles de *o*-nitrofenol producidos; *ml* es el volumen de extracto utilizado en la determinación de la actividad; *mg/ml* es la concentración de proteínas de la muestra; y *min* representa los minutos durante los cuales la muestra fue incubada a 33°C antes de detener la reacción. Por tanto, la actividad  $\beta$ -galactosidasa se expresa como nanomoles de *o*-nitrofenol producidos por minuto por miligramo de proteína.

### C.II.10. Localización subcelular de proteínas

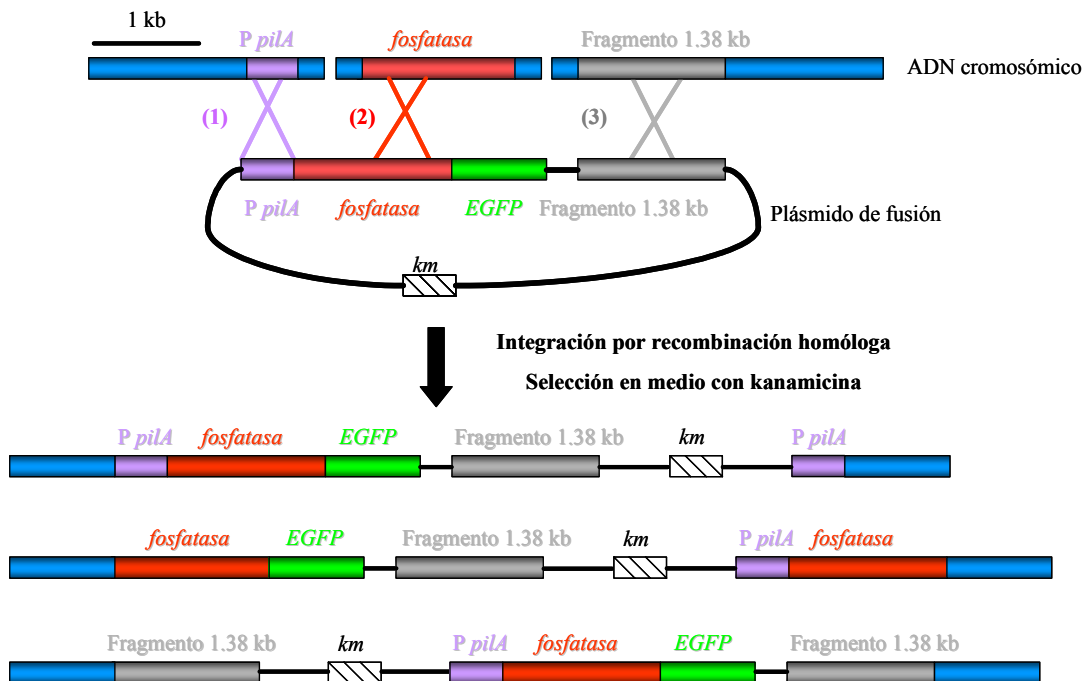
La localización subcelular de proteínas se estudió mediante la obtención de fusiones proteicas entre el extremo C-terminal de las fosfatasa y el extremo N-terminal de una variante mejorada de la proteína verde fluorescente (EGFP).

Para la construcción de estas fusiones se empleó el vector pMR2917. Este vector contiene el gen de la EGFP y un fragmento de 1.38 kb de *M. xanthus* que carece de actividad promotora y permite dirigir la integración del plásmido por recombinación homóloga. Además, contiene el promotor y la secuencia de unión al ribosoma del gen *pilA* de *M. xanthus*. El gen *pilA* se expresa a niveles elevados durante el crecimiento

## Material y Métodos

vegetativo, especialmente en un fondo genético  $\Delta pilS$ . Este vector también porta un gen de resistencia a kanamicina que permite la selección de presuntos positivos. La construcción de estas fusiones implicó la clonación de las regiones codificantes de las proteínas en fase con el gen de la EGFP. Para ello, se amplificaron por PCR los genes de ambas fosfatasa, empleando oligonucleótidos específicos que incorporasen el sitio de restricción *NheI*, y como molde el ADN cromosómico de *M. xanthus*. El producto de PCR se digirió con *NheI*, al igual que el vector pMR2917, cuyos extremos fueron desfosforilados con fosfatasa alcalina para evitar la aparición de religados, y el producto de PCR se clonó en fase con el gen EGFP (Fig. 7).

Una vez construidos los plásmidos, se dializaron y se introdujeron por electroporación en la cepa de *M. xanthus* DK10415. Los plásmidos obtenidos poseían 3 regiones de homología con el cromosoma de la mixobacteria [promotor de *pilA* (1), gen de la fosfatasa (2) y el fragmento de 1.38 kb (3)] de manera que se podían integrar, por recombinación homóloga, por cualquiera de estas regiones y no en todos los casos la construcción resultante era correcta. A partir de los presuntos positivos aparecidos en medio CTT sólido con kanamicina tras 5-7 días de incubación, la corrección de la construcción se comprobó mediante PCR con un oligonucleótido directo que anillaba al final del promotor de *pilA* y un oligonucleótido inverso que anillaba al principio del gen de *EGFP*. Las construcciones correctas eran aquellas que aseguraran la integridad de la construcción, es decir, el promotor de *pilA*, la fosfatasa diana y el gen de la EGFP. Una vez seleccionada la construcción correcta se pudo visualizar la localización de las proteínas fusionadas en las condiciones deseadas.



**Figura 7.** Construcción de una fusión entre un gen de *M. xanthus* y el gen *EGFP*. La integración en el cromosoma de *M. xanthus* se puede producir por cualquiera de las 3 regiones señaladas. Son correctas las construcciones obtenidas como consecuencia de la recombinación en la región del promotor del gen *pilA* (1) y en el fragmento de 1.38 kb sin actividad promotora (3).

Las cepas de *M. xanthus* que portaban las construcciones fueron tratadas siguiendo las indicaciones descritas por Welch y Kaiser (2001). Para ello las muestras se cultivaron en medio CTT con kanamicina hasta una  $DO_{600}$  entre 0.7 y 1. Para la observación de la localización subcelular durante el crecimiento vegetativo se depositó una gota de 0.5  $\mu$ l en medio CTT sólido depositado sobre un portaobjetos y se pasó a su observación inmediata mediante microscopía de fluorescencia. Cuando se trató del ciclo de desarrollo, el cultivo fue concentrado hasta una densidad celular de  $5 \times 10^9$  células/ml. Para evitar la excesiva señal de fluorescencia originada como consecuencia de la acumulación de células durante la formación de los cuerpos fructificantes, la cepa de *M. xanthus* portadora de la construcción fue diluida en una proporción 1:50 con la cepa DK10415 concentrada a la misma densidad celular. Una muestra de 1  $\mu$ l de la mezcla resultante fue depositada en medio TPM sólido situado sobre un portaobjetos. Las preparaciones fueron incubadas a 32°C y observadas a las 8, 24 y 32 h, una vez adicionando 1  $\mu$ g/ml DAPI, en los microscopios de epifluorescencia Nikon (Melville, NY) Eclipse E600, equipado con filtro Nikon Chroma 41017 Endow y cámara digital Nikon Coolpix 5000 o *Cell R IX81*.

### C.II.11. Estudio del perfil de expresión de genes de *M. xanthus*

La construcción de cepas portadoras de fusiones entre el gen *lacZ* de *E. coli* y un gen de interés de *M. xanthus* permitió establecer tanto el momento como el nivel de expresión del gen analizado a lo largo del ciclo de vida de esta bacteria. En primer lugar, se llevó a cabo la construcción de la fusión para después pasar a realizar un análisis cualitativo, que determinara las condiciones de expresión y, posteriormente, se procedió a la cuantificación del nivel de expresión.

#### C.II.11.1. Construcción de una fusión entre un gen de *M. xanthus* y el gen *lacZ* de *E. coli*

En las construcciones resultantes, el gen *lacZ* de *E. coli* queda bajo el control del promotor del gen cuya actividad se quiere analizar, para lo cual es clonado en la misma pauta de lectura. De este modo, cuando se expresa el gen de interés, se transcribe el gen *lacZ* dando lugar a la producción de la proteína  $\beta$ -galactosidasa, cuya actividad enzimática puede ser cuantificada.

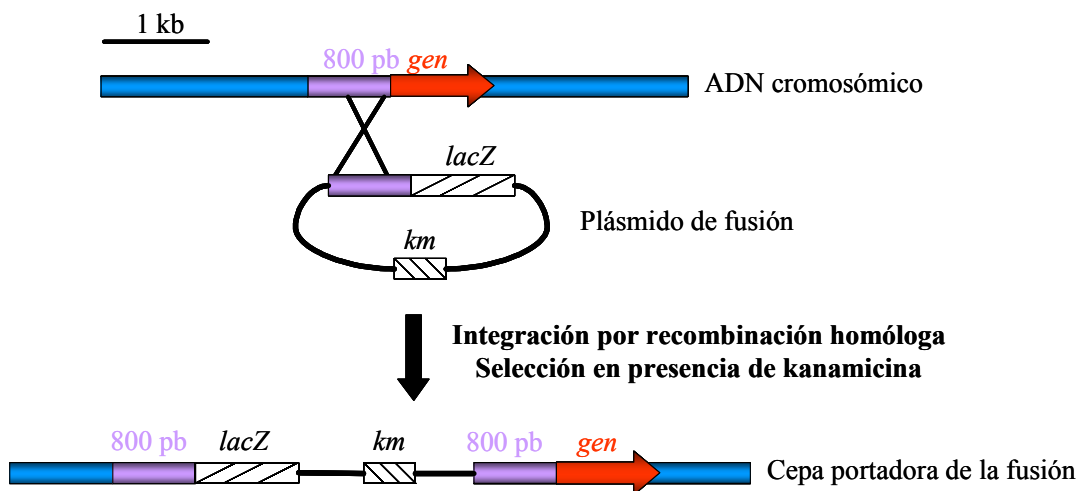


Figura 8. Construcción de una fusión entre un gen de *M. xanthus* y el gen *lacZ* de *E. coli*.



Para la construcción de estas fusiones se utilizó el vector pKY481. Este vector posee el gen *lacZ* de *E. coli* y un marcador de resistencia a kanamicina que permite la selección de presuntos positivos. La construcción implicó la clonación de un fragmento de unas 800 pb localizado delante del gen cuya expresión se deseaba analizar. Para ello, se amplificó por PCR ese fragmento empleando oligonucleótidos específicos que incorporasen los sitios de restricción deseados, y como molde el ADN cromosómico de *M. xanthus*. El producto de PCR se digirió con las enzimas adecuadas, al igual que el vector pKY481, y se clonó en fase con el gen *lacZ* de *E. coli* (Fig. 8). Según el caso, la fusión con el gen *lacZ* del vector se realizó en el codón de inicio del gen de *M. xanthus* o bien sobre los primeros codones del mismo.

Una vez finalizada la construcción, se procedió a su introducción en la mixobacteria mediante electroporación del plásmido dializado. De este modo, la incorporación de la construcción al cromosoma de la cepa adecuada de *M. xanthus* se debía producir mediante un único proceso de recombinación asegurando, por tanto, la integridad de la construcción realizada. Las células electroporadas fueron cultivadas en medio CTT sólido con kanamicina, de modo que sólo podrían crecer las bacterias que hubiesen incorporado el plásmido. Transcurridos varios días de incubación a 30°C, algunas de las colonias aparecidas en el medio con kanamicina fueron seleccionadas como presuntos positivos y analizadas mediante Southern blot.

### **C.II.11.2. Determinación cualitativa de la actividad $\beta$ -galactosidasa en *M. xanthus***

Para efectuar esta determinación, los medios sólidos utilizados para el análisis de las distintas cepas fueron suplementados con X-gal y en ellos fue depositada una gota de 10  $\mu$ l de cultivo concentrado a una DO<sub>600</sub> de 15. La aparición de un precipitado de color azulado en la zona donde se encontraban las células, como consecuencia de la hidrólisis del X-gal por la acción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, fue indicativo del momento de expresión de los genes analizados, mientras que la intensidad del color azul permitió establecer una valoración acerca del nivel de expresión de esos genes.

### **C.II.11.3. Determinación cuantitativa de la actividad $\beta$ -galactosidasa en *M. xanthus***

La cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las cepas de mixobacteria portadoras de fusiones con el gen *lacZ* de *E. coli* se efectuó siguiendo el procedimiento descrito por Kroos *et al.* (1986).

#### **C.II.11.3.1. Preparación de extractos de *M. xanthus***

Las bacterias cuyas actividades se querían medir fueron cultivadas en medio líquido CTT con kanamicina a 30°C y 300 rpm de agitación hasta que los cultivos alcanzaron una DO<sub>600</sub> de 1. Las células fueron recogidas mediante centrifugación a 10000xg durante 10 min a temperatura ambiente y concentradas a una DO<sub>600</sub> de 15 en TM (C.I.3.). Posteriormente, se sembraron en placas de medio sólido adecuado (CTT, CF, TPM o TM) a razón de 200  $\mu$ l de cultivo por placa. Las placas se mantuvieron en incubación a 30°C y las células se recogieron a diferentes tiempos, conservando las muestras a -20°C hasta su sonicación. Para ello, las muestras fueron resuspendidas en 200  $\mu$ l de tampón TM y sonicadas durante 5 min en pulsos de 30 seg. Durante la

sonicación, las muestras se mantuvieron en hielo. Para posibilitar su ruptura, las muestras que contenían mixósporas se sonicaron en presencia de bolas de vidrio (Sigma), que previamente habían sido equilibradas en tampón TM. Tras la sonicación, las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 5 min a 4°C y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y conservado a -20°C hasta el momento de efectuar la medida de la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

### C.II.11.3.2. Medida de actividad $\beta$ -galactosidasa

En primer lugar, se midió la concentración de proteínas siguiendo el procedimiento descrito en C.II.8.5. A continuación, para la determinación de la actividad, se adicionaron de 30 a 50  $\mu$ g del extracto a ensayar en 450  $\mu$ l de tampón Z con ONPG (1 mg/ml) (C.I.3.) y se completó con tampón TM (C.I.3.) hasta obtener un volumen final de 500  $\mu$ l. Puesto que los extractos de *M. xanthus* presentan una tonalidad amarillenta, al igual que el producto de la degradación enzimática del ONPG, se preparó un lote paralelo de muestras en las que los 450  $\mu$ l de tampón Z con ONPG fueron reemplazados por 450  $\mu$ l de tampón Z únicamente. En ambos casos, la mezcla resultante se incubó a 37°C hasta que el desarrollo del color amarillo adquirió la intensidad adecuada (0.6-0.9 de DO<sub>420</sub>) o hasta un período máximo de 3 h de incubación, momento en el que la reacción se detuvo adicionando 0.5 ml de 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Finalmente, se realizó la lectura espectrofotométrica a 420 nm de las muestras, frente a blancos sometidos al mismo tratamiento en los que el extracto que se quería analizar fue reemplazado por 50  $\mu$ l de tampón TM.

La actividad específica, en nanomoles de *o*-nitrofenol (ONP) producidos por minuto y por miligramo de proteína, se obtuvo siguiendo la ecuación:

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

donde 213 deriva del coeficiente de extinción molar del *o*-nitrofenol y convierte la densidad óptica medida a 420 nm obtenida en nanomoles de *o*-nitrofenol producidos; *ml* es el volumen de extracto utilizado en la determinación de la actividad; *mg/ml* es la concentración de proteínas de la muestra; y *min* representa los minutos durante los cuales la muestra fue incubada a 37°C antes de detener la reacción.

## C.II.12. Construcción y caracterización de mutantes de delección

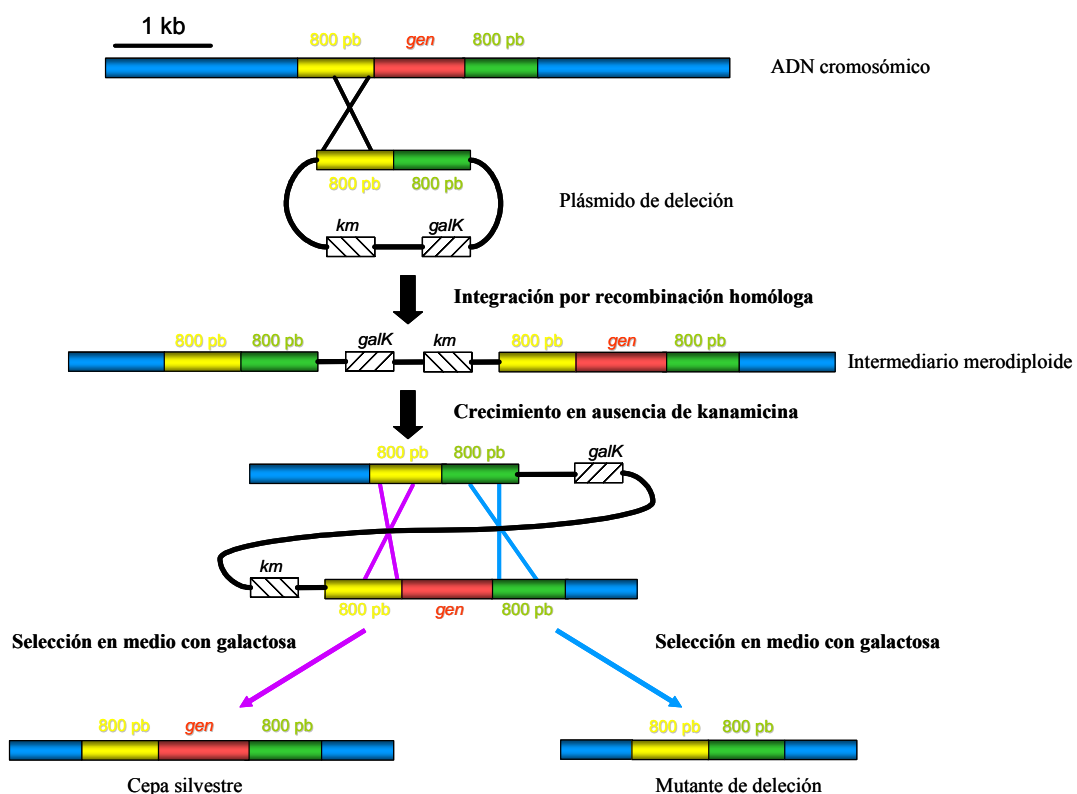
### C.II.12.1. Construcción de mutantes de delección de *M. xanthus*

El primer paso para la obtención de cepas de *M. xanthus* mutantes de delección fue la construcción de un plásmido portador de dicha delección. Para ello, se clonaron dos fragmentos de ADN cromosómico de *M. xanthus* de al menos 800 pb, uno situado inmediatamente delante del gen que se quería deleccionar y otro localizado inmediatamente detrás del gen de interés, manteniendo la pauta de lectura y conectados por un sitio de restricción (Fig. 9). Estos fragmentos se amplificaron por PCR con oligonucleótidos específicos que portaban las secuencias reconocidas por las enzimas de

## Material y Métodos

restricción adecuadas, y se clonaron en el vector pBJ113 digerido con las mismas enzimas. El vector, además de contener un marcador seleccionable de resistencia a kanamicina, incluye el gen de la galactoquinasa (*galK*), lo que provoca sensibilidad a la galactosa.

A continuación, la cepa silvestre de *M. xanthus* se electroporó con el plásmido portador de la deleción dializado y los intermediarios merodiploides, que se obtuvieron en CTT sólido con kanamicina tras 5 a 7 días de incubación a 30°C, fueron analizados mediante Southern blot. Una vez seleccionado el intermediario correcto, se sembró secuencialmente en medio CTT sólido y líquido sin kanamicina, durante un día en cada caso, para permitir la pérdida del plásmido por recombinación homóloga. A partir del cultivo líquido, se realizaron diluciones en medio CTT líquido hasta la dilución  $10^{-4}$  y 100  $\mu$ l de estas diluciones fueron depositados en 4.5 ml de CTT blando y plaqueados en CTT sólido con galactosa. Tras 5-7 días de incubación, las colonias resultantes de las diluciones se picaron en paralelo en medio CTT sólido con kanamicina y en medio CTT sólido con galactosa para seleccionar las que eran capaces de crecer en presencia de galactosa y no de kanamicina. Estas colonias se analizaron mediante Southern blot para diferenciar las que habían revertido a silvestre de los mutantes de deleción.



**Figura 9.** Obtención de una cepa de *M. xanthus* portadora de una deleción. La recombinación se puede dar en el primer fragmento de 800 pb (amarillo) o en el segundo (verde) dando lugar a la incorporación del plásmido en el cromosoma. En la imagen sólo se representa una de las dos posibilidades.

## C.II.12.2. Caracterización de mutantes de delección

### C.II.12.2.1. Crecimiento vegetativo en medio líquido

El estudio de la curva de crecimiento se realizó como parte de la caracterización de las cepas portadoras de delecciones para diferentes genes por comparación con el crecimiento de la cepa silvestre DZF1.

Para ello, las bacterias fueron inoculadas en tubos que contenían 5 ml de medio CTT líquido e incubados a 30°C en agitación (300 rpm) durante una noche. Transcurrido el período de incubación, se determinó la  $DO_{600}$  de los cultivos y, a continuación, las muestras fueron diluidas en tubos que contenían 5 ml de medio CTT líquido hasta una  $DO_{600}$  de partida de 0.05. Tras unos instantes de agitación, se tomó una primera medida para determinar el valor de absorbancia correspondiente al tiempo 0 de cada una de las cepas analizadas. Periódicamente se tomaron medidas de los cultivos para determinar su  $DO_{600}$  en el espectrofotómetro *Spectronic 20D+*.

El estudio del efecto del CCCP sobre el crecimiento de *M. xanthus*, se realizó mediante la adición de este compuesto en distintas concentraciones a cultivos que presentaban una  $DO_{600}$  de partida de 0.05. El crecimiento experimentado para cada cepa se valoró, tras 24 h de incubación a 30°C y 300 rpm de agitación, mediante la determinación de su  $DO_{600}$  en el mismo espectrofotómetro.

### C.II.12.2.2. Movilidad por deslizamiento

El análisis del deslizamiento de las mixobacterias mutantes se determinó mediante la observación de su desplazamiento a lo largo del tiempo sobre la superficie de un medio sólido, en comparación con la bacteria silvestre. Para ello, un cultivo crecido de cada cepa a una  $DO_{600}$  de 1 fue centrifugado a 10000xg durante 10 min a temperatura ambiente, para concentrarlo en tampón TM (C.I.3.) a una  $DO_{600}$  de 15. Posteriormente, se depositaron en el centro de placas Petri de 5.5 cm de diámetro, que contenían 8 ml de medio sólido, gotas de 10  $\mu$ l de estos cultivos concentrados.

Para el análisis de la movilidad aventurera se emplearon los medios CTT, CYE y 3/5 CTT (con 0.6% de Bacto-casitona) suplementados con 1.5% de agar, mientras que estos mismos medios fueron adicionadas con 0.4% de agar para el estudio de la movilidad social. El resultado se obtuvo midiendo el diámetro de la colonia tras incubar las muestras durante una semana.

### C.II.12.2.3. Fenotipo durante el ciclo de desarrollo

El análisis fenotípico de las cepas mutantes de *M. xanthus* durante el ciclo de desarrollo se llevó a cabo tras sembrar las bacterias en medios de cultivo pobres en nutrientes, capaces de inducir el desarrollo multicelular en *M. xanthus* y tomando como control a la bacteria silvestre DZF1. Para ello, un cultivo crecido a una  $DO_{600}$  de 1 de cada cepa de *M. xanthus* se centrifugó a 10000xg durante 10 min a temperatura ambiente. Las células recogidas, se lavaron con tampón TM (C.I.3.) y, tras ser centrifugadas en las mismas condiciones anteriores, se resuspendieron en TM a una  $DO_{600}$  de 60 y 15. A continuación, se tomaron 10  $\mu$ l del cultivo concentrado y se depositaron en forma de gota sobre placas de 5.5 cm de diámetro con 8 ml de medio CF,

TPM o TM. Las muestras fueron incubadas a 30°C y se siguió a la lupa de forma periódica el transcurso del ciclo de desarrollo de cada cepa hasta las 96 h de incubación, tomando imágenes a lo largo del tiempo.

#### **C.II.12.2.4. Recuento de esporas**

Las cepas de mixobacteria cuyas esporas se deseaban recontar fueron cultivadas en medio CTT líquido a 30°C y 300 rpm de agitación hasta que los cultivos alcanzaron una DO<sub>600</sub> de 1. En ese instante, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 10000xg durante 10 min a temperatura ambiente. El sedimento obtenido fue lavado en tampón TM (C.I.3.). Tras una nueva centrifugación, el cultivo fue concentrado en TM hasta una DO<sub>600</sub> de 15 y diseminado en placas que contenían el medio de cultivo inductor del desarrollo a razón de 200 µl por placa, distribuidos en 10 gotas. Las placas fueron incubadas a 30°C y transcurridas 24, 32, 48, 72 y 96 h, se recogieron muestras raspando la superficie del medio. A continuación, se procedió a su sonicación para eliminar los bacilos presentes en las mismas y dispersar las esporas que se encontrasen agregadas. Para ello, las muestras fueron recogidas en 200 µl de tampón TM y sonicadas durante 1.5 min en pulsos de 30 seg. Antes de proceder a su recuento, las muestras sonicadas fueron diluidas 10 veces en tampón TM en el caso de extractos recogidos tras 32 y 48 h de incubación en medio de desarrollo, ó 100 veces en el mismo tampón cuando se trataba de muestras recogidas tras 72 y 96 h de incubación. El recuento se efectuó en una cámara *Petroff-Hausser*. El resultado del recuento se expresó como número de esporas/placa.

#### **C.II.12.2.5. Germinación de esporas**

Para determinar el porcentaje de esporas viables, efectuado siguiendo el procedimiento descrito por Wu *et al.* (1998), se utilizaron los mismos extractos empleados para efectuar el recuento de esporas. Las muestras sonicadas fueron descongeladas a temperatura ambiente, incubadas en un baño a 50°C durante 2 h y, a continuación, sonicadas durante 30 seg. El objetivo de esta sonicación era dispersar las esporas que se encontrasen agrupadas.

Posteriormente, las muestras fueron diluidas 1:100000 en tampón TPM (C.I.3.) y 50 µl de muestra diluida fueron adicionados a 5 ml de medio CTT blando mantenido en sobrefusión en un baño a 50°C. Tras homogeneizar la muestra, el medio semisólido se distribuyó uniformemente sobre una placa de 20 ml de CTT. Las placas fueron incubadas a 30°C y, finalmente, el número de esporas viables fue determinado en función del número de colonias aparecidas tras 7 días de incubación. La eficiencia de la esporulación, por su parte, fue calculada dividiendo el número de esporas viables entre el número de esporas recontadas en la muestra de partida.

## **D. RESULTADOS**



## D.I. BÚSQUEDA Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS PROTEÍNAS FOSFATASAS CODIFICADAS EN EL GENOMA DE *Myxococcus xanthus*

Como se ha comentado en la Introducción, las fosfatasa se agrupan en 4 superfamilias en función de su secuencia: fosfoproteínas fosfatasa (PPP), proteínas fosfatasa dependientes de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  (PPM), fosfotirosina fosfatasa (PTP) dentro de las cuales se incluyen las familias fosfotirosina fosfatasa convencionales (CPTP) y fosfotirosina fosfatasa de bajo peso molecular (LMMPTP) y, por otro lado, polimerasa e histidinol fosfatasa (PHP), que incluyen tirosina fosfatasa dependientes de  $Mn^{2+}$  (Shi *et al.*, 1998; Morona *et al.*, 2002).

El primer objetivo de este trabajo fue la identificación de genes que codifican fosfatasa en el genoma de *Myxococcus xanthus*. La estrategia de búsqueda empleada consistió en confrontar la secuencia consenso de cada superfamilia de fosfatasa, definida por la base de datos Pfam (Finn *et al.*, 2008), frente a la secuencia del genoma de *M. xanthus* utilizando el programa BLASTP (Altschul *et al.*, 1997). Posteriormente se validó manualmente el resultado obtenido comparando las supuestas fosfatasa identificadas de *M. xanthus* con fosfatasa de otros organismos presentes en las bases de datos.

Este análisis reveló la presencia en el genoma de *M. xanthus* de proteínas pertenecientes a las 4 superfamilias de fosfatasa, un hecho que acontece en muy pocos procariontes, siendo los miembros de la superfamilia PPP los más abundantes. El número total de genes que codifican proteínas fosfatasa es de 34, lo que corresponde, aproximadamente, a un tercio de las quinasas que posee esta bacteria (99). Sin embargo, que el número de fosfatasa sea menor que el de quinasas es un hecho extendido en la mayoría de organismos, procariontes y eucariotes (Kennelly, 2002).

De los 34 genes que codifican fosfatasa sólo 4 parecen formar parte de un operón con genes que cifran quinasas: tres de estos genes codifican fosfatasa de la superfamilia PPP y uno de la superfamilia PPM.

Por otro lado, las 4 fosfotirosinas fosfatasa de *M. xanthus* se encuentran agrupadas en el primer cuarto del genoma, a diferencia del resto de fosfatasa pertenecientes a las superfamilias PPP y PPM, las cuales se distribuyen a lo largo del mismo (Tabla 13).

### D.I.1. Superfamilia PPP

En *M. xanthus* se encontraron sólo dos genes que codifican fosfatasa de tipo PPP con los tres motivos definidos para esta superfamilia (Shi *et al.*, 1998; Zhang y Shi, 2004), las codificadas por MXAN1509 y MXAN5467. Sin embargo, todas las fosfatasa pertenecientes a esta superfamilia presentan el Pfam de metalofosfatasa (PF00149), el cual no viene definido exactamente por las secuencias conservadas definidas por Shi y colaboradores. Los residuos conservados en las metalofosfatasa están implicados en la unión de metales requerida para la desfosforilación (Egloff *et al.*, 1995).



## Resultados

El análisis del genoma de *M. xanthus* reveló 33 genes que codifican proteínas con el Pfam de metalofosfatasa. Este Pfam engloba también a nucleotidasas, esfingomielina fosfodiesterasas, 2'-3'AMPc fosfodiesterasas y nucleasas, lo que dificulta la determinación del número exacto de fosfatasa de tipo PPP. Seis de las 33 proteínas presentan el dominio metalofosfatasa junto con un dominio nucleotidasa, de modo que estas proteínas poseerán actividad nucleotidasa (MXAN2236, 2661, 4313, 5325, 5361 y 6266), razón por la que no fueron consideradas en este estudio.

MXAN2579 codifica una proteína multidominio con un dominio PKD en el extremo C-terminal, implicado en las interacciones proteína-proteína y proteína-carbohidrato. Este dominio suele presentar una localización extracelular. De hecho, MXAN2579 posee una secuencia péptido señal, de modo que será secretada al espacio periplásmico, razón por la que fue excluida como fosfatasa perteneciente a la superfamilia PPP.

Finalmente, la proteína cifrada por el gen MXAN0958 muestra gran similitud con la subunidad C de exonucleasa Sbc. Además, este gen se localiza junto a un gen que codifica una proteína con similitud con la subunidad D del mismo tipo de exonucleasa. Por estas dos razones este gen también se excluyó del análisis.

Los 25 genes restantes pueden codificar Ser/Thr fosfatasa. Estas proteínas de *M. xanthus* presentan la mayoría de los residuos implicados en la unión de los metales catalíticos, por lo que podrían tener actividad fosfatasa. El tamaño de las proteínas codificadas por dichos genes oscila entre 217 y 485 residuos (Tabla 13). Sólo 5 de las 25 proteínas presentan regiones transmembrana en la porción N-terminal, lo que indica que deben estar ancladas a la membrana con el dominio catalítico localizado en el citoplasma. El resto de proteínas fosfatasa de este tipo se localiza en el citoplasma de *M. xanthus* (Tabla 13).

### D.I.2. Superfamilia PPM

Como se ha mencionado en la Introducción, esta superfamilia incluye a las familias PP2C y SpoIIE.

En el genoma de *M. xanthus* hay 4 genes que poseen el Pfam de fosfatasa de tipo PP2C (PF00481) (Tabla 13). Tres de ellas poseen un tamaño que va de 247 a 265 aminoácidos, coincidente con el tamaño del dominio PP2C, mientras que la fosfatasa MXAN4398, de 442 aminoácidos, posee un motivo de unión de nucleótidos cíclicos NMPc (PF00027) localizado en el extremo C-terminal y el dominio PP2C en el extremo N-terminal.

Por su parte, únicamente se identificó un gen que codifica una fosfatasa de tipo SpoIIE (PF07228), MXAN4562 (Tabla 13). Esta fosfatasa de *M. xanthus* posee una arquitectura multidominio, con un dominio HAMP en el centro de la proteína y el dominio SpoIIE en el extremo C-terminal. Además se encuentra anclada a la membrana.

Tabla 13. Proteínas fosfatasa en el genoma de *M. xanthus*.

Superfamilia	Familia	Gen	Tamaño (aa)	Localización
PPM	PP2C	MXAN1412	247	Citoplasma
		MXAN2044	254	Citoplasma
		MXAN4398	442	Citoplasma
		MXAN5349	265	Citoplasma
	SpoIIE	MXAN4562	521	Membrana
PPP		MXAN0149	417	Citoplasma
		MXAN0267	367	Citoplasma
		MXAN0344	245	Citoplasma
		MXAN0414	379	Membrana
		MXAN0555	276	Citoplasma
		MXAN0888	465	Membrana
		MXAN1272	290	Citoplasma
		MXAN1509	235	Citoplasma
		MXAN2613	310	Citoplasma
		MXAN3577	485	Citoplasma
		MXAN3722	260	Citoplasma
		MXAN4086	398	Membrana
		MXAN4207	399	Membrana
		MXAN4514	375	Citoplasma
		MXAN4779	316	Citoplasma
		MXAN4882	234	Citoplasma
		MXAN5131	256	Citoplasma
		MXAN5467	339	Citoplasma
		MXAN6076	217	Citoplasma
		MXAN6105	276	Citoplasma
MXAN6383	426	Membrana		
MXAN6543	336	Citoplasma		
MXAN6890	389	Citoplasma		
MXAN6972	300	Citoplasma		
MXAN7163	230	Citoplasma		
PTP	CPTP	MXAN0419	214	Citoplasma
		MXAN0448	193	Citoplasma
		MXAN1665	237	Membrana
	LMMPTP	MXAN0575	135	Citoplasma

### D.I.3. Superfamilias PTP

Esta superfamilia también engloba dos familias de tirosina fosfatasas, CPTP y LMMPTP (Shi *et al.*, 1998).

En el genoma de *M. xanthus* hay 3 genes que codifican fosfatasas pertenecientes a la familia CPTP que muestran el Pfam de fosfatasas con especificidad dual (PF00782). Dos de ellas se localizan en el citoplasma, mientras que la tercera está anclada a la membrana a través de dos regiones transmembrana localizadas en el extremo N-terminal (Tabla 13).

Por otro lado, tan sólo se identificó una proteína perteneciente a la familia LMMPTP (PF01451), cuya localización es citoplasmática (Tabla 13).

### D.I.4. Superfamilia PHP

En el genoma de *M. xanthus* se han identificado 7 genes que codifican proteínas con el Pfam PHP (PF02811). Pero este Pfam engloba además de tirosina fosfatasas dependientes de metal, a la subunidad  $\alpha$  de la ADN polimerasa III, familia X ADN polimerasa e histidinol fosfatasa (Aravind y Koonin, 1998), por lo que el conocimiento del número exacto de proteínas fosfatasas de este tipo resulta complicado, como ocurre con la superfamilia PPP. Cuatro de las 7 proteínas identificadas (MXAN2739, 2757, 3697 y 4715) carecen de los residuos altamente conservados presentes en este tipo de proteínas, por lo que fueron descartadas como fosfatasa PHP.

Por su parte, MXAN3982 y MXAN5844 codifican proteínas multidominio, ya que poseen, además del dominio PHP, un dominio subunidad  $\alpha$  de la ADN polimerasa III, por lo que podrían formar parte de esta polimerasa bacteriana y no actuar como tirosina fosfatasas.

La proteína restante, codificada por el MXAN4427, podría ser una tirosina fosfatasa perteneciente a la superfamilia PHP ya que presenta los 4 motivos conservados y la mayoría de los residuos absolutamente conservados presentes en este tipo de enzimas, pero no está claro por lo que no se consideró en este análisis.

## D.II. ESTUDIO DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN FOSFATASAS DE *M. xanthus*

Una vez completado el análisis bioinformático de los genes que cifran fosfatasas en el genoma de *M. xanthus*, se seleccionaron 5 de ellas pertenecientes a las superfamilias PPM, PPP y PTP, eligiendo proteínas de membrana y citoplasmáticas, con el objetivo de tener una muestra representativa (Tabla 14). Para efectuar este análisis, la estrategia seguida fue la construcción de fusiones entre cada uno de los genes que codifican estas fosfatasas y el gen *lacZ* de *Escherichia coli*.

**Tabla 14.** Características principales de las fosfatasa seleccionadas para su análisis a lo largo del ciclo de vida de *M. xanthus*.

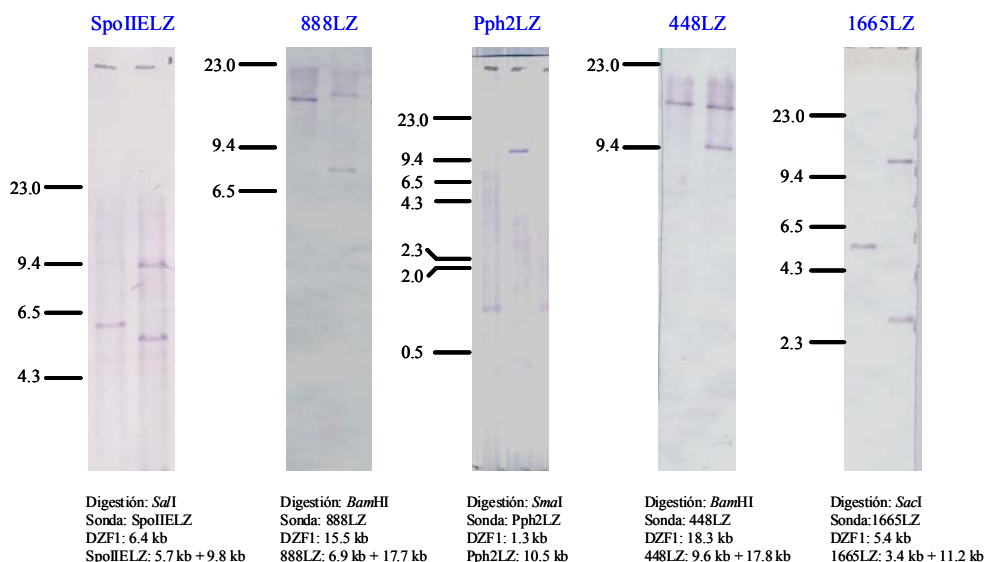
Superfamilia	MXAN	Homología	Pfam	Localización	Tamaño (Aa)
PPM	4562	Ser/Thr fosfatasa	SpoIIE (5.3e-49)	Membrana	591
PPP	0888	Ser/Thr fosfatasa	Metalofosfatasa (5.1e-15)	Membrana	465
	4779	Ser/Thr fosfatasa	Metalofosfatasa (8.1e-13)	Soluble	315
PTP	0448	Fosfatasa dual	Especificidad dual (2e-5)	Soluble	193
	1665	Fosfatasa dual	Tyr fosfatasa (2e-3)	Membrana	237

La obtención de estas fusiones se llevó a cabo como se detalla en Material y Métodos (C.II.11.1.) y los oligonucleótidos empleados para cada fusión se muestran en la Tabla 5. Las fusiones se efectuaron en el codón de iniciación en el caso de las fosfatasa MXAN0888 y 4779, sobre los primeros aminoácidos en la fusión de MXAN0448 y justo delante de los dominios fosfatasa en MXAN4562 y 1665. Los productos de PCR obtenidos fueron digeridos con *XhoI-BamHI* para MXAN0888 y 4779 y *KpnI-BamHI* para el resto de fusiones. El vector empleado en todos los casos fue pKY481 digerido con las mismas enzimas de restricción que los productos de PCR correspondientes. Los plásmidos obtenidos se denominaron pKY-SpoIIE, pKY-888, pKY-Pph2, pKY-448 y pKY-1665, y las cepas de *M. xanthus* portadoras de cada fusión, obtenidas tras la electroporación de estos plásmidos y analizadas mediante Southern blot (Fig. 10), se denominaron SpoIIE LZ, 888 LZ, Pph2 LZ, 448 LZ y 1665 LZ para MXAN4562, 0888, 4779, 0448 y 1665, respectivamente.

En cada una de las cepas de *M. xanthus* portadoras de fusiones *lacZ*, la síntesis de la enzima  $\beta$ -galactosidasa sólo se produce cuando se activa la expresión del gen fusionado, de manera que la actividad desarrollada en cada momento se correlaciona de forma directa con el nivel de expresión de la fosfatasa analizada. Por tanto, para establecer el patrón de expresión de cada gen, se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa presentada por la cepa portadora de la fusión a lo largo del ciclo de vida de *M. xanthus*.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa de cada una de las cepas se analizó de forma cualitativa, siguiendo el procedimiento descrito en C.II.11.2., tanto durante el crecimiento vegetativo, en medio CTT, como durante el ciclo de desarrollo, en los medios CF, TPM y TM, suplementados en todos los casos con el sustrato X-gal. El desarrollo de una tonalidad azulada tras la modificación de este compuesto por la enzima  $\beta$ -galactosidasa sirvió como indicador para conocer el perfil y grado de expresión del gen de cada fosfatasa a lo largo del ciclo de vida de *M. xanthus*.

## Resultados

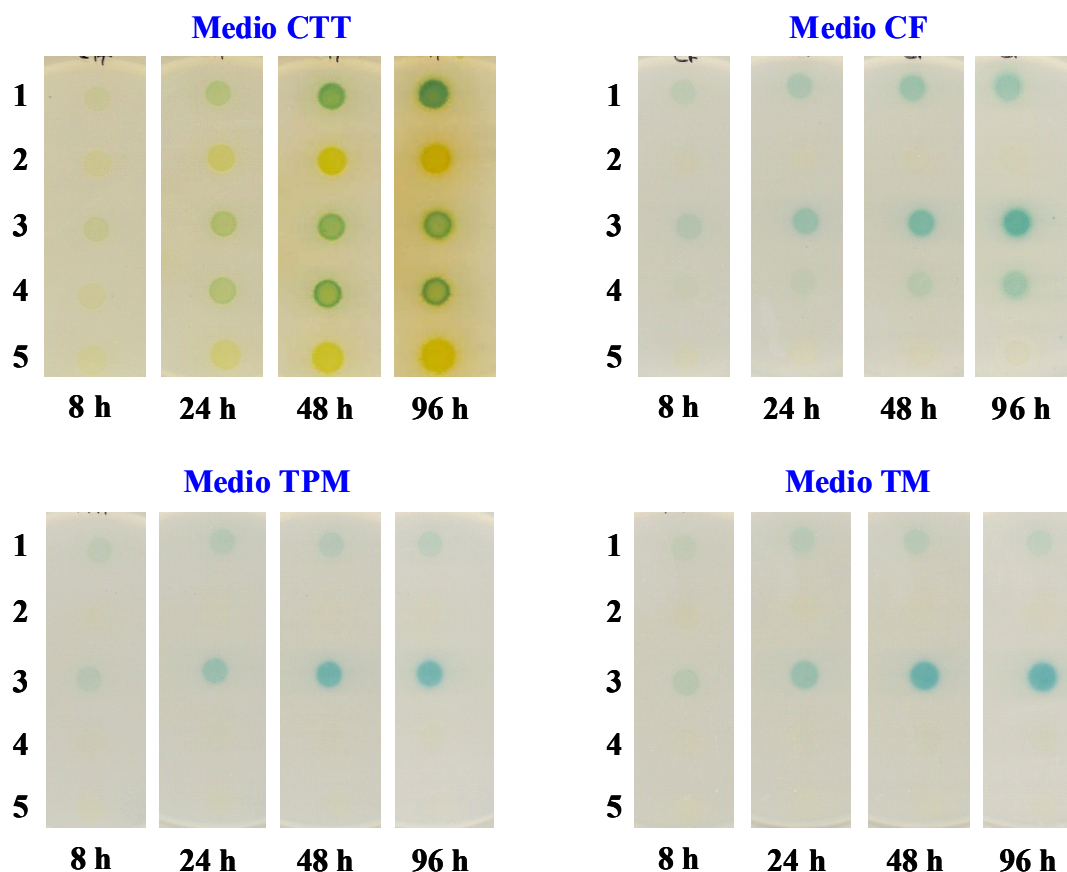


**Figura 10.** Análisis mediante Southern blot de las cepas portadoras de fusiones *lacZ* con los genes de las fosfatasa de *M. xanthus*. En todos los casos, en la primera calle se analiza el cromosoma de la cepa silvestre y en la segunda el de la cepa portadora de la fusión. Se indica la fusión de que se trata, la digestión realizada para la comprobación, la sonda empleada y el tamaño de los fragmentos esperados para el silvestre y las fusiones. El tamaño del estándar se muestra en kb.

Como se puede observar en la Fig. 11, los genes codificantes de las fosfatasa SpoIIE (gota 1), Pph2 (gota 3) y MXAN0448 (gota 4) se expresan tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo. Por el contrario, los genes de las fosfatasa MXAN0888 (gota 2) y MXAN1665 (gota 5) no se expresan en las condiciones analizadas, o alcanzan unos niveles de expresión indetectables con esta técnica.

Durante el crecimiento vegetativo, la expresión de los genes que codifican las tres fosfatasa comienza a detectarse a las 8 horas de incubación, pero los niveles de expresión alcanzados por *spoIIE* (Fig. 11, gota 1) parecen ser ligeramente superiores a los de los otros dos genes, cuyos perfiles de expresión se muestran muy similares a lo largo del tiempo en este medio (Fig. 11, gotas 3 y 4).

Con respecto al ciclo de desarrollo, se aprecian diferencias en los patrones de expresión en los tres medios analizados: CF, TPM y TM. Conviene recordar que estos medios se diferencian en la cantidad de nutrientes presentes (C.I.2.2.). Como se observa en la Fig. 11, en el medio CF los tres genes cuya expresión es detectable se expresan a partir de las 8 horas de incubación, pero los niveles alcanzados son diferentes. Así, el gen *pph2* (gota 3) muestra el nivel de expresión superior, mientras que MXAN0448 (gota 4) presenta cualitativamente la actividad  $\beta$ -galactosidasa menos acentuada, manteniéndose estas diferencias a lo largo del tiempo. En el caso de los otros dos medios del desarrollo, TPM y TM, la situación es muy similar en ambos. En estas condiciones sólo se detecta expresión de *spoIIE* (gota 1) y *pph2* (gota 3), mientras que el gen MXAN0448 (gota 4) no muestra expresión. Al igual que en el medio CF, los genes de las fosfatasa que se expresan lo hacen transcurridas 8 horas del ciclo de desarrollo y los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa alcanzados por *pph2* (gota 3) son superiores a los del gen *spoIIE* (gota 1), aunque en estos medios las diferencias de expresión entre los genes que cifran ambas fosfatasa son más marcadas.



**Figura 11.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa durante el crecimiento vegetativo (medio CTT) y el ciclo de desarrollo (medios CF, TPM y TM) de las cepas portadoras de fusiones *lacZ* con cinco genes para fosfatasa de *M. xanthus*: 1) SpoIIELZ, 2) 888LZ, 3) Pph2LZ, 4) 448LZ y 5) 1665LZ.

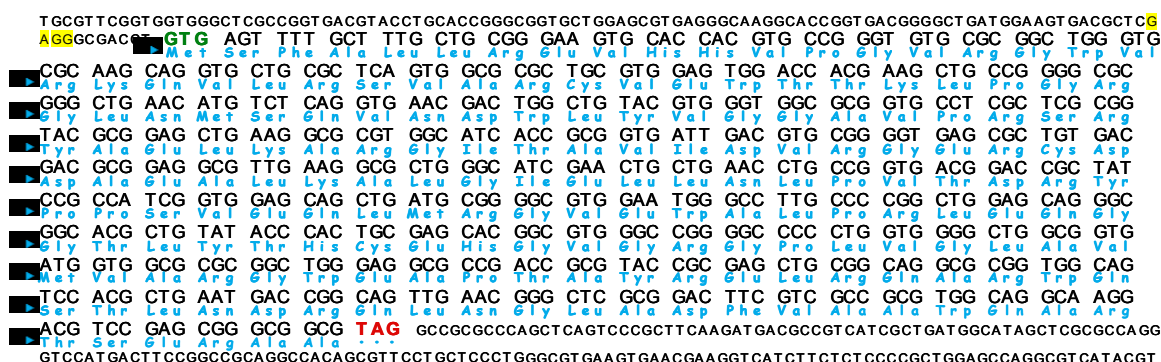
Las proteínas MXAN0448 perteneciente a la familia CPTP, MXAN4562 (SpoIIE) miembro de las fosfatasa de tipo PPM y MXAN4779 (Pph2: **P**hosphoprotein **p**hosphatase **2**) de la superfamilia PPP, presentan varios aspectos de relevancia, razón por la que se eligieron para su caracterización. La fosfatasa MXAN0448 se seleccionó porque la fosforilación y desfosforilación en residuos de tirosina no se ha esclarecido en mixobacterias y sólo existen 3 proteínas de este tipo en esta bacteria. Por su parte, la fosfatasa SpoIIE es la única proteína de este tipo en *M. xanthus*. Además, es una proteína de membrana cuyo gen codificante aparece en el mismo operón que el gen de la proteína quinasa PskA12 (MXAN4557), cuyo mutante muestra bloqueo completamente el ciclo de desarrollo (Inouye *et al.*, 2008) y es posible que ambas proteínas participen en la misma vía de transducción de señales, controlando el mismo proceso. Con respecto a la fosfatasa Pph2, se eligió porque el gen *pph2* forma parte del mismo operón que el sistema regulador de dos componentes *phoPR1* caracterizado por nuestro grupo. Este sistema se expresa durante el crecimiento vegetativo, pero aumenta sus niveles considerablemente durante el ciclo de desarrollo y regula la expresión de más de 18 genes, fundamentalmente implicados en el metabolismo energético (Carrero-Lérida, 2004). A las razones anteriores hay que añadir que los genes que cifran las tres fosfatasa seleccionadas se expresan en las condiciones analizadas. Por ello, se prosiguió con la caracterización de sólo estas tres fosfatasa.

### D.III. CARACTERIZACIÓN DE LA TIROSINA FOSFATASA MXAN0448

Tras la identificación inicial que indicaba que el gen MXAN0448 codifica una fosfatasa con especificidad dual perteneciente a la superfamilia PTP que se expresa tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo, se procedió a un análisis detallado de la proteína. Este estudio se realizó para, por un lado, confirmar el resultado inicial mediante la comparación de MXAN0448 con otras fosfatasas de la superfamilia PTP caracterizadas y depositadas en las bases de datos y, por otra parte, tratar de determinar su posible función en *M. xanthus*.

#### D.III.1. Análisis de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de MXAN0448

En la Fig. 12 se muestra la secuencia de nucleótidos del gen *MXAN0448* de *M. xanthus*, así como la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína codificada por dicho gen.

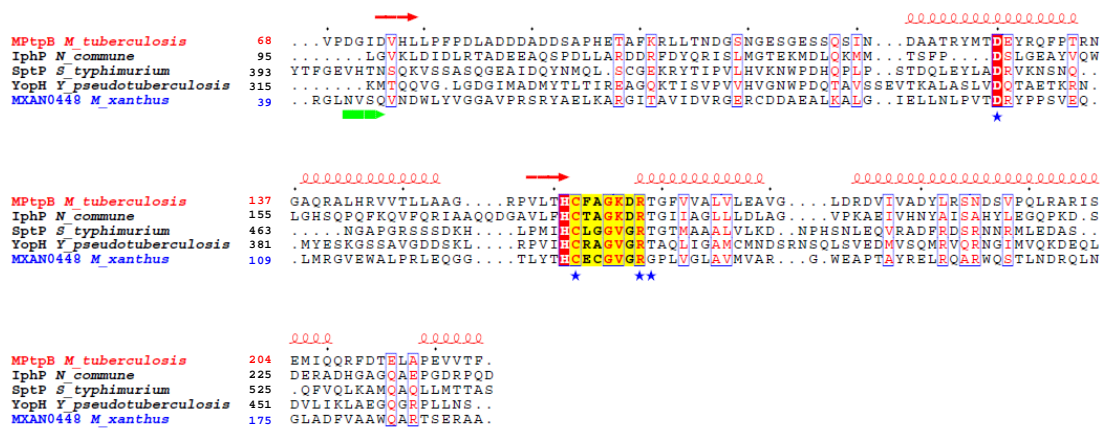


**Figura 12.** Secuencia nucleotídica del gen MXAN0448 de *M. xanthus*. En azul se indica la secuencia aminoacídica deducida de la fosfatasa MXAN0448. En verde se muestra el codón de iniciación, en rojo el codón de terminación y destacado sobre fondo amarillo un posible sitio de unión al ribosoma.

Como codón de iniciación de la fosfatasa MXAN0448 se consideró un codón alternativo de tipo GTG, destacado en verde. Este triplete de iniciación, bastante común en los genes de *M. xanthus*, se encuentra en la misma pauta de lectura que el codón de terminación de la secuencia, TAG, destacado en rojo, e inicia una pauta de lectura con el uso de codones característico de *M. xanthus*. No se pudo asignar un codón ATG para el inicio de la transcripción, debido a que el primer triplete de este tipo, situado en la pauta de lectura correcta, se encuentra dentro del dominio fosfatasa con especificidad dual. Destacado sobre fondo amarillo se indica un posible sitio de unión al ribosoma en posición -8 con respecto al codón de iniciación (Fig. 12).

Por tanto, el gen MXAN0448 está constituido por 582 pb y codifica una proteína de 193 residuos con un peso molecular estimado de 21500. Este gen presenta el uso de codones típico de *M. xanthus* y otros microorganismos con alto contenido en G+C (Bibb *et al.*, 1984; Inouye *et al.*, 1989; Shimkets, 1993), dado que el 89.2% de los tripletes presentan G o C en la tercera posición.

La comparación de la secuencia aminoacídica de MXAN0448 con las proteínas depositadas en las bases de datos confirmó su homología con proteínas fosfatasa con especificidad dual y permitió diferenciar en ella una porción N-terminal y una región C-terminal, donde se localiza el dominio fosfatasa con especificidad dual, de 140 residuos de longitud. Esta proteína se parece a MPtpB de *Mycobacterium tuberculosis* (Koul *et al.*, 2000), con la que muestra un 15.2% de identidad, a IphP de *Nostoc commune* (Potts *et al.*, 1993), con la que comparte un 12.9% de identidad, a SptP de *Salmonella typhimurium* (Kaniga *et al.*, 1996; Murli *et al.*, 2001), con un 8.7% de identidad, y a YopH de *Yersinia pseudotuberculosis* (Bliska *et al.*, 1991), con la que presenta un 11.1% de identidad (Fig. 13). La baja identidad ofrecida por los miembros pertenecientes a la familia CPTP se debe a que estas proteínas presentan baja similitud de secuencia ya que la homología prácticamente está restringida al dominio catalítico.



**Figura 13.** Alineamiento de la porción C-terminal de la secuencia aminoacídica de la tirosina fosfatasa MXAN0448 de *M. xanthus* con otras tirosina fosfatasa convencionales (números de acceso en Tabla 12). Sobre fondo amarillo aparecen los aminoácidos del motivo conservado CX<sub>5</sub>R característico de las tirosina fosfatasa. El resto de aminoácidos conservados se muestran sobre fondo rojo, mientras que los aminoácidos conservados implicados en la catálisis aparecen destacados con una estrella azul. En la parte superior se muestra la estructura secundaria de la proteína MPtpB de *M. tuberculosis*. En la parte inferior, las flechas verdes indican el comienzo y el fin del dominio de especificidad dual (PF00782) de la tirosina fosfatasa MXAN0448 de *M. xanthus*.

La fosfatasa MXAN0448 de *M. xanthus* posee el motivo catalítico CX<sub>5</sub>R así como el residuo de aspártico localizado en posición N-terminal con respecto a la cisteína catalítica, implicado en la catálisis. Sin embargo, carece del residuo de serina/treonina situado a continuación del residuo de arginina catalítico, que contribuye al proceso de desfosforilación, de manera que aparece sustituido por un residuo de glicina en la fosfatasa de *M. xanthus* (Fig. 13).

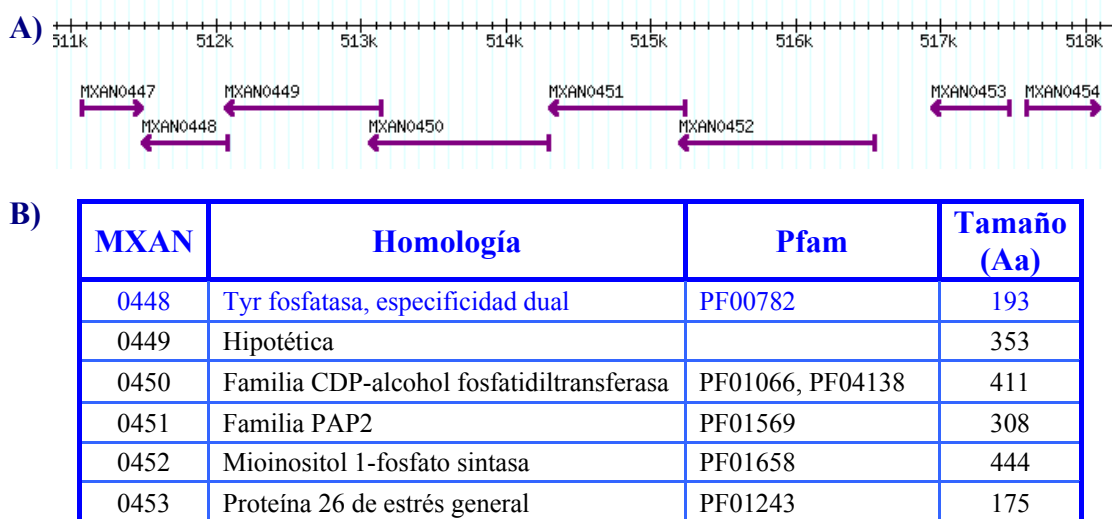
El análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de MXAN0448 indica que carece de segmentos transmembrana y de péptido señal, de manera que esta proteína debe presentar localización citoplasmática.



### D.III.2. Análisis de las regiones genómicas situadas en torno al gen MXAN0448

Para tratar de identificar genes relacionados a nivel funcional con la ruta de transducción de señales en la que se integra la fosfatasa MXAN0448 se procedió al análisis de los genes situados alrededor del gen MXAN0448, lo que reveló la presencia de 5 genes con la misma orientación que él y localizados todos ellos justo por delante del mismo en el sentido de transcripción. Los 6 genes se encuentran lo bastante próximos como para formar parte del mismo operón (Fig. 14A). 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.

Los productos de estos genes fueron comparados frente a otras proteínas depositadas en las bases de datos para tratar de determinar su posible función. Para 5 de ellas se encontró homología, en mayor o menor medida, con otras proteínas o familias de proteínas, mientras que la restante no mostró similitud significativa con ningún tipo proteico concreto (Fig. 14B).



**Figura 14.** Genes situados en torno al gen de la fosfotirosina fosfatasa MXAN0448 en el genoma de *M. xanthus*. A) Organización genómica. B) Similitud y características de las proteínas codificadas por esos genes.

Así, MXAN0449 genera una proteína hipotética soluble, de 353 residuos, que carece de dominios funcionales representativos y tan sólo muestra muy baja homología con la familia de ATP sintasas  $\alpha$ - $\beta$  implicadas en el transporte iónico.

MXAN0450 cifra una proteína de membrana de 411 residuos. Esta proteína pertenece a la familia de CDP-alcohol fosfatidiltransferasas, ya que posee los motivos conservados propios de esta familia entre los residuos 112 y 244. Las proteínas pertenecientes a esta familia están implicadas en la biosíntesis de fosfolípidos y en el desplazamiento de CMP desde CDP-alcohol por un segundo alcohol, con la formación de un enlace fosfodiéster (Morein *et al.*, 1996). Además, en esta proteína también está presente un dominio que caracteriza a la familia GtrA, que abarca los residuos 279 al

392. Este dominio se asocia con proteínas de membrana implicadas en la síntesis de polisacáridos de la superficie celular, así como en el transporte a través de la membrana (Morein *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1999; Lan *et al.*, 2000).

MXAN0451, por su parte, codifica una proteína de 308 aminoácidos perteneciente a la familia PAP2 (Fosfatasa tipo 2 de ácido fosfórico), que incluye proteínas de tipo fosfoesterasa. Se trata de una proteína anclada a la membrana.

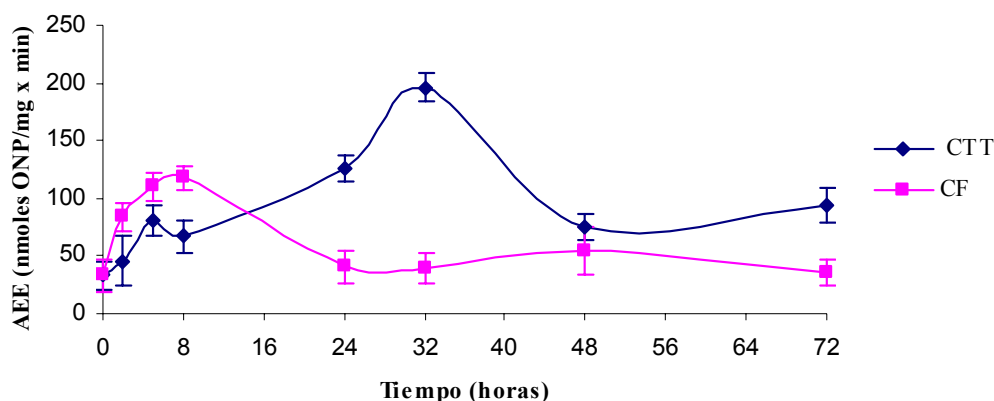
MXAN0452 codifica una proteína soluble de 444 residuos, perteneciente a la familia de mioinositol-1-fosfato sintasas, implicadas en la conversión de glucosa 6-fosfato en inositol 1-fosfato, el cual es luego desfosforilado a inositol (Klig *et al.*, 1994).

Por último, MXAN0453 cifra una proteína soluble de 175 aminoácidos implicada en el estrés general. Esta proteína posee un dominio pirodoxamina 5' fosfatooxidasa entre los residuos 11 y 98.

### D.III.3. Determinación del perfil de expresión de MXAN0448

El perfil y el nivel de expresión del gen de la tirosina fosfatasa MXAN0448 durante el ciclo de vida de *M. xanthus* se analizó cualitativamente a partir de la construcción de una fusión traduccional entre el gen MXAN0448 y el gen *lacZ* de *E. coli*, que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa, como se ha descrito anteriormente en el apartado de Resultados D.II. A continuación, se valoró cuantitativamente la actividad  $\beta$ -galactosidasa específica de la bacteria portadora de la fusión durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo. Para ello, se siguió el protocolo descrito en C.II.11.3.

La cepa portadora de la fusión, denominada 448LZ, se cultivó en CTT sólido para determinar la actividad desarrollada durante el crecimiento vegetativo, mientras que el análisis durante el ciclo de desarrollo se llevó a cabo en medio CF.



**Figura 15.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa específica de la cepa 448LZ desarrollada durante el crecimiento vegetativo (medio CTT) y durante el ciclo de desarrollo (medio CF).

## Resultados

El análisis cuantitativo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa portadora de la fusión en ambos medios corrobora lo observado tras el análisis cualitativo inicial. Esto es, que el gen que codifica la tirosina fosfatasa MXAN0448 se expresa tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo (Fig. 15). En las primeras horas de incubación, el gen muestra un perfil de expresión similar en ambos medios, siendo los niveles ligeramente superiores en medio CF. Sin embargo, a partir de las 8 horas de incubación la situación inicial se invierte. De este modo, en el caso del crecimiento vegetativo aumenta considerablemente la expresión, alcanzando un máximo tras 32 horas de incubación, descendiendo posteriormente para mantenerse constante hasta las 72 horas. Por su parte, durante el ciclo de desarrollo, los niveles de expresión disminuyen a partir de las 8 horas y se mantienen prácticamente constantes desde las 24 hasta las 72 horas de incubación, siendo sus valores inferiores a los de la actividad  $\beta$ -galactosidasa durante el crecimiento vegetativo en el mismo periodo de incubación (Fig. 15).

Por tanto, el gen MXAN0448 se induce ante el agotamiento de nutrientes, alcanzando un máximo de expresión a las 8 horas durante el desarrollo y a las 32 horas durante el crecimiento vegetativo (Fig. 15).

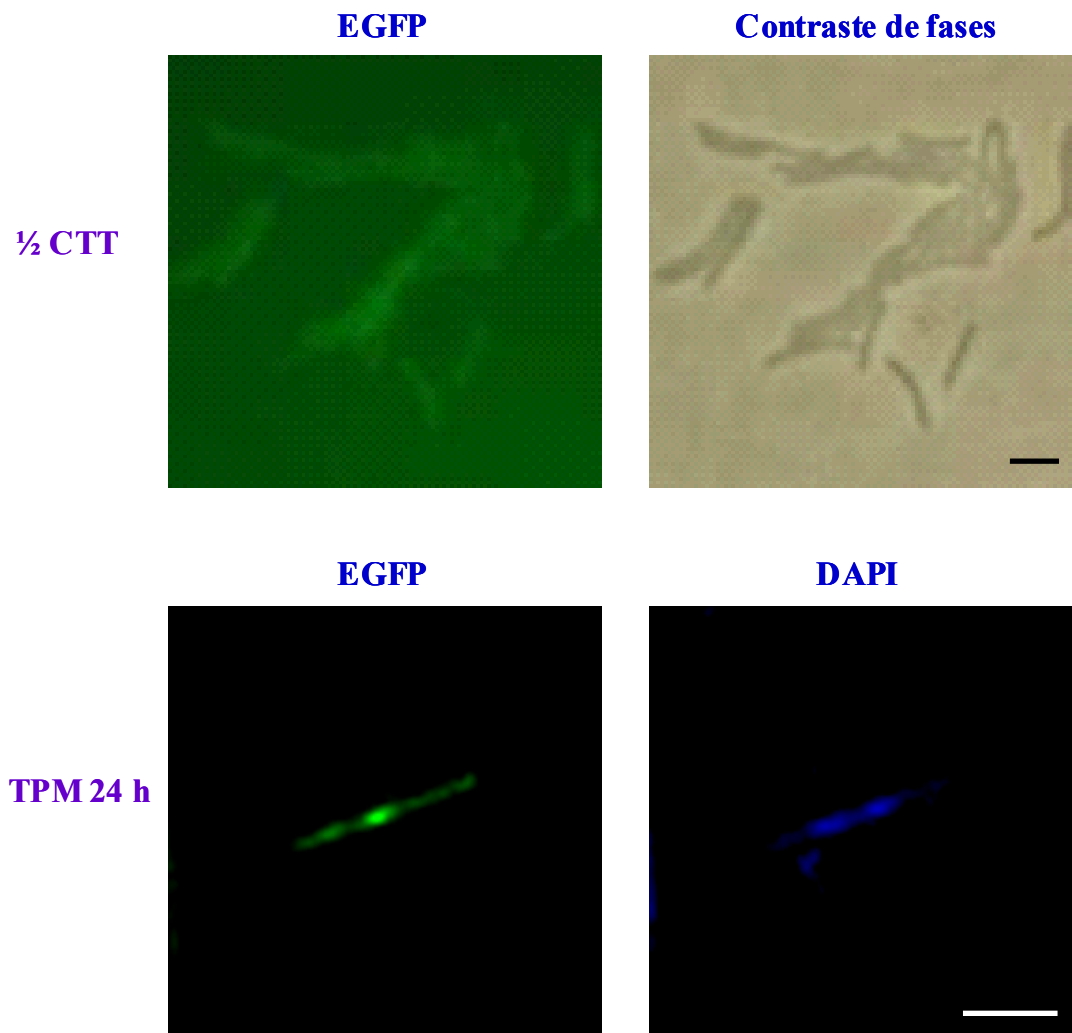
### D.III.4. Localización subcelular de la fosfatasa MXAN0448

La localización subcelular de esta proteína de *M. xanthus* se analizó mediante la obtención de una fusión traduccional entre el gen de la fosfatasa y el gen de una variante mejorada de la proteína verde fluorescente, denominada EGFP (Cormack *et al.*, 1996). Para ello, se empleó el plásmido pMR2917 originado a partir del vector pEGFP-C2 diseñado por *Clontech* para la expresión de la EGFP en células de mamífero. Este análisis fue llevado a cabo en el laboratorio del Dr. Shimkets en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Georgia (EE.UU.).

La obtención de esta fusión se llevó a cabo como se detalla en Material y Métodos (C.II.10.). Los oligonucleótidos empleados fueron la pareja 448GFNheF-448GFNheR (Tabla 7). La fusión se realizó entre el extremo C-terminal de la fosfatasa y el N-terminal de la EGFP. El plásmido obtenido, denominado pMR-448, fue dializado e introducido en la cepa de *M. xanthus* DK10415. Posteriormente, se analizaron mediante PCR las colonias que crecieron en CTT con kanamicina, para asegurar la corrección de la construcción. La cepa portadora de la fusión se denominó 448GFP.

La localización subcelular de la proteína MXAN0448 se estudió siguiendo las indicaciones descritas por Welch y Kaiser (2001), detalladas en Material y Métodos (C.II.10.). Se analizó la localización subcelular durante el crecimiento vegetativo, en medio  $\frac{1}{2}$  CTT (que contiene la mitad de Bacto-casitona que el medio CTT), y durante el ciclo de desarrollo, en medio TPM.

La observación de las preparaciones realizadas se llevó a cabo utilizando microscopía de fluorescencia y de contraste de fases. De esta manera, se pudo determinar que la fosfatasa MXAN0448 presenta una localización dispersa a lo largo del bacilo durante el crecimiento vegetativo (Fig. 16), mientras que durante el ciclo de desarrollo se observa principalmente concentrada en la porción central del mismo, pero ocupando una posición opuesta al cromosoma de la mixobacteria, que es visualizado con DAPI (Fig. 16).



**Figura 16.** Análisis de la localización subcelular de MXAN0448 durante el crecimiento vegetativo (1/2 CTT) y el ciclo de desarrollo (TPM). Se muestran los mismos campos ópticos observados mediante microscopía de fluorescencia (EGFP y DAPI) y contraste de fases. La barra representa 5  $\mu\text{m}$ .

### D.III.5. Implicación de la fosfatasa MXAN0448 en el ciclo de vida de *M. xanthus*

#### D.III.5.1. Obtención de un mutante de delección para el gen MXAN0448

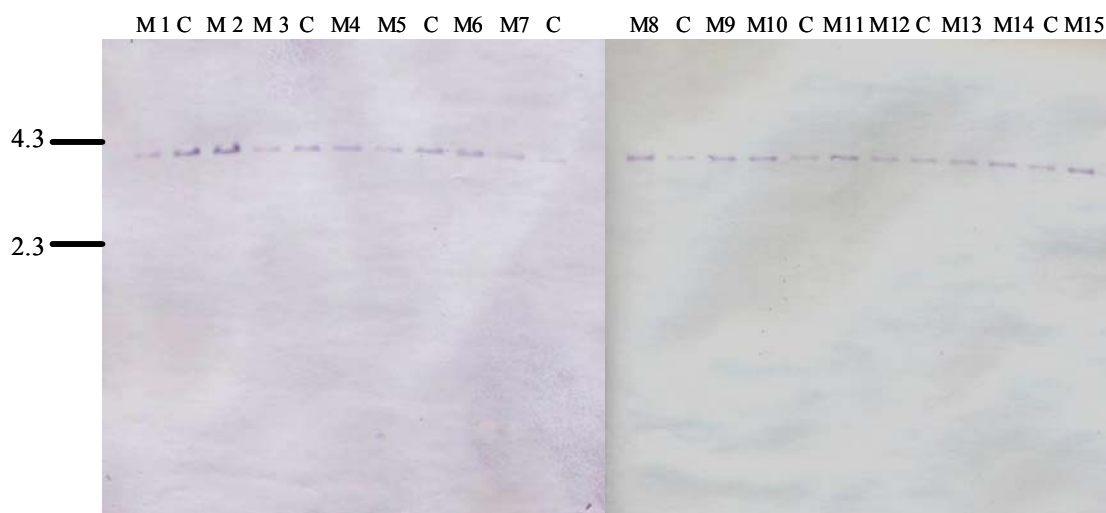
Para tratar de determinar la posible función que la proteína MXAN0448 pudiera tener en el ciclo de vida de *M. xanthus* durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo, se diseñó la construcción de un mutante de delección en fase para este gen empleando el plásmido pBJ113 como se indica en Material y Métodos (C.II.12.1.).

La obtención de este mutante de delección implicó la eliminación del 78% del gen, incluyendo la región codificante del dominio catalítico de la proteína. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos 448KpnLZF-448BamLZR para la amplificación de la

## Resultados

región cromosómica situada por encima del gen MXAN0448 y la pareja de cebadores 448BamIFR-4448PstIFF para la clonación del fragmento situado por detrás de dicho gen (Tabla 6). Los productos de PCR obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción adecuadas y clonados secuencialmente en el vector pBJ113. El plásmido resultante se denominó p $\Delta$ 448 y porta la delección de la mayor parte del gen de la fosfatasa, puesto que la región codificante de la proteína se eliminó al fusionar en fase los dos fragmentos que flanquean al gen mediante la secuencia de la enzima de restricción *Bam*HI. El plásmido p $\Delta$ 448 fue dializado e introducido en la mixobacteria por electroporación. Las colonias resultantes, capaces de crecer en presencia de kanamicina, se analizaron mediante Southern blot para tratar de identificar intermediarios merodiploides (no mostrado). A partir de un intermediario correcto, tras varias generaciones de crecimiento en medio CTT sin antibiótico para favorecer un segundo proceso de recombinación que originara la pérdida del plásmido, se efectuaron diluciones en medio CTT con galactosa. Sin embargo, a partir de este intermediario no fue posible aislar mutantes de delección, ya que en las 50 colonias analizadas mediante PCR o Southern blot se produjo la reversión a genotipo silvestre (Fig. 17).

Por tanto, el gen MXAN0448 parece ser esencial para la viabilidad de *M. xanthus* y, por ello, no se pudo generar una cepa mutante, de manera que no fue posible determinar el papel de MXAN0448 en el ciclo de vida de esta bacteria, razón por la cual no se prosiguió con su caracterización.



**Figura 17.** Southern blots para la identificación de la cepa mutante de delección para el gen MXAN0448. Las calles M corresponden al cromosoma de las colonias sensibles a kanamicina y las calles C al cromosoma de la cepa silvestre DZF1 utilizado como control. En todos los casos los ADN cromosómicos fueron digeridos con *Pst*I. Se empleó como sonda la región cromosómica situada por encima del gen MXAN0448. El tamaño de los fragmentos esperados era de 4.0 kb en el caso del silvestre y 3.6 kb en el del mutante. El tamaño del estándar se muestra en kb.

## D.IV. CARACTERIZACIÓN DE LA Ser/Thr FOSFATASA SpoIIE (MXAN4562)

Para la caracterización de esta fosfatasa se siguieron las mismas pautas que en el caso de la tirosina fosfatasa MXAN0448.

### D.IV.1. Análisis de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de SpoIIE

La secuencia de nucleótidos del gen *spoIIE* de *M. xanthus*, así como la secuencia de aminoácidos deducida a partir de ella, se muestra en la Fig. 18. En ella se puede observar que el codón de iniciación de la traducción, destacado en verde, es TTG, un codón alternativo de uso poco frecuente en bacterias, y el codón de terminación, destacado en rojo, es TGA. El análisis de la región cromosómica localizada en sentido 5' respecto a *spoIIE* no indicó la existencia de una posible secuencia Shine-Dalgarno.

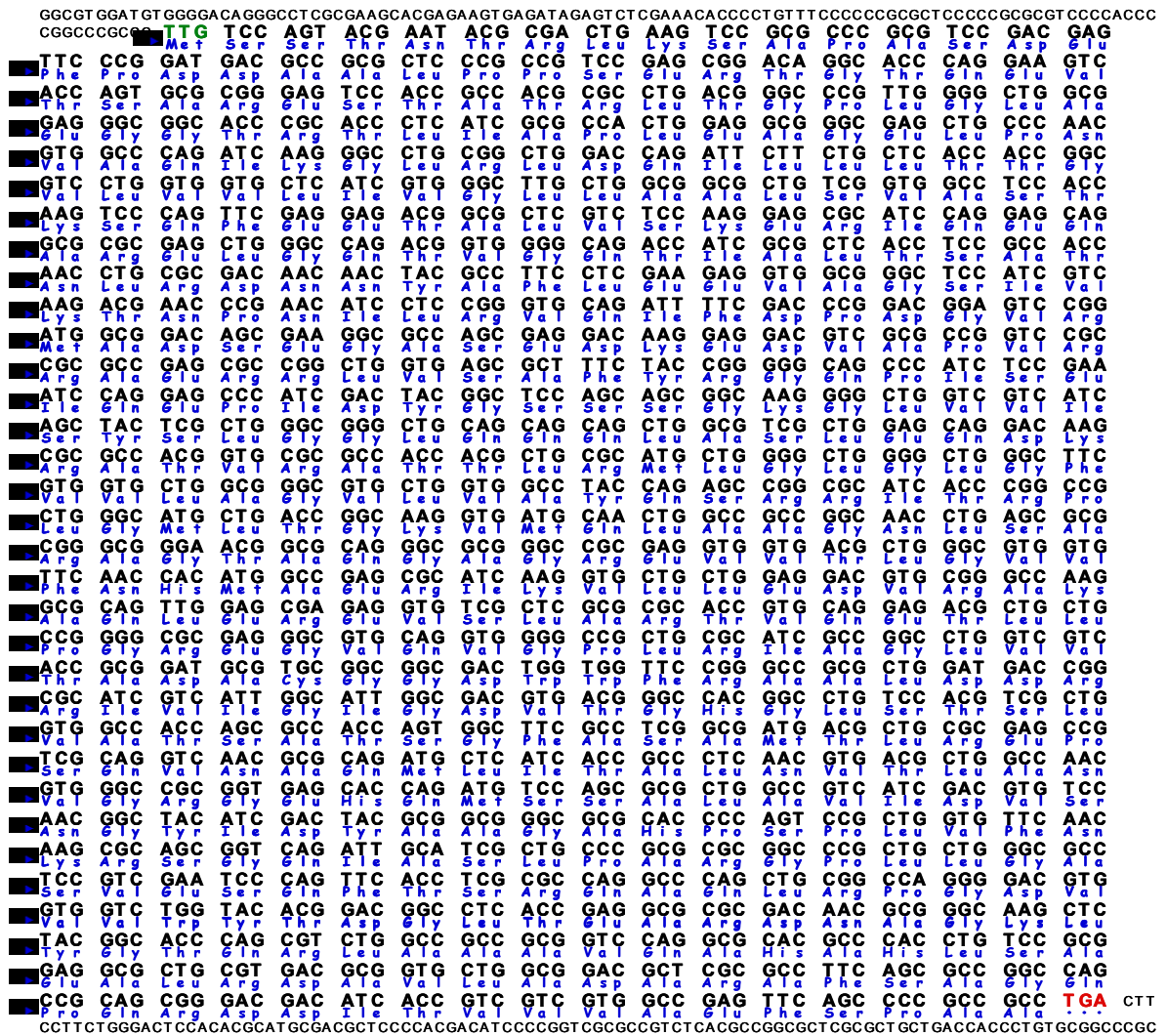


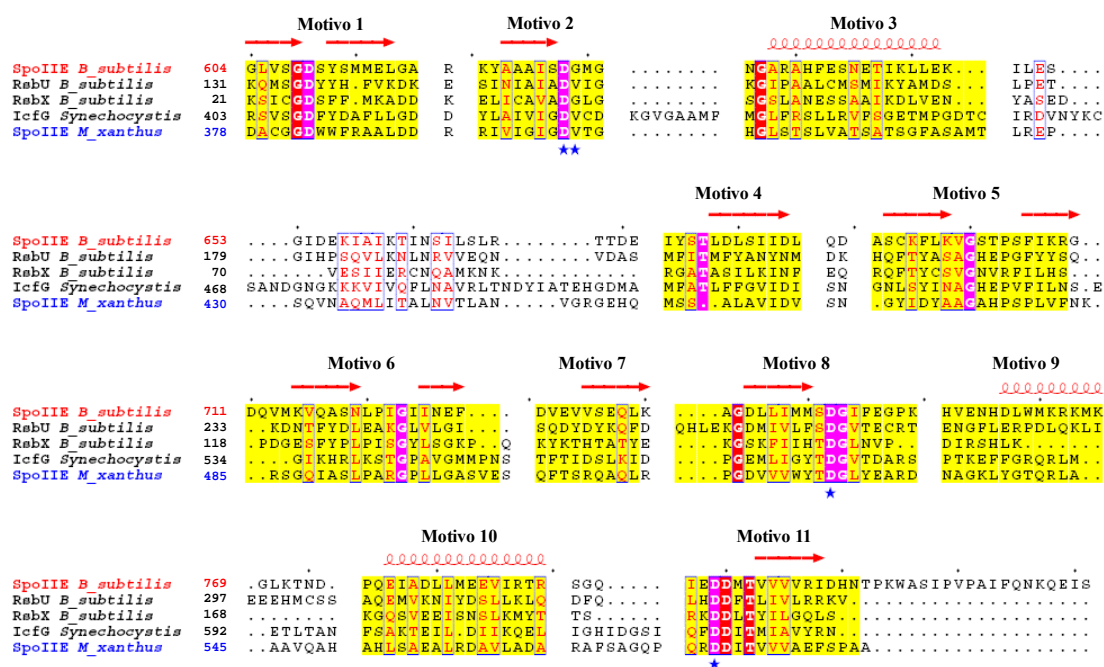
Figura 18. Secuencia nucleotídica del gen *spoIIE* de *M. xanthus*. En azul se indica la secuencia aminoacídica deducida de la fosfatasa MXAN4562. En verde se muestra el codón de inicio y en rojo se destaca el codón de terminación de SpoIIE.

## Resultados

Para el establecimiento del codón de iniciación de esta fosfatasa se siguieron las mismas premisas indicadas en el caso de MXAN0448. Es decir, se tuvo en cuenta el primer codón de iniciación que se situara en la misma pauta de lectura que el codón de terminación y que originara una proteína con el uso de codones típico de *M. xanthus*.

El análisis de la secuencia de *spoIIE* permitió establecer que este gen, que codifica una proteína de 591 aminoácidos, está constituido por 1776 pb. La proteína SpoIIE tiene un peso molecular estimado de 62400 y presenta G o C en la tercera posición del codón en el 94% de los tripletes, lo que supone un uso de codones típico de microorganismos con un alto contenido en G+C (Bibb *et al.*, 1984; Inouye *et al.*, 1989; Shimkets, 1993).

La comparación con las proteínas depositadas en las bases de datos de la secuencia aminoacídica de SpoIIE confirmó su homología con fosfatasas de la familia SpoIIE. Así, muestra un 11.3, 13.2 y 6.6% de identidad con las proteínas SpoIIE (Duncan *et al.*, 1995), RsbU y RsbX (Yang *et al.*, 1996), respectivamente, de *Bacillus subtilis* y un 19.0% de identidad con IcfG (Beuf *et al.*, 1994) de *Synechocystis* PCC6803 (Fig. 19). Al igual que en el caso de las tirosina fosfatasas, las proteínas pertenecientes a la familia SpoIIE muestran una reducida homología de secuencia a lo largo de la totalidad de la proteínas quedando ésta reducida a los motivos conservados propios de este tipo de enzimas.



**Figura 19.** Alineamiento de la porción C-terminal de la secuencia aminoacídica de la fosfatasa SpoIIE de *M. xanthus* con otras Ser/Thr fosfatasas pertenecientes a la superfamilia PPM (números de acceso en Tabla 12). Sobre fondo amarillo aparecen los 11 motivos conservados característicos de esta superfamilia, destacado sobre fondo rosa los 8 residuos absolutamente conservados. El resto de aminoácidos conservados se muestran sobre fondo rojo, mientras que los aminoácidos conservados implicados en la catálisis o en la unión de metales aparecen destacados con una estrella azul. En la parte superior se muestra la estructura secundaria consenso de esta superfamilia.

Como se ha mencionado, las proteínas pertenecientes a la superfamilia PPM se caracterizan por la presencia de 11 motivos conservados y 8 residuos absolutamente conservados todos ellos presentes en la fosfatasa SpoIIE de *M. xanthus* (Fig. 19). Estas proteínas unen iones metálicos en el centro activo necesarios para la catálisis y el reconocimiento del sustrato mediante 5 aminoácidos conservados, tres de los cuales están presentes en la secuencia de la proteína SpoIIE de *M. xanthus*, mientras que los dos restantes se encuentran sustituidos por residuos funcionalmente similares (Fig. 19).

En la proteína de *M. xanthus* se pueden diferenciar dos dominios, un dominio HAMP de 71 aminoácidos, localizado en el centro de la proteína, y un dominio de tipo SpoIIE de 196 residuos, localizado en la porción C-terminal. El dominio SpoIIE aparece en Ser/Thr fosfatasas. La proteína SpoIIE de *B. subtilis* está implicada en la formación del septo y activa a  $\sigma^F$  en la preespora durante la esporulación en esta bacteria (Barak *et al.*, 1996). El dominio HAMP aparece en histidina quinasa, adenilato ciclasas, proteínas que unen metales y fosfatasas. Es típico de proteínas sensoras y quimiotácticas de bacterias, además de aparecer en histidina quinasa eucarióticas. Las proteínas que presentan este dominio suelen ser de membrana y participan en la transducción de señales junto con sistemas reguladores de dos componentes (Aravind y Ponting, 1999).

A partir del análisis de la secuencia de SpoIIE de *M. xanthus* también se pudo establecer la existencia de dos regiones transmembrana en la proteína que se extienden entre los aminoácidos 82-104 y 258-280. La presencia de estas regiones transmembrana determina que el dominio SpoIIE, situado en la porción C-terminal, de la proteína se localice en el citoplasma, mientras que el dominio HAMP se localiza parte en la membrana y parte en el citoplasma.

#### **D.IV.2. Análisis de las regiones genómicas situadas en torno al gen *spoIIE***

Al igual que en el caso del gen que codifica la tirosina fosfatasa MXAN0448, se procedió a analizar los genes situados alrededor del gen *spoIIE*.

Para ello, se analizaron todos los genes que se encontraban en la misma orientación que el gen *spoIIE*, ya que podrían formar parte del mismo operón y, por tanto, participar en el mismo proceso (Fig. 20A). Los 12 genes analizados, que aparecen en el mismo sentido de transcripción que el gen *spoIIE*, se localizan por detrás de él y muestran un uso de codones característico de *M. xanthus*. De esos 12 genes, 8 codifican proteínas hipotéticas, mientras que los 4 restantes cifran proteínas que muestran homología con otras de función conocida (Fig. 20B).

MXAN4550 codifica una proteína de 369 residuos, soluble que posee un dominio oxidorreductasa dependiente de FAD entre los residuos 6 y 343. Entre las proteínas que poseen este dominio se incluyen glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, subunidad  $\beta$  de sarcosina oxidasa, D-alanina oxidasa y D-aspartato oxidasa (Todone *et al.*, 1997).

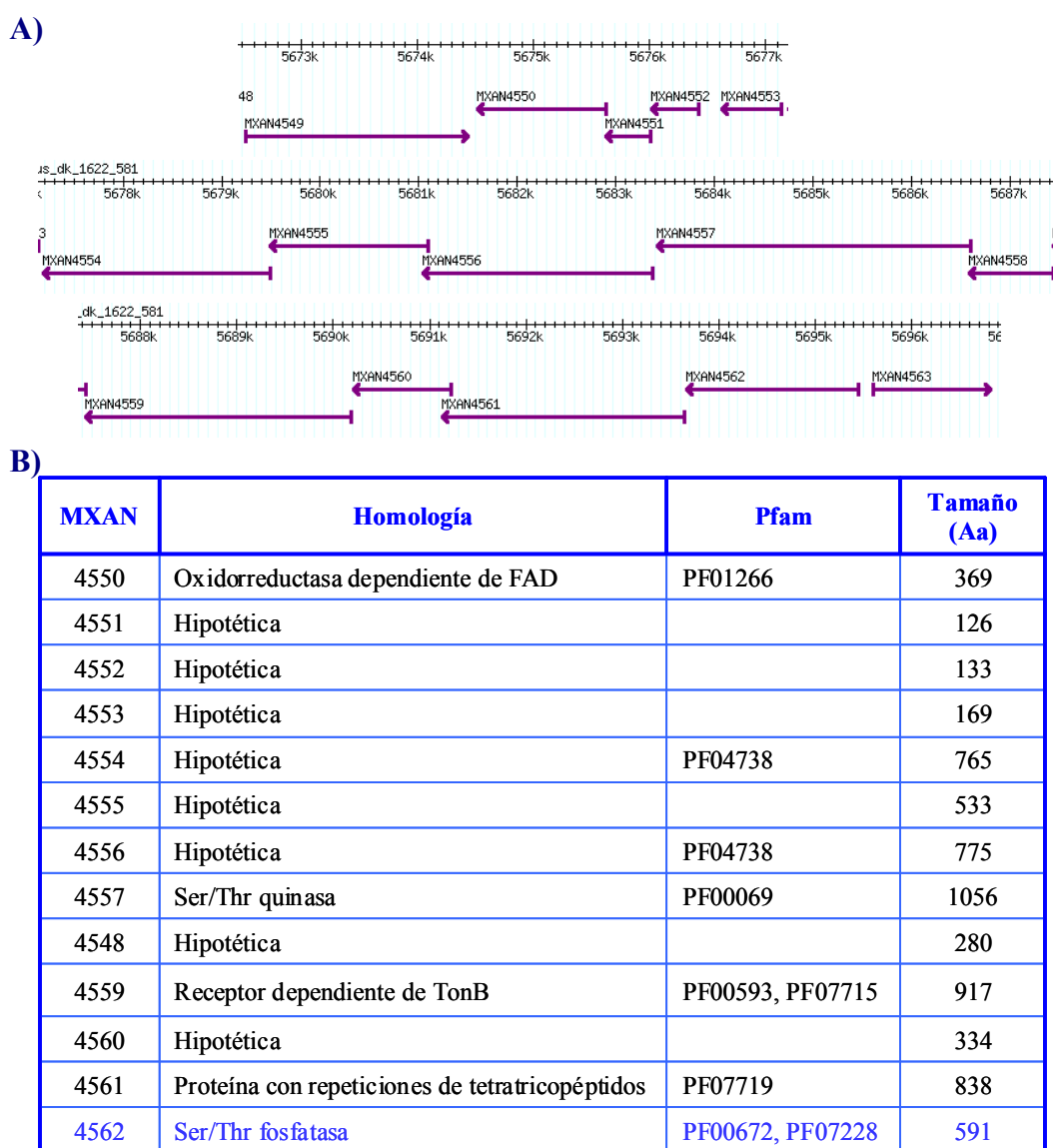
MXAN4557 cifra una quinasa soluble de 1056 aminoácidos. El dominio quinasa se localiza entre los residuos 395 y 665. La ausencia de esta quinasa bloquea completamente el ciclo de desarrollo de *M. xanthus* (Inouye *et al.*, 2008).



## Resultados

MXAN4559 codifica una proteína de 917 residuos que se localiza anclada en la membrana. Esta proteína posee un dominio Plug (conector dependiente de receptores TonB) entre los residuos 292 y 402 que constituye una subunidad independiente plegada de los receptores dependientes de TonB y actúa como un canal bloqueando el poro hasta que se une el ligando. Una vez que esto ocurre, sufre un cambio conformacional y se abre el canal (Oke *et al.*, 2004). Además, MXAN4559 posee un dominio característico de la familia de receptores dependientes de TonB entre los residuos 667 y 917.

Por último, MXAN4561 codifica una proteína soluble de 838 residuos que posee repeticiones de tetratricopéptidos a lo largo de toda la proteína. Estas repeticiones aparecen en proteínas que interactúan con otras (Das *et al.*, 1995).



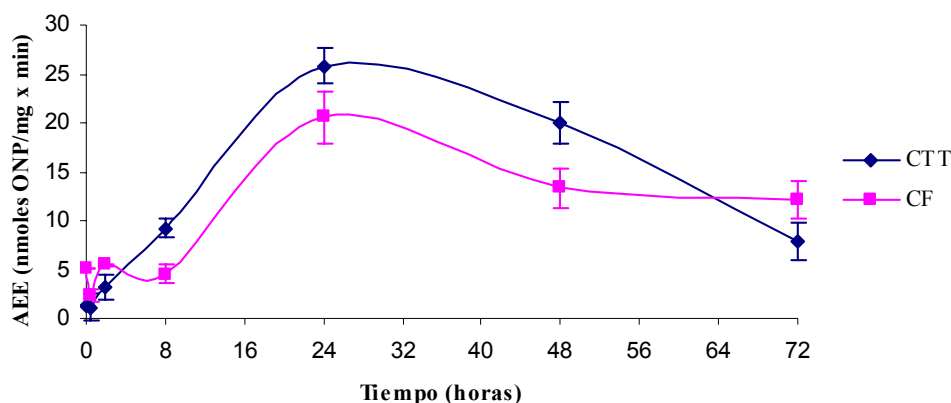
**Figura 20.** Genes situados en torno al gen *spoIIE* en el genoma de *M. xanthus*. A) Organización genómica. B) Similitud y características de las proteínas codificadas por esos genes.

### D.IV.3. Determinación del perfil de expresión de *spoIIE*

El estudio cualitativo de la fusión para el gen *spoIIE* de *M. xanthus* se comentó anteriormente en el apartado D.II. Seguidamente, se cuantificó la actividad  $\beta$ -galactosidasa específica de la bacteria portadora de la fusión durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo como se indica en Material y Métodos (C.II.11.3.).

Para determinar el nivel de expresión durante el crecimiento vegetativo, la cepa portadora de la fusión, denominada SpoIIELZ, se cultivó en medio CTT sólido, mientras que la cuantificación durante el ciclo de desarrollo se realizó en medio CF.

El gen *spoIIE* muestra perfiles de expresión similares durante el crecimiento y el desarrollo (Fig. 21). En las primeras horas, la expresión es prácticamente nula, pero durante la incubación comienzan a aumentar los niveles de expresión alcanzando un máximo tras 24 horas. A partir de ese momento los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa descienden hasta llegar a ser prácticamente indetectables transcurridas 72 horas de incubación (Fig. 21).



**Figura 21.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa específica de la cepa SpoIIELZ durante el crecimiento vegetativo en medio CTT y el ciclo de desarrollo en medio CF.

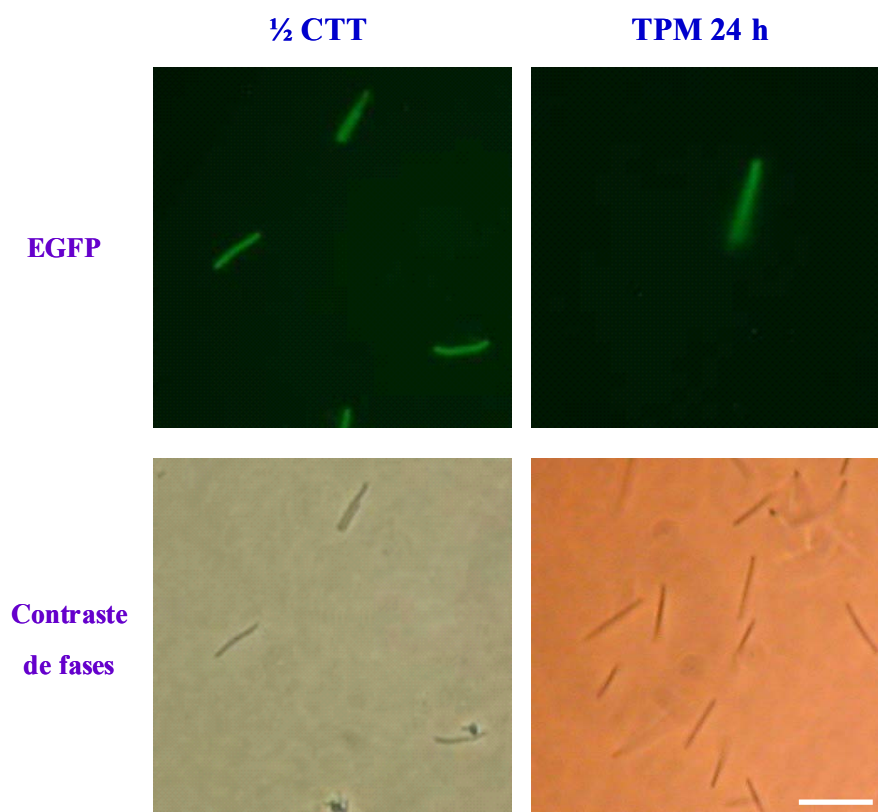
Los resultados cualitativos y cuantitativos de actividad  $\beta$ -galactosidasa obtenidos indican que *spoIIE* se expresa a niveles no muy elevados, tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*, alcanzando un máximo de expresión a las 24 horas.

### D.IV.4. Localización subcelular de la fosfatasa SpoIIE

Los oligonucleótidos empleados para fusionar *spoIIE* con *EGFP* fueron SpoIIENheF y SpoIIENheR (Tabla 7), lo que permitió obtener la fusión entre el extremo C-terminal de la fosfatasa y el N-terminal de la EGFP. El plásmido obtenido se denominó pMR-SpoIIE y tras su diálisis se introdujo en la cepa de *M. xanthus* DK10415. Las colonias surgidas en CTT suplementado con kanamicina se analizaron mediante PCR para asegurar la integridad de la construcción. La cepa portadora de la fusión entre *spoIIE* de *M. xanthus* y el gen *EGFP* se denominó SpoIIEGFP.

## Resultados

Las preparaciones se observaron al microscopio de fluorescencia y de contraste de fases. La emisión de fluorescencia por parte de la EGFP, fusionada con la fosfatasa, permitió establecer que SpoIIE se localiza distribuida a lo largo de toda la membrana del bacilo, presentando esta localización tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo (Fig. 22). Al igual que en el caso de MXAN0448, el análisis de la localización subcelular de SpoIIE se realizó en el laboratorio del Dr. Shimkets en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Georgia (EE.UU.).



**Figura 22.** Análisis de la localización subcelular de SpoIIE en medio 1/2 CTT (crecimiento vegetativo) y en medio TPM (ciclo de desarrollo). Las imágenes corresponden al mismo campo óptico observado utilizando microscopía de fluorescencia y de contraste de fases. La barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

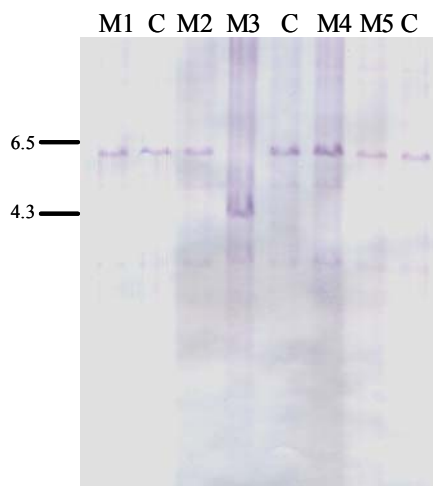
### D.IV.5. Implicación de SpoIIE en el ciclo de vida de *M. xanthus*

#### D.IV.5.1. Obtención de un mutante de delección para el gen *spoIIE*

Al igual que en el caso de la construcción del mutante de delección en fase para el gen de la fosfotirosina fosfatasa MXAN0448, la obtención del mutante para la fosfatasa SpoIIE proporcionaría idea de la implicación de esta proteína en el ciclo de vida de *M. xanthus*. La construcción del mutante se detalla en Material y Métodos (C.II.12.1.).

En el mutante de delección para el gen *spoIIE* se eliminó la totalidad del gen, manteniendo solamente el codón de iniciación y el codón de terminación de la proteína

conectados por un sitio de restricción *Bam*HI, conservando de esta manera la pauta de lectura y evitando cualquier efecto polar que pudiera tener la delección del gen. Para ello, se utilizó la pareja de oligonucleótidos SpoIIIF1Hin-SpoIIIF1Bam para la amplificación de un fragmento situado por delante del gen *spoIIE*, y la pareja SpoIIIF2Bam-SpoIIIF2Kpn para amplificar una región cromosómica situada por detrás de dicho gen (Tabla 6). Ambos productos de PCR fueron clonados de forma secuencial en el vector pBJ113, denominándose el plásmido resultante p $\Delta$ SpoIIE.



**Figura 23.** Southern blot para la identificación del mutante de delección para el gen *spoIIE*. Las calles M corresponden al cromosoma de las colonias recombinantes y las calles C al cromosoma de la cepa silvestre DZF1 utilizado como control. En todos los casos el cromosoma se digirió con *Sal*I. La región cromosómica situada por encima del gen *spoIIE* se utilizó como sonda. El tamaño de los fragmentos esperados era de 6.4 kb en el caso del silvestre y 4.6 kb en el del mutante. El tamaño del estándar se muestra en kb.

Este plásmido fue dializado e introducido en la mixobacteria por electroporación y las colonias obtenidas, resistentes a kanamicina como consecuencia de la incorporación del plásmido, se analizaron mediante Southern blot para identificar intermediarios merodiploides (no mostrado). Una vez seleccionado el intermediario correcto, éste se utilizó para obtener el mutante de delección. Para ello se favoreció la pérdida del plásmido a través de un segundo evento de recombinación cultivando el intermediario en medio CTT sin antibiótico y, por tanto, en ausencia de presión selectiva. Posteriormente, se llevaron a cabo diluciones en medio CTT con galactosa y se seleccionaron 5 colonias recombinantes que eran capaces de crecer en presencia de galactosa pero no de kanamicina, como consecuencia de la pérdida del plásmido por recombinación homóloga entre los fragmentos situados por encima y por debajo del gen *spoIIE*, los cuales se encuentran duplicados en el intermediario merodiploide. Estas colonias se analizaron mediante Southern blot para diferenciar las que habían revertido a genotipo silvestre de las que portaban la delección deseada. Sólo una colonia recombinó para la obtención de la mutación deseada, M3, el resto revertió a silvestre (Fig. 23). La cepa mutante de delección para *spoIIE* se denominó  $\Delta$ *spoIIE*.

#### D.IV.5.2. Caracterización del mutante $\Delta$ *spoIIE*

Dado que el gen de la fosfatasa SpoIIE se expresa tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo, se trató de determinar la función de esta proteína durante el ciclo de vida de *M. xanthus*. Para ello se analizaron, mediante comparación con la cepa silvestre DZF1, diversos parámetros que podían verse afectados por la ausencia del gen. De esta manera, se estudió la capacidad de la cepa mutante para crecer en medio líquido, el deslizamiento en medio sólido, el fenotipo de los cuerpos

## Resultados

fructificantes producidos durante el ciclo de desarrollo, la formación de mixósporas de resistencia, así como la capacidad de germinación de éstas.

### D.IV.5.2.1. Crecimiento vegetativo

Para analizar la posible influencia que la delección de este gen pudiera tener sobre el crecimiento vegetativo, el mutante de delección, así como la cepa silvestre DFZ1, fueron cultivados en medio CTT líquido siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos (C.II.12.2.1.).

El análisis de estos resultados no mostró diferencias significativas entre las cepas silvestre y mutante ni en el tiempo de generación (en torno a 4 horas), ni en la densidad celular alcanzada por los cultivos en la fase estacionaria (aproximadamente  $DO_{600}$  2). Tampoco se apreciaron diferencias en los distintos estadios del crecimiento vegetativo, de modo que el crecimiento exponencial se mantiene hasta transcurridas unas 24 horas de incubación, momento en el que los cultivos entran en fase estacionaria. Esta fase se prolonga durante unas 24 horas más, antes de que tenga lugar la etapa de lisis celular.

El análisis de la movilidad en medio sólido se realizó como se explica en Material y Métodos (C.II.12.2.2.). Este análisis permitió determinar que la delección del gen *spoIIE* no tiene influencia ni sobre la movilidad social ni sobre la movilidad aventurera de la cepa  $\Delta spoIIE$ , dado que la dispersión alcanzada por los enjambres de esta bacteria fue equivalente a la de la cepa silvestre DZF1.

### D.IV.5.2.2. Ciclo de desarrollo

Mediante el análisis del ciclo de desarrollo de la cepa mutante  $\Delta spoIIE$  se pretendía determinar la influencia de la delección de *spoIIE* sobre los procesos que tienen lugar durante esta etapa del ciclo de vida de *M. xanthus* como son la formación de los cuerpos fructificantes y la aparición y posterior germinación de las mixósporas.

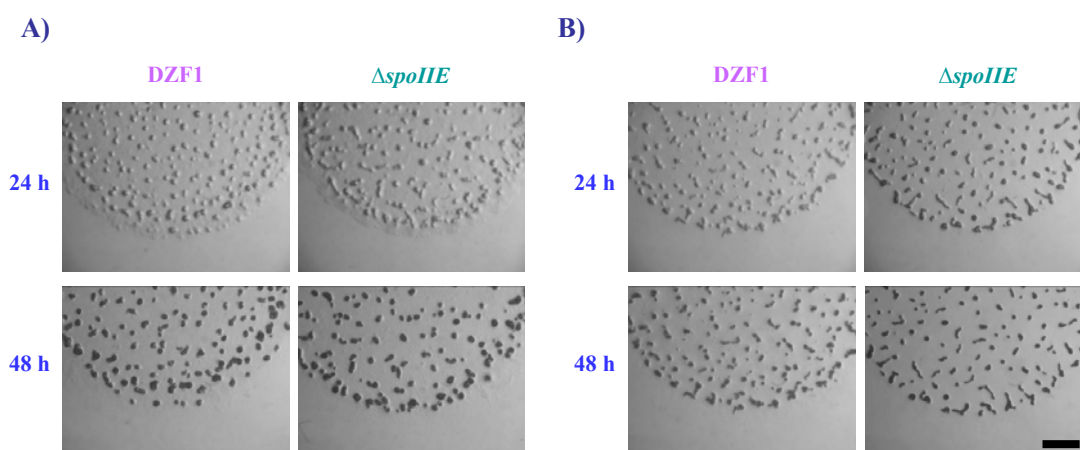
Para cada uno de estos ensayos, las cepas analizadas fueron tratadas siguiendo las pautas indicadas en los correspondientes apartados de Material y Métodos (C.II.12.2.3., C.II.12.2.4. y C.II.12.2.5.).

#### D.IV.5.2.2.1. FENOTIPO DURANTE EL CICLO DE DESARROLLO

Para analizar el papel de la fosfatasa SpoIIE durante el ciclo de desarrollo, el mutante de delección y la cepa silvestre DZF1 de *M. xanthus* fueron cultivados en dos medios de cultivo pobres en nutrientes, los cuales se diferencian en su contenido nutricional.

La Fig. 24A muestra los cuerpos fructificantes originados por las cepas silvestre DZF1 y mutante  $\Delta spoIIE$  en medio CF transcurridas 24 y 48 horas de incubación a partir de muestras con  $DO_{600}$  de partida de 15. Como se puede observar, el mutante de delección forma cuerpos fructificantes muy similares, en cuanto a número, forma y distribución, a los de la cepa silvestre. Tampoco se observan diferencias entre las cepas en lo que respecta al ritmo de formación de los cuerpos fructificantes, dado que el grado de maduración de los mismos es idéntico en DZF1 y  $\Delta spoIIE$ .

Los cuerpos fructificantes originados en medio TPM por las dos cepas analizadas se muestran en la Fig. 24B. En este caso, se aprecian ligeras diferencias entre ambas cepas relativas a la velocidad de formación de los cuerpos fructificantes, proceso que en la cepa mutante va ligeramente adelantado con respecto al silvestre. En este sentido, en  $\Delta spoIIE$  aparecen cuerpos prácticamente maduros y bien empaquetados a las 24 horas de incubación, mientras que en DZF1 el grado de maduración de los cuerpos fructificantes es menor transcurrido el mismo periodo. Estas diferencias se atenúan transcurridas 48 horas y desaparecen cuando se prolonga el tiempo de incubación, originando finalmente ambas cepas cuerpos fructificantes idénticos. No obstante, esas diferencias en el ritmo de maduración de los cuerpos fructificantes no tienen su reflejo en lo que se refiere a la distribución y número de los mismos, dado que no se aprecian diferencias entre las cepas analizadas.



**Figura 24.** Análisis fenotípico de las cepas silvestre DZF1 y mutante  $\Delta spoIIE$  de *M. xanthus* a partir de cultivos concentrados a  $DO_{600}$  inicial de 15. A) Medio CF. B) Medio TPM. La barra representa 1 mm.

#### D.IV.5.2.2.2. ESPORULACIÓN

Dado que las mayores diferencias fenotípicas durante el ciclo de desarrollo entre las cepas silvestre y mutante  $\Delta spoIIE$  se observaron en el medio TPM, este medio pobre en nutrientes fue utilizado para llevar a cabo el recuento de mixósporas. El análisis se realizó para tratar de determinar si, además de las diferencias observadas en el momento de formación de los cuerpos fructificantes originados por estas cepas, existían diferencias en la producción de células de resistencia.

Los resultados de estos recuentos indicaron que existen diferencias significativas en el número de esporas producidas por la cepa silvestre DZF1 y el mutante  $\Delta spoIIE$  en medio TPM (Fig. 25). Así, mientras que la cepa mutante produce un número considerable de mixósporas tras las primeras 32 horas de incubación, el número de las mismas es prácticamente nulo en la cepa silvestre. Estas diferencias se mantienen, e incluso aumentan, tras 48 horas, ya que la cepa silvestre produce  $4.5 \times 10^7$  mixósporas/placa en este medio, frente a las  $1.1 \times 10^8$  mixósporas/placa contadas en la muestra de la cepa mutante tras el mismo período de incubación, lo que representa casi dos veces y media el número de células de resistencia producidas por el silvestre. Sin embargo, el número de esporas producido por la cepa silvestre sigue siendo más bajo aunque la diferencia es menor a partir de las 72 horas de incubación (Fig. 25).

## Resultados

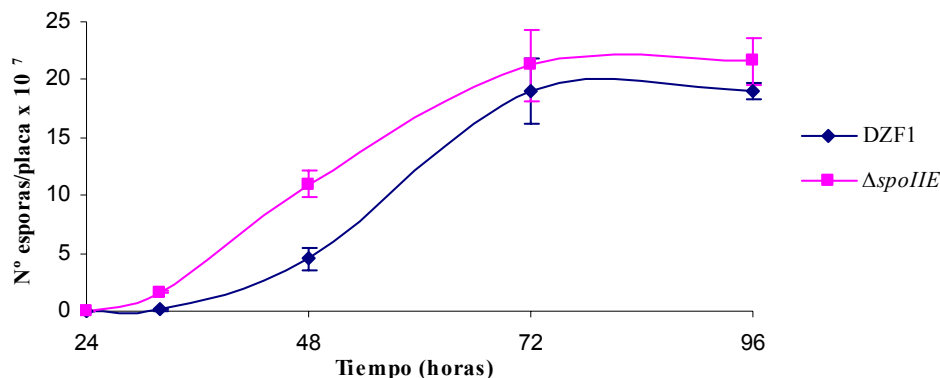


Figura 25. Recuento de mixósporas en medio TPM de las cepas DZF1 y  $\Delta spoIIE$ .

Para tratar de apreciar diferencias en la morfología de las mixósporas, se llevó a cabo la preparación de muestras para su observación al microscopio electrónico de transmisión (TEM). La visualización de estas muestras permitió determinar que las células de resistencia de  $\Delta spoIIE$  no muestran diferencias en cuanto a forma y grosor de la cubierta con respecto a las mixósporas de la cepa silvestre (no mostrado).

### D.IV.5.2.2.3. GERMINACIÓN

Para determinar la viabilidad relativa de las mixósporas producidas por la cepa silvestre DZF1 y el mutante  $\Delta spoIIE$ , las muestras utilizadas para efectuar los recuentos fueron expuestas a condiciones de disponibilidad de nutrientes para posibilitar su germinación.

Los datos obtenidos indican que las células de resistencia producidas por las dos cepas analizadas presentan una eficiencia de germinación muy similar, siendo del 8.0% para las mixósporas recogidas tras 72 horas de incubación en TPM.

## D.V. CARACTERIZACIÓN DE LA Ser/Thr FOSFATASA Pph2 (MXAN4779) Y DE PROTEÍNAS DEL MISMO OPERÓN

El gen que cifra la fosfatasa Pph2 se había analizado junto con los genes de otras fosfatasas de *M. xanthus* para determinar de manera cualitativa su perfil de expresión (Fig. 11) (D.II.). Esta fosfatasa fue una de las elegidas para su caracterización por expresarse su gen codificante durante el crecimiento vegetativo y aumentar sus niveles durante el ciclo de desarrollo. Además, aparece cerca de un sistema regulador de dos componentes, denominado *phoPR1*, que fue caracterizado en nuestro laboratorio (Carrero-Lérida *et al.*, 2005).

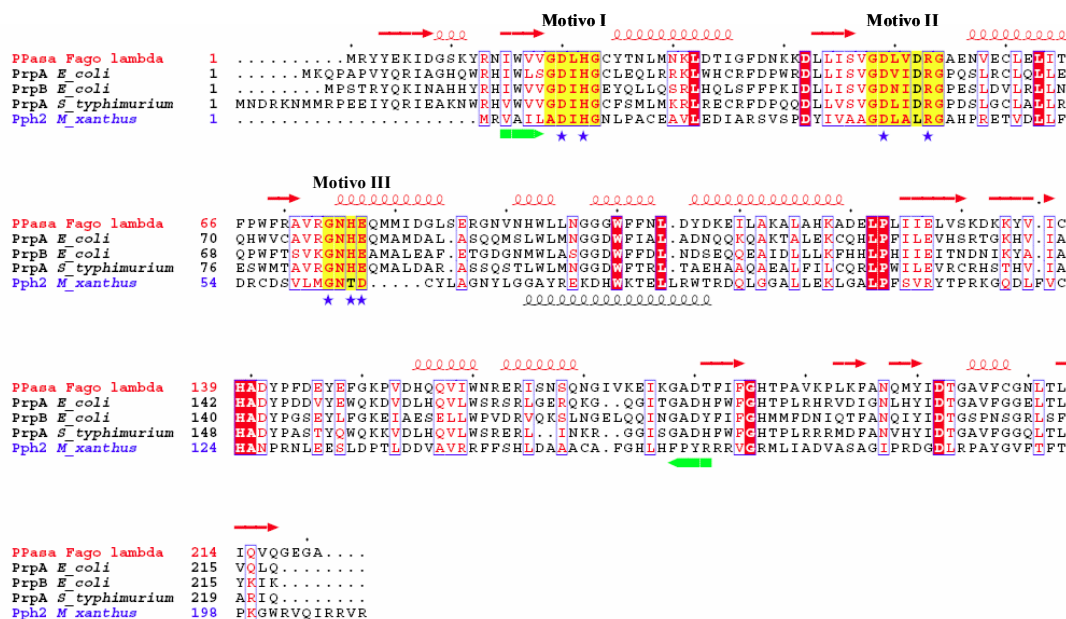
### D.V.1. Análisis de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de Pph2

El gen *pph2* consta de 945 pb y su producto es una proteína de 314 residuos con un peso molecular estimado de 34400. El ATG considerado como codón de iniciación de la traducción se determinó en función del uso de codones, dado que el 93.4% de los tripletes presentan G ó C en la tercera posición del codón, lo que representa un uso de





## Resultados

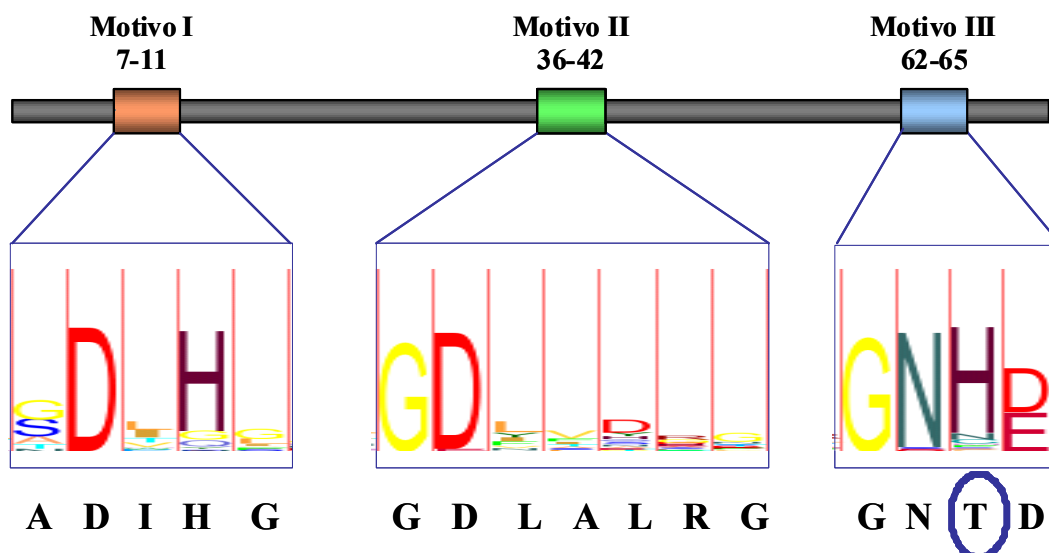


**Figura 27.** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la Ser/Thr fosfatasa Pph2 de *M. xanthus* con otras Ser/Thr fosfatasas pertenecientes a la superfamilia PPP (números de acceso en Tabla 12). Sobre fondo amarillo se indican los aminoácidos conservados pertenecientes a los motivos característicos de esta superfamilia. El resto de aminoácidos conservados se muestran sobre fondo rojo, mientras que los residuos conservados implicados en la catálisis o en la unión de metales aparecen destacados con una estrella azul. En la parte superior se muestra la estructura secundaria de la proteína  $\lambda$ -PP perteneciente al fago  $\lambda$ . En la parte inferior de los alineamientos aparece una estructura helicoidal que indica el dominio superenrollado implicado en la interacción de la fosfatasa con sus sustratos y, delimitado por flechas verdes, el dominio metalofosfatasa (PF00149) de Pph2 de *M. xanthus*.

Por otro lado, existe una región que va desde los aminoácidos 75 al 91 en Pph2 de *M. xanthus*, que constituye un dominio superenrollado importante para la interacción de la proteína con sus sustratos (Fig. 27).

En la Fig. 28 se muestran los 3 motivos conservados propios de esta superfamilia, representados mediante HMM logos (Schuster-Bockler *et al.*, 2004). Como se observa, la única sustitución aminoacídica importante presente en la fosfatasa Pph2 de *M. xanthus* es el residuo de treonina del motivo III, que debiera ser un residuo de histidina, el resto de residuos si están conservados (Fig. 28). Dado que sustituciones aminoacídicas similares a las observadas en la proteína Pph2 han sido detectadas en otras fosfatasas, (Shi *et al.*, 1998), se puede considerar que la fosfatasa Pph2 de *M. xanthus* pertenece a la superfamilia PPP de Ser/Thr fosfatasas.

El análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de la proteína Pph2 indica que esta fosfatasa de *M. xanthus* presenta localización citoplasmática, ya que carece de dominios transmembrana y de péptido señal.



**Figura 28.** Distribución de los motivos conservados de las metalofosfatasa (Pfam PF00149) en la proteína Pph2 de *M. xanthus*. Los motivos se han representado como HMM Logos utilizando fosfatasa descritas tanto en eucariotas como en procariotas (Schuster-Boeckler *et al.*, 2004). En la línea inferior se muestra la secuencia exacta que presenta Pph2 de *M. xanthus*, con el residuo de treonina del motivo III destacado. La numeración de los residuos aminoácidos constituyentes de los motivos conservados es la referida a Pph2 de *M. xanthus*.

#### D.V.2. Análisis de las regiones genómicas situadas en torno al gen *pph2*

Dada su posible relación funcional, se estudió si los genes que se encuentran alrededor de la fosfatasa *pph2* forman parte del mismo operón. Este análisis permitió conocer que en sentido 5' de *pph2* hay 4 genes, mientras que en sentido 3' se encuentra un gen. Al encontrarse en el mismo sentido de transcripción y bastante próximos, cabe la posibilidad de que estos 6 genes formen parte del mismo operón (Tabla 15).

El primer gen, MXAN4775, codifica una proteína de membrana de 311 residuos que posee repeticiones de tetratricopéptidos a lo largo de toda la proteína.

Por su parte, MXAN4776 cifra una posible lipoproteína soluble de 167 aminoácidos que no posee ningún dominio conservado.

MXAN4777 y MXAN4778 codifican el regulador de respuesta y la histidina quinasa, respectivamente, del sistema regulador de dos componentes PhoPR1. La histidina quinasa PhoR1 es una proteína de membrana que presenta una porción N-terminal de 200 aminoácidos, que constituye el dominio sensor de la proteína, y una región C-terminal de 254 residuos, correspondiente al dominio quinasa. Posee un dominio PAS, que en bacterias está asociado con la detección de estímulos y aparece en el dominio sensor de las histidina quinasa (Taylor *et al.*, 1999), y un dominio HAMP, que, como se ha comentado anteriormente en la caracterización de la fosfatasa SpoIIE de *M. xanthus*, es típico de proteínas sensoras y quimiotácticas de bacterias (Aravind y Ponting, 1999). Por su parte, PhoP1 es citoplasmática y en ella se pueden diferenciar los dominios característicos de los reguladores de respuesta, esto es, un dominio N-terminal regulador y un dominio C-terminal efector. Por otro lado, el sistema *phoPR1* se expresa durante el crecimiento vegetativo, pero aumenta sus niveles considerablemente durante

## Resultados

el ciclo de desarrollo. Este sistema está implicado en la diferenciación de los bacilos en mixósporas y en el control de la actividad fosfatasa neutra y ácida de *M. xanthus*. También es responsable de la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo energético y en la síntesis de proteínas (Carrero-Lérida, 2004).

MXAN4779 y MXAN4780 codifican, respectivamente, las fosfatasas Pph2 y SixA que se describirán en detalle más adelante.

**Tabla 15.** Genes situados en torno al gen de la fosfatasa Pph2 en el genoma de *M. xanthus*.

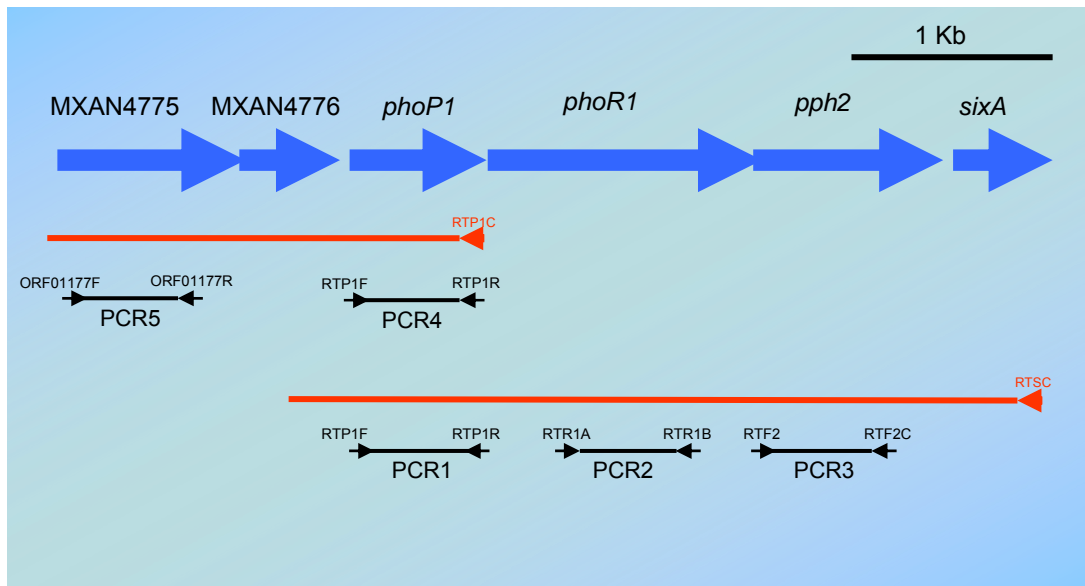
MXAN	Homología	Pfam	Tamaño (Aa)
4775	Proteína con repeticiones de tetratricopéptidos	PF07719	311
4776	Posible lipoproteína		167
4777	Regulador de respuesta PhoP	PF00072	226
4778	Histidina quinasa PhoR	PF000512	454
4779	Ser/Thr fosfatasa	PF00149	315
4780	Fosfohistidina fosfatasa SixA	PF00300	164

Para determinar si el gen *sixA* se transcribe en la misma molécula de ARNm que los otros cinco genes de *M. xanthus*, se utilizó la técnica de RT-PCR. Para ello, se siguió el procedimiento descrito en Material y Métodos (C.II.6.2.).

Una vez obtenido el ARN total de la cepa silvestre DZF1 de *M. xanthus*, se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa usando el oligonucleótido específico RTSC (Tabla 4). Este oligonucleótido anilla en el interior del gen que codifica la fosfohistidina fosfatasa SixA. De este modo, se logró sintetizar un ADN complementario al ARNm obtenido tras la transcripción del gen *sixA* (Fig. 29).

En un segundo paso, la cadena de ADN complementario obtenida se usó como molde para llevar a cabo la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, de regiones de ADN situadas dentro de los genes que codifican el regulador de respuesta PhoP1 (PCR1), la histidina quinasa PhoR1 (PCR2) y la fosfatasa Pph2 (PCR3). Para ello, se utilizaron las parejas de oligonucleótidos RTP1F-RTP1R, RTR1A-RTR1B y RTF2-RTF2C (Tabla 4), respectivamente (Fig. 29).

En el caso de que el gen *sixA* se cotranscriba con los genes *phoP1*, *phoR1* y *pph2*, los cuatro tendrán el mismo ARNm, por lo que el ADN complementario sintetizado desde el gen que codifica la fosfohistidina fosfatasa cubrirá también los genes que codifican PhoP1, PhoR1 y Pph2. Será posible, por tanto, amplificar por PCR una región de ADN situada dentro de los mencionados genes (Fig. 29).



**Figura 29.** Genes constituyentes del operón *phoP1*. Se indica la localización de los oligonucleótidos empleados para llevar a cabo la síntesis de ADN complementario y las PCRs de comprobación.

Para determinar si los genes *MXAN4775* y *MXAN4776* se transcriben en la misma molécula de ARNm que los otros cuatro genes del operón se siguió la misma estrategia descrita anteriormente. Para ello, se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa usando el oligonucleótido específico RTP1C (Tabla 4). Esto permitió sintetizar un ADN complementario al ARNm obtenido tras la transcripción del gen *phoP1*, dado que este oligonucleótido anilla en el interior del gen que codifica para el regulador de respuesta PhoP1 (Fig. 29).

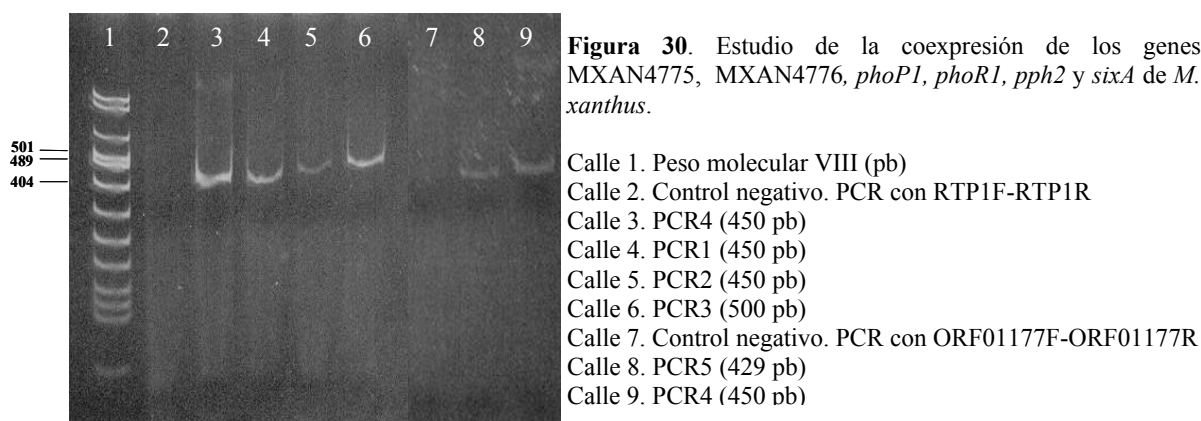
Posteriormente, utilizando como molde la cadena de ADN complementario obtenida, se amplificaron regiones de ADN situadas dentro de los genes que codifican para el regulador de respuesta PhoP1 (PCR4) y *MXAN4775* (PCR5). Para ello, se utilizaron las parejas de oligonucleótidos RTP1F-RTP1R y ORF01177F-ORF01177R, respectivamente (Tabla 4 y Fig. 29).

Si los genes *MXAN4775* y *MXAN4776* se cotranscriben con el gen *phoP1* tendrán el mismo ARNm, de modo que el ADN complementario sintetizado desde *phoP1* cubrirá también los genes *MXAN4775* y *MXAN4776*, y será posible, amplificar una región de ADN situada dentro de los mismos.

Como controles negativos se realizaron las PCRs con las parejas de oligonucleótidos RTP1F-RTP1R y ORF01177F-ORF01177R, pero tomando como molde el ARN utilizado para sintetizar el ADN complementario. En este caso, si el ARN está totalmente libre de ADN cromosómico, no se obtendrá producto de PCR puesto que no existe molde para la polimerasa (Fig. 30).

En las PCRs realizadas a partir de los ADN complementarios se obtuvo amplificación del fragmento de ADN que quedaba delimitado por cada una de las parejas de oligonucleótidos. En cambio, no se obtuvo producto de PCR cuando se utilizó el ARN inicial como molde para la reacción de PCR (Fig. 30).

## Resultados



Los resultados obtenidos indican que el gen que codifica la fosfohistidina fosfatasa SixA se transcribe conjuntamente con los genes que codifican la proteína con repeticiones de tetratricopéptidos, la lipoproteína hipotética, el regulador de respuesta PhoP1, la histidina quinasa PhoR1 y la fosfatasa Pph2. De esta manera, se puede concluir que los seis genes forman parte del mismo operón (Fig. 29).

### D.V.3. Perfil de expresión del operón en el que se localiza *pph2*

Ya se conocía que el sistema *phoPR1* se expresa durante el crecimiento vegetativo y aumenta sus niveles considerablemente durante el ciclo de desarrollo (Carrero-Lérida *et al.*, 2005). Por tanto, al formar parte del mismo operón, los genes *pph2* y *sixA* tendrán el mismo patrón de expresión que el sistema regulador de dos componentes *phoPR1*.

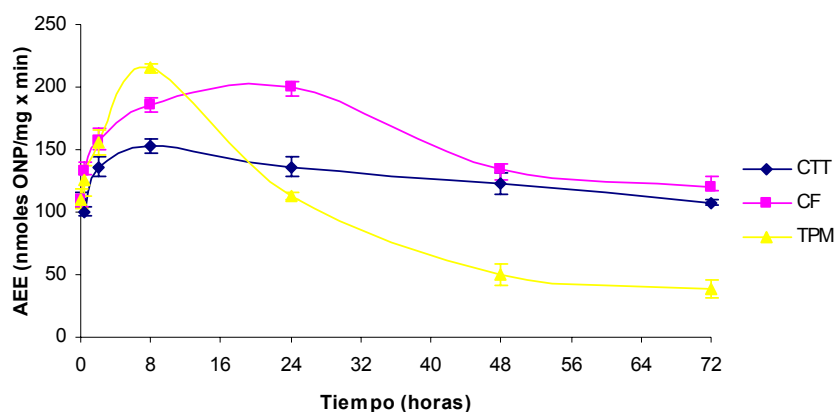
Para tratar de confirmarlo se comparó el perfil de expresión de la fusión construida entre el gen *lacZ* de *E. coli* y el gen *pph2* de *M. xanthus* (D.II.), con la obtenida entre el gen *lacZ* de *E. coli* y el gen *phoP1* de *M. xanthus* (Carrero-Lérida *et al.*, 2005). Si los genes forman parte del mismo operón mostrarían un perfil de expresión similar. A continuación, se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la actividad enzimática  $\beta$ -galactosidasa de dicha cepa como se indica en Material y Métodos (C.II.11.3.).

La Fig. 31 muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa específica de la cepa Pph2LZ de *M. xanthus* portadora de la fusión *pph2-lacZ* en medio CTT, para el crecimiento vegetativo, y en los medios CF y TPM, para el análisis del ciclo de desarrollo.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el gen que codifica la fosfatasa Pph2 se expresa siguiendo el mismo patrón de expresión que el sistema regulador de dos componentes *phoPR1* (Carrero-Lérida *et al.*, 2005), es decir, ambos se expresan tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo de la bacteria. No obstante, experimentan un notable aumento en su expresión durante el ciclo de desarrollo ya que, como puede observarse en la Fig. 31, en medio CTT el nivel de actividad  $\beta$ -galactosidasa se mantiene prácticamente constante a lo largo del tiempo, mientras que en los medios de cultivo pobres en nutrientes se distingue un punto en el que la expresión es máxima. Así, en medio CF la máxima expresión se alcanza tras 8 horas de incubación, aunque los niveles se mantienen muy similares hasta transcurridas

24 horas del desarrollo momento a partir del cual desciende hasta llegar a los niveles del crecimiento vegetativo. Por su parte, en medio TPM la expresión máxima se alcanza igualmente tras 8 horas de incubación, pero a continuación el nivel de actividad  $\beta$ -galactosidasa desciende bruscamente hasta índices bastante inferiores a los de CTT o CF para el mismo periodo de incubación. No obstante los niveles de expresión de *pph2* son más bajos que los mostrados por el sistema *phoPR1* probablemente porque el gen *pph2* se encuentra en sentido 3' de dicho sistema, ya que cuanto más alejado se encuentre un gen de su promotor menor es su eficiencia de traducción.

Este resultado, unido al obtenido mediante la técnica de RT-PCR (Fig. 30), confirma que el gen codificante de la fosfatasa Pph2 forma parte del mismo operón que el sistema *phoPR1* y que, por tanto, estarán implicados en los mismos procesos.



**Figura 31.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa específica de la cepa Pph2LZ durante el crecimiento vegetativo (medio CTT) y durante el ciclo de desarrollo (Medios CF y TPM).

#### D.V.4. Autorregulación del operón por el sistema PhoPR1

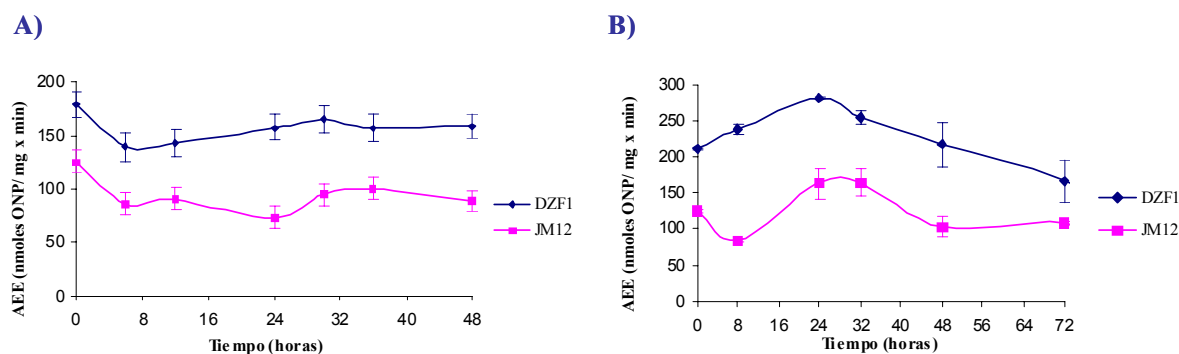
Para determinar si el regulador de respuesta PhoP1 está implicado en la regulación de la expresión de su propio operón y, en consecuencia, de la expresión de los genes de las fosfatasas Pph2 y SixA, se dispuso del plásmido pJC1BELacK que porta la fusión entre el gen *phoP1* de *M. xanthus* y el gen *lacZ* de *E. coli*, y de una cepa mutante de delección, construida no en fase, para el sistema *phoPR1*, denominada JM12 (Carrero-Lérida *et al.*, 2005). Se recurrió a esta fusión, en lugar de la anterior, porque los niveles de expresión son superiores y por tanto cualquier efecto será más evidente. De este modo, las diferencias de actividad  $\beta$ -galactosidasa que se pudieran observar entre las cepas DZF1 y JM12 portadoras de la fusión *phoP1-lacZ* podrían ser atribuidas a la ausencia del regulador de respuesta PhoP1 en la cepa mutante de delección y, por tanto, serían indicativas de que el sistema PhoPR1 controla su propia expresión.

La introducción del plásmido pJC1BELacK en la cepa JM12 se realizó mediante electroporación, una vez dializado. Para permitir el crecimiento selectivo de las bacterias portadoras del gen de resistencia a kanamicina, que forma parte del plásmido pJC1BELacK, las células electroporadas fueron incubadas en medio CTT con kanamicina. Las bacterias que creciesen en este medio deberían ser aquellas en las que hubiese tenido lugar un único entrecruzamiento entre el cromosoma de la bacteria y el

## Resultados

plásmido pJC1BElacK. Los posibles positivos fueron analizados mediante Southern blot (no mostrado).

Cuando se analizó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de dicha fusión introducida en la cepa silvestre DZF1 y en el mutante de delección JM12, se observó que durante el crecimiento vegetativo en medio CTT y durante el ciclo de desarrollo en medio TPM, los niveles de expresión del operón se reducen de un 50 a un 60% en el mutante JM12 respecto a DZF1 (Fig. 32A y 32B). Por tanto, puesto que la actividad  $\beta$ -galactosidasa no está completamente abolida en el mutante, el sistema PhoPR1 controla sólo parcialmente la expresión de su operón.



**Figura 32.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa específica de la fusión *phoP1-lacZ* en el silvestre (DZF1) y en el mutante de delección del sistema *phoPR1* (JM12). A) En medio CTT. B) En medio TPM.

### D.V.5. Caracterización de la fosfohistidina fosfatasa SixA (MXAN4780)

Dado que el gen que cifra la fosfatasa SixA forma parte del mismo operón que los genes codificantes del sistema PhoPR1 y la fosfatasa Pph2, resultaba interesante su caracterización, ya que es probable que en *M. xanthus* existan sistemas de transducción de señales donde intervengan conjuntamente tanto proteínas quinasa y fosfatasas de tipo eucariota como sistemas reguladores de dos componentes típicos de procariontes. Además, sólo existen dos proteínas de tipo SixA en el genoma de *M. xanthus*.

La fosforilación en residuos de histidina en los sistemas reguladores de dos componentes origina fosfoamidados (Klumpp y Krieglstein, 2002). Uno de los mecanismos de regulación del grado de fosforilación de la histidina quinasa de estos sistemas está mediado por las fosfatasas de tipo SixA (Matsubara y Mizuno, 2000).

En *E. coli* hay unas treinta formas de fosforilación His-Asp que responden a una amplia variedad de estímulos ambientales regulando múltiples respuestas celulares, incluyendo quimiotaxias, osmorregulación y patogénesis. La fosfohistidina fosfatasa SixA de *E. coli* está implicada en procesos de desfosforilación de residuos de histidina del sistema regulador de dos componentes ArcB, involucrado en la osmorregulación y la respiración anaeróbica de esta bacteria (Matsubara y Mizuno, 2000).

En *M. xanthus* la fosforilación es uno de los principales factores que regula la transducción de señales durante el ciclo de desarrollo. Por ello, debe haber proteínas fosfatasas que desfosforilen tanto residuos fosforilados de serina, treonina y tirosina,

como de histidina. Por todo ello, se procedió a caracterizar esta fosfatasa SixA de *M. xanthus*.

### D.V.5.1. Análisis de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de SixA

El gen *sixA* está constituido por 495 pb y codifica una proteína de 164 residuos con un peso molecular estimado de 17800. Esta proteína presenta el uso de codones típico de *M. xanthus*, dado que el 91% de los tripletes presentan G o C en la tercera posición (Bibb *et al.*, 1984; Inouye *et al.*, 1989; Shimkets, 1993). No se pudo identificar una posible región de unión al ribosoma en sentido 5' respecto al codón de iniciación de la traducción establecido (Fig. 33).

```

CGGGCGGGCGCCGCTGCCCTGGACGGCTCAACGATTT CGAAGGGTAGACGTTGT CGCCAGTCCGTTGCTTGCGCGGGAACGCCGGGGTGATT CACGGCGC
TCACG ATG TCT GCA CGC GAG CTG CCG CTG CTG TTC ATC CGC CAC GCC GTC GCG GAG GAC TCT CAC GTC
Met Ser Ala Arg Glu Leu Pro Leu Leu Phe Ile Arg His Ala Val Ala Glu Asp Ser His Val
CTG GGC GAT GAG GCG CGC GCC CTC ACC CCG GAA GGC CGC GCC GCC TTC CGC CAC CAT GCA CGC AAG CTG
Leu Gly Asp Glu Ala Arg Ala Leu Thr Pro Glu Gly Arg Ala Ala Phe Arg His His Ala Arg Lys Leu
GCA CGC CTC ACG CCA CTG CGC GGC ATC ATC ACC AGT CCG CTG GTG CGT GCC GTC CAG ACG GCG GAG CTG
Ala Arg Leu Thr Pro Leu Arg Gly Ile Ile Thr Ser Pro Leu Val Arg Ala Val Glu Thr Ala Glu Leu
CTC GCC GAG GCC TTC GGC GTG TCC GGC GTG GAG GTC CAC CCC GCC CTG CTG CCC CAG CGC GGC GCG CAC
Leu Ala Glu Ala Phe Gly Val Ser Gly Val Glu Val His Pro Ala Leu Leu Pro Glu Arg Gly Ala His
AAG CGC ATC GTC GAC CTG GGC CGC GAG CGC GGA GCG GGC TGG GCC CTG GTG GGC CAC AAC CCC TCG CTG
Lys Arg Ile Val Asp Leu Gly Arg Glu Arg Gly Ala Gly Trp Ala Leu Val Gly His Asn Pro Ser Leu
GAG CGC GCG GCC ATT CGC GCC CTG GAG CAT GAG CTG CCG GAC AAG CTG CGC AAG GGC GCG GCG CTG GCG
Glu Arg Ala Ala Ile Arg Ala Leu Glu His Glu Leu Pro Asp Lys Leu Arg Lys Gly Ala Ala Leu Ala
CTC CAT CCC CTG AAG AAC GGC GGC TTC ACG CTC GCG TGG TGG GCC ACG CCG GGC AAG CCC GTG AAG GCG
Leu His Pro Leu Lys Asn Gly Gly Phe Thr Leu Ala Trp Trp Ala Thr Pro Gly Lys Pro Val Lys Arg
CCC GGC GAC CTG CCG TGA CGCGCCTCAGTGCGCCGCGCCACGACAGGAAGGACAGGACGAGCATGCCAGCACCGTGGCGGTGATTCCCACGTAG
Pro Gly Asp Leu Arg ...
AGCCGGTCTTCTGCTGGCGGAAGATGAGCAGCGACAGGGCCACCCGCATCACCGGTAGGGCCATCATCA

```

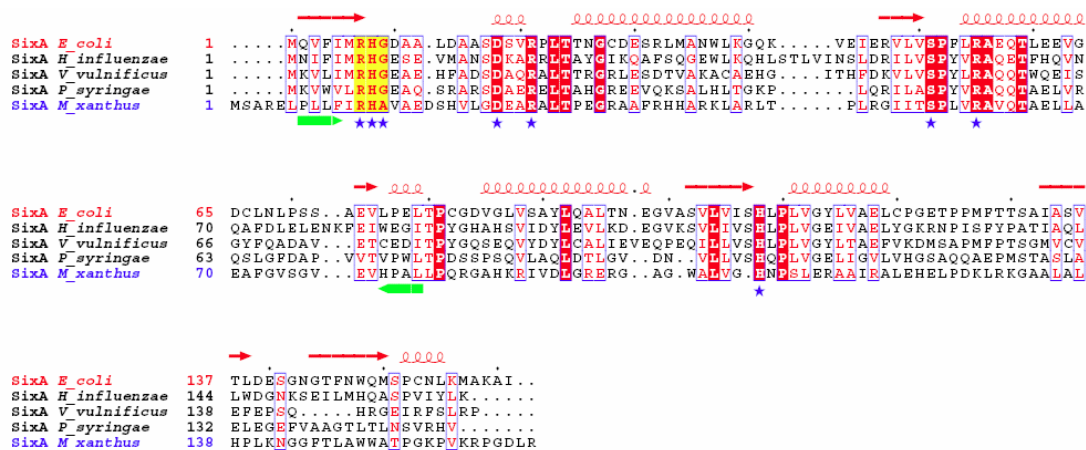
**Figura 33.** Secuencia nucleotídica del gen *sixA* de *M. xanthus*. En verde se indica la secuencia aminoacídica deducida de la fosfatasa SixA. En verde se destaca el codón de iniciación de *sixA* y en rojo el codón de terminación.

La comparación de la secuencia aminoacídica de SixA de *M. xanthus* con las proteínas depositadas en las bases de datos permitió observar que muestra una elevada homología, a lo largo de casi la totalidad de la proteína, con fosfohistidina fosfatasas SixA de diferentes microorganismos. Esta proteína se parece a SixA de *E. coli* (Ogino *et al.*, 1998; Hamada *et al.*, 2005), con la que muestra un 19.9% de identidad, a SixA de *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995) con un 19.3% de identidad, a SixA de *Vibrio vulnificus* (Rhee *et al.*, 2000) con un 17.6% de identidad y a SixA de *Pseudomonas syringae* (Buell *et al.*, 2003), con un 22.3% de identidad (Fig. 34). Esta identidad se encuentra principalmente restringida a los residuos catalíticos típicos de este tipo de enzimas.

De esta manera, en las fosfatasas de tipo SixA los residuos conservados R7, H8 y G9 (numeración referida a SixA de *E. coli*) constituyen el motivo conservado RHG, localizado en su extremo N-terminal, donde H8 actúa como aceptor nucleofílico del fosfato durante el proceso de desfosforilación. Este motivo RHG también se encuentra presente en fructosa 2, 6 bifosfatasas de eucariotas, en fosfatasas periplásmicas, en glucosa-1-fosfato fosfatasas de *E. coli* y en fosfoglicerato mutasas (Ogino *et al.*, 1998).

Los residuos D18, R21, S51, R55 y H108 se encuentran en el sitio activo y también están implicados en la catálisis. Los aminoácidos conservados H8 y H108 se encuentran separados por una distancia apropiada e imprescindible para la desfosforilación del sustrato (Ogino *et al.*, 1998; Hamada *et al.*, 2005).





**Figura 34.** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la fosfatasa SixA de *M. xanthus* con otras fosfohistidina fosfatasas (números de acceso en Tabla 12). Sobre fondo amarillo aparecen los aminoácidos conservados del motivo RHG característico de las fosfohistidina fosfatasas. El resto de aminoácidos conservados se muestran sobre fondo rojo, mientras que los aminoácidos conservados implicados en la catálisis o en la unión de metales aparecen destacados con una estrella azul. En la parte superior se muestra la estructura secundaria de la proteína SixA de *E. coli*, mientras que en la parte inferior se destaca el dominio PGAM (PF00300), delimitado por flechas verdes, de SixA de *M. xanthus*.

En la fosfatasa SixA de *M. xanthus* se encuentran estos residuos conservados, salvo el residuo de glicina del motivo conservado RHG, que aparece sustituido por un residuo de alanina (Fig. 34).

El análisis de la secuencia aminoacídica de SixA indica que esta proteína tiene localización citoplasmática, ya que carece de segmentos transmembrana y de péptido señal.

### D.V.5.2. Implicación de SixA en el ciclo de vida de *M. xanthus*

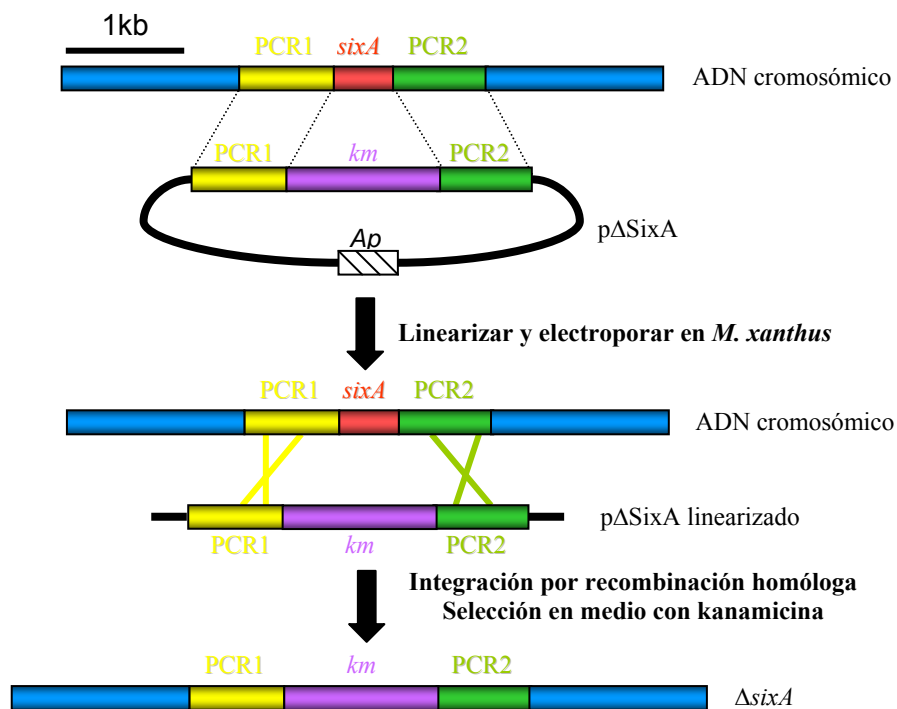
Para tratar de determinar la posible implicación de esta fosfatasa tanto en el ciclo vegetativo como en el ciclo de desarrollo de *M. xanthus* se obtuvo un mutante de delección que careciese de dicho gen.

#### D.V.5.2.1. Obtención de un mutante de delección para el gen *sixA*

La obtención de este mutante de delección implicó la sustitución de una región de 495 pb del cromosoma de la cepa silvestre de *M. xanthus* DZF1, correspondiente a la secuencia codificante de la fosfohistidina fosfatasa SixA, por un gen que confiere resistencia a kanamicina. Al tratarse del último gen del operón no existe riesgo de efecto polar de la mutación como consecuencia de no haberla realizado en fase. Esta estrategia sólo se utilizó para la construcción de este mutante, por ello se detalla a continuación.

Para realizar esta construcción se amplificaron mediante PCR los fragmentos situados inmediatamente por delante (PCR1) y por detrás (PCR2) del gen *sixA* con las parejas de oligonucleótidos SixA1E-SixA1B y SixA2B-SixA2H, respectivamente (Tabla 6). Estos fragmentos fueron clonados secuencialmente en el vector pUC19. En

primer lugar, pUC19 y PCR1 fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*, y puestos en contacto. Como resultado de la ligación se obtuvo el plásmido pUC19-PCR1. Posteriormente, este plásmido, así como PCR2, fueron digeridos con *BamHI* y *HindIII*, y ligados. El resultado de esta ligación dio lugar al plásmido pUC19-PCR1-2. A continuación, en el plásmido pUC19-PCR1-2 se clonó un gen que confiere resistencia a kanamicina, de modo que pudiera ser usado como marcador selectivo. Como plásmido donador de un gen que confiere resistencia a kanamicina se utilizó pUC7SKm(Pst'). Este plásmido fue digerido con la enzima *BamHI* y el fragmento de 1.3 kb resultante se ligó al plásmido pUC19-PCR1-2 digerido con la misma enzima. El plásmido así obtenido se denominó p $\Delta$ SixA (Fig. 35).

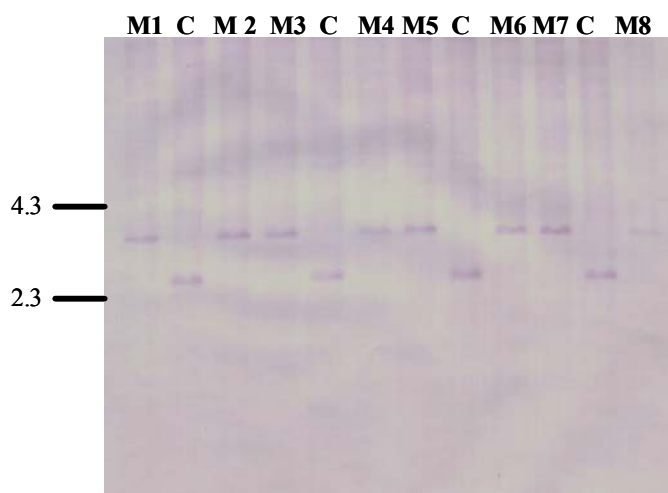


**Figura 35.** Estrategia seguida para la construcción de un mutante de deleción para el gen *sixA* de *M. xanthus*.

Por tanto, el plásmido p $\Delta$ SixA contiene los fragmentos situados por encima y por debajo del gen *sixA*, y en el que la totalidad de dicho gen ha sido sustituida por un gen que confiere resistencia a kanamicina.

Una vez obtenido el plásmido anterior, el paso siguiente consistió en introducirlo en *M. xanthus*. Para ello, p $\Delta$ SixA fue digerido con *HindIII* para su linearización y, posteriormente, dializado antes de ser introducido en la cepa DZF1 de *M. xanthus* mediante electroporación. Las células electroporadas fueron cultivadas en medio sólido CTT adicionado con kanamicina (80  $\mu$ g/ml), de modo que en este medio sólo podían crecer las células que hubieran incorporado el gen de resistencia a kanamicina mediante un doble entrecruzamiento entre el plásmido p $\Delta$ SixA linearizado y el cromosoma de la mixobacteria (Fig. 35).

## Resultados



**Figura 36.** Southern blot para la identificación de la cepa mutante de delección para el gen *sixA*. Las calles M corresponden al cromosoma de las colonias resistentes a kanamicina y las calles C al cromosoma de la cepa silvestre DZF1 utilizado como control. En todos los casos el cromosoma se digirió con *XhoI*. Como sonda se empleó el producto de PCR PCR2. El tamaño de los fragmentos esperados era de 2.8 kb en el caso del silvestre y 3.6 kb en el mutante. El tamaño del estándar se muestra en kb.

Tras varios días de incubación, algunas de las colonias que crecieron en el medio con kanamicina fueron seleccionadas como presuntos positivos y analizadas mediante Southern blot (Fig. 36). Las ocho colonias analizadas eran mutantes de delección para el gen de la fosfohistidina fosfatasa SixA. La cepa así obtenida se denominó  $\Delta sixA$ .

### D.V.5.2.2. Caracterización del mutante $\Delta sixA$

Dado que el sistema regulador de dos componentes *phoPR1* se expresa a nivel basal durante el crecimiento vegetativo y aumenta los niveles de expresión durante el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*, el gen que codifica la fosfatasa SixA, al formar parte del mismo operón debe seguir el mismo patrón de expresión que el sistema. Por tanto, se analizaron, mediante comparación con la cepa silvestre DZF1, los distintos parámetros que podrían verse alterados por la ausencia de esta fosfatasa en la mixobacteria durante su fase de crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo.

#### D.V.5.2.2.1. CRECIMIENTO VEGETATIVO

El mutante de delección  $\Delta sixA$  fue cultivado en medio CTT líquido siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos (C.II.12.2.1). Como control, la cepa silvestre DZF1 fue analizada en paralelo.

Los resultados obtenidos indican que no existen diferencias ni en el tiempo requerido por las células para su duplicación, en torno a 4 horas, ni en la densidad celular mostrada por los cultivos tras alcanzar la fase estacionaria, en torno a  $DO_{600}$  de 2. Así mismo, tampoco se aprecian diferencias significativas en la fase exponencial, que se prolonga hasta transcurridas unas 24 horas de incubación, seguida de una fase estacionaria que se mantiene hasta que tiene lugar la lisis celular tras 48 horas de incubación.

El análisis de la movilidad en medio sólido de la cepa mutante, en comparación con la cepa silvestre DZF1, siguiendo las indicaciones descritas en Material y Métodos (C.II.12.2.2.), permitió determinar que la delección del gen que cifra la fosfatasa SixA no tiene influencia sobre la movilidad social (del enjambre) o aventurera (células

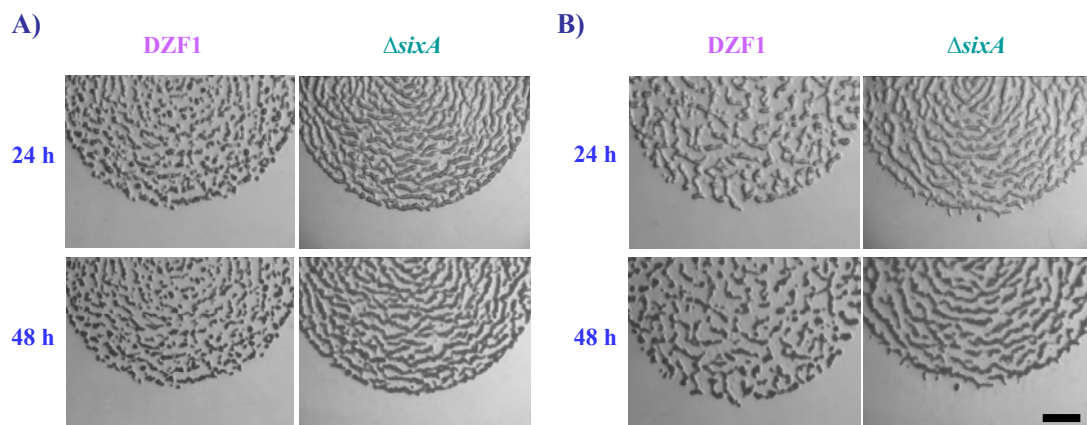
individuales), dado que no existen diferencias en las medidas del deslizamiento de los enjambres de  $\Delta sixA$  respecto a la cepa DZF1.

#### D.V.5.2.2.2. CICLO DE DESARROLLO

Dado que la delección del gen *sixA* no parecía causar modificaciones fenotípicas durante el crecimiento vegetativo, se llevaron a cabo experimentos encaminados a detectar la posible influencia que la ausencia de la fosfatasa SixA pudiera tener sobre diversos aspectos del ciclo de desarrollo. Los procedimientos seguidos para analizar estos procesos se detallan en los apartados C.II.12.2.3., C.II.12.2.4. y C.II.12.2.5.

##### D.V.5.2.2.2.1. Fenotipo durante el ciclo de desarrollo

En la Fig. 37A se muestran los cuerpos fructificantes originados por las cepas silvestre DZF1 y mutante  $\Delta sixA$  en medio CF a partir de cultivos de ambas cepas que habían sido concentrados hasta una  $DO_{600}$  inicial de 60. Como se puede observar, tras 24 horas de incubación tanto la cepa silvestre como el mutante forman cuerpos fructificantes prácticamente maduros que se muestran densos y compactos. No obstante, se aprecian ligeras diferencias respecto a la morfología de estas formaciones macroscópicas, dado que los cuerpos fructificantes generados por  $\Delta sixA$  presentan una forma más alargada que los producidos por la cepa silvestre.



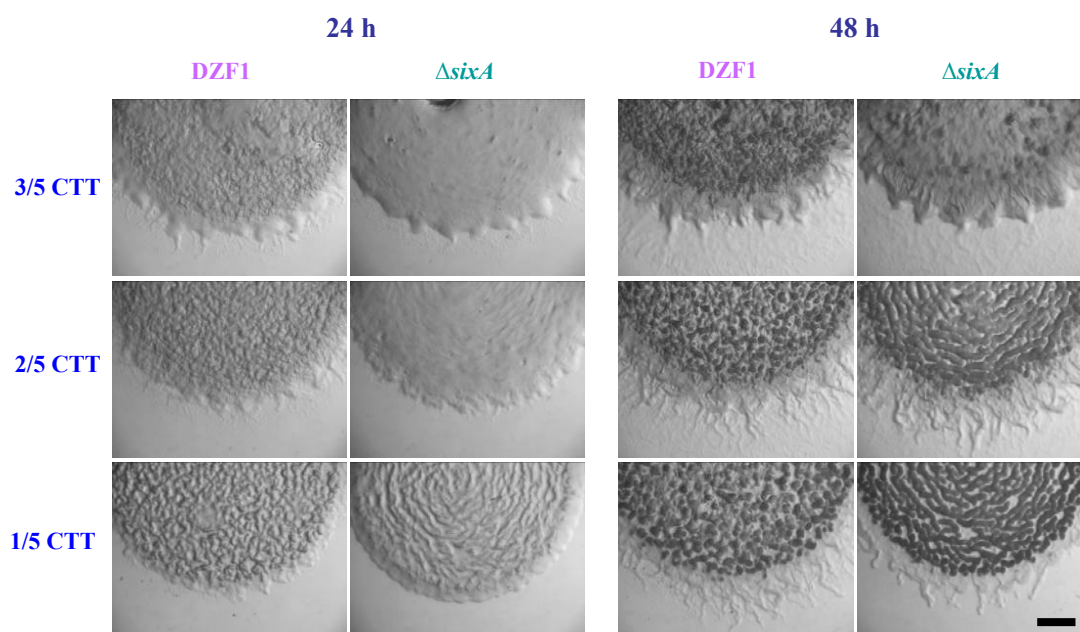
**Figura 37.** Análisis fenotípico de las cepas silvestre DZF1 y mutante  $\Delta sixA$  de *M. xanthus* utilizando cultivos concentrados a  $DO_{600}$  inicial de 60. A) En medio CF. B) En medio TPM. La barra representa 1 mm.

Los cuerpos fructificantes originados por la cepa  $\Delta sixA$  en medio TPM, en comparación con la cepa DZF1, en ambos casos con una  $DO_{600}$  de partida de 60, se muestran en la Fig. 37B. Se puede apreciar cómo transcurridas 24 horas del desarrollo la cepa mutante presenta un ligero retraso en la formación de los cuerpos fructificantes dado que se muestran algo más translúcidos que los de la cepa silvestre. Las diferencias fenotípicas entre las cepas mutante y control se atenúan con el avance del ciclo de desarrollo de modo que, tras 48 horas de incubación en medio TPM, los cuerpos fructificantes generados por  $\Delta sixA$  muestran un grado de maduración similar a los de DZF1, si bien el empaquetamiento de los mismos es menor en la cepa mutante que en la cepa silvestre.

## Resultados

No se obtuvieron diferencias significativas cuando se emplearon cultivos concentrados a  $DO_{600}$  inicial de 15 para los dos medios del desarrollo. Por tanto, parece que la ausencia de la fosfatasa SixA no origina cambios fenotípicos evidentes durante el ciclo de vida de *M. xanthus* en las condiciones analizadas.

Dado que no se observaron diferencias fenotípicas significativas entre la cepa silvestre DZF1 y el mutante de delección  $\Delta sixA$  en los medios inductores del desarrollo utilizados hasta el momento, se decidió analizar si existían diferencias entre las cepas cuando las distintas etapas del ciclo de desarrollo se suceden de un modo más pausado. Para ello, se utilizaron como medio sólido de cultivo las variantes 3/5 CTT, 2/5 CTT y 1/5 CTT, que contienen cantidades decrecientes de Bacto-casitona y, por tanto, de nutrientes.

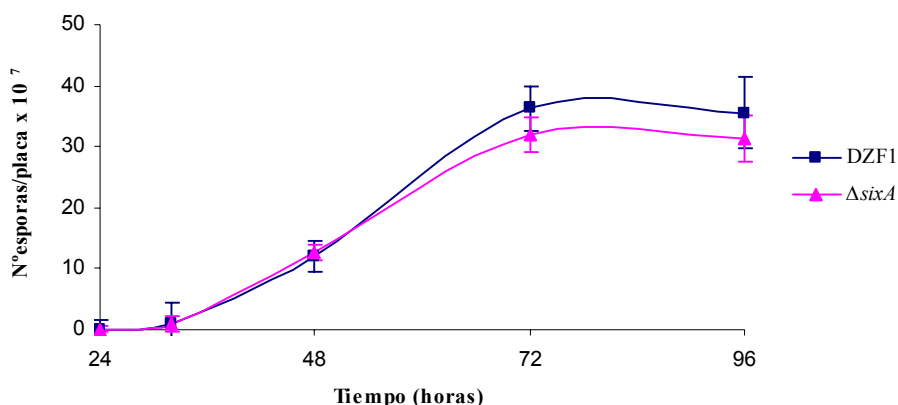


**Figura 38.** Análisis fenotípico de las cepas silvestre DZF1 y mutante  $\Delta sixA$  de *M. xanthus* en medio CTT con distintas concentraciones de Bacto-casitona transcurridas 24 y 48 horas de incubación. Los cultivos fueron concentrados hasta  $DO_{600}$  inicial de 60. La barra representa 1 mm.

Como se aprecia en la Fig. 38, el mutante de delección muestra retraso en la formación de cuerpos fructificantes con respecto a la cepa silvestre. Así, la bacteria silvestre, tras 24 horas, forma agregados incipientes e irregulares en los tres medios empleados, mientras que la cepa mutante no muestra signos de agregación, y sólo en el medio 1/5 CTT el mutante  $\Delta sixA$  comienza a formar agregados de un modo similar al de la cepa silvestre. Transcurridas 48 horas de incubación, el retraso inicial en el ciclo de desarrollo de  $\Delta sixA$  desaparece. No obstante, se aprecian diferencias en la morfología de los cuerpos fructificantes. En este sentido, en los medios 2/5 y 1/5 CTT, la cepa silvestre origina cuerpos fructificantes algo menos compactos y más irregularmente distribuidos que la cepa  $\Delta sixA$ . Por el contrario, en el medio 3/5 CTT, al poseer una concentración superior de Bacto-casitona, no se dan las condiciones para progresar en la formación de cuerpos fructificantes y el ciclo de desarrollo se encuentra en sus estadios iniciales.

## D.V.5.2.2.2.2. Esporulación

Dado que las ligeras diferencias fenotípicas entre las cepas  $\Delta sixA$  y DZF1 se apreciaron cuando se prolonga el ciclo de desarrollo al utilizar medios con diferentes concentraciones de Bacto-casitona, el medio CF fue utilizado para llevar a cabo el recuento de esporas, ya que es el medio clásico inductor del ciclo de desarrollo en el cual esta etapa del ciclo de vida de *M. xanthus* transcurre más lentamente.



**Figura 39.** Recuento de mixósporas en medio CF de las cepas silvestre y mutante  $\Delta sixA$ .

No obstante, los recuentos efectuados ponen de manifiesto que no existen diferencias significativas en el número de mixósporas, de manera que la cepa silvestre produce  $3.6 \times 10^8$  mixósporas/placa tras 72 horas de incubación, frente a  $3.2 \times 10^8$  mixósporas/placa contadas en la cepa  $\Delta sixA$  (Fig. 39). Estas ligeras diferencias se mantuvieron en los recuentos efectuados con las muestras de las dos cepas tras 96 horas de incubación en medio CF.

## D.V.5.2.2.2.3. Germinación

Tras efectuar el recuento de las células de resistencia originadas por las cepas silvestre DZF1 y  $\Delta sixA$ , las mixósporas fueron expuestas a condiciones de disponibilidad de nutrientes que posibilitaran su germinación para, de este modo, determinar la viabilidad relativa de las mismas. De esta manera se determinó que ambas cepas presentan una eficiencia de germinación muy similar, situándose en el 7% para mixósporas recogidas tras 96 horas de incubación.

### D.V.5.3. Demostración de que SixA es una fosfohistidina fosfatasa

Para tratar de demostrar que la proteína SixA de *M. xanthus* es una fosfohistidina fosfatasa funcional era necesario clonar su gen codificante en un vector de expresión y la posterior purificación de la proteína recombinante para determinar su actividad *in vitro* hacia residuos de histidina fosforilados presentes en la histidina quinasa de los sistemas reguladores de dos componentes.

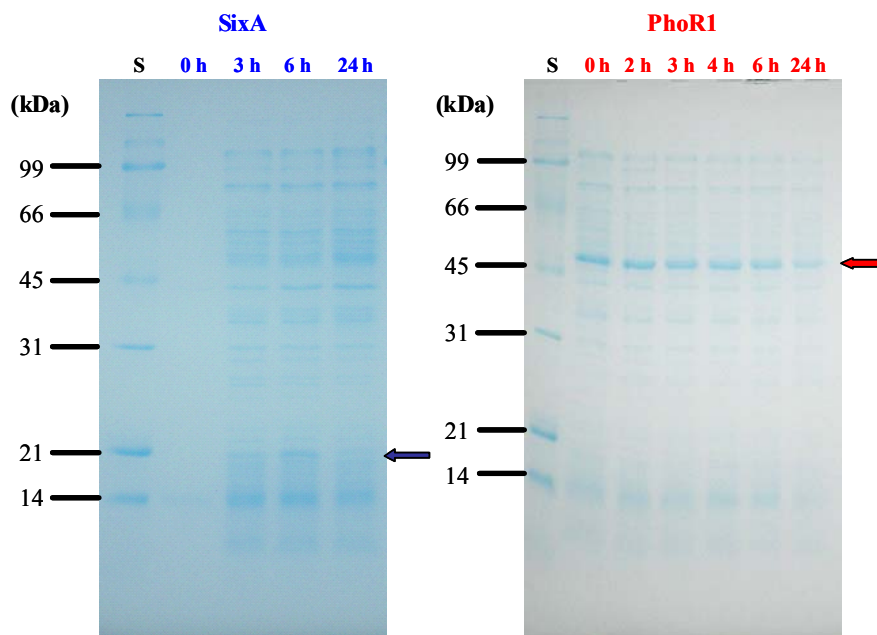
Como se ha comentado anteriormente, el gen *sixA* forma parte del mismo operón que el sistema *phoPR1*. Por tanto, la histidina quinasa PhoR1 fue la primera candidata analizada para tratar de demostrar la actividad fosfatasa de SixA.

### D.V.5.3.1. Clonación de *sixA* y *phoR1* en el vector pET-28a(+) y sobreexpresión de las proteínas recombinantes en *E. coli*

Como paso inicial, se amplificó mediante PCR la secuencia codificante del gen *sixA* y de la fracción citoplasmática de *phoR1* que comprende la región catalítica de la histidina quinasa y, por tanto, el residuo de histidina fosforilable conservado. Para ello, se utilizó como molde el ADN cromosómico de *M. xanthus* y los oligonucleótidos específicos SixANcoIF-SixAXhoR, para la fosfatasa SixA, y la pareja PhoR1NdeF-PhoR1XhoR, para la histidina quinasa PhoR1 (Tabla 8). A continuación, los productos de PCR, así como el vector pET28a(+), fueron digeridos con las enzimas de restricción adecuadas y puestos en contacto. Los plásmidos resultantes se denominaron pET-SixA y pET-PhoR1.

Para sobreexpresar las proteínas recombinantes, se transformó la cepa BL21(DE3)Star de *E. coli* con el plásmido pET28-SixA o pET28-PhoR1, según se tratara de la sobreexpresión de la fosfatasa o la histidina quinasa, respectivamente, siguiendo las indicaciones descritas en Material y Métodos (C.II.8.2.1.).

Para determinar las condiciones idóneas de inducción, se analizó la producción de cada proteína recombinante modificando los parámetros de tiempo y temperatura de incubación. Así, las incubaciones de los cultivos a los que se había adicionado IPTG se realizaron a 24 y 30°C, y, para cada una de ellas, se analizaron extractos celulares tomados tras 0, 3, 6 y 24 horas en el caso de las muestras incubadas a 24°C, mientras que en el caso de los cultivos incubados a 30°C las muestras fueron analizadas tras 0, 2, 3, 4, 6 y 24 horas de incubación. Los extractos se trataron como se indica en Material y Métodos (C.II.8.2.2.) y fueron analizados mediante SDS-PAGE, lo que permitió determinar las condiciones en las que se obtenía mayor proporción de proteína recombinante en la fracción soluble (Fig. 40).



**Figura 40.** Producción de las proteínas recombinantes SixA y PhoR1 a 24 y 30°C de incubación, respectivamente. Se muestran las fracciones solubles de las células de *E. coli* productoras de SixA y PhoR1 tomadas tras distintos periodos de inducción. SixA presenta un peso molecular estimado de 18.5 kDa, mientras que el de PhoR1 es de 45.7 kDa.

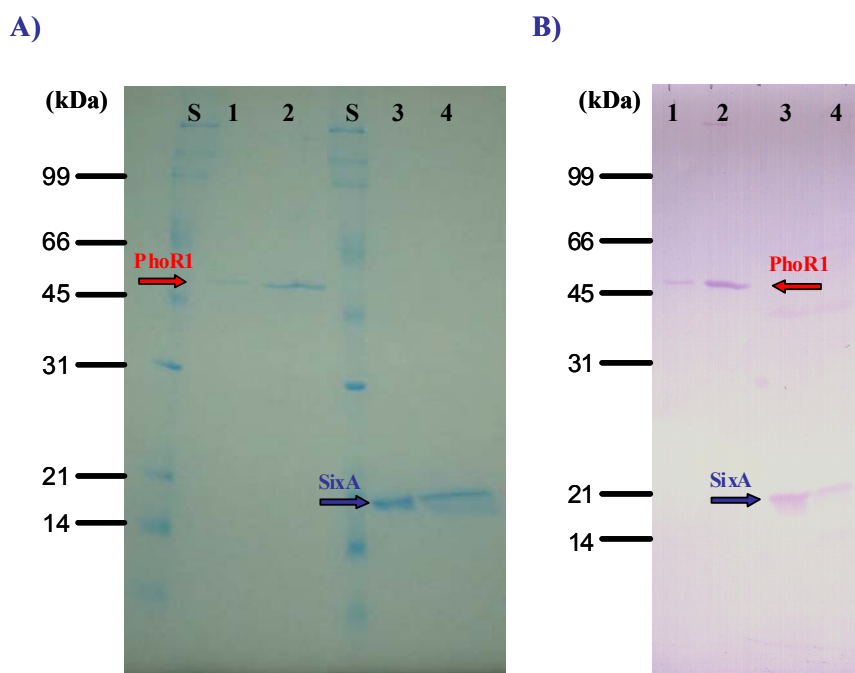
Tras este análisis, se estableció que la purificación de la proteína recombinante SixA se realizaría a partir de las fracciones solubles obtenidas tras 6 horas de incubación a 24°C, mientras que la purificación de PhoR1 recombinante se realizaría tras 3 horas de incubación a 30°C, tomando como material de partida igualmente la fracción soluble.

#### D.V.5.3.2. Purificación de las proteínas SixA y PhoR1

Una vez establecidas las condiciones en las que ambas proteínas se producían en mayor concentración en forma soluble, se procedió a su purificación (Fig. 41A). La proteína recombinante SixA presenta fusionada en el extremo carboxilo una cola de histidina, mientras que la proteína recombinante PhoR1 posee dos colas, una en el extremo amino y otra en el extremo carboxilo. La presencia de estas colas permitió la purificación de las proteínas recombinantes en un solo paso mediante el desarrollo de cromatografía de afinidad en columnas de agarosa-níquel, siguiendo las indicaciones desarrolladas en Material y Métodos (C.II.8.2.3.).

En la Fig. 41A se muestra el resultado de la purificación de ambas proteínas después de su concentración para eliminar el imidazol presente en las muestras. Como se puede observar en la imagen, se obtuvieron ambas proteínas con un elevado grado de pureza.

Las muestras obtenidas tras la purificación y concentración fueron comprobadas mediante Western blot para confirmar que se trataba de las proteínas deseadas. Para ello, se utilizó un anticuerpo específico frente a la cola de histidinas del extremo carboxilo terminal de las proteínas recombinantes analizadas, siguiendo las indicaciones descritas en Material y Métodos (C.II.8.3.) (Fig. 41B).



**Figura 41.** Purificación de las proteínas recombinantes PhoR1 y SixA. S: Marcadores de peso molecular (kDa); líneas 1 y 2 proteína PhoR1 purificada; líneas 3 y 4 proteína SixA purificada. A) Análisis mediante SDS-PAGE. B) Confirmación mediante Western blot.



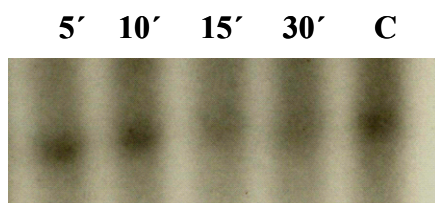
### D.V.5.3.3. Autofosforilación de PhoR1 y desfosforilación por SixA

Para el proceso de autofosforilación de PhoR1 y posterior desfosforilación por SixA se siguió el protocolo descrito en Material y Métodos C.II.8.5.

La actividad catalítica de PhoR1 se demuestra mediante el análisis de la capacidad de autofosforilación de la histidina quinasa sobre un residuo de histidina conservado que caracteriza a los miembros de esta familia proteica. En este ensayo, se pone en contacto la muestra de proteína concentrada con ATP radiactivo marcado con  $P^{32}$  en posición  $\gamma$ , en un tampón de fosforilación apropiado que aporta iones  $Mg^{2+}$  necesarios para la actividad de la proteína.

Para llevar a cabo este ensayo en primer lugar se fosforiló PhoR1 purificada para, posteriormente, ser sometida al proceso de desfosforilación por SixA. La actividad desfosforilante de SixA sobre PhoR1 se analizó adicionado SixA en concentración apropiada a un volumen adecuado de PhoR1 previamente fosforilada. La evolución del proceso de desfosforilación se realizó tomando muestras tras 5, 10, 15 y 30 minutos de incubación de la mezcla proteica resultante (Fig. 42).

Las diferentes muestras obtenidas, así como los distintos controles efectuados, se sometieron a electroforesis mediante SDS-PAGE. A continuación, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF y se realizó la autorradiografía colocando una película fotográfica sobre la membrana (Fig. 42).



**Figura 42.** Autofosforilación de PhoR1 y desfosforilación por SixA. La calle C representa a PhoR1 fosforilada e incubada del mismo modo que las demás muestras pero sin la adición de SixA, mientras que las calles 5', 10', 15' y 30' corresponden a las muestras en las que PhoR1 fosforilada fue incubada junto con SixA durante 5, 10, 15 y 30 minutos, respectivamente.

La autorradiografía demuestra que la proteína PhoR1 es una histidina quinasa funcional, puesto que incorpora  $P^{32}$ , a partir de ATP, mediante autofosforilación (Fig. 42, calle C). Por otro lado, con respecto a la actividad desfosforilante de SixA sobre PhoR1, cuando PhoR1 fosforilado se incubaba con SixA durante 5 y 10 minutos, SixA no tiene efecto sobre el estado de fosforilación de PhoR1 (Fig. 42). Sin embargo, cuando la incubación se prolonga durante 15 y 30 minutos, SixA desfosforila parcialmente a PhoR1, puesto que se aprecia una disminución en la intensidad de la banda correspondiente a la proteína PhoR1 fosforilada (Fig. 42).

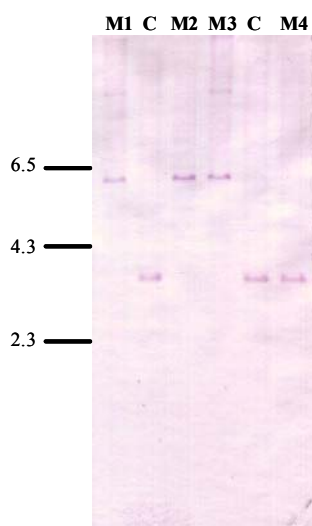
Por tanto, la proteína PhoR1 se autofosforila actuando como una histidina quinasa funcional y parece que la fosfohistidina fosfatasa SixA desfosforila a PhoR1 *in vitro*.

### D.V.6. Construcción de un mutante de delección en fase para el sistema *phoPR1* (MXAN4777-4778)

Los genes que cifran las fosfatasas Pph2 y SixA forman parte del mismo operón que los genes codificantes del sistema regulador de dos componentes PhoPR1, cuya implicación en el ciclo de vida de *M. xanthus* había sido estudiada mediante el análisis de un mutante que no estaba construido en fase, denominado JM12 (Carrero-Lérida *et al.*, 2005). Por ello, para discernir si los resultados obtenidos con dicho mutante eran debidos a un efecto polar de la delección, se construyó otro mutante en el que la delección de los genes que cifran el sistema regulador de dos componentes se efectuó en fase.

La obtención de este mutante de delección implicó la eliminación del 97% de la secuencia codificante del sistema. En la construcción resultante se mantienen los 3 primeros tripletes del gen *phoP1* y los 10 últimos del gen *phoR1*, y se sustituyen 1998 pb por un sitio de restricción *Bam*HI manteniendo la pauta de lectura. De esta manera, los codones de iniciación y de terminación de PhoP1 y PhoR1, respectivamente, son los mismos, pero se codifica un péptido de 15 aminoácidos que carece de función.

La construcción del plásmido portador de la delección en fase del sistema *phoP1-phoR1* se realizó siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos (C.II.12.1.). Se amplificó por PCR dos fragmentos de ADN de unas 800 pb correspondientes a las regiones situadas justo por encima del gen *phoP1* e inmediatamente por debajo del gen *phoR1* utilizando las parejas de oligonucleótidos PhoP1HindIII-PhoP1BamHI y PhoR1BamHI-PhoR1EcoRI (Tabla 6), respectivamente. Ambos productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción apropiadas y se clonaron secuencialmente en el vector pBJ113, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción que los productos de PCR, dando lugar al plásmido p $\Delta$ PhoPR1.



**Figura 43.** Southern blot para la identificación del mutante de delección para los genes *phoP1-phoR1* de *M. xanthus*. Las calles M corresponden al cromosoma de las colonias recombinantes y las calles C al cromosoma de la cepa silvestre DZF1 utilizado como control. En todos los casos, la enzima de restricción empleada fue *Pst*I. Como sonda se utilizó la región cromosómica de 800 pb situada inmediatamente por debajo de *phoR1*. El tamaño de los fragmentos esperados era de 3.3 kb en la cepa DZF1 y 6.1 kb en el mutante de delección. El tamaño del estándar se muestra en kb.

El plásmido p $\Delta$ PhoPR1 se introdujo por electroporación en la cepa silvestre de *M. xanthus* y se seleccionaron intermediarios merodiploides con el plásmido integrado. Estas colonias, capaces de crecer en medio CTT con kanamicina, se analizaron mediante Southern blot (no mostrado). Una vez identificado un intermediario merodiploide

## Resultados

correcto se cultivó en medio CTT sin antibiótico durante varias generaciones para facilitar la pérdida del plásmido mediante un segundo evento de recombinación. Tras diluciones del cultivo en medio CTT con galactosa, se obtuvieron recombinantes haploides carentes del plásmido y, por tanto, sensibles a kanamicina. Estas colonias se analizaron mediante Southern blot para identificar aquellas que portaban la delección deseada (Fig. 43). La cepa que carecía del sistema *phoPR1* se denominó JM12IF por analogía con el mutante de delección para el mismo sistema que no estaba construido en fase y se denominaba JM12. El mutante JM12IF fue sometido a los mismos ensayos que el mutante JM12 obteniéndose resultados coincidentes. No obstante, el nuevo mutante JM12IF fue utilizado para nuevos ensayos cuyos resultados se comentarán más adelante.

### D.V.7. Implicación de la fosfatasa Pph2 en el ciclo de vida de *M. xanthus*

Las secuencias nucleotídica y aminoacídica del gen *pph2* así como su perfil de expresión ya han sido comentados en los apartados de resultados D.V.1., D.V.2., D.V.3 y D.V.4. Además, se comprobó que el gen *pph2* forma parte del mismo operón que el sistema *phoPR1*, el cual regula la expresión de su propio operón. A continuación se trató de determinar la posible función ejercida por la fosfatasa Pph2 durante el ciclo de vida de *M. xanthus*, por lo que se procedió a la obtención de una cepa portadora de la delección del gen *pph2*. El análisis fenotípico de esta cepa carente de la fosfatasa permitió determinar el papel de esta proteína en el ciclo de vida de *M. xanthus*.

#### D.V.7.1. Obtención de un mutante de delección para el gen *pph2*

La obtención de este mutante de delección implicó la eliminación de 330 pb, un 35% del gen, correspondiente a los motivos II y III de las Ser/Thr fosfatasas de la superfamilia PPP, y a la región implicada en la interacción de la proteína con sus sustratos. En la construcción resultante se mantienen los extremos 5' y 3' de *pph2*, y se sustituyen 330 pb por la secuencia de un sitio de restricción, manteniendo la pauta de lectura. De esta manera, el codón de iniciación y de terminación de la proteína que se genera son los mismos que los de Pph2, pero en este caso se codifica un péptido de 207 aminoácidos que no es funcional.

La obtención de este mutante, sensible a kanamicina, fue posible mediante la utilización del vector pBJ113. En este vector se clonaron dos fragmentos de tamaño similar, 1500 pb, correspondientes a los fragmentos situados delante del primer sitio *XhoI* y detrás del segundo sitio *XhoI* del gen *pph2*, denominándose primer brazo y segundo brazo, respectivamente (Fig. 44).

Para la obtención del primer brazo, el plásmido P1, que contiene clonados los genes *phoR1*, *pph2* y *sixA*, fue digerido con las enzimas de restricción *XhoI* y *EcoRI*, originando tres fragmentos de 330 pb, 2800 pb y 4200 pb. A continuación, se purificó el fragmento de 4200 pb que presentaba extremos *XhoI-EcoRI* (Fig. 44).

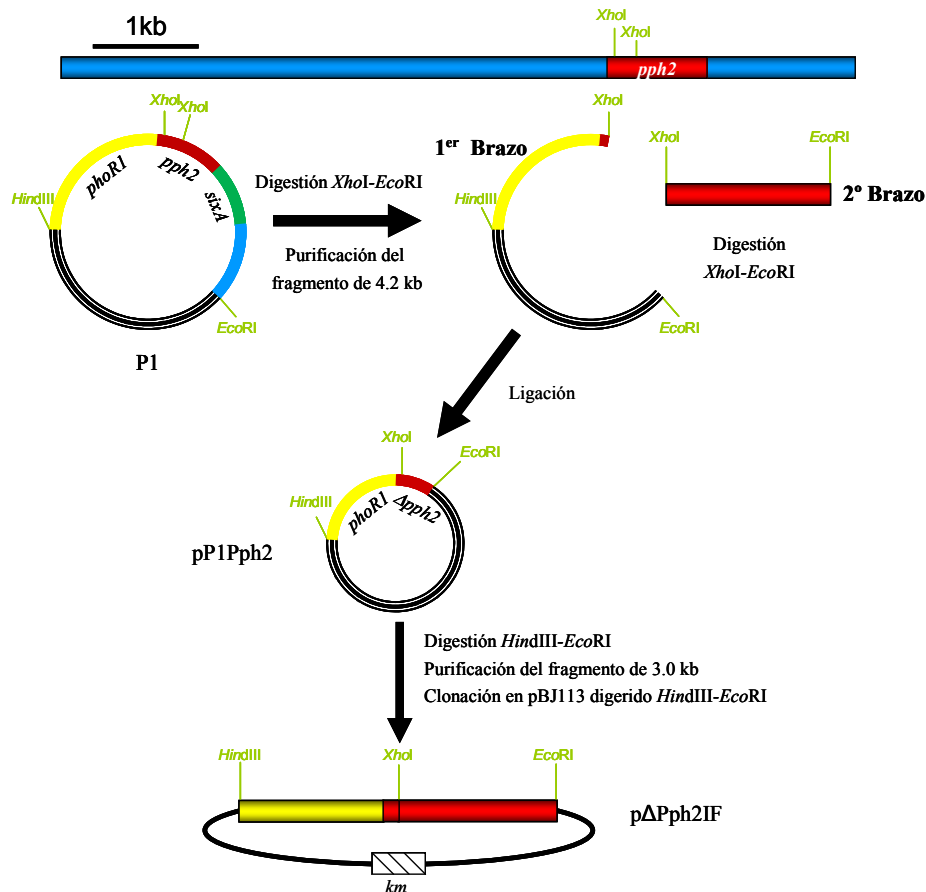
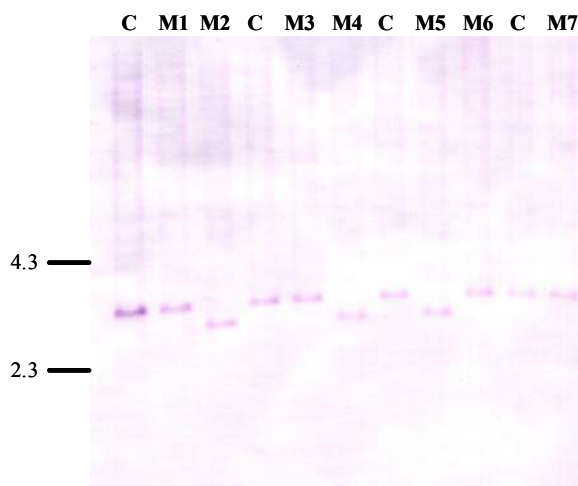


Figura 44. Construcción del plásmido portador de la delección del gen *pph2* de *M. xanthus*.

Por otro lado, para la obtención del segundo brazo, se llevó a cabo la amplificación por PCR de un fragmento de 1500 pb desde el segundo sitio *XhoI* del gen *pph2* en adelante, utilizando la pareja de oligonucleótidos Pph2ER-Pph2XF (Tabla 6). Este fragmento fue digerido con las enzimas de restricción *XhoI* y *EcoRI* y clonado en el fragmento *XhoI*-*EcoRI* purificado anteriormente. Como resultado se obtuvo el plásmido pP1Pph2 (Fig. 44).

En la siguiente etapa, el plásmido pP1Pph2 fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI*-*HindIII* y, tras la purificación del fragmento de 3000 pb resultante, éste fue ligado al vector pBJ113 digerido con las mismas enzimas. El plásmido obtenido se denominó pΔPph2IF (Fig. 44).

Una vez obtenido el plásmido pΔPph2IF, los siguientes pasos para la obtención del mutante fueron similares a los descritos con anterioridad y detallados en Material y Métodos (C.II.12.1.). En primer lugar, se introdujo el plásmido pΔPph2IF dializado en la mixobacteria por electroporación. Posteriormente, se analizaron mediante Southern blot las colonias que podían crecer en presencia de kanamicina para tratar de identificar intermediarios merodiploides (no mostrado). A partir de un intermediario correcto se seleccionaron colonias recombinantes, capaces de crecer en presencia de galactosa, pero no de kanamicina y se analizaron mediante Southern blot, lo que reveló que tres de las siete colonias analizadas recombinaron a mutante (M2, M4 y M5), mientras que las cuatro restantes revirtieron a silvestre (M1, M3, M6 y M7) (Fig. 45). La cepa mutante de delección para el gen *pph2* se denominó  $\Delta pph2$ .



**Figura 45.** Southern blot para la identificación de la cepa mutante  $\Delta pph2$  de *M. xanthus*. Las calles M corresponden al cromosoma de las colonias sensibles a kanamicina y las calles C al cromosoma de la cepa silvestre DZF1 utilizado como control. La enzima de restricción empleada para digerir todos los cromosomas fue *Pst*I. Como sonda se utilizó el segundo brazo empleado en la construcción del plásmido portador de la delección de *pph2*. El tamaño de los fragmentos esperados era de 3.3 kb en DZF1 y 2.9 kb en el mutante. El tamaño del estándar se muestra en kb.

### D.V.7.2. Caracterización del mutante $\Delta pph2$

La función que la fosfatasa Pph2 desempeña durante el ciclo de vida de *M. xanthus* se analizó mediante la comparación de diferentes caracteres fenotípicos del crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo de la cepa mutante de delección obtenida mediante comparación con la cepa silvestre DZF1.

#### D.V.7.2.1. Crecimiento vegetativo

La influencia de la delección del gen *pph2* en el crecimiento vegetativo de *M. xanthus* se determinó tras cultivar tanto la cepa silvestre DZF1 como el mutante de delección  $\Delta pph2$  en medio CTT líquido, siguiendo las pautas expuestas en C.II.12.2.1. y en medio sólido como se indica en Material y Métodos (C.II.12.2.2.).

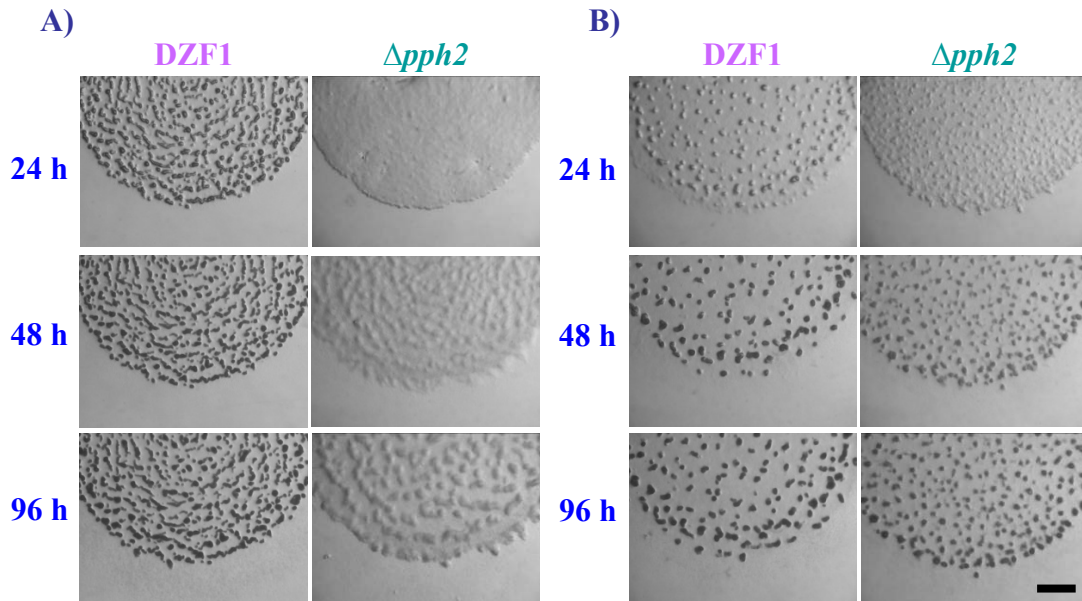
Los resultados obtenidos indican la ausencia de diferencias significativas en el crecimiento desarrollado por ambas cepas a lo largo del tiempo tanto en medio líquido como en medio sólido.

#### D.V.7.2.2. Ciclo de desarrollo

Para el análisis de la cepa mutante  $\Delta pph2$  durante el ciclo de desarrollo de *M. xanthus* se siguieron las indicaciones descritas en C.II.12.2.3., C.II.12.2.4. y C.II.12.2.5.

##### D.V.7.2.2.1. FENOTIPO DURANTE EL CICLO DE DESARROLLO

Para analizar la progresión del ciclo de desarrollo del mutante de delección  $\Delta pph2$ , en comparación con la cepa silvestre DZF1, ambas bacterias fueron cultivadas en los medios de cultivo inductores del ciclo de desarrollo CF y TPM.

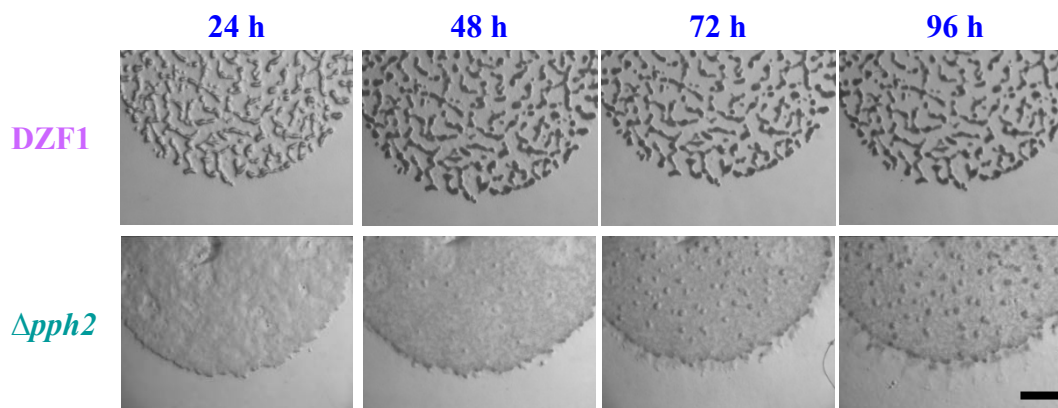


**Figura 46.** Análisis fenotípico en medio CF de las cepas silvestre DZF1 y mutante  $\Delta pp h 2$  de *M. xanthus*. A) Cultivos concentrados a  $DO_{600}$  inicial de 60 tras 24, 48 y 96 horas de incubación. B) Cultivos concentrados a  $DO_{600}$  de partida de 15 tras los mismos tiempos de incubación. La barra representa 1 mm.

Los cuerpos fructificantes originados en medio CF por la cepas silvestre DZF1 y mutante de delección  $\Delta pp h 2$  a partir de cultivos concentrados a  $DO_{600}$  inicial de 60 se muestran en la Fig. 46A. El mutante  $\Delta pp h 2$  presenta un acusado retraso en la formación de los cuerpos fructificantes, ya que tras 24 horas de incubación la cepa silvestre origina cuerpos fructificantes definidos, prácticamente maduros, mientras que el mutante no muestra indicios de agregación hasta transcurridas 48 horas. La evolución de las formaciones macroscópicas producidas por el mutante  $\Delta pp h 2$  progresa a lo largo de la incubación, aunque a un ritmo más lento que el de la cepa silvestre, de modo que, aún tras 96 horas de desarrollo en medio CF, los cuerpos fructificantes permanecen inmaduros, translúcidos y poco definidos. Además, los cuerpos fructificantes originados por el mutante presentan un mayor tamaño y son menos numerosos que los producidos por la cepa silvestre.

El resultado obtenido en medio CF a partir de muestras con  $DO_{600}$  de partida de 15, correspondiente a las cepas silvestre y mutante, se muestra en la Fig. 46B. A esta densidad óptica también se observa retraso en la formación de los cuerpos fructificantes por parte de la cepa mutante. Este retraso se mantiene incluso tras 48 horas de incubación, aunque las diferencias entre ambas cepas no son tan marcadas como en el caso de la densidad óptica anterior. Aun así, transcurridas 96 horas se aprecian cuerpos fructificantes peor empaquetados y menos maduros en la cepa mutante. Al igual que en el caso de las muestras con  $DO_{600}$  de 60, los cuerpos fructificantes originados por la cepa carente de la fosfatasa Pph2 son más numerosos y pequeños que los de la cepa silvestre (Fig. 46B).

## Resultados



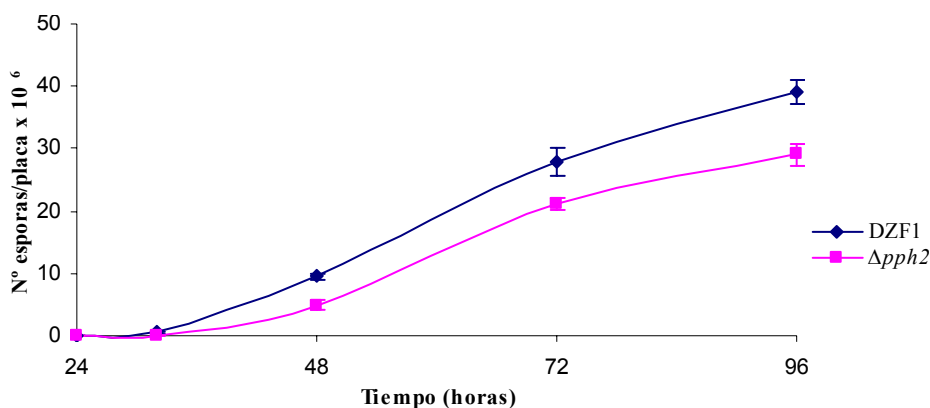
**Figura 47.** Análisis fenotípico en medio TPM a  $DO_{600}$  de partida de 60 de las cepas silvestre DZF1 y mutante  $\Delta pph2$  de *M. xanthus* tras los tiempos de incubación indicados. La barra representa 1 mm.

En medio TPM, el mutante de delección  $\Delta pph2$  presenta un retraso más acentuado que en medio CF con respecto a la cepa silvestre cuando los cultivos se concentran a  $DO_{600}$  de partida de 60 (Fig. 47). La cepa silvestre, tras 24 horas de incubación, muestra cuerpos fructificantes bien empaquetados y definidos. Sin embargo, la cepa  $\Delta pph2$  permanece completamente plana tras 48 horas de incubación y no comienza a formar agregados hasta transcurridas 72 horas. Incluso después de 96 horas, los cuerpos fructificantes formados por el mutante siguen siendo inmaduros, translúcidos y poco empaquetados y, además, difieren en cuanto a número y morfología de los producidos por la cepa silvestre.

### D.V.7.2.2.2. ESPORULACIÓN

Para efectuar el recuento de las células de resistencia producidas por las cepas DZF1 y  $\Delta pph2$  se empleó el medio CF. Con este análisis se puede determinar si existe relación entre el retraso en la formación de cuerpos fructificantes observado y la producción de mixósporas.

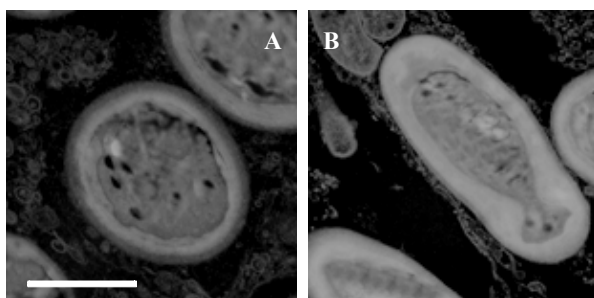
Los resultados de estos recuentos (Fig. 48) reflejan la relación existente entre el retraso observado en la formación de los cuerpos fructificantes por parte de  $\Delta pph2$  respecto a la cepa silvestre y en el número de mixósporas producidas por ambas cepas. De esta manera, el retraso en las etapas iniciales del ciclo de desarrollo que conducen a la formación de cuerpos fructificantes y, en consecuencia, las mixósporas integrantes de los mismos, se traduce en que la cepa silvestre DZF1 produce  $9.6 \times 10^6$  mixósporas/placa tras 48 horas de incubación, frente a  $4.8 \times 10^6$  mixósporas/placa producidas por el mutante  $\Delta pph2$ . Posteriormente, las diferencias fenotípicas entre ambas cepas se atenúan, pero el retraso inicial se refleja en el número de estructuras de resistencia producidas. Así, tras 96 horas de incubación en medio CF, la cepa silvestre produce  $3.9 \times 10^7$  mixósporas/placa, frente a  $2.9 \times 10^7$  mixósporas/placa producidas por la cepa mutante.



**Figura 48.** Recuento de esporas producidas por las cepas silvestre DZF1 y mutante  $\Delta pph2$  de *M. xanthus* en medio CF.

Durante el recuento de mixósporas efectuado con la cámara Petroff-Hausser en el microscopio de contraste de fases, se pudieron apreciar algunas mixósporas que presentaban una longitud inferior a la de las células vegetativas, pero que no llegaban a alcanzar la morfología ovoidea característica de estas células de resistencia de *M. xanthus*, aunque sí mostraban la refringencia característica de las mixósporas.

Para apreciar las posibles diferencias existentes entre los distintos tipos de mixósporas identificados, se llevó a cabo la preparación de muestras para su observación al microscopio electrónico de transmisión (TEM). La visualización de estas muestras permitió confirmar la coexistencia en la cepa mutante de mixósporas ovoideas con otras más alargadas. Además, la utilización de esta técnica de microscopía permitió determinar que ambos tipos de mixósporas de la cepa mutante (Fig. 49B) presentaban cubiertas muy similares entre sí y también con respecto a la cubierta de la bacteria silvestre (Fig. 49A).



**Figura 49.** Mixósporas de las cepas DZF1 (A) y  $\Delta pph2$  (B) de *M. xanthus*. La barra representa 1  $\mu\text{m}$ . Las imágenes fueron tomadas en un microscopio electrónico de transmisión.

#### D.V.7.2.2.3.GERMINACIÓN

La capacidad de germinación de las esporas producidas por las cepas silvestre DZF1 y mutante  $\Delta pph2$  se evaluó a partir del análisis de viabilidad de las mismas. Para ello, las muestras de mixósporas empleadas anteriormente para efectuar los recuentos fueron expuestas a la presencia de nutrientes.

Las células de resistencia producidas por la cepa mutante presentan una reducción en la eficiencia de germinación, siendo del 2.1% tras 72 horas de incubación frente al 7.5% de la cepa silvestre.



### **D.V.7.3. Efecto del CCCP, un protonóforo, sobre los mutantes JM12IF y $\Delta$ *pph2* de *M. xanthus***

Existen evidencias de que el operón del que forman parte los genes del sistema *phoPR1* y las fosfatasas *pph2* y *sixA* está implicado en el metabolismo energético de *M. xanthus*. En este sentido, la histidina quinasa PhoR1 de dicho sistema posee un dominio PAS. Los dominios PAS son importantes módulos sensores que detectan cambios en la luz, el potencial redox, el nivel de oxígeno, pequeñas moléculas y, sobre todo en el nivel de energía de la célula. Estos dominios también pueden detectar diversos factores medioambientales que atraviesan la membrana celular y/o afectan al metabolismo celular (Taylor y Zhulin, 1999). Por otro lado, se ha comprobado que la expresión del operón es dependiente de la concentración de nutrientes, ya que se induce durante el ciclo de desarrollo. Además, en el curso de la caracterización de la fosfatasa Pph2 de *M. xanthus* durante este trabajo de investigación se ha observado que la agregación celular en el mutante  $\Delta$ *pph2* se ve comprometida de manera también dependiente de la concentración de nutrientes presente en el medio. Igualmente, estudios proteómicos con el mutante del sistema *phoPR1* pusieron de manifiesto una reducción en el nivel de expresión de proteínas implicadas en el metabolismo energético (Carrero Lérída, 2004).

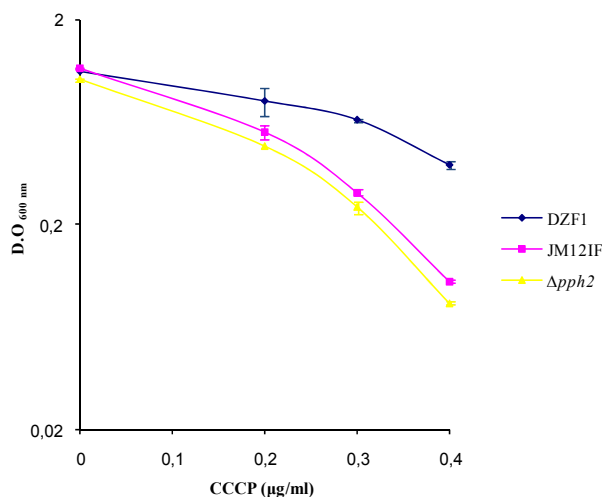
La carencia de nutrientes genera un estado de baja carga energética celular que induce una respuesta adaptativa en la bacteria para aprovechar al máximo los recursos disponibles. Si el agotamiento de nutrientes persiste, *M. xanthus* detiene su crecimiento e inicia el ciclo de desarrollo. Esta disminución de la carga energética puede ser inducida igualmente mediante el empleo de compuestos químicos que reducen la fuerza protón-motriz de la membrana, como el agente CCCP (carbonil cianida 3-cloro fenil hidrazona).

El CCCP actúa como desacoplador de la fosforilación oxidativa, disipando el gradiente quimiosmótico de la membrana, tras introducirse repetidamente en forma protonada en el citoplasma, donde libera los protones captados en el periplasma. En estas circunstancias, la pérdida del potencial protón-motriz no se encuentra acoplada a la síntesis de ATP por el complejo ATPasa, lo que produce una reducción drástica del nivel energético celular.

#### **D.V.7.3.1. Crecimiento vegetativo en presencia de CCCP**

La sensibilidad frente al CCCP de las cepas de *M. xanthus* silvestre DZF1 y mutantes de delección para los genes del sistema *phoPR1* y la fosfatasa *pph2*, denominadas JM12IF y  $\Delta$ *pph2*, respectivamente, se determinó mediante la valoración del crecimiento de estas cepas en presencia de 0.2, 0.3 y 0.4  $\mu$ g/ml del compuesto, siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos (C.II.12.2.1.).

El crecimiento de los mutantes de delección se encuentra muy afectado por la concentración de CCCP, a diferencia de la cepa silvestre. Ambos mutantes son prácticamente igual de sensibles a la acción de este compuesto. Así, a partir de 0.2  $\mu$ g/ml de CCCP se reduce moderadamente el crecimiento de JM12IF y  $\Delta$ *pph2*, mientras que DZF1 crece casi al mismo nivel que en ausencia del agente. En presencia de 0.3  $\mu$ g/ml de CCCP se inhibe aún más el crecimiento de los mutantes, mientras que el silvestre es capaz de prosperar de forma adecuada incluso en presencia de 0.4  $\mu$ g/ml del desacoplador, concentración a la cual el crecimiento de los mutantes se encuentra totalmente inhibido (Fig. 50).



**Figura 50.** DO<sub>600</sub> de las cepas silvestre DZF1 y mutantes JM12IF y  $\Delta pph2$  de *M. xanthus* en presencia de diferentes concentraciones de CCCP tras 24 horas de incubación.

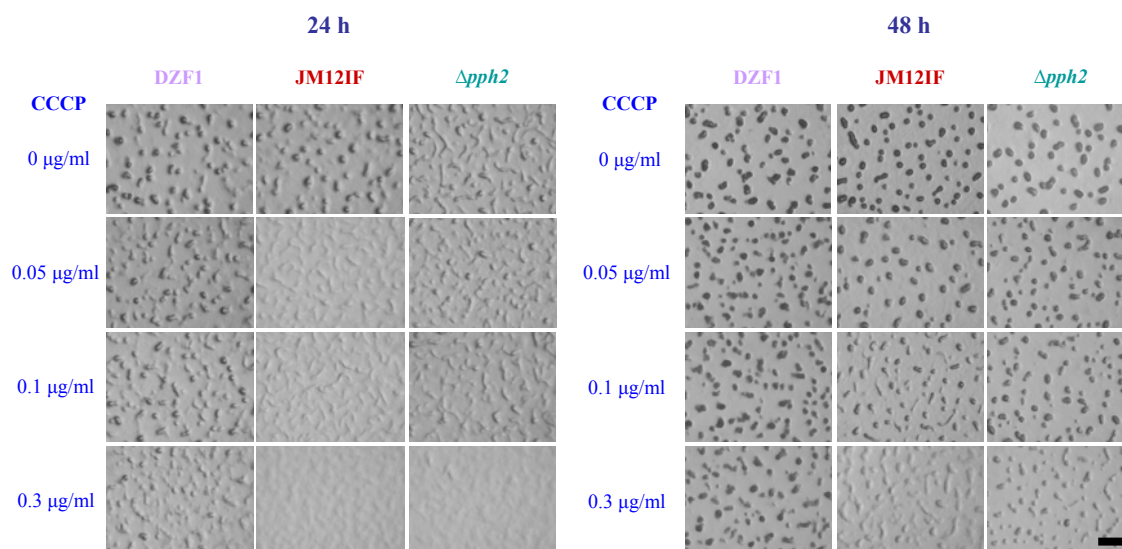
#### D.V.7.3.2. Efecto del CCCP sobre el ciclo de desarrollo

El sistema PhoPR1, al igual que la fosfatasa Pph2, es necesario para el crecimiento de la bacteria en condiciones que generan una reducción en el nivel energético celular. En la naturaleza el agotamiento de nutrientes produce una disminución del nivel energético, induciendo el inicio del ciclo de desarrollo en *M. xanthus*. El efecto combinado de la carencia de nutrientes y la presencia de CCCP se analizó cultivando las cepas silvestre DZF1 y los mutantes de delección JM12IF y  $\Delta pph2$  en medio CF suplementado con distintas concentraciones de CCCP (0, 0.05, 0.1 y 0.3 µg/ml) (Fig. 51).

La presencia de CCCP retarda la agregación y fructificación de la cepa silvestre DZF1, puesto que en medio CF, tras 24 horas de incubación, aparecen cuerpos fructificantes definidos y bien formados, mientras que en los medios con CCCP tan sólo se aprecian cuerpos fructificantes inmaduros, siendo el grado de agregación y empaquetamiento menor a medida que aumenta la concentración de CCCP. Tras 48 horas de incubación, la cepa silvestre origina cuerpos fructificantes maduros y opacos en los distintos medios, aunque los cuerpos fructificantes producidos en los medios con CCCP se encuentran empaquetados más laxamente (Fig. 51).

Por su parte el mutante JM12IF permanece prácticamente liso, con agregados incipientes tras 24 horas de incubación en los medios a los que se había adicionado CCCP, mientras que transcurrido ese período el silvestre ya presenta cuerpos fructificantes bien formados (Fig. 51). Tras 48 horas, el mutante sigue mostrando retraso en la formación de los cuerpos fructificantes, retraso que es más acentuado en el medio que presenta mayor concentración de CCCP (0.3 µg/ml) (Fig. 51). Las diferencias fenotípicas entre los cuerpos fructificantes del mutante JM12IF y la cepa silvestre se atenúan hasta prácticamente desaparecer transcurridas 72 horas de incubación (no mostrado).

## Resultados



**Figura 51.** Análisis fenotípico de las cepas silvestre DZF1 y mutantes JM12IF y  $\Delta pph2$  de *M. xanthus* en medio CF con 0, 0.05, 0.1 y 0.3  $\mu\text{g/ml}$  de CCCP tras 24 y 48 horas de incubación. La  $\text{DO}_{600}$  inicial fue 15. La barra representa 1 mm.

Por otro lado, el mutante  $\Delta pph2$  presenta un considerable retraso en la formación de los cuerpos fructificantes respecto al silvestre DZF1 en medio CF, pero este retraso se hace más acusado en presencia de CCCP. No obstante, las modificaciones fenotípicas originadas por la incorporación de CCCP al medio CF son menos drásticas en el caso de la cepa  $\Delta pph2$  que las observadas en el mutante JM12IF transcurridas 24 horas de incubación (Fig. 51). Tras 48 horas, las cepas silvestre y mutante  $\Delta pph2$  presentan cuerpos fructificantes bien delimitados, pero los del mutante presentan un menor grado de madurez, especialmente en el medio con 0.3  $\mu\text{g/ml}$  de CCCP (Fig. 51). Al igual que en el caso del mutante JM12IF los cuerpos fructificantes originados por la cepa  $\Delta pph2$  adquieren un aspecto similar a los de la cepa silvestre transcurridas 72 horas de incubación (no mostrado).

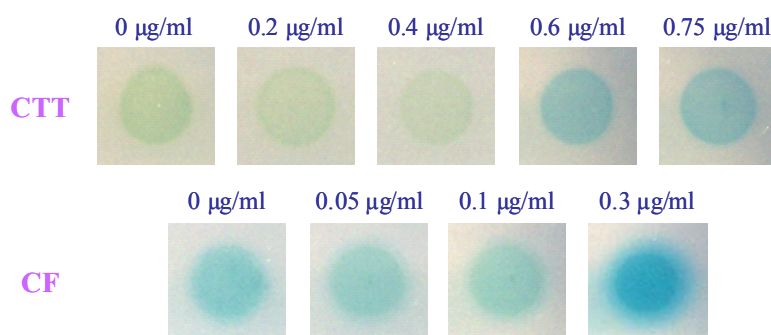
Por tanto, el análisis fenotípico de los mutantes de delección JM12IF y  $\Delta pph2$  respecto a la cepa silvestre de *M. xanthus* durante el ciclo de desarrollo indica que ambos mutantes resultan mucho más afectados por la presencia de CCCP que la cepa silvestre. De hecho, ambos mutantes de delección, al ser más sensibles a este compuesto, se resienten de forma más drástica y, por tanto, sufren un considerable retraso en la progresión del ciclo de desarrollo en relación con la cepa silvestre, resultando especialmente acentuado en el caso de JM12IF.

### D.V.7.3.3. Efecto del CCCP sobre la expresión del operón

Debido a que las cepas carentes del sistema PhoPR1 y la fosfatasa Pph2 ven afectado su crecimiento vegetativo y la formación de cuerpos fructificantes en presencia de CCCP, se trató de comprobar si este agente activa la expresión del operón que contiene dichos genes. Para ello, se llevó a cabo el análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa desarrollada por la cepa portadora de la fusión entre el gen *lacZ* de *E. coli* y el gen *pph2* de *M. xanthus*, denominada Pph2LZ, en presencia de distintas concentraciones de CCCP (Fig. 52).

En primer lugar, se procedió a un análisis cualitativo de la expresión de *p<sub>ph2</sub>* durante el crecimiento vegetativo en medio CTT y durante el ciclo de desarrollo en medio CF, en presencia de CCCP, para establecer las condiciones en las cuales se llevaría a cabo el análisis cuantitativo, siguiendo las indicaciones descritas en Material y Métodos (C.II.11.2. y C.II.11.3.).

Una vez establecidas las condiciones en las que se produce la inducción de la expresión de *p<sub>ph2</sub>* en los medios CTT y CF con diferentes concentraciones de CCCP a partir de los resultados obtenidos mediante la valoración cualitativa de la actividad  $\beta$ -galactosidasa desarrollada por la cepa Pph2LZ, se realizó un análisis cuantitativo de la misma para determinar el momento en el que se producía dicha inducción y los niveles de expresión alcanzados.

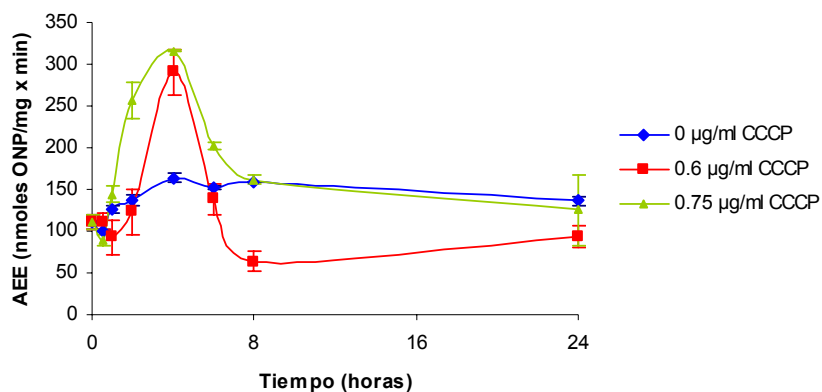


**Figura 52.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa desarrollada durante el crecimiento vegetativo (medio CTT) y el ciclo de desarrollo (medio CF) con distintas concentraciones de CCCP por la cepa Pph2LZ, tras 24 horas de incubación.

En la Fig. 53 se muestra el perfil de expresión de *p<sub>ph2</sub>* durante el crecimiento vegetativo en CTT en presencia de CCCP. En el medio que no posee CCCP, línea azul, el operón mantiene unos niveles de expresión prácticamente constantes a lo largo del tiempo. Por su parte, la adición de 0.6  $\mu\text{g/ml}$  de CCCP, línea roja, produce un notable incremento de la expresión en las primeras horas de incubación, alcanzando un máximo tras 4 horas. A partir de este momento, la expresión desciende y se mantiene constante a lo largo del tiempo, mostrando un nivel similar al ofrecido por la bacteria en este medio sin la adición del compuesto. La adición de 0.75  $\mu\text{g/ml}$  de CCCP al medio, línea verde, produce un patrón de expresión similar al observado cuando se adicionan 0.6  $\mu\text{g/ml}$ , aunque la activación se produce antes (Fig. 53). De manera que se puede concluir que el CCCP induce la expresión del operón durante el crecimiento vegetativo.

Este análisis también se llevó a cabo de manera cuantitativa durante el ciclo de desarrollo en medio CF. En este caso no se observó incremento de la expresión del operón ocasionada por la adición del compuesto en ninguna de las concentraciones ensayadas (no mostrado), por lo que el CCCP no tiene efecto inductor de la expresión del operón durante el ciclo de desarrollo, probablemente porque no se pueden utilizar concentraciones tan elevadas como las que se emplean durante el crecimiento.

## Resultados



**Figura 53.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa específica desarrollada por la cepa Pph2LZ de *M. xanthus* durante el crecimiento vegetativo en medio CTT con 0, 0.6 y 0.75  $\mu\text{g/ml}$  de CCCP.

### D.V.8. Actividad fosfatasa de Pph2

La actividad fosfatasa de Pph2 de *M. xanthus* se determinó mediante la clonación del gen *pph2* en un vector de expresión y el posterior ensayo de la proteína recombinante sobre el sustrato genérico de las fosfatasas *pNPP* (*p*-nitrofenilfosfato).

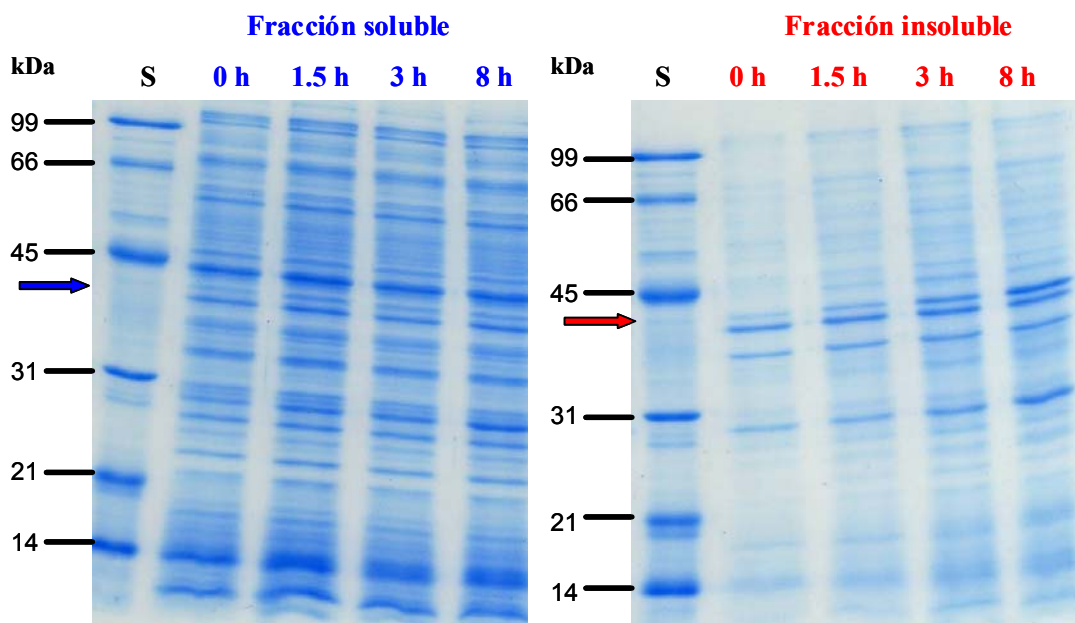
#### D.V.8.1. Clonación de *pph2* en el vector pET-200/D-TOPO y sobreexpresión de la proteína recombinante en *E. coli*

En primer lugar, se amplificó por PCR el gen *pph2* mediante el empleo del ADN cromosómico de *M. xanthus* como molde, junto con los oligonucleótidos pTOP-Pph2F y pTop2-Pph2R (Tabla 8). El producto de PCR se puso en contacto con el vector pET-200/D-TOPO, generándose el plásmido pETTOPO200-Pph2N.

La sobreexpresión de la fosfatasa recombinante se realizó mediante la transformación de *E. coli* BL21(DE3)Star con el plásmido pETTOPO200-Pph2N siguiendo las indicaciones descritas en Material y Métodos (C.II.8.2.1.).

La determinación de los parámetros de expresión óptimos para la producción de la proteína recombinante se llevó a cabo mediante el ensayo de diferentes condiciones de tiempo y temperatura de inducción. De este modo, las inducciones se realizaron a 15 y 30°C, se tomaron muestras tras 0, 2, 4, 6 y 24 horas de incubación, en el caso de que la inducción se hubiera desarrollado a 30°C, o bien tras 0, 1.5, 3 y 8 horas de la adición de IPTG si se realizó a 15°C. Los extractos se sometieron a los procedimientos descritos en Material y Métodos (C.II.8.2.2.) y fueron analizados mediante SDS-PAGE para establecer las condiciones que proporcionaban una mayor cantidad de proteína recombinante en forma soluble.

El análisis correspondiente a la inducción realizada a 15°C se muestra en la Fig. 54. Como se puede observar, la mayor parte de la proteína aparece en forma de cuerpos de inclusión, si bien una proporción minoritaria se detecta en la fracción soluble. Por ello, se estableció que la purificación de la proteína recombinante Pph2 se realizaría a partir de las fracciones solubles obtenidas tras 3 horas de incubación a 15°C.



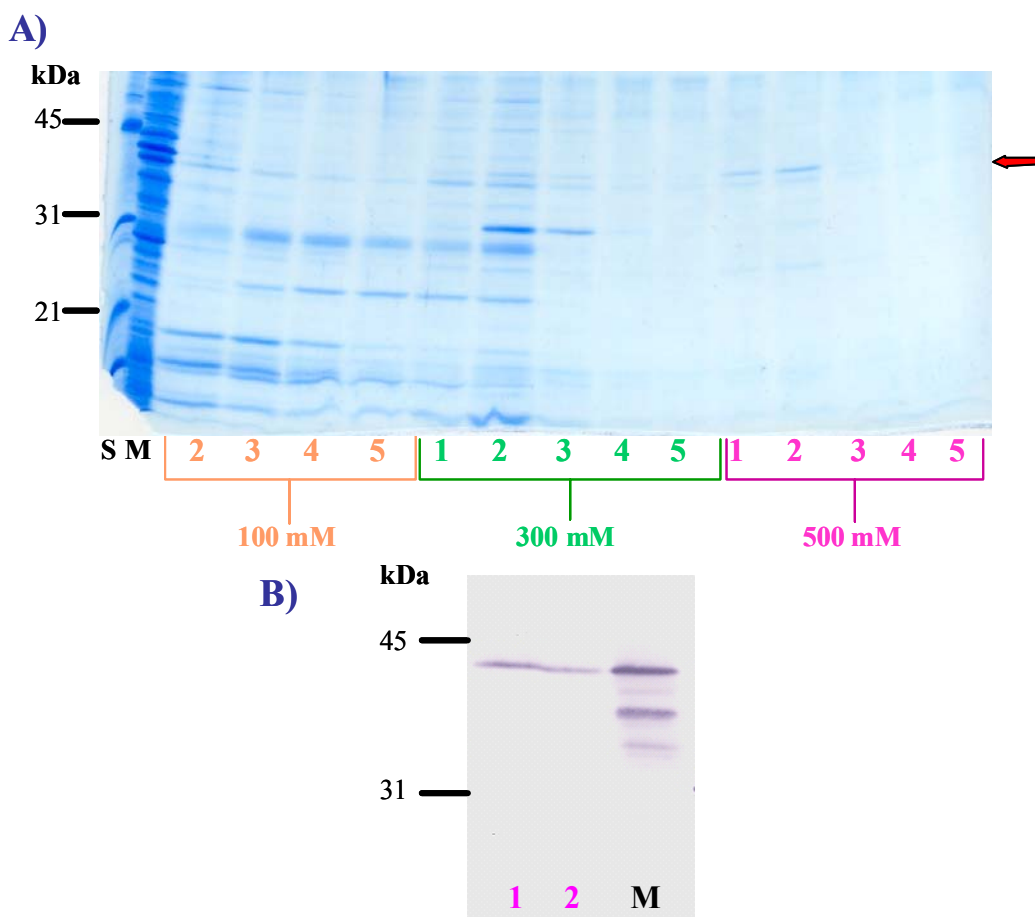
**Figura 54.** Producción de la proteína recombinante Pph2. Se muestran las fracciones soluble e insoluble de las muestras de *E. coli* con Pph2 inducida tomadas tras 0, 1.5, 3 y 8 horas de inducción a 15°C de incubación. Pph2 presenta un peso molecular estimado de 37 kDa. El estándar, S, se indica en kDa.

### D.V.8.2. Purificación de Pph2

Para la purificación de Pph2 se utilizó, como se ha indicado en el apartado anterior, la fracción soluble obtenida tras 3 horas de inducción a 15°C. La fusión de una cola de 6 histidinas en el extremo N-terminal de la fosfatasa Pph2 recombinante permitió su purificación mediante cromatografía de afinidad siguiendo las indicaciones descritas en Material y Métodos (C.II.8.2.3.).

El proceso de purificación de Pph2 se llevó a cabo en varios lotes, ya que el volumen total de cultivo empleado para la purificación de esta proteína fue de 6.5 litros, tratando en cada uno de ellos 500 ml de cultivo inducido. En la Fig. 55A se muestra el resultado de una de las purificaciones. Como se puede observar, la proteína recombinante Pph2 eluye en la primera y segunda muestra de la fracción correspondiente a 500 mM de imidazol. A continuación, las muestras resultantes de la purificación fueron concentradas para eliminar el imidazol presente en las mismas.

La muestra así obtenida fue comprobada mediante Western blot siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos (C.II.8.3.) para confirmar que se trataba de la proteína de interés. Efectivamente, la proteína detectada, empleando un anticuerpo específico frente a la cola de histidinas, (Fig 56B) presentaba el mismo tamaño al detectado en los geles SDS-PAGE (Fig. 55A).



**Figura 55.** Purificación de la proteína recombinante Pph2 de *M. xanthus*. S: Marcadores de peso molecular (kDa). M: extracto de *E. coli* con Pph2 inducida antes de la purificación. Las líneas 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a las fracciones de elución con concentraciones de 100, 300 y 500 mM de imidazol. A) Análisis mediante SDS-PAGE. B) Confirmación mediante Western blot de las fracciones 1 y 2 correspondientes a 500 mM de imidazol.

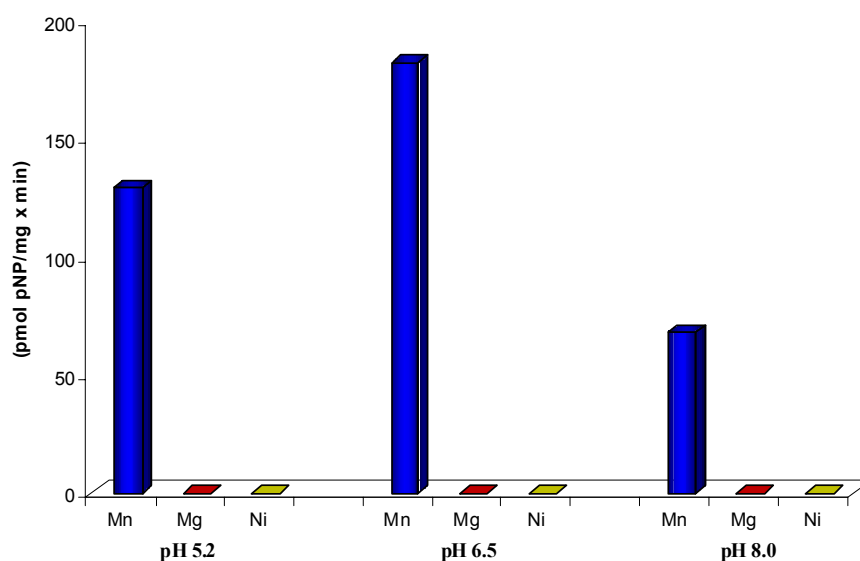
### D.V.8.3. Determinación de la actividad fosfatasa de Pph2

Una vez purificada la proteína Pph2, el siguiente paso fue tratar de demostrar su actividad fosfatasa frente al *pNPP*, un sustrato genérico de este tipo de proteínas. Para ello, se siguieron las indicaciones descritas en Material y Métodos (C.II.8.6.).

La actividad catalítica de Pph2 se demostró mediante el análisis de su capacidad para hidrolizar el *pNPP* generando fosfato y *p*-nitrofenol. En este ensayo se puso en contacto la proteína, purificada y concentrada, con el sustrato *pNPP* en un tampón de desfosforilación apropiado que aportaba iones divalentes necesarios para la actividad de la proteína.

La actividad fosfatasa de Pph2 sobre el *pNPP* se analizó utilizando 6 tampones que presentaban diversos pHs y a los que se adicionaron uno o varios de los siguientes metales: manganeso, magnesio, calcio, níquel y zinc. (Composición exacta en C.I.3.). Los ensayos se llevaron a cabo incubando las muestras a 37°C durante 30 minutos empleando de 1 a 2.5 µg de proteína purificada.

La medida de actividad fosfatasa frente al *pNPP* de Pph2 purificada demuestra que la proteína Pph2 de *M. xanthus* es una fosfatasa funcional, puesto que es capaz de hidrolizar el sustrato en presencia de iones manganeso, un ión requerido para la actividad de la mayoría de fosfatasas pertenecientes a la superfamilia PPP. Como se observa en la Fig. 56, cuando Pph2 se incubaba en un tampón con manganeso, la mayor tasa de hidrólisis de *pNPP* se produce a pH cercano a la neutralidad. El nivel de actividad detectado no es muy elevado. No obstante, cuando el ión metálico incorporado a la reacción difiere del manganeso no se detecta actividad en ninguna de las condiciones analizadas, lo que sugiere que la hidrólisis del *pNPP*, a pesar de no ser notable, es dependiente de iones manganeso y ocurre principalmente a pH neutro.



**Figura 56.** Actividad enzimática específica de Pph2 utilizando como sustrato *pNPP* en presencia de iones manganeso, magnesio o níquel a pH 5.2, 6.5 y 8.0. Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante 30 minutos utilizando de 1 a 2.5  $\mu$ g de Pph2.

#### D.V.9. Detección de proteínas de *M. xanthus* que interaccionan con la fosfatasa Pph2

Para continuar con la caracterización de la fosfatasa Pph2 se trató de determinar las proteínas que interaccionan con ella e intervienen en la misma ruta de transducción de señales. Para ello, se realizó el rastreo de una genoteca de expresión de *M. xanthus* utilizando el sistema del doble híbrido de levadura como se indica en Material y Métodos (C.II.9.). Los genes codificantes de las proteínas interaccionantes durante el rastreo fueron parcialmente secuenciados y el resultado de la secuenciación se utilizó para identificar el gen completo en el genoma de *M. xanthus*.

En respuesta a un estímulo apropiado, las fosfatasas intervienen en la transducción de señales interaccionando con sus proteínas diana para desfosforilarlas. La desfosforilación de la proteína requiere el contacto con la fosfatasa y, por tanto, la interacción proteína-proteína, que puede ser detectada mediante el sistema del doble híbrido de levadura. En consecuencia, la finalidad de este estudio fue la búsqueda de proteínas capaces de contactar físicamente con la fosfatasa Pph2, que participen junto a ella en la misma ruta de transducción de señales celulares en *M. xanthus*.



## Resultados

La secuencia codificante de la fosfatasa Pph2 de *M. xanthus*, utilizada como cebo, se clonó en el vector pGBKT7. El plásmido resultante contiene el gen *pph2* fusionado con la secuencia que cifra el dominio de unión al ADN del factor de transcripción GAL4. Por su parte, los genes de la genoteca, que actúan como presas, están clonados en la serie de vectores pGAD y se expresan como proteínas de fusión con el dominio activador de la transcripción de GAL4. Para la viabilidad de la levadura es necesario que cebo y presa se expresen de forma simultánea en la misma célula.

La cepa empleada para analizar las interacciones proteicas en el sistema del doble híbrido de levadura fue AH109 de *S. cerevisiae*, que contiene cuatro genes testigo cuya expresión está bajo el control de diferentes promotores activados por GAL4. Dos de ellos son marcadores nutricionales, *HIS3* y *ADE2*, necesarios para la síntesis de histidina y adenina, respectivamente, en un medio mínimo carente de estos aminoácidos. La presencia de dos marcadores nutricionales permite controlar el nivel de selección de la interacción. Así, la ausencia de histidina permite detectar interacciones débiles y las cepas en las que se producen son incapaces de prosperar en un medio carente de adenina, cuya ausencia sólo permite el crecimiento de levaduras con interacciones muy fuertes entre las proteínas cebo y presa. Además, GAL4 regula la expresión de dos marcadores enzimáticos, *MEL1* y *lacZ*, que codifican las enzimas  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasa, respectivamente. 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.

### D.V.9.1. Construcción del plásmido cebo pGBK-Pph2

Para construir un plásmido que exprese la proteína Pph2 como cebo, se amplificó el gen *pph2* por PCR utilizando los oligonucleótidos Pph2Eco2HF y Pph2Pst2HR (Tabla 9) y el cromosoma de *M. xanthus* como molde. El vector pGBKT7 y el producto de PCR obtenido se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRI* y *PstI*, y el plásmido resultante de la unión de ambos elementos se denominó pGBK-Pph2.

La construcción de la genoteca de expresión de *M. xanthus* empleada en este estudio fue realizada por Castañeda-García (2007) en el laboratorio de la Dra. Elías de la Universidad de Murcia. La genoteca está construida de tal manera que los fragmentos génicos clonados cubren el genoma completo de *M. xanthus*. Para ello, se emplearon tres enzimas de restricción diferentes cuya frecuencia de corte es elevada en el cromosoma de *M. xanthus*. La clonación de fragmentos, dentro del rango de tamaño medio de los genes de esta bacteria, en la serie de vectores pGAD, que difieren entre sí en la pauta de lectura del sitio de clonación, maximiza la posibilidad de expresar cada fragmento en la fase de lectura correcta.

### D.V.9.2. Rastreo de la genoteca de expresión de *M. xanthus* con el plásmido cebo pGBK-Pph2

En primer lugar, se introdujo por transformación el plásmido cebo pGBK-Pph2 en la levadura *S. cerevisiae* AH109 y se comprobó que la proteína híbrida Pph2 no inducía la activación de la transcripción de los genes dependientes de GAL4 por sí misma. Además, el hecho de que el gen *pph2* se clone bajo el control de un promotor constitutivo y que la proteína Pph2 codificada no presente dominios transmembrana ni

péptido señal, asegura que esta proteína se produce en cantidades suficientes y puede ser translocada al núcleo de la levadura.

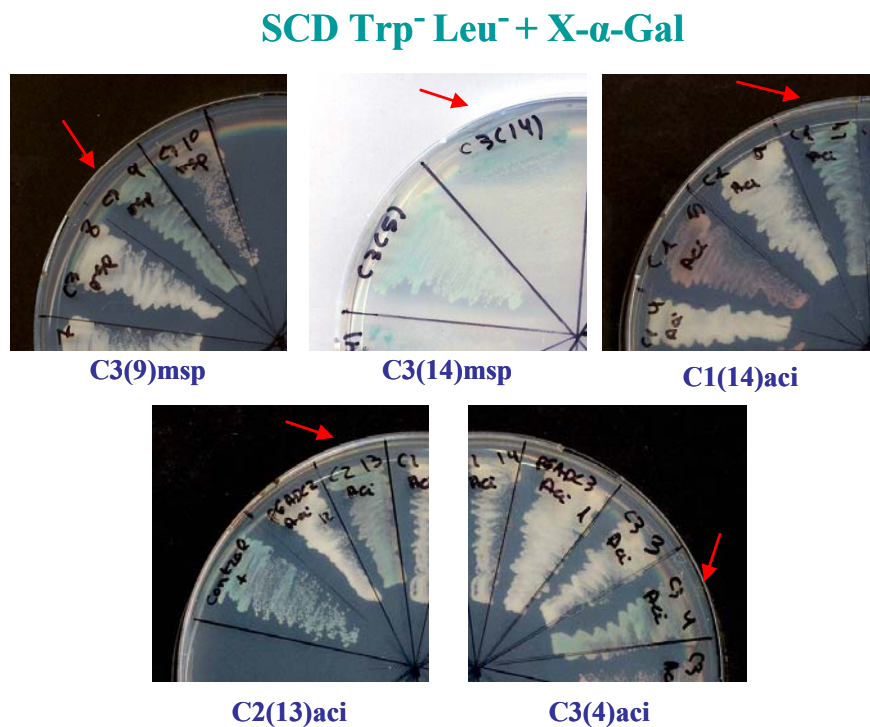
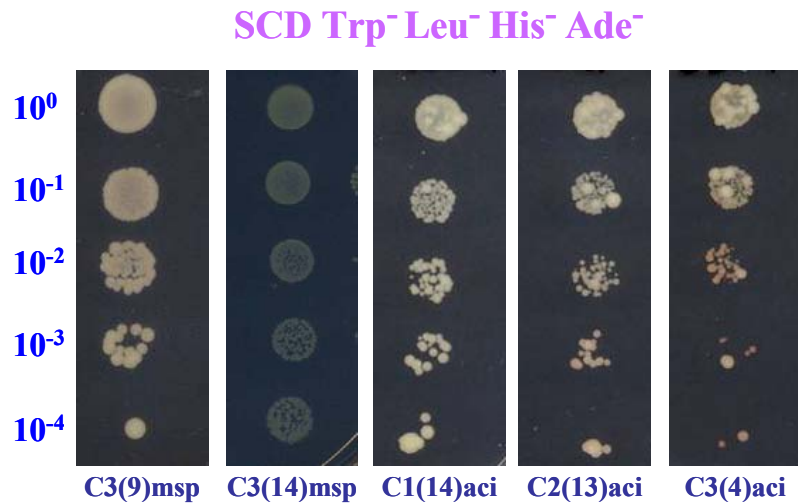
A continuación, la cepa portadora del plásmido cebo se transformó con el ADN plasmídico procedente de la genoteca de *M. xanthus*. Para ello, se realizaron 60 transformaciones con muestras procedentes de diferentes combinaciones de los vectores pGAD con fragmentos cromosómicos de *M. xanthus* digeridos con las enzimas de restricción *MspI* y *AciI*. En cada una de las transformaciones se empleó 1 µg de ADN plasmídico con la finalidad de que las células de levadura incorporaran de forma mayoritaria un único plásmido de la genoteca, facilitando así la posterior identificación del fragmento génico responsable de la interacción. Las células transformantes se seleccionaron en un medio sin triptófano, leucina ni histidina. En paralelo, se valoró la eficiencia de cada transformación mediante la siembra de diluciones en medio mínimo SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>, donde sólo pueden crecer las levaduras que hayan incorporado los plásmidos cebo y presa. El número medio de colonias obtenido en cada transformación fue de 50000, por lo que en total se rastrearon unos 3000000 de colonias para la búsqueda de interacciones con la Ser/Thr fosfatasa Pph2.

La búsqueda de proteínas interaccionantes no se llevó a cabo directamente con los transformantes obtenidos en el medio moderadamente selectivo carente de triptófano, leucina e histidina. Este medio se emplea en primer lugar porque, al no ser demasiado restrictivo, permite que prosperen las células de levadura. La siembra inmediata de los transformantes sobre un medio nutricional demasiado exigente, deficiente también en adenina, les impediría crecer, 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. De este modo, la selección nutricional en medio SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>His<sup>-</sup> favorece el crecimiento diferencial de las levaduras que portan interacciones positivas, dando lugar a colonias definidas de tamaño considerable sobre un crecimiento de fondo.

Posteriormente, las cepas capaces de crecer de forma adecuada en ausencia de histidina se sembraron en un medio muy restrictivo, carente tanto de histidina como de adenina, SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Ade<sup>-</sup>, en el cual tan sólo crecen las levaduras portadoras de interacciones entre el cebo y la presa, eliminando así posibles falsos positivos (Fig. 57A).

Las levaduras presuntamente positivas, capaces de crecer en este último medio, se verificaron mediante el análisis de la actividad enzimática  $\alpha$ -galactosidasa. La valoración cualitativa de la expresión de la enzima se llevó a cabo mediante la adición al medio SDC Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup> del sustrato X- $\alpha$ -Gal, dando lugar a una coloración azul en las cepas de levadura que expresan el gen *MEL1* (Fig. 57B).

A continuación, se aislaron los plásmidos presentes en cada una de las colonias de levadura que activaban la expresión de los genes dependientes de GAL4, siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos (C.II.5.1.), y se emplearon para volver a transformar la cepa que contenía el plásmido cebo pGBK-Pph2. Con ello se pretendía comprobar que se reconstituía el fenotipo observado durante el rastreo. Dichos plásmidos también se utilizaron para transformar la cepa de *S. cerevisiae* AH109, previamente transformada con el vector pGBKT7 sin inserto, para comprobar que el fragmento génico de *M. xanthus* contenido en el plásmido presa no activa por sí solo la expresión de los genes dependientes de GAL4, sino que requiere de Pph2 expresada en el plásmido cebo.



**Figura 57.** Crecimiento de las cepas de levadura obtenidas tras el rastreo de la genoteca de expresión de *M. xanthus* empleando la fosfatasa Pph2 como cebo. A) Determinación de la intensidad de la interacción en medio SDC Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Ade<sup>-</sup>. B) Selección enzimática en medio SDC Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> con X- $\alpha$ -Gal para determinar cualitativamente la actividad  $\alpha$ -galactosidasa.

Finalmente, se seleccionaron 5 colonias que superaron todos los controles y eran capaces de crecer en un medio mínimo deficiente en histidina y adenina, y además, presentaban tonalidad azulada en medio SDC Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> con X- $\alpha$ -Gal como consecuencia de la actividad  $\alpha$ -galactosidasa desarrollada (Fig. 57). Estas levaduras, que contenían el plásmido cebo pGBK-Pph2 y los plásmidos presa interaccionantes, se denominaron C3(9)msp, C3(14)msp, C1(14)aci, C2(13)aci y C3(4)aci (Fig. 57), donde CX indica el vector de la serie pGAD utilizado, (x) la colonia analizada y msp o aci la enzima de restricción utilizada para la obtención de fragmentos cromosómicos durante la construcción de la genoteca de expresión de *M. xanthus*.

### D.V.9.3. Secuenciación de los plásmidos presa contenidos en las cepas de levadura interaccionantes

Los plásmidos presa, aislados de las cepas de levadura que portaban una interacción, fueron secuenciados mediante el empleo del cebador pGADSecF (Tabla 10). El análisis de las secuencias obtenidas permitió identificar, mediante comparación con la secuencia del genoma de *M. xanthus*, el fragmento cuya expresión es responsable en cada caso de la interacción con la fosfatasa Pph2. Además, el estudio del punto de inserción de estos fragmentos cromosómicos en el vector permitió conocer si la fusión obtenida mantenía una pauta de lectura correcta para la expresión de la proteína híbrida.

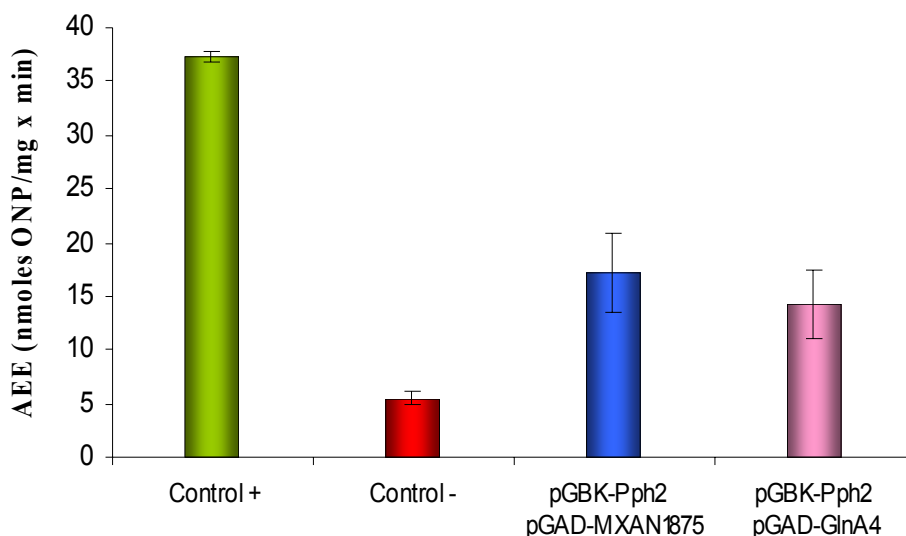
El análisis de los fragmentos cromosómicos detectados durante el rastreo de la genoteca con el sistema del doble híbrido de levadura reveló que dos de las cinco cepas seleccionadas expresan fragmentos cromosómicos pertenecientes a genes de *M. xanthus* en orientación y fase de lectura correcta. El resto de las cepas resultaron ser falsos positivos que expresan secuencias integradas en una orientación opuesta respecto al sentido de transcripción del gen en que se localizan o bien se traducen en una pauta de lectura errónea, dando lugar a proteínas anómalas carentes de sentido biológico.

Como resultado de este rastreo, se comprobó que la Ser/Thr fosfatasa Pph2 interacciona con las proteínas MXAN1875 y MXAN5630 de forma específica. La primera de ellas se identificó a partir del fragmento de ADN cromosómico portado por la cepa C3(9)msp, cuya expresión como presa genera una interacción fuerte con la fosfatasa (Fig. 57A). La segunda, se determinó tras analizar el segmento de ADN cromosómico obtenido a partir de la cepa C3(4)aci, que al ser expresado determina una interacción un poco más débil con Pph2 (Fig. 57A). La comparación de las secuencias aminoacídicas de estas proteínas de *M. xanthus* con las depositadas en las bases de datos indica que MXAN1875 corresponde a una proteína hipotética de función desconocida, mientras que MXAN5630 codifica una glutamina sintetasa de tipo GlnA4.

### D.V.9.4. Actividad $\beta$ -galactosidasa desarrollada por las cepas de levadura portadoras de las interacciones

Una vez realizados todos los controles y secuenciados los plásmidos presa de las levaduras presuntamente positivas, sólo dos de las interacciones detectadas resultaron ser verdaderas y específicas de Pph2 de *M. xanthus*. El siguiente paso fue determinar la actividad  $\beta$ -galactosidasa desarrollada por estas cepas para estimar la intensidad relativa de la interacción entre las proteínas. Para ello, se siguieron las indicaciones descritas en Material y Métodos (C.II.9.1.).

En la Fig. 58 se muestran los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa de una interacción positiva muy fuerte (columna verde), de una interacción negativa (columna roja), así como los de la cepa de levadura portadora de la interacción entre Pph2 y la proteína hipotética MXAN1875 (columna azul), y de la interacción de Pph2 con la glutamina sintetasa GlnA4 (MXAN5630) (columna rosa).



**Figura 58.** Análisis cuantitativo de la expresión del marcador enzimático *lacZ*, que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa, en el estudio de la interacción de Pph2 con las proteínas detectadas durante el rastreo de la genoteca, así como de un control positivo, correspondiente a una interacción muy fuerte, y de un control negativo, donde no existe interacción.

Los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa obtenidos indican que la interacción entre Pph2 y las proteínas detectadas durante el rastreo de la genoteca de *M. xanthus* es de una intensidad moderada, dado que los niveles de actividad medidos para ambas interacciones representan, aproximadamente, la mitad del nivel mostrado por la interacción fuerte empleada como control positivo. Sin embargo, esos valores son tres veces superiores al nivel de actividad  $\beta$ -galactosidasa cuantificado entre dos proteínas que no interactúan, representado en el caso del control negativo. Por tanto, los valores obtenidos de las medidas realizadas de las interacciones Pph2-MXAN1875 y Pph2-GlnA4 son significativos. En general, los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa obtenidos son muy bajos, incluso para el control positivo, debido a que la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa se encuentra bajo el control de un promotor muy débil de tipo *MELI*.

#### D.V.9.5. Interacción de Pph2 con GlnA

Antes de proceder a la caracterización de las proteínas detectadas durante el rastreo de la genoteca de *M. xanthus* utilizando la fosfatasa Pph2 como cebo, dado que una de ellas resultó ser una glutamina sintetasa, se analizó la presencia de otros genes que cifran proteínas de este tipo presentes en esta bacteria y, en caso de haber, si Pph2 también interactúa con las proteínas codificadas por ellos.

En primer lugar, se identificaron los genes que codifican glutamina sintetasas en el genoma de *M. xanthus*. La estrategia de búsqueda empleada fue confrontar el dominio catalítico de este tipo de proteínas, definido por la base de datos PFAM (Finn *et al.*, 2008), frente a la secuencia del genoma de *M. xanthus* utilizando el programa BLASTP (Altschul *et al.*, 1997). De esta manera, se determinó que en el genoma de *M. xanthus* hay dos proteínas de tipo glutamina sintetasa, denominadas GlnA y GlnA4, de las cuales la segunda fue detectada como proteína interaccionante con la Ser/Thr fosfatasa Pph2 durante el rastreo de la genoteca de expresión de *M. xanthus*.

El siguiente paso fue determinar, mediante el empleo del sistema del doble híbrido de levadura, si la otra glutamina sintetasa, GlnA (MXAN0912), interacciona con la fosfatasa Pph2.

El análisis de la interacción Pph2-GlnA requería la expresión de la proteína GlnA como presa, ya que la fosfatasa Pph2 fue expresada como cebo para el rastreo de la genoteca de expresión de *M. xanthus*. En primer lugar, se amplificó por PCR el gen *glnA* a partir de los oligonucleótidos GlnAEco2HF y GlnAXho2HR (Tabla 11), utilizando como molde el ADN cromosómico de *M. xanthus*. A continuación, se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*, tanto el producto de PCR obtenido como el vector pGADT7 y se pusieron en contacto. Como resultado de la ligación se obtuvo el plásmido pGAD-GlnA, que expresa la proteína GlnA fusionada al dominio de activación de GAL4. Finalmente, la cepa de levadura portadora del plásmido cebo pGBK-Pph2 se transformó con el plásmido presa pGAD-GlnA.

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 X- $\alpha$ -Gal (no mostrado). Todo ello indica que la proteína Pph2 de *M. xanthus* no interacciona con GlnA de *M. xanthus* en el sistema del doble híbrido de levadura.

#### **D.V.9.6. Caracterización de la proteína hipotética MXAN1875**

Tras los primeros análisis que indicaron que el gen MXAN1875 codifica una proteína hipotética que interacciona con la fosfatasa Pph2, el siguiente paso consistió en la caracterización de dicha interacción proteica. Para ello, se trató de determinar el momento y las condiciones en las que ambas proteínas interaccionan.

##### **D.V.9.6.1. Análisis de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de MXAN1875**

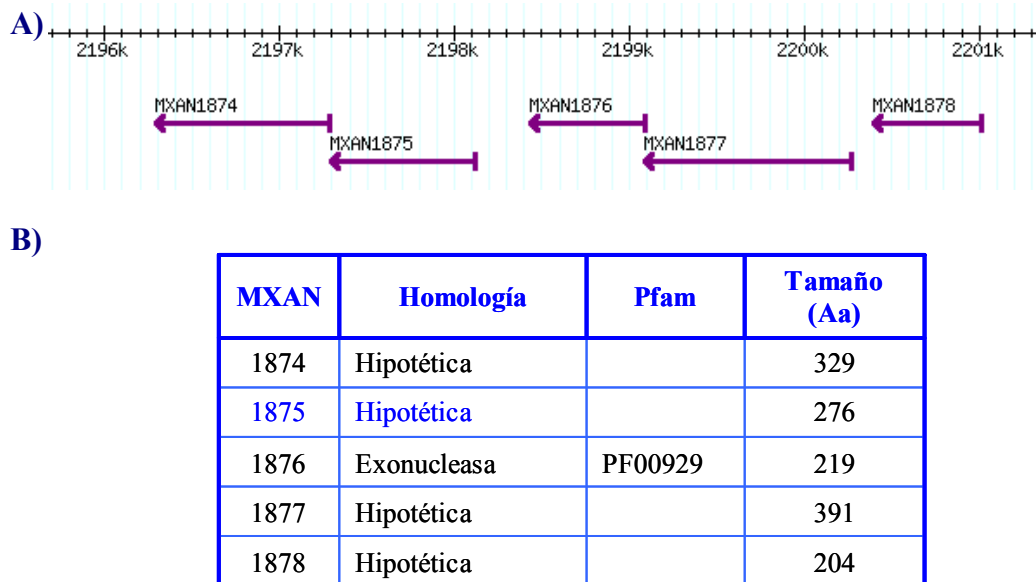
MXAN1875 es un gen de 831 pb que codifica una proteína hipotética soluble de 276 aminoácidos y 31100 de peso molecular estimado. El GTG considerado como codón de iniciación de la traducción, destacado en verde en la Fig. 59, se determinó en función del uso de codones, dado que el 89.5% de los tripletes presentan G ó C en la tercera posición del codón, lo que representa un uso de codones típico de *M. xanthus* (Bibb *et al.*, 1984; Inouye *et al.*, 1989; Shimkets, 1993). El análisis de la secuencia nucleotídica que precede al codón de iniciación no permitió identificar un sitio de unión al ribosoma característico.

La comparación de la secuencia aminoacídica de MXAN1875 con las proteínas depositadas en las bases de datos indicó que esta proteína carece de motivos funcionales reconocidos y sólo mantiene una estrecha similitud con dos proteínas hipotéticas de *Stigmatella aurantiaca*.



Finalmente, MXAN1878 codifica una proteína soluble de 204 residuos, hipotética, pero que presenta una baja homología con exonucleasas y helicasas del ADN.

Por tanto, la mayoría de las proteínas que forman parte del operón son proteínas hipotéticas, aunque algunas muestran homología en mayor o menor medida con enzimas implicadas en la replicación y transcripción del ADN.



**Figura 60.** Genes situados en torno al gen de la proteína hipotética MXAN1875 en el genoma de *M. xanthus*. A) Organización genómica. B) Similitud y características de las proteínas codificadas por esos genes.

#### D.V.9.6.3. Determinación del perfil de expresión de MXAN1875

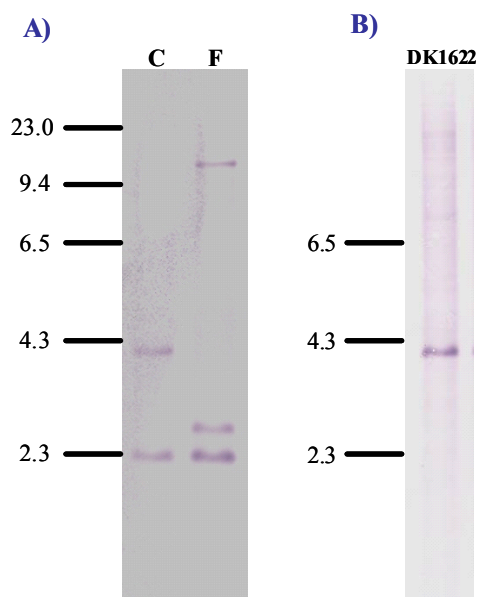
Para tratar de determinar en qué momento del ciclo de vida de *M. xanthus* interacciona MXAN1875 con la fosfatasa Pph2 se determinó el momento en el que su gen codificante se expresa. Para ello, se construyó una fusión entre el gen *lacZ* de *E. coli* y el gen MXAN1875 de *M. xanthus* siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos (C.II.11.1.). El gen *lacZ* codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa cuya actividad puede ser analizada de modo cualitativo y/o cuantitativo y, a partir, de la misma, inferir el perfil de expresión del gen de interés fusionado con *lacZ*.

Para la obtención del plásmido portador de la fusión se llevó a cabo la amplificación por PCR de un fragmento de 800 pb que incluye los 50 primeros codones del gen MXAN1875 y la región localizada justo por delante del mismo, utilizando como molde el ADN cromosómico de *M. xanthus* y los oligonucleótidos 1875Bam y 1875Kpn (Tabla 5). El producto de PCR obtenido se digirió con las enzimas de restricción *KpnI* y *BamHI*, al igual que el vector pKY481. Ambos productos de las digestiones se pusieron en contacto y el plásmido generado se denominó pKY-MXAN1875.

Finalmente, se generó la cepa portadora de la fusión tras la integración del plásmido pKY-MXAN1875 en el cromosoma de la cepa silvestre DZF1 de *M. xanthus*. La cepa resultante, denominada 1875LZ, se verificó mediante Southern blot (Fig. 61A).



## Resultados



**Figura 61.** A) Southern blot para la identificación de la cepa portadora de la fusión entre el gen MXAN1875 de *M. xanthus* y el gen *lacZ* de *E. coli*. La calle C corresponde al ADN cromosómico de la cepa silvestre DZF1 utilizado como control y la calle F al de la cepa portadora de la fusión digeridos ambos con *Xho*I. La sonda empleada fue el producto de PCR utilizado para la construcción de la fusión. El tamaño de los fragmentos esperados era de 4.0 kb en el caso de la cepa silvestre DZF1 y de 2.8 y 10.3 kb en el de la fusión. B) ADN cromosómico de la cepa silvestre DK1622 digerido con *Xho*I. La sonda empleada fue la misma que en el apartado A). El tamaño del estándar se muestra en kb.

El resultado de este Southern blot reveló la presencia, tanto en el cromosoma de la cepa silvestre DZF1, como en el de la cepa portadora de la fusión, de las bandas de tamaño esperado, así como de otra banda adicional de 2.3 kb. El hecho de que la banda adicional presentara una intensidad de señal similar a la de las esperadas descartaba que su aparición se debiera a falta de especificidad de la sonda empleada y planteó la posibilidad de que la región cromosómica utilizada como sonda (que incluye los 150 primeros nucleótidos de MXAN18745) se encontrase repetida en la cepa DZF1 de *M. xanthus* y no fuese única como en el caso de la cepa DK1622 de esta mixobacteria, según ha revelado la secuenciación de su genoma. Para comprobarlo, se procedió a digerir el ADN cromosómico de la cepa DK1622 con la misma enzima de restricción y se efectuó un Southern blot empleando la sonda anterior para la hibridación. En este caso, sólo se obtuvo la banda esperada (Fig. 61B). De esta manera, se pudo comprobar que la cepa DZF1 posee, al menos, una copia adicional del gen MXAN1875 en su genoma.

El análisis cualitativo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa desarrollada por la cepa 1875LZ en los medios adicionados con X-Gal indica que el gen MXAN1875 no se expresa a niveles detectables con esta técnica durante el crecimiento vegetativo en CTT, ni tampoco a lo largo del desarrollo en los medios CF, TPM y TM, ya que no fue posible apreciar el desarrollo de color azulado bajo las condiciones analizadas (no mostrado). De igual forma, la cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa no ofreció resultados significativos, lo que impidió conocer el perfil de expresión del gen MXAN1875 a lo largo del ciclo de vida de *M. xanthus*.

#### D.V.9.6.4. Implicación de MXAN1875 en el ciclo de vida de *M. xanthus*

Para tratar de estudiar el papel de la proteína MXAN1875, en relación con la función que la fosfatasa Pph2 ejerce durante el ciclo de vida de *M. xanthus*, se procedió a la obtención de una cepa portadora de la delección del gen MXAN1875. El análisis fenotípico de esta cepa, carente de la proteína hipotética, permitiría determinar el papel de esta proteína en el ciclo de vida de *M. xanthus*.

##### D.V.9.6.4.1. OBTENCIÓN DE UN MUTANTE DE DELECCIÓN PARA EL GEN MXAN1875

La obtención de este mutante de delección supuso la eliminación de 681 pb de las 831 pb constituyentes del gen, dado que se mantienen los primeros 50 codones y el codón de terminación del gen, y se sustituye el resto por la secuencia que representa un sitio de restricción, manteniendo la pauta de lectura. Para la obtención de dicho mutante se siguieron las indicaciones descritas en Material y Métodos (C.II.12.1.).

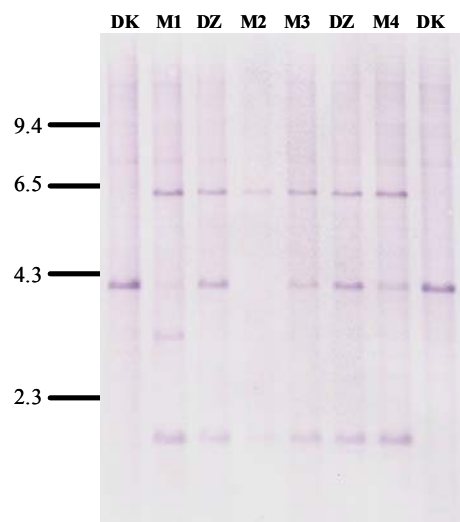
El plásmido portador de la delección en fase del gen MXAN1875 se obtuvo tras proceder a la clonación de dos fragmentos de 800 pb, situados justo por encima y por debajo de este gen, en el vector pBJ113. Para ello, se llevó a cabo la amplificación por PCR de ambos fragmentos a partir del ADN cromosómico de *M. xanthus* con las parejas de cebadores 4875Bam-1875Kpn y 1875IFHin-1875IFBam (Tabla 6). Ambos fragmentos se clonaron de manera secuencial en el vector pBJ113 utilizando las enzimas adecuadas, y el plásmido resultante se denominó p $\Delta$ MXAN1875.

Por tanto, el plásmido p $\Delta$ MXAN1875 contiene dos fragmentos de 800 pb conectados por un sitio de restricción *Bam*HI, y en el que se ha eliminado el 82% del gen MXAN1875 manteniendo la pauta de lectura.

Tras electroporar este plásmido en la cepa silvestre DZF1 de *M. xanthus* se originaron intermediarios merodiploides resistentes a kanamicina con el plásmido p $\Delta$ MXAN1875 integrado en el cromosoma que fueron comprobados mediante Southern blot (no mostrado). A partir de un intermediario correcto fue posible aislar colonias recombinantes haploides que se analizaron mediante Southern blot para tratar de diferenciar las colonias que habían revertido a genotipo silvestre de las que portaban la delección deseada. El resultado de este Southern blot reveló que sólo una de las cuatro colonias analizadas era mutante (M1), mientras que las tres restantes revirtieron a genotipo silvestre (M2, M3 y M4) (Fig. 62). La cepa mutante de delección para el gen MXAN1875 de *M. xanthus* se denominó  $\Delta$ MXAN1875.

En esta ocasión, el revelado del Southern blot mostró dos bandas adicionales a las esperadas en las calles correspondientes al cromosoma de la cepa silvestre DZF1 y de las colonias recombinantes (calles M y DZ, Fig. 62) y la presencia de la única banda esperada en el cromosoma de la cepa silvestre DK1622 (calles DK, Fig. 62). Lo que confirma los resultados obtenidos durante la construcción de la fusión con *lacZ* para el mismo gen, es decir, que la región cromosómica del gen MXAN1875 está presente en más de una copia en el genoma de la cepa DZF1 de *M. xanthus*.

## Resultados



**Figura 62.** Southern blot para la identificación del mutante de delección para el gen MXAN1875 de *M. xanthus*. Las calles M corresponden al cromosoma de las colonias recombinantes, mientras que las calles DZ y DK muestran el cromosoma de las cepas silvestres DZF1 y DK1622, respectivamente, utilizadas como control. En todos los casos, los cromosomas fueron digeridos con *Xho*I. El fragmento amplificado por debajo del gen MXAN1875 fue empleado como sonda. El tamaño de los fragmentos esperados era de 4.0 kb en el caso de los silvestres y de 3.2 kb en el del mutante. El tamaño del estándar se muestra en kb.

### D.V.9.6.4.2. CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE $\Delta$ MXAN1875

Para tratar de relacionar la función de la proteína MXAN1875 con la de la fosfatasa Pph2 con la cual interacciona, se analizaron en el mutante de delección obtenido, mediante la comparación con la cepa silvestre DZF1, distintos aspectos del ciclo de vida de la mixobacteria siguiendo las indicaciones descritas en Material y Métodos (C.II.12.2.).

#### D.V.9.6.4.2.1. Crecimiento vegetativo

El efecto que la delección del gen MXAN1875 pudiera tener sobre el crecimiento vegetativo de *M. xanthus* se determinó tras cultivar tanto la cepa silvestre DZF1 como el mutante de delección  $\Delta$ MXAN1875 en medio CTT líquido y sólido para la realización de una curva de crecimiento y determinar la movilidad de las cepas. Durante el desarrollo de estos experimentos no se detectaron diferencias significativas en el crecimiento desarrollado por ambas cepas.

#### D.V.9.6.4.2.2. Ciclo de desarrollo

Mediante el estudio del efecto que la delección del gen MXAN1875 ejerce durante el ciclo de desarrollo sobre la agregación y fructificación, así como durante la esporulación y germinación de las mixósporas, fue posible establecer la función desempeñada por la proteína sobre el control de los distintos eventos que conforman esta etapa del ciclo de vida de *M. xanthus*.

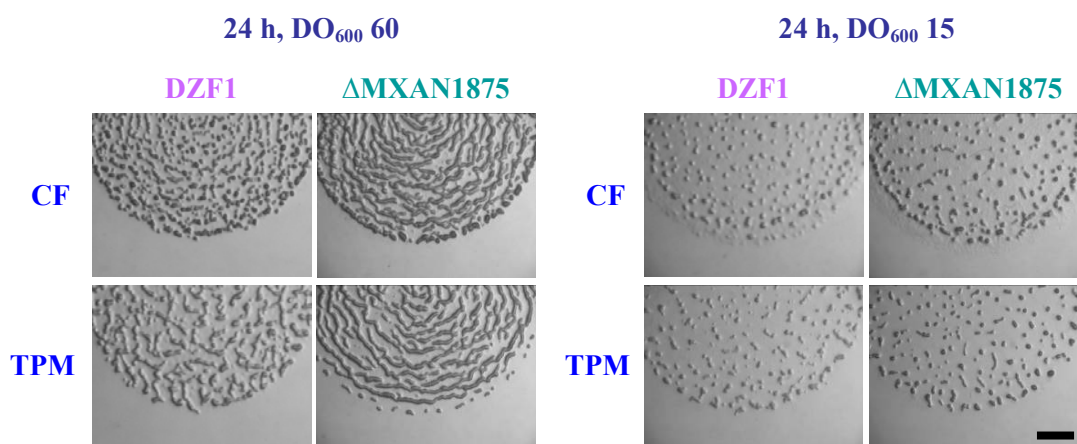
### Fenotipo durante el ciclo de desarrollo

El estudio de la progresión del ciclo de desarrollo del mutante de delección  $\Delta$ MXAN1875, en comparación con la cepa silvestre DZF1, se llevó a cabo cultivando ambas bacterias en medios pobres en nutrientes capaces de inducir el ciclo de desarrollo. Los medios empleados, CF y TPM, presentan características nutricionales diferenciales que condicionan el ritmo de la evolución de esta fase del ciclo de vida de *M. xanthus*.

En la Fig. 63 se muestran los cuerpos fructificantes generados en medio CF y TPM por las cepas silvestre y  $\Delta$ MXAN1875 a densidad óptica de partida, medida a 600 nm, de 60 y 15. Al comparar la progresión del ciclo de desarrollo de ambas bacterias en los dos medios inductores del desarrollo empleados, se aprecia que el mutante carente de la proteína hipotética MXAN1875 presenta un desarrollo ligeramente prematuro, puesto que la formación de cuerpos fructificantes se encuentra adelantada con respecto a la cepa silvestre (Fig. 63). De este modo, tras 24 horas de incubación en medio CF, a partir de cultivos concentrados a  $DO_{600}$  de 60, la cepa silvestre produce cuerpos fructificantes bien formados y empaquetados, pero con un grado de madurez ligeramente inferior al mostrado por la cepa mutante. Además, las cepas DZF1 y  $\Delta$ MXAN1875 generan cuerpos fructificantes que difieren en su morfología, siendo de mayor tamaño y más alargados los formados por la cepa mutante de delección que los producidos por la cepa silvestre (Fig. 63).

Un resultado análogo se obtuvo cuando estas cepas se cultivaron en medio TPM. Sin embargo, se observan mayores diferencias entre las cepas silvestre y mutante cuando la densidad celular de partida en ambos medios fue de 15. En este caso, igualmente transcurridas 24 horas de incubación, el silvestre muestra cuerpos fructificantes inmaduros y translúcidos, mientras que la cepa mutante carente de la proteína hipotética produce cuerpos fructificantes definidos y empaquetados con cierta opacidad, en una fase más avanzada de maduración (Fig. 63).

A medida que progresa el ciclo de desarrollo, las diferencias fenotípicas entre las cepas DZF1 y  $\Delta$ MXAN1875 se atenúan, de tal manera que una vez completadas 48 horas de incubación, las dos cepas presentan cuerpos fructificantes maduros muy similares entre sí, totalmente opacos y con un elevado grado de empaquetamiento.



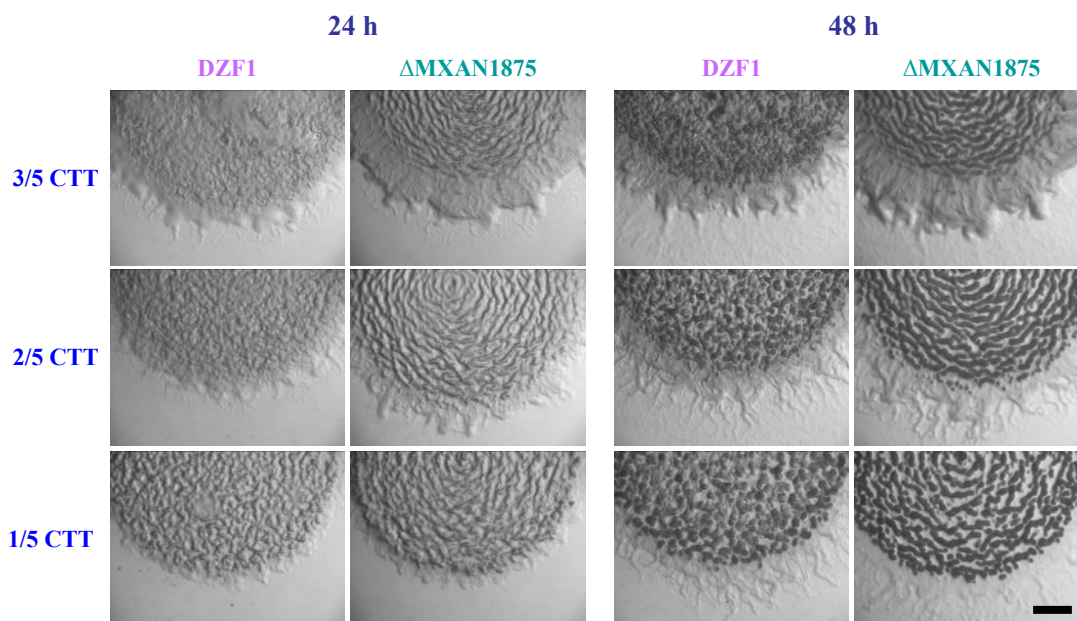
**Figura 63.** Análisis fenotípico en los medios CF y TPM, tras 24 horas de incubación, por las cepas silvestre DZF1 y mutante  $\Delta$ MXAN1875 de *M. xanthus* de cultivos concentrados a  $DO_{600}$  inicial de 60 y 15. La barra representa 1 mm.

## Resultados

Los resultados anteriores muestran que la cepa mutante de delección para el gen MXAN1875 presenta un ligero adelanto en el ciclo de desarrollo que se mantiene tan sólo hasta las 24 horas de incubación. Para confirmar que la cepa mutante presenta un desarrollo prematuro se recurrió a la misma estrategia empleada para la caracterización del mutante  $\Delta sixA$ , es decir, el empleo de variantes del medio CTT con diferentes concentraciones de nutrientes.

De este modo, se utilizaron los medios 3/5 CTT, 2/5 CTT y 1/5 CTT que presentan un contenido decreciente de Bacto-casitona y una  $DO_{600}$  de partida de 60 para cada cepa. El empleo de estos medios permitió observar que el mutante forma cuerpos fructificantes inmaduros en medio 3/5 CTT (Fig. 64) tras 24 horas de incubación, mientras que la cepa silvestre sólo presenta agregados incipientes. Un resultado equivalente se observa en el medio 2/5 CTT, mientras que en el medio 1/5 CTT las diferencias entre ambas cepas son menores (Fig. 64). Transcurridas 48 horas de incubación, la cepa  $\Delta MXAN1875$  genera cuerpos fructificantes plenamente maduros, nítidos y definidos en 1/5 CTT, disminuyendo el grado de maduración, nitidez y definición en 2/5 CTT y más aún en 3/5 CTT, esto es, en relación a la cantidad de nutrientes presentes en el medio. Una situación similar se da en la cepa silvestre, pero en todos los medios empleados la formación de cuerpos fructificantes se muestra en un estadio retrasado respecto al de la cepa  $\Delta MXAN1875$ , quedando reducida a la generación de simples agregados en el caso del medio 3/5 CTT (Fig. 64).

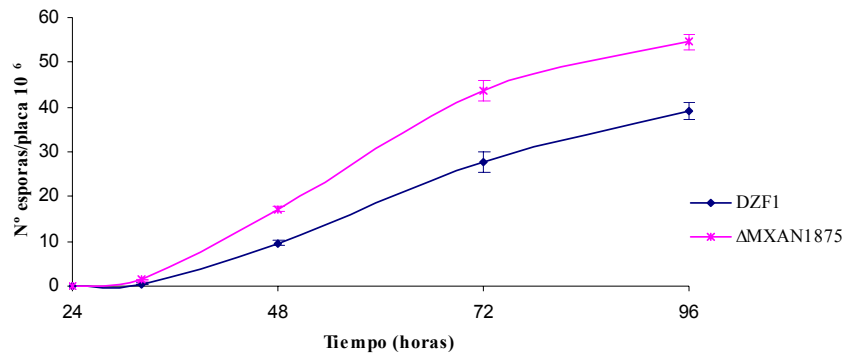
Por tanto, los resultados obtenidos del análisis fenotípico durante el ciclo de desarrollo de las cepas DZF1 y  $\Delta MXAN1875$  indican que existe un adelanto en la formación de los cuerpos fructificantes en la cepa carente del gen MXAN1875, de manera que este mutante de delección muestra un fenotipo opuesto al ofrecido por la cepa carente de la fosfatasa Pph2 con la cual interacciona la proteína MXAN1875.



**Figura 64.** Análisis fenotípico de las cepas silvestre DZF1 y mutante  $\Delta MXAN1875$  en medio CTT con distintas concentraciones de Bacto-casitona tras 24 y 48 horas de incubación utilizando una  $DO_{600}$  de partida de 60. La barra representa 1 mm.

## Esporulación

Para llevar a cabo el recuento de las mixósporas originadas por las cepas DZF1 y  $\Delta$ MXAN1875 se empleó el medio CF. De esta manera, se podría determinar si existe relación entre el adelanto observado en la formación de los cuerpos fructificantes y la producción de esporas.



**Figura 65.** Recuento de esporas producidas por las cepas silvestre DZF1 y mutante  $\Delta$ MXAN1875 de *M. xanthus* en medio CF.

Los resultados obtenidos reflejan la relación existente entre el fenotipo observado durante el ciclo de desarrollo y la producción de estructuras de resistencia, ya que existen diferencias significativas en el número de mixósporas producidas por las cepas silvestre y mutante de delección para MXAN1875. De esta manera, la cepa silvestre produce  $9.6 \times 10^6$  mixósporas/placa tras 48 horas de incubación, frente a  $1.7 \times 10^7$  mixósporas/placa generadas por  $\Delta$ MXAN1875 (Fig. 65). A pesar de que en estadios posteriores del ciclo de desarrollo las diferencias fenotípicas entre ambas cepas se reducen, estas diferencias se mantienen en los recuentos efectuados transcurridas 96 horas de incubación, produciendo la cepa silvestre  $3.9 \times 10^7$  mixósporas/placa, frente a  $5.4 \times 10^7$  mixósporas/placa originadas por la cepa mutante (Fig. 65).

## Germinación

Para determinar si las esporas producidas por la cepa mutante  $\Delta$ MXAN1875 presentan la misma viabilidad que las mixósporas generadas por la cepa silvestre DZF1, se estudió la germinación de las mismas. Para ello, las muestras utilizadas para efectuar los recuentos fueron expuestas a condiciones de disponibilidad de nutrientes.

Las células de resistencia producidas por la cepa mutante presentan una reducción en la eficiencia de germinación, siendo del 2.7%, frente al 7.5% en la cepa silvestre tras 72 horas de incubación.

### D.V.9.7. Caracterización de la glutamina sintetasa GlnA4 (MXAN5630)

Durante el rastreo de una genoteca de expresión de *M. xanthus* mediante el sistema del doble híbrido de levadura utilizando la fosfatasa Pph2 como proteína cebo, junto a la interacción con MXAN1875, se detectó la interacción con MXAN5630 cuyo análisis de secuencia indica que corresponde a una enzima glutamina sintetasa GlnA4.

La glutamina sintetasa (GS) es la principal enzima para la asimilación de amonio, por conversión de glutamato en glutamina, en numerosos procariontes. Está formada por 12 subunidades idénticas y sufre modificación posttraduccional por adenilación en enterobacterias. Dicha regulación consiste en la unión covalente de un grupo AMP a un residuo de tirosina de cada subunidad, lo cual inactiva la enzima progresivamente (Merrick y Edwards, 1995). Existen otras formas de modificación covalente, como en el caso de *Rhodospirillum rubrum*, *Streptomyces griseus* y *Synechocystis*, en los que la modificación ocurre mediante ADP ribosilación (Merrick y Edwards, 1995).

Además, se han descrito varias formas de glutamina sintetasa, siendo GSI la enzima universal con una secuencia altamente conservada (Merrick y Edwards, 1995). Sin embargo, muchas bacterias sintetizan más de una forma de glutamina sintetasa (Harth *et al.*, 2005; Rexer *et al.*, 2006).

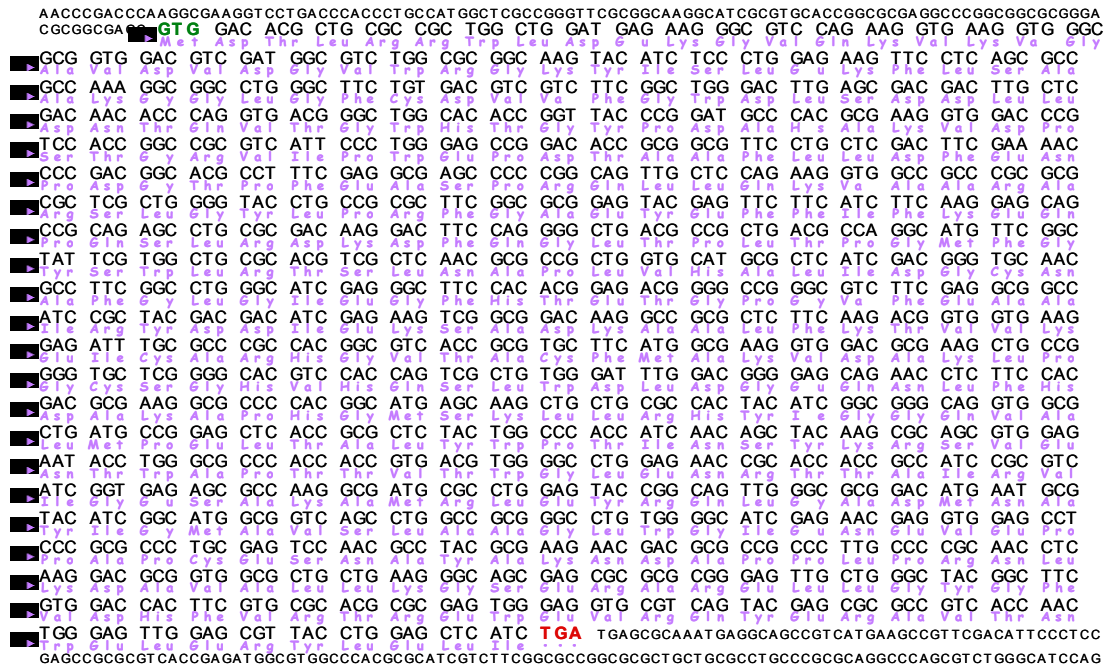
Por su parte, *M. xanthus* contiene 2 genes de este tipo, denominados *glnA* y *glnA4* que no han sido caracterizados, de manera que el estudio de la interacción de GlnA4 con la fosfatasa Pph2 podría esclarecer el papel que esta proteína desempeña en el ciclo de vida de la mixobacteria.

#### D.V.9.7.1. Análisis de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de GlnA4

Una vez que se hubo secuenciado el plásmido presa en el cual se encontraba parcialmente clonada la secuencia codificante de la enzima glutamina sintetasa se procedió al análisis de su secuencia completa.

Como codón de iniciación se consideró un codón alternativo de tipo GTG, destacado en la Fig. 66 en verde. Este triplete de iniciación se encuentra en la misma pauta de lectura que el codón de terminación de la secuencia, TGA, destacado en rojo, e inicia una pauta de lectura con el uso de codones típico de *M. xanthus* (Bibb *et al.*, 1984; Inouye *et al.*, 1989; Shimkets, 1993), ya que el 95% de los tripletes presentan G o C en la tercera posición. No fue posible determinar un sitio claro de unión al ribosoma tras el análisis de la región genómica localizada por delante del codón de iniciación establecido.

El gen *glnA4* está constituido por 1350 pb y codifica una proteína soluble de 449 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 50000.



**Figura 66.** Secuencia nucleotídica del gen *glnA4* de *M. xanthus*. En violeta se muestra la secuencia aminoacídica deducida de la glutamina sintetasa GlnA4. Se indica en verde el codón de iniciación y en rojo el codón de terminación de GlnA4.

Cuando su secuencia aminoacídica fue comparada con la de otras proteínas depositadas en las bases de datos, GlnA4 de *M. xanthus* mostró gran homología con enzimas de tipo glutamina sintetasa. De esta manera, muestra un 24.5% de identidad con GlnA4 de *S. typhimurium* (Janson *et al.*, 1986), un 20.2 % de identidad con GlnA de *M. xanthus*, 33.5% de identidad con GlnA4 (Rexer *et al.*, 2006) de *S. coelicolor* y un 38.0% de identidad con la proteína IpuC de *Pseudomonas* IKE171 (de Azevedo *et al.*, 2002). Este análisis también permitió diferenciar en GlnA4 de *M. xanthus* el dominio catalítico glutamina sintetasa entre los residuos 110 y 370, el cual juega un papel clave en el metabolismo del nitrógeno, ya que cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato y amonio. GlnA de *M. xanthus* posee un dominio adicional de tipo anclaje  $\beta$  (PF03951), presente en algunas enzimas de tipo GlnA.

Las enzimas glutamina sintetasa de procariontes y eucariotes se caracterizan por la presencia de 19 aminoácidos estrictamente conservados que juegan un papel clave en la catálisis y unión de sustratos (Fig. 67). GlnA4 de *M. xanthus* carece de tres de ellos. Las sustituciones encontradas son S53 (numeración referida a GlnA de *S. typhimurium*) por glutamina, N264 por prolina y, por último, E327 por triptófano. El residuo S53 está implicado en incrementar la estabilidad entre las subunidades por interacción con E327, mientras que el residuo de N264, por su parte, coordina el grupo amino del glutamato y estabiliza E327 tras la unión de los inhibidores metionina sulfoximina o fosfinotricina. Finalmente, el residuo E327 estabiliza la estructura tetraédrica formada como consecuencia del ataque del amonio, acepta un protón del intermediario tetraédrico para producir L-glutamina, cierra el sitio activo y protege al intermediario  $\gamma$ -glutamilfosfato de la hidrólisis. Sustituciones similares a las encontradas en GlnA4 de *M. xanthus* se han descrito en otras proteína (Rexer *et al.*, 2006).



## Resultados

Por otro lado, la mayoría de enzimas glutamina sintetasa presentan en el extremo C-terminal un motivo de adenilación (Fig. 68) implicado en el reconocimiento de la enzima adeniltransferasa que incluye un residuo de tirosina que se modifica covalentemente. Las dos glutamina sintetetas de *M. xanthus* carecen de este motivo (Fig. 67). GlnA carece de 7 de los 8 residuos conservados presentes en esta caja de adenilación, mientras que GlnA4 posee 3 de ellos, al igual que GlnA2, 3 y 4 de *S. coelicolor* A3(2) (Rexer *et al.*, 2006).

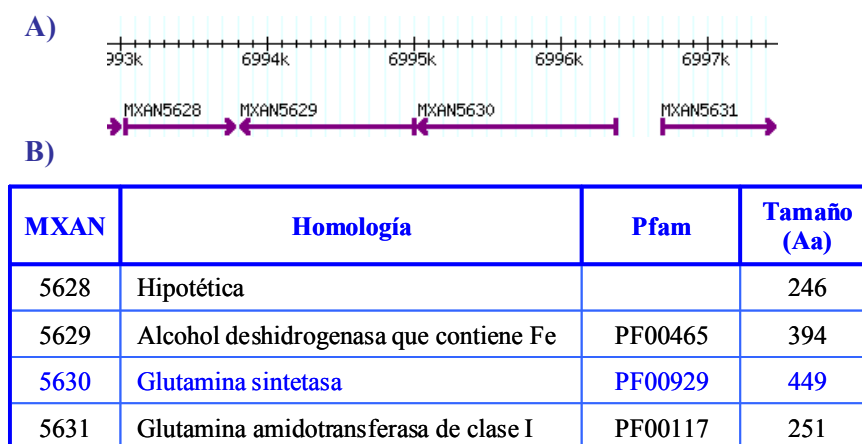


**Figura 67.** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la glutamina sintetasa GlnA4 de *M. xanthus* con otras glutamina sintetetas (números de acceso en Tabla 12). Los aminoácidos conservados se muestran sobre fondo rojo, mientras que los residuos conservados implicados en la catálisis y en la unión del sustrato aparecen destacados con una estrella azul. Además, se destaca sobre fondo verde la caja de adenilación. En la parte superior se muestra la estructura secundaria de la glutamina sintetasa de *S. typhimurium*. En la parte inferior, delimitado por flechas verdes, aparece el dominio glutamina sintetasa (PF00120) de GlnA4 de *M. xanthus*.

### D.V.9.7.2. Análisis de las regiones genómicas situadas en torno al gen *glnA4*

El análisis de los genes localizados junto a *glnA4* en el genoma de *M. xanthus* reveló la presencia de un gen (MXAN5629) orientado en el mismo sentido de transcripción, de modo que posiblemente ambos formen parte del mismo operón (Fig. 68A). Los genes integrados en esta región corresponden a marcos abiertos de lectura con el uso de codones típico de microorganismos con alto contenido en G+C como *M. xanthus*. Además, se muestran otros dos genes que presentan sentido de transcripción opuesto (Fig. 68A).

Los productos de estos genes fueron comparados con proteínas depositadas en las bases de datos para tratar de determinar su posible función. Dos de ellas muestran homología con proteínas caracterizadas, mientras que la restante no presenta similitud significativa con ningún tipo proteico concreto (Fig. 68B).



**Figura 68.** Genes situados en torno al gen de la glutamina sintetasa *GlnA4* en el genoma de *M. xanthus*. A) Organización genómica. B) Similitud y características de las proteínas codificadas por esos genes.

MXAN5628 genera una proteína hipotética soluble de 246 residuos que carece de dominios funcionales representativos y tan sólo muestra similitud muy baja con la proteína FtsQ implicada en la división celular (Joseleau-Petit *et al.*, 1999).

MXAN5629 cifra una proteína soluble de 394 residuos. Esta proteína pertenece a la familia alcohol deshidrogenasa que contiene hierro, ya que posee el motivo conservado propio de esta familia entre los residuos 18 y 386. Las proteínas pertenecientes a esta familia catalizan la oxidación reversible de etanol a acetaldehído con reducción de NAD. Se conocen tres enzimas, estructural y catalíticamente diferentes, que conforman la familia de alcohol deshidrogenasas: las que contienen zinc o de larga cadena, las de tipo insecto o de corta cadena y las que contienen hierro. La proteína MXAN5629 presenta homología, además de con otras enzimas alcohol deshidrogenasas que contienen hierro, con 4-hidroxiacetato deshidrogenasas dependientes de NAD.

Por último, MXAN5631 cifra una proteína soluble de 251 aminoácidos que posee un dominio glutamina amidotransferasa de clase I entre los residuos 90 y 211. Estas proteínas están implicadas en la eliminación del grupo amino de una molécula de

## Resultados

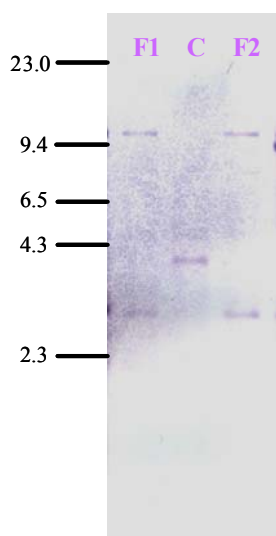
glutamato y en la transferencia del mismo a su sustrato, creando en él un nuevo grupo C-N. Existen dos tipos de glutamina amidotransferasa. Las de clase I, como es el caso de MXAN5631, poseen cisteína, histidina y glutamato en el dominio catalítico conservado.

### D.V.9.7.3. Determinación del perfil de expresión de *glnA4*

La expresión de *glnA4* durante el ciclo de vida de *M. xanthus* se analizó a partir de la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa desarrollada por una cepa portadora de una fusión entre el gen *glnA4* de *M. xanthus* y el gen *lacZ* de *E. coli* siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos (C.II.11.1.).

El plásmido portador de la fusión *glnA4-lacZ* se obtuvo a partir de la amplificación de un fragmento de 800 pb situado justo por delante del gen *glnA4*, utilizando el ADN cromosómico de la cepa DZF1 de *M. xanthus* y los oligonucleótidos 5630Bam y 5630Sma (Tabla 5). El producto de PCR obtenido, que incluye los 16 codones iniciales del gen *glnA4*, así como el plásmido pKY481, fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sma*I, se pusieron en contacto y el plásmido generado se denominó pKY-GlnA4.

Finalmente, la cepa portadora de la fusión se generó tras la integración del plásmido pKY-GlnA4 en el cromosoma de la cepa silvestre DZF1 de *M. xanthus* y, tras la comprobación mediante Southern blot, se denominó GlnA4LZ (Fig. 69).



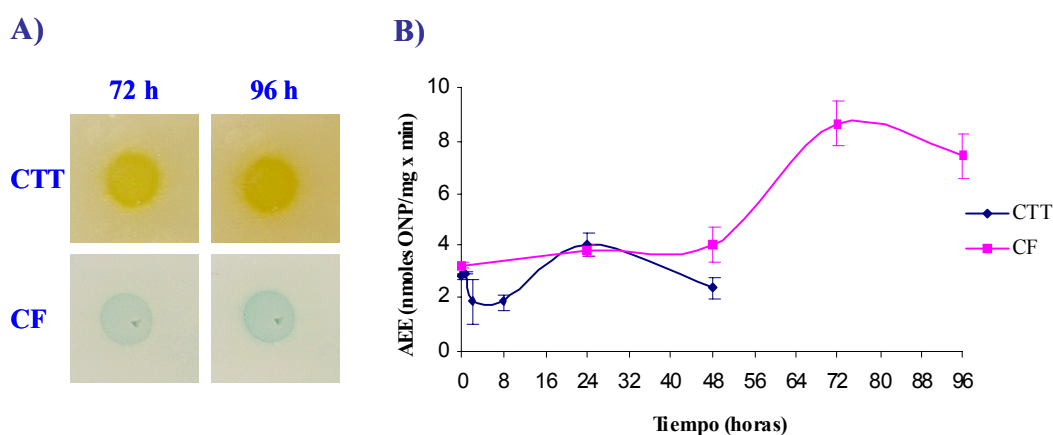
**Figura 69.** Southern blot para la identificación de la cepa portadora de la fusión entre el gen *glnA4* de *M. xanthus* y el gen *lacZ* de *E. coli*. La calle C corresponde al ADN cromosómico de la cepa silvestre DZF1 empleado como control y las calles F a los de las cepas portadoras de la fusión, todos ellos digeridos con *Sma*I. La sonda empleada fue el producto de PCR utilizado para la construcción de la fusión. El tamaño de los fragmentos esperados era de 4.1 kb en el caso de la cepa silvestre y de 3.1 y 10.2 kb en el de la fusión. El tamaño del estándar se muestra en kb.

Una vez obtenida la cepa portadora de la fusión, se pasó a analizar cualitativa y cuantitativamente el momento y nivel de expresión del gen *glnA4*.

El análisis cualitativo de la fusión GlnA4LZ se llevó a cabo durante el crecimiento vegetativo en medio CTT y durante el ciclo de desarrollo en los medios CF, TPM y TM, a los que se había adicionado X-gal. En la Fig. 70A se muestra el resultado obtenido en los medios CTT y CF tras 72 y 96 horas de incubación. Como se puede observar, mediante el empleo de esta técnica no fue posible detectar expresión durante el crecimiento vegetativo. Durante el ciclo de desarrollo, sólo en medio CF fue posible

apreciar una leve expresión tardía (Fig. 70A). En los medios TPM y TM no se detectó expresión (no mostrado).

Para confirmar el resultado anterior y determinar el nivel y momento de expresión del gen de la glutamina sintetasa GlnA4, se procedió al análisis cuantitativo en los medios CTT y CF (Fig. 70B). El perfil de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa portadora de la fusión *glnA4-lacZ* indica que el gen de *M. xanthus* se expresa a niveles muy bajos tanto durante el crecimiento vegetativo como durante el ciclo de desarrollo, de tal manera que, durante el crecimiento vegetativo en medio CTT, la expresión es prácticamente nula (Fig. 70B). Por su parte, durante el ciclo de desarrollo en medio CF, inicialmente los niveles de expresión son muy bajos, similares a los obtenidos durante el crecimiento vegetativo. Sin embargo, a partir de las 48 horas de incubación comienzan a aumentar alcanzando un máximo transcurridas 72 horas. Este nivel máximo se mantiene tras 96 horas de incubación (Fig. 70B).



**Figura 70.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa GlnA4LZ. A) Análisis cualitativo en los medios CTT y CF tras 72 y 96 horas de incubación. B) Análisis cuantitativo en los mismos medios.

#### D.V.9.7.3.1. Inducción de la expresión del gen *glnA4* por CCCP

Para determinar si el gen *glnA4* se induce de la misma forma que el gen *pph2* se procedió a cuantificar la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa portadora de la fusión *glnA4-lacZ* durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo en presencia del desacoplante de la fosforilación oxidativa CCCP, ya que *pph2* se induce en presencia de este compuesto y el mutante  $\Delta pph2$  es sensible a él.

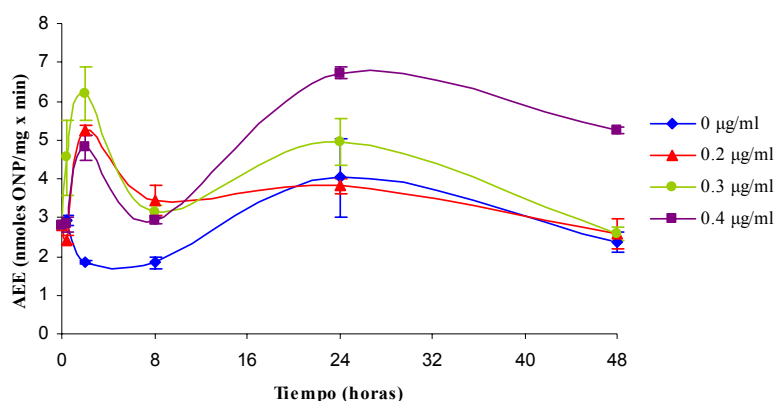
Las condiciones en las cuales se llevaría a cabo el análisis cuantitativo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa desarrollada por la cepa GlnA4LZ se establecieron a partir del análisis cualitativo previo de la mencionada actividad enzimática, durante el crecimiento vegetativo en medio CTT y durante el ciclo de desarrollo en medio CF, en presencia de distintas concentraciones de CCCP, siguiendo las indicaciones descritas en Material y Métodos (C.II.11.2. y C.II.11.3.). De esta forma, la adición del agente CCCP a los medios de cultivo, adicionados a su vez con X-gal, sustrato de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, no reveló inducción aparente de la expresión del gen *glnA4* en ninguna de las condiciones analizadas. Dado que, como se había establecido con anterioridad, los niveles de expresión mostrados por este gen son muy bajos, se procedió a un análisis cuantitativo

## Resultados

que permitiera esclarecer si se producía inducción del gen como consecuencia de la adición de CCCP.

En la Fig. 71 se muestra el perfil de actividad  $\beta$ -galactosidasa desarrollado por la cepa GlnA4LZ durante el crecimiento vegetativo en presencia de CCCP. Como se observa en ella, la adición del compuesto produce la inducción de la expresión del gen *glnA4*. En ausencia de CCCP (línea azul), el gen muestra niveles de expresión muy similares a los comentados anteriormente. Por su parte, la adición de 0.2  $\mu\text{g/ml}$  (línea roja), 0.3  $\mu\text{g/ml}$  (línea verde) o 0.4  $\mu\text{g/ml}$  de CCCP al medio (línea morada), produce un incremento de la expresión que presenta un pico máximo transcurridas 2 horas. Una vez alcanzando este máximo, la expresión de *glnA4* comienza a descender hasta situarse en los niveles mostrados durante el crecimiento vegetativo.

Los niveles de expresión alcanzados por *glnA4* en medio CTT con la adición de CCCP se asemejan a los ofrecidos por este gen durante el ciclo de desarrollo en medio CF (Fig. 70B).



**Figura 71.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa específica desarrollada por la cepa GlnA4LZ de *M. xanthus* durante el crecimiento vegetativo en medio CTT con 0, 0.2, 0.3 y 0.4  $\mu\text{g/ml}$  de CCCP.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa GlnA4LZ también se determinó de manera cuantitativa durante el ciclo de desarrollo en presencia de CCCP. Sin embargo, en este caso no se observó incremento de la expresión del gen *glnA4* debida a la adición del compuesto en ninguna de las concentraciones analizadas (no mostrado).

### D.V.9.7.4. Implicación de GlnA4 en el ciclo de vida de *M. xanthus*

Para determinar la función que GlnA4 desempeña en el ciclo de vida de *M. xanthus* y tratar de relacionarla con la fosfatasa Pph2 con la cual interacciona, se llevó a cabo la construcción de una cepa portadora de una delección sencilla para el gen *glnA4* y de una cepa portadora de una delección doble para los genes de la fosfatasa Pph2 y de la glutamina sintetasa GlnA4.

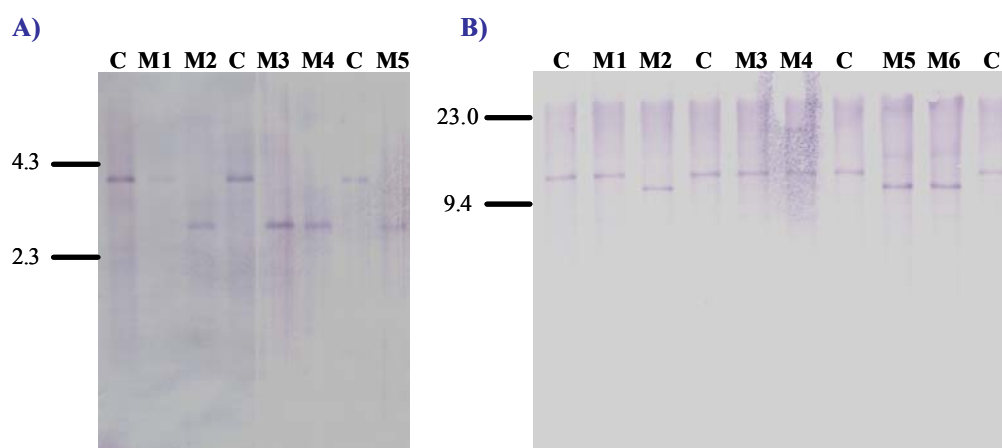
#### D.V.9.7.4.1. OBTENCIÓN DE LOS MUTANTES DE DELECCIÓN PARA EL GEN *glnA4* Y LOS GENES *pph2-glnA4*

La obtención de ambos mutantes de delección se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos (C.II.12.1.).

En primer lugar, se construyó el plásmido portador de la delección del gen *glnA4*. Para ello, utilizando como molde el ADN cromosómico de la cepa silvestre de *M. xanthus* y la pareja de oligonucleótidos 5630Sma-5630Bam (Tabla 6), se amplificó por PCR un fragmento de 800 pb correspondiente a la región situada justo por encima del gen *glnA4* y, de igual forma, empleando los cebadores 5630IFHin-5630IFBam (Tabla 6), se obtuvo otro fragmento del mismo tamaño correspondiente a la secuencia situada inmediatamente por debajo del mismo gen. Ambos productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción apropiadas y se clonaron de forma secuencial en el vector pBJ113, previamente digerido, dando lugar al plásmido pΔGlnA4.

El plásmido pΔGlnA4 contiene la delección en fase del gen *glnA4* en la que el 96% de dicho gen se encuentra sustituido por la secuencia de un sitio de restricción para mantener la pauta de lectura y evitar el efecto polar. La porción del gen delecionada incluye la región codificante del domino catalítico de la proteína GlnA4, necesario para la actividad de la enzima.

pΔGlnA4 se empleó para la construcción del mutante de delección sencillo para el gen *glnA4*, utilizando como fondo genético la cepa silvestre DZF1 de *M. xanthus* y para la construcción del mutante doble Δ*pph2*Δ*glnA4*, empleando en este caso la cepa mutante Δ*pph2*. Ambas cepas fueron electroporadas con el plásmido pΔGlnA4 y se seleccionaron como presuntos intermediarios merodiploides, que fueron analizados mediante Southern blot para confirmar su identidad (no mostrado).



**Figura 72.** A) Southern blot para la identificación del mutante de delección para el gen *glnA4*. Las calles C corresponden al cromosoma de la cepa silvestre DZF1 utilizada como control y las calles M al de las colonias recombinantes. La enzima de restricción empleada fue *Sma*I y el tamaño de los fragmentos esperados, empleando el fragmento amplificado por encima del gen *glnA4* como sonda, era de 4.1 kb en el silvestre y de 2.6 kb en el mutante. B) Southern blot para la identificación del mutante de delección doble para los genes *pph2* y *glnA4*. Las calles C corresponden al cromosoma de la cepa Δ*pph2* utilizada como control y las calles M al de las colonias recombinantes. La enzima de restricción empleada fue *Eco*RI, la sonda el fragmento

## Resultados

amplificado por debajo del gen *glnA4* y el tamaño de los fragmentos esperados era de 11.9 kb en el caso del control y de 10.4 kb en el de los mutantes. El tamaño del estándar se muestra en kb.

A partir del intermediario se obtuvieron colonias sensibles a kanamicina que se analizaron mediante Southern blot. En el caso del mutante de delección sencillo, 4 de las 5 colonias analizadas resultaron ser mutantes (Fig. 72A), mientras que para el mutante doble sólo lo fueron 3 de las 6 colonias analizadas (Fig. 72B). La cepa mutante que carecía del gen *glnA4* únicamente o la que carecía de los genes *pph2* y *glnA4* se denominaron  $\Delta glnA4$  y  $\Delta pph2\Delta glnA4$ , respectivamente.

### D.V.9.7.4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES $\Delta glnA4$ Y $\Delta pph2\Delta glnA4$

#### D.V.9.7.4.2.1. Crecimiento vegetativo

Mediante la realización de una curva de crecimiento en medio CTT líquido de la cepa silvestre DZF1 y de los mutantes de delección  $\Delta glnA4$  y  $\Delta pph2\Delta glnA4$ , de acuerdo con el procedimiento descrito en Material y Métodos (C.II.12.2.1.), se determinó que la carencia de la glutamina sintetasa GlnA4, así como de GlnA4 junto con la fosfatasa Pph2, no parece afectar al crecimiento vegetativo en medio líquido de *M. xanthus* (no mostrado).

De un modo similar, la delección del gen *glnA4* por sí sola, o junto con la delección del gen *pph2*, tampoco tiene influencia sobre la movilidad social y aventurera del enjambre de las cepas mutantes comparadas con la cepa DZF1, según indicó el análisis del crecimiento vegetativo en medio sólido (no mostrado).

#### D.V.9.7.4.2.2. Ciclo de desarrollo

La relación que la glutamina sintetasa GlnA4 presenta con los distintos eventos que suceden durante el ciclo de desarrollo de *M. xanthus* se analizó mediante el estudio del fenotipo exhibido por la cepa mutante  $\Delta glnA4$  y por el mutante doble  $\Delta pph2\Delta glnA4$  en el transcurso del mismo siguiendo las indicaciones descritas en Material y Métodos (C.II.12.2.3., C.II.12.2.4. y C.II.12.2.5.).

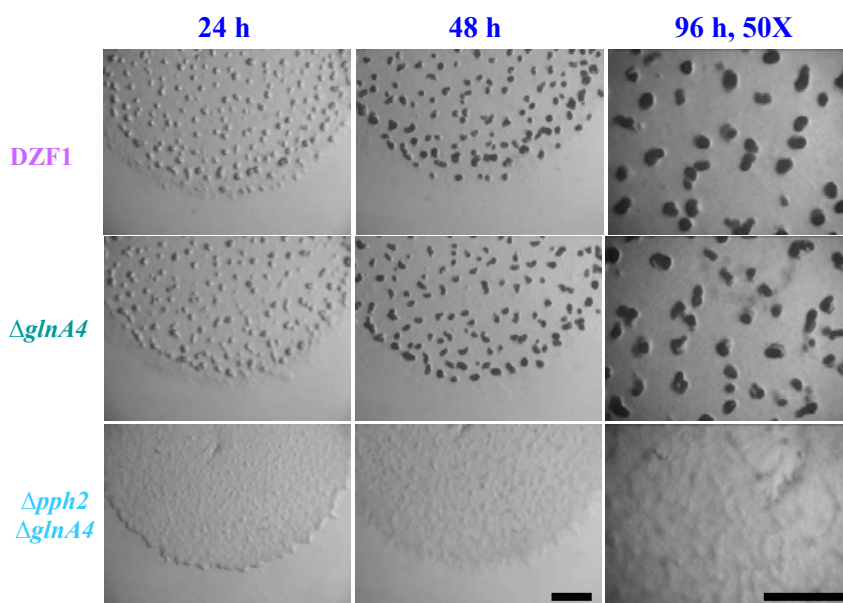
#### Fenotipo durante el ciclo de desarrollo

Las características fenotípicas mostradas por la cepa silvestre DZF1 durante el ciclo de desarrollo en los medios CF y TPM fueron utilizadas como referencia de esta etapa del ciclo de vida de los mutantes de delección  $\Delta glnA4$  y  $\Delta pph2\Delta glnA4$ .

Los cuerpos fructificantes originados en medio CF por la cepa silvestre DZF1 y los mutantes de delección  $\Delta glnA4$  y  $\Delta pph2\Delta glnA4$  se muestran en la Fig. 73. El mutante carente de la glutamina sintetasa GlnA4 muestra un fenotipo muy similar al presentado por la cepa silvestre, mientras que el mutante doble para *glnA4* y *pph2* presenta un retraso muy acusado en la formación de cuerpos fructificantes durante el ciclo de desarrollo.

En este sentido, tras 24 horas de incubación, el mutante  $\Delta glnA4$  origina agregados definidos aunque todavía poco compactos, al igual que la cepa silvestre, mientras que el mutante doble  $\Delta pph2\Delta glnA4$  no muestra, prácticamente, signos de agregación. A medida

que avanza el desarrollo, transcurridas 48 horas del mismo, se observan cuerpos fructificantes maduros, opacos y bien formados en las muestras correspondientes al mutante sencillo y al silvestre, a diferencia del mutante doble que únicamente presenta modestos indicios de agregación. Tras 96 horas de incubación, el silvestre y el mutante  $\Delta glnA4$  muestran formaciones macroscópicas completamente maduras y opacas. Sin embargo, transcurrido ese mismo periodo de incubación, el mutante doble no progresa en la formación de cuerpos fructificantes y sólo presenta agrupaciones inmaduras, completamente traslúcidas y laxas (Fig. 73).



**Figura 73.** Análisis fenotípico en medio CF a partir de cultivos concentrados a  $DO_{600}$  inicial de 15, tras 24 y 48 horas a 25X y tras 96 horas a 50X, de las cepas silvestre DZF1 y mutantes  $\Delta glnA4$  y  $\Delta pph2\Delta glnA4$  de *M. xanthus*. La barra representa 1 mm.

Del mismo modo, los cuerpos fructificantes producidos por los mutantes  $\Delta glnA4$  y  $\Delta pph2\Delta glnA4$  en medio TPM son muy parecidos a los originados en medio CF (no mostrado).

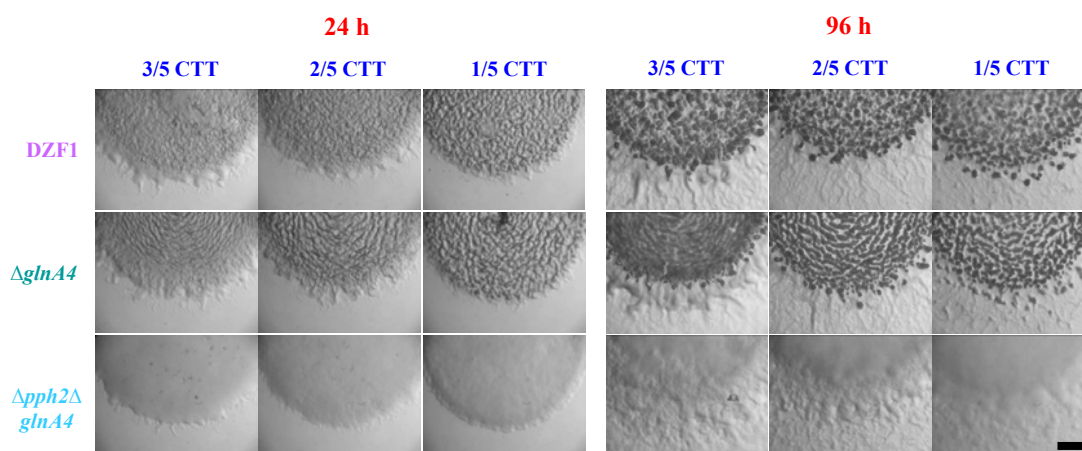
Para confirmar estos resultados se procedió a analizar el fenotipo de estas bacterias en un medio donde el ciclo de desarrollo transcurriera más lentamente que en el medio CF como consecuencia de su contenido nutricional más elevado. Para ello, se utilizaron las variantes 3/5 CTT, 2/5 CTT y 1/5 CTT con cantidades decrecientes de Bacto-casitona y se estableció una  $DO_{600}$  de partida de 60 para cada una de las cepas analizadas.

En este caso, se observó que el mutante  $\Delta glnA4$  empieza a formar agregados en el medio 3/5 CTT (Fig. 74) tras 24 horas de incubación, mientras que la cepa silvestre sólo muestra agrupaciones incipientes. Un resultado equivalente se aprecia en el medio 2/5 CTT (Fig. 74), mientras que en el medio 1/5 CTT no se observaron diferencias entre las cepas. Sin embargo, el mutante doble  $\Delta pph2\Delta glnA4$  permanece completamente plano en los tres medios analizados, mostrando un retraso mucho más marcado que en los medios inductores del desarrollo comentados anteriormente. Transcurridas 48 horas de incubación en estos medios, los cuerpos fructificantes mostrados por el mutante sencillo son similares a los originados por la cepa DZF1, mientras que el mutante doble



## Resultados

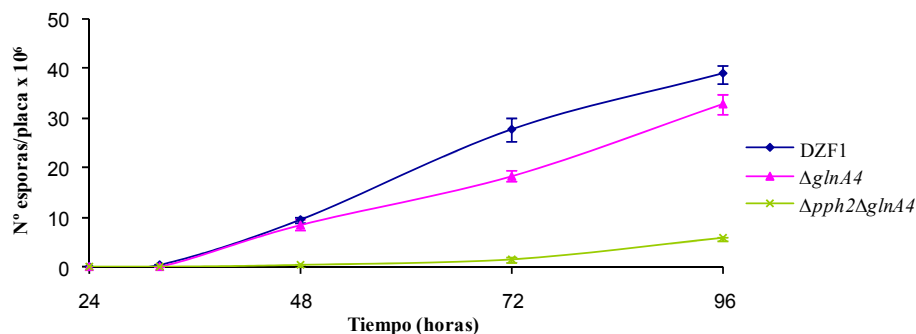
permanece sin presentar indicios de agregación. El retraso en la formación de cuerpos fructificantes mostrado por la cepa  $\Delta pph2\Delta glnA4$  se mantiene incluso tras 96 horas de incubación, momento en el que permanece completamente plano (Fig. 74).



**Figura 74.** Análisis fenotípico de las cepas silvestre DZF1 y mutantes  $\Delta glnA4$  y  $\Delta pph2\Delta glnA4$  de *M. xanthus* en medio CTT con cantidades decrecientes de Bacto-casitona tras 24 y 96 horas de incubación a partir de cultivos con  $DO_{600}$  inicial de 60. La barra representa 1 mm.

## Esporulación

Para determinar el efecto que la delección sencilla del gen *glnA4* y la delección conjunta de los genes *pph2* y *glnA4* tiene sobre el proceso de esporulación en *M. xanthus*, se efectuó el recuento de las mixósporas producidas por las dos cepas mutantes, así como de la cepa silvestre DZF1 en medio CF.



**Figura 75.** Recuento de esporas producidas por la cepa silvestre DZF1 y los mutantes de delección  $\Delta glnA4$  y  $\Delta pph2\Delta glnA4$  de *M. xanthus* en medio CF.

El resultado obtenido indica que el mutante sencillo, carente de *glnA4*, produce un número de esporas muy similar al de la cepa silvestre, mostrando ciertas diferencias tras 72 horas de incubación, momento en el que la cepa DZF1 produce  $2.8 \times 10^7$  mixósporas/placa frente a  $1.8 \times 10^7$  mixósporas/placa originadas por el mutante sencillo (Fig. 75). Sin embargo, existen diferencias considerables en la producción de estructuras de resistencia entre la cepa silvestre y el mutante doble  $\Delta pph2\Delta glnA4$ . Así, mientras que la cepa silvestre genera esporas tras 32 horas de incubación en medio CF, el mutante doble no lo hace y permanece sin producirlas hasta incluso después de haber transcurrido

72 horas. Tras 96 horas, el mutante doble produce tan solo  $5.8 \times 10^6$  mixósporas/placa, frente a  $3.9 \times 10^7$  mixósporas/placa contadas en la cepa silvestre (Fig. 75). Estas diferencias son reflejo del acusado retraso mostrado por el mutante  $\Delta pph2\Delta glnA4$  durante el ciclo de desarrollo.

### Germinación

A partir de las muestras de mixósporas utilizadas para efectuar los recuentos se analizó la capacidad de germinación de las células de resistencia en presencia de nutrientes. El recuento del número de colonias generadas por cada bacteria a partir de las muestras de mixósporas indica la existencia de diferencias en la viabilidad de las mixósporas de la cepa silvestre y los mutantes  $\Delta glnA4$  y  $\Delta pph2\Delta glnA4$ , ya que la eficiencia de germinación de la cepa silvestre es del 7.5% frente al 1.2% mostrado por la cepa carente de *glnA4* y el 3.0% ofrecido por la cepa carente de *glnA4* y *pph2*.

### **D.V.9.7.5. Actividad de GlnA4 y efecto de Pph2 sobre ella**

Para determinar la influencia que la fosfatasa Pph2 pudiera tener sobre la actividad de GlnA4 se determinó en primer lugar la actividad de la proteína GlnA4. Una vez establecida, el siguiente paso consistió en estudiar si esa actividad variaba cuando GlnA4 fuese incubada con extractos procedentes de *M. xanthus* y, posteriormente, cuando se adicionara Pph2. Para ello, fue necesaria la sobreexpresión de *glnA4* y la posterior purificación de la proteína recombinante, puesto que ya se contaba con la proteína Pph2 obtenida como se ha descrito anteriormente en el apartado D.V.8.3.

#### D.V.9.7.5.1. Clonación de *glnA4* en el vector pET-200/D-TOPO y sobreexpresión de la proteína recombinante en *E. coli*

Para expresar *glnA4* en *E. coli* se utilizó el mismo vector que en el caso de la expresión de *pph2*, el vector pET-200/D-TOPO de Invitrogen. Mediante el uso de este vector, la proteína recombinante producida se obtiene con una cola de 6 residuos de histidina fusionada en el extremo N-terminal.

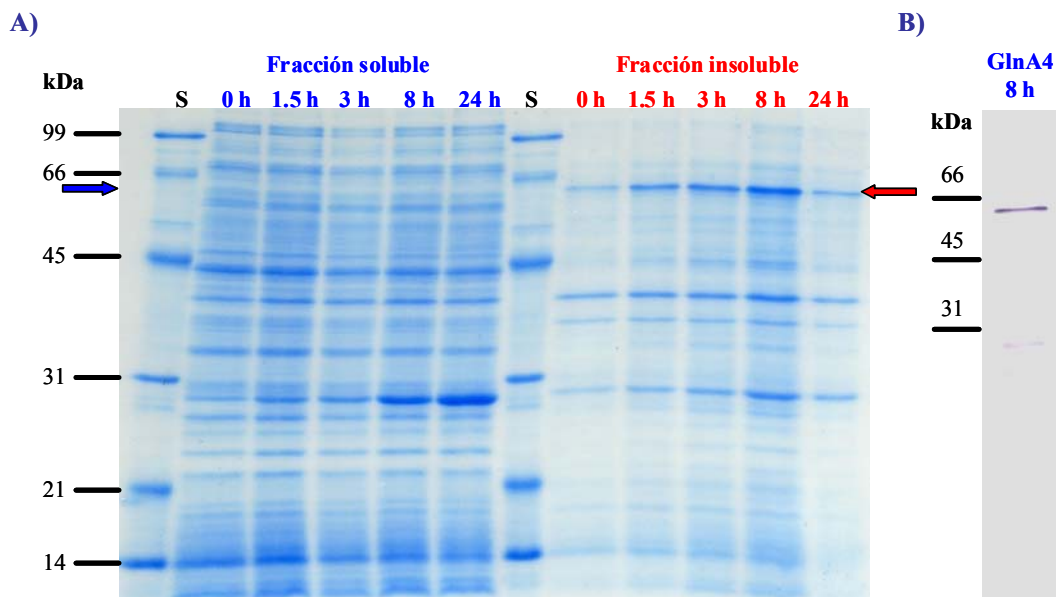
Por tanto, la secuencia codificante del gen *glnA4* se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos pETTopo2-GlnNF y pETTopo2-GlnR (Tabla 8) y como molde el cromosoma de la cepa silvestre de *M. xanthus*, y se clonó en el vector pET-200/D-TOPO. El plásmido resultante se denominó pETTOPO200-GlnA4.

Posteriormente, se transformó la cepa de *E. coli* BL21(DE3)Star con el plásmido pETTOPO200-GlnA4 y se determinaron las condiciones óptimas de inducción para conseguir la mayor concentración de proteína recombinante en la fracción soluble. Para ello, se analizaron distintas condiciones de temperatura y se tomaron muestras a lo largo del tiempo. Los extractos se prepararon como se indica en Material y Métodos (C.II.8.2.2.) y fueron analizados mediante SDS-PAGE. La Fig. 76A muestra el resultado de una de estas inducciones realizada a 15°C. Como se aprecia, casi la totalidad de la proteína recombinante aparece en la fracción insoluble formando parte de cuerpos de inclusión. Para determinar la presencia de proteína recombinante en la fracción soluble, se tomó la muestra de la misma obtenida tras 8 horas de inducción a 15°C y se realizó un Western blot empleando un anticuerpo específico frente a la cola de histidinas N-terminal de GlnA4 siguiendo el protocolo descrito en Material y

## Resultados

Métodos (C.II.8.3.). Como se observa en la Fig. 76B, existe una pequeña cantidad de GlnA4 recombinante en la muestra correspondiente a la fracción soluble.

Por ello, se estableció que la purificación de GlnA4 recombinante se realizara a partir de muestras correspondientes a la fracción soluble obtenida tras 8 horas de inducción a 15°C.



**Figura 76.** A) Producción de la proteína recombinante GlnA4 a 15°C. Muestras correspondientes a la fracción soluble e insoluble tras 0, 1.5, 3, 8 y 24 horas de inducción. S: marcadores de peso molecular (kDa). B) Western blot de la muestra correspondiente a la fracción soluble tomada tras 8 horas de inducción a 15°C. GlnA4 presenta un peso molecular estimado de 56 kDa.

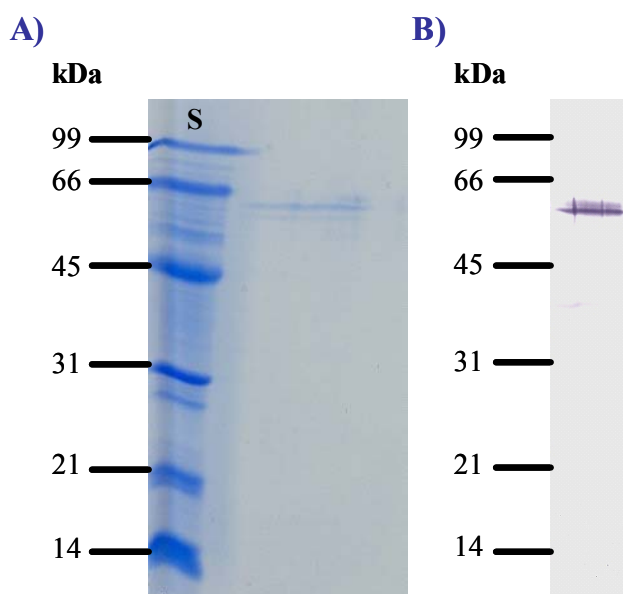
### D.V.9.7.5.2. Purificación de GlnA4

Dada la pequeña cantidad de GlnA4 presente en la fracción soluble, la purificación de la proteína recombinante requirió un volumen de muestra considerable, por lo que se realizó una inducción a gran escala en las condiciones previamente establecidas, empleando 10 litros de cultivo de *E. coli* BL21(DE3)Star transformado con el plásmido pETTOPO200-GlnA4 crecido a 15°C e inducido con IPTG durante 8 horas.

La purificación de la proteína GlnA4 se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad siguiendo las indicaciones desarrolladas en Material y Métodos (C.II.8.2.3.).

Los 10 litros de cultivo inducido utilizados para la purificación de GlnA4 fueron divididos en varios lotes para su tratamiento. Las fracciones solubles 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 con respecto al extracto bruto, lo que posibilita su detección mediante electroforesis SDS-PAGE. En la Fig. 77A se muestra el resultado de la purificación tras concentrar la muestra para eliminar el imidazol presente en la misma.

Para comprobar que la proteína purificada correspondía con la glutamina sintetasa GlnA4 recombinante, se realizó un Western blot empleando un anticuerpo específico frente a la cola de histidinas N-terminal portada por GlnA4 siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos (C.II.8.3.). En la Fig. 77B se muestra el revelado de la membrana con la muestra procedente de la purificación y posteriormente concentrada. Como se aprecia, la proteína purificada se identifica con GlnA4 recombinante ya que presenta el mismo tamaño que la proteína detectada en los geles SDS-PAGE y posee el peso molecular estimado esperado.



**Figura 77.** Purificación de la proteína recombinante GlnA4 de *M. xanthus*. S: Marcadores de peso molecular (kDa) A) Análisis mediante SDS-PAGE. B) Confirmación mediante Western blot.

#### D.V.9.7.5.3. Determinación de la actividad de GlnA4

En primer lugar, se trató de determinar si GlnA4 de *M. xanthus* posee actividad glutamina sintetasa ya que tiene el dominio catalítico propio de estas enzimas. La determinación de la actividad glutamina sintetasa se puede llevar a cabo a partir de tres reacciones, entre ellas la reacción de transferencia. Esta reacción consiste en la producción de  $\gamma$ -glutamyl hidroxamato y amonio a partir de glutamina e hidroxilamina en presencia de ADP y arseniato potásico. Por ello, se procedió a medir la actividad glutamina sintetasa de GlnA4 mediante el método de transferencia siguiendo las indicaciones descritas por Shapiro y Stadtman (1970).

En este ensayo se puso en contacto la proteína recombinante GlnA4 con la mezcla de reacción, que poseía todos los componentes necesarios para llevar a cabo la reacción en concentraciones adecuadas, y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, la reacción se detuvo mediante la adición de solución de parada (C.I.3.). Finalmente, se determinó espectrofotométricamente la concentración de  $\gamma$ -glutamyl hidroxamato producido por comparación con una curva estándar de  $\gamma$ -glutamyl hidroxamato. Siguiendo este procedimiento, se determinó una actividad enzimática específica de GlnA4 de  $33.33 \pm 1.23$  nanomoles de hidroxamato/mg por min.

## Resultados

En segundo lugar, dado que GlnA4 de *M. xanthus* muestra una elevada homología con la proteína IpuC de *Pseudomonas* KIE171, proteína de tipo GlnA que posee actividad  $\gamma$ -glutamil isopropilamida sintetasa (de Azevedo *et al.*, 2002), se procedió a determinar si GlnA4 de *M. xanthus* también presentaba esta actividad. Para ellos, se empleó el método de biosíntesis, mediante el cual la enzima produce glutamina y libera ADP y fosfato inorgánico, a partir de glutamato y amonio, en presencia de iones manganeso y de ATP. En este caso, se sustituyó el amonio por isopropilamina como sustrato y se añadió NaCl siguiendo las recomendaciones descritas por de Azevedo *et al.*, (2002) y detallado en Material y Métodos (C.II.8.7.2.). En este caso, la actividad mostrada por GlnA4 de *M. xanthus* fue de  $560.5 \pm 140.7$  nmoles Pi por mililitro de reacción.

### D.V.9.7.5.4. Demostración de la interacción Pph2-GlnA4

Una vez determinada la actividad de GlnA4 recombinante, se utilizó el método de biosíntesis, empleando isopropilamina como sustrato, para establecer en qué medida la actividad fosfatasa de Pph2 podía modificar la actividad mostrada por GlnA4 y, de esta manera, poder demostrar que la fosfatasa Pph2 interacciona con la glutamina sintetasa GlnA4.

Para ello, en primer lugar se determinó la actividad glutamina sintetasa de cuatro muestras empleadas como controles que se adicionaron a GlnA4 para determinar su actividad:

- Esporas  $\Delta pph2$ : corresponde a un extracto de esporas procedente del mutante  $\Delta pph2$  que carece de la fosfatasa Pph2. Este extracto se utilizó para fosforilar a GlnA4, dado que en el mismo debe estar presente la proteína quinasa de *M. xanthus* que fosforile a GlnA4. Si Pph2 es la fosfatasa que origina la desfosforilación de GlnA4, la ausencia de Pph2 en el extracto de  $\Delta pph2$  tendría como consecuencia que GlnA4 permanezca fosforilada.
- GlnA4 inactivada: se trata de GlnA4 inactivada tras su incubación a 100°C durante 10 minutos.
- GlnA4 inactivada + esporas  $\Delta pph2$ : corresponde a GlnA4 inactivada y sometida a fosforilación por el extracto de esporas procedente del mutante  $\Delta pph2$ .
- Pph2: es la fosfatasa Pph2 recombinante purificada. Se empleó para desfosforilar a GlnA4.

Por otro lado, siguiendo el mismo procedimiento, se determinó la actividad glutamina sintetasa de GlnA4 sola o en combinación con una o dos de las muestras anteriores:

- GlnA4: corresponde a la proteína GlnA4 recombinante purificada.
- GlnA4 + Pph2: se trata de GlnA4 recombinante purificada junto con Pph2 recombinante purificada. Con esta combinación se pretendía determinar si, en caso de haber sido GlnA4 fosforilada por *E. coli*, en presencia de Pph2 se producía su desfosforilación.
- GlnA4 + esporas  $\Delta pph2$ : con esta muestra se determinó la actividad de GlnA4 tras ser sometida a fosforilación por el extracto de esporas procedente del mutante  $\Delta pph2$ .
- GlnA4 + esporas  $\Delta pph2$  + Pph2: mediante esta combinación se estableció la actividad de GlnA4 tras ser sometida, primero a un proceso de fosforilación por el

extracto de esporas del mutante  $\Delta pph2$  y, posteriormente, a desfosforilación por la fosfatasa Pph2.

Los tampones utilizados para medir la actividad glutamina sintetasa por el método de biosíntesis incluyen iones manganeso y ATP necesarios para el proceso de fosforilación y la desfosforilación posterior por parte de Pph2. Por tanto, no fue necesaria la incorporación de ningún componente adicional a la mezcla de reacción. En la Fig. 78 se muestra la actividad, medida en nanomoles de fosfato inorgánico liberado por mililitro de reacción, de las muestras analizadas.

Los resultados obtenidos demuestran la interacción de la fosfatasa Pph2 con la glutamina sintetasa GlnA4. Como se observa en las primeras cuatro columnas de la Fig. 78, el extracto proteico de las esporas procedentes del mutante  $\Delta pph2$ , GlnA4 inactivada, GlnA4 inactivada fosforilada por el extracto de esporas de  $\Delta pph2$ , así como la fosfatasa Pph2, producen una escasa liberación de fosfato inorgánico atribuible a liberación espontánea a partir de los componentes constituyentes de las muestras analizadas.

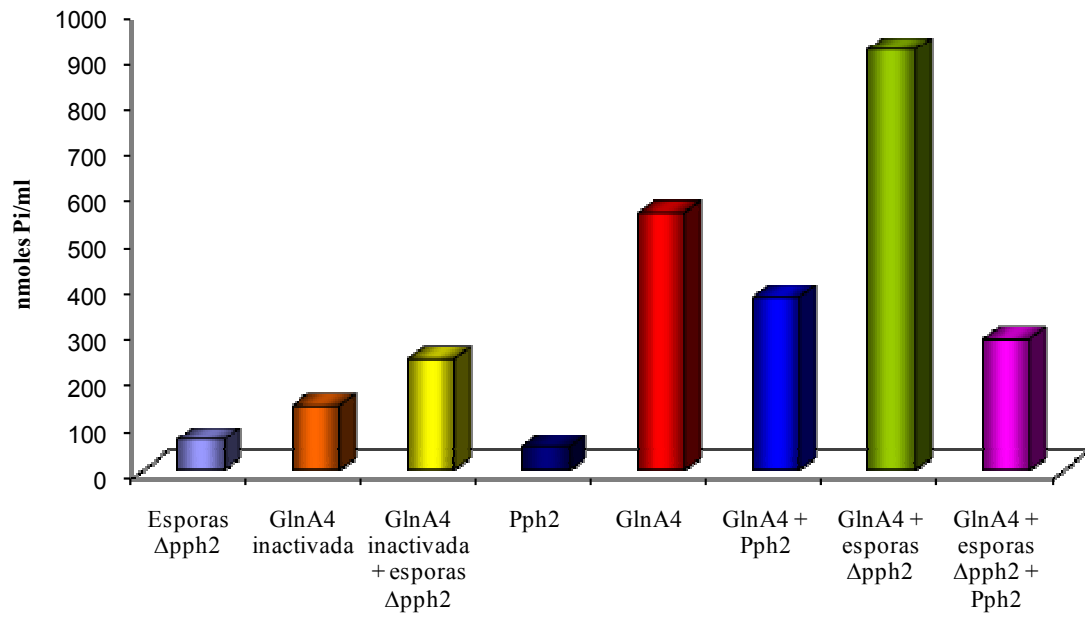
Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, la glutamina sintetasa GlnA4 presenta una actividad de  $560.5 \pm 140.7$  nmoles Pi/ml (columna roja, Fig.78). No obstante, al añadir Pph2, la actividad disminuye a  $378.0 \pm 123.6$  nmoles Pi/ml (columna azul, Fig. 78).

Sin embargo, la mayor actividad determinada para GlnA4 se obtiene cuando se somete la proteína a fosforilación por parte del extracto de esporas procedentes del mutante  $\Delta pph2$ . En este caso, la proteína GlnA4, como se observa en la columna verde de la Fig. 78, muestra un notable incremento en su actividad, alcanzando un valor de  $915.5 \pm 101.1$  nmoles Pi/ml.

Finalmente, se procedió a determinar la actividad de GlnA4 sometida, en primer lugar, a fosforilación por el extracto de esporas de  $\Delta pph2$  y, posteriormente, a desfosforilación por Pph2. Lo que cabía esperar es que si Pph2 interacciona con GlnA4, la fosfatasa desfosforile a GlnA4 fosforilada por el extracto de esporas y GlnA4 muestre la actividad inicial. El resultado obtenido en este caso, como se observa en la columna rosa de la Fig. 78, coincide con lo esperado, es decir, una disminución importante de la actividad, alcanzando un nivel de  $285.0 \pm 14.1$  nmoles Pi/ml, muy similar al mostrado por el control correspondiente a la proteína GlnA4 inactivada por calor y fosforilada por el extracto de esporas del mutante  $\Delta pph2$  de *M. xanthus*.

Por tanto, los resultados obtenidos confirman la interacción proteica entre la fosfatasa Pph2 y la glutamina sintetasa GlnA4 de *M. xanthus* detectada mediante el sistema del doble híbrido de levadura.

## Resultados



**Figura 78.** Actividad glutamina sintetasa determinada mediante el método de biosíntesis empleando isopropilamina como sustrato. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C durante 15 minutos utilizando 200 ng de proteína en todos los casos.

## **E. DISCUSIÓN**





Como se ha comentado en la Introducción, las mixobacterias son microorganismos del suelo que hacen frente a cambios medioambientales de su entorno de tal modo que, en presencia de nutrientes, llevan a cabo un ciclo de vida vegetativo mientras que cuando los recursos nutritivos se agotan, inician un ciclo de desarrollo en el cual experimentan cambios fisiológicos y morfológicos que culminan con la formación de cuerpos fructificantes constituidos por un elevado número de mixósporas. Cuando las condiciones nutricionales vuelven a ser favorables, las mixósporas germinan de forma conjunta originando la aparición de un nuevo enjambre constituido por células que crecen vegetativamente y se nutren de modo cooperativo (Goldman, 2006).

Las células deben detectar tanto el agotamiento de nutrientes como las señales emitidas por otras mixobacterias para que el ciclo de desarrollo tenga lugar de una manera coordinada. En procariontes, las rutas de señalización predominantes son aquellas en las que intervienen los sistemas reguladores de dos componentes (Kim y Forst, 2001), mientras que el contenido en quinasas de tipo eucariota suele ser minoritario. Sin embargo, las mixobacterias poseen un elevado número de Ser/Thr y Tyr quinasas, próximo al contenido en histidina quinasas típicas de los sistemas reguladores de dos componentes (99 quinasas frente a 133 histidina quinasas en *M. xanthus*) o superándolo (Inouye *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2008; Whitworth y Cock, 2008), lo que representa una situación única entre los procariontes. Este resultado revela que en mixobacterias las rutas de señalización basadas en quinasas de tipo eucariota han de constituir un mecanismo de considerable relevancia para la señalización celular.

En *M. xanthus* se han caracterizado diversos sistemas reguladores de dos componentes implicados en la transducción de diferentes señales a lo largo del ciclo de desarrollo (Kuspa *et al.*, 1992a; Kuspa *et al.*, 1992b; Plamann *et al.*, 1992; Bonner y Shimkets, 2001), así como en el control del movimiento quimiotáctico de este microorganismo (Zusman, 1982; Blackhart y Zusman, 1985a; Blackhart y Zusman, 1985b; Yang *et al.*, 1998). Además, en esta mixobacteria también se han descrito quinasas de tipo eucariota implicadas en la regulación de procesos que requieren mecanismos de transducción de señales más elaborados como es el caso de los distintos eventos que conforman el ciclo de desarrollo (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991; Udo *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996a; Hanlon *et al.*, 1997; Cho y Zusman, 1999b; Thomasson *et al.*, 2002; Nariya e Inouye, 2003; Nariya e Inouye, 2005; Nariya e Inouye, 2006; Stein *et al.*, 2006). De hecho, las cascadas de quinasas 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 reguladores de dos componentes (Cashin *et al.*, 2006).

Para que las proteínas diana reguladas por estas rutas de transducción de señales retornen a su estado inicial y resulten nuevamente funcionales, tiene lugar la actuación de proteínas con actividad fosfatasa que revierten la acción ejercida por las quinasas. Las proteínas fosfatasa han sido objeto de estudio de este trabajo de investigación ya que no han sido extensamente caracterizadas en las mixobacterias, habiéndose descrito hasta el momento una única fosfatasa de tipo eucariota en *M. xanthus*, denominada Pph1 (Treuner-Lange *et al.*, 2001).

## E.I. Proteínas fosfatasa presentes en *M. xanthus*

El análisis del genoma de *M. xanthus* revela la presencia de 34 genes que cifran proteínas fosfatasa, muy por encima de la cantidad de proteínas de este tipo presentes en la mayoría de los procariotas, que poseen un número reducido y, a veces, tan sólo una o dos (Shi *et al.*, 1998), a excepción de los microorganismos que llevan a cabo un ciclo de desarrollo, los cuales poseen un número más elevado de fosfatasas (Zhang y Shi, 2004).

Entre las 34 fosfatasas codificadas por *M. xanthus* se incluyen representantes pertenecientes a las 3 superfamilias de fosfatasas, como ocurre en prácticamente todos los organismos eucariotas estudiados hasta el momento y, a diferencia de la mayoría de procariotas (Shi *et al.*, 1998). El número total de genes que codifican proteínas fosfatasas en *M. xanthus* corresponde, aproximadamente, a un tercio de los que cifran quinasas (99) (Pérez *et al.*, 2008). El hecho de que el número de fosfatasas sea notablemente inferior al de quinasas es debido, posiblemente, a la capacidad que poseen las fosfatasas de actuar sobre diferentes sustratos, por lo que es probable que una misma fosfatasa interactúe con diferentes quinasas en mixobacterias, al igual que se ha descrito en otras bacterias (Sharma *et al.*, 2006).

Como se ha comentado en los resultados, *M. xanthus* posee 25 genes que codifican fosfatasas pertenecientes a la superfamilia PPP. Si todos estos genes realmente codifican fosfatasas, *M. xanthus* sería la bacteria con el mayor número de proteínas de este tipo identificada hasta el momento. En este sentido, considerando la densidad de genes, expresado como número de genes por megabase de genoma, *M. xanthus* muestra la mayor densidad de todos los organismos vivos, procariotas y eucariotas. Sin embargo, esta mixobacteria posee un número extremadamente bajo de fosfatasas de tipo SpoIIE, si se compara con otras bacterias que llevan a cabo un ciclo de desarrollo, tales como *B. subtilis*, (Duncan *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996; Vijay *et al.*, 2000), *S. coelicolor* o *S. avermitilis* que poseen 4, 48 y 47 genes de este tipo, respectivamente (Zhang y Shi, 2004). Además, las fosfatasas de tipo PP2C no están presentes en todos los genomas que se han secuenciado. Las bacterias que sí las poseen tienen de una a tres fosfatasas de esta familia mientras que sólo *Anabaena* sp PCC7120 (Kaneko *et al.*, 2001) y *M. xanthus* poseen 4. Por otro lado, *M. xanthus* posee sólo un gen que codifica una tirosina fosfatasa de bajo peso molecular, pero su similitud con una proteína que confiere resistencia a arseniato (Bennett *et al.*, 2001) hace que se cuestione su capacidad para actuar como tirosina fosfatasa.

Con frecuencia, los genes que codifican fosfatasas se localizan cerca de genes que cifran quinasas. Esto ocurre, sobre todo, en el caso de los genes que codifican tirosina fosfatasas y tirosina quinasas, lo que sugiere una expresión coordinada de estos genes y, en consecuencia, la producción regulada de las correspondientes enzimas. Esta proximidad es bastante frecuente en bacterias Gram negativas, mientras que en bacterias Gram positivas los genes que codifican estas enzimas también están situados uno al lado del otro, pero la actividad tirosina quinasa requiere del producto de dos genes sucesivos (Cozzone *et al.*, 2004). En el caso de *M. xanthus*, de los 34 genes que codifican fosfatasas sólo 4 de ellos parecen formar parte del mismo operón que genes que cifran quinasas, mientras que en un caso los genes que cifran las proteínas quinasa y fosfatasa se encuentran separados por un gen y localizados en sentido de transcripción opuesto. Debido a la especificidad de fosforilación preferente sobre residuos de serina y/o treonina de las quinasas de mixobacterias, tan sólo se han identificado Ser/Thr fosfatasas

asociadas a quinasas, de las cuales 4 pertenecen a la superfamilia PPP (MXAN0267, MXAN0555, MXAN6543 y MXAN7163) y 1 a la superfamilia PPM (MXAN4562).

La quinta parte de las proteínas fosfatasa de *M. xanthus* (7 de 34) se localizan ancladas en la membrana, lo que permite a la bacteria detectar las condiciones del entorno y regular la actividad de rutas de señalización intracelulares de tipo eucariota en respuesta al estímulo recibido. Para ello, estas proteínas se disponen a modo de receptor de membrana, con un dominio sensor extracelular capaz de regular la actividad fosfatasa del dominio catalítico intracelular en respuesta a un estímulo adecuado, al igual que ocurre en las tirosina fosfatasas receptoras de eucariotas (Meng *et al.*, 2000). Esta topología en la membrana implica que estas proteínas podrían detectar estímulos y funcionar como el primer componente en las rutas de transducción de señales en las que participan.

El análisis de la secuencia proteica de las fosfatasas de *M. xanthus* ha permitido determinar que la presencia de motivos funcionales adicionales al motivo fosfatasa no es muy frecuente, ya que sólo tres de ellas poseen arquitectura multidominio. En este sentido, la fosfatasa MXAN4398, perteneciente a la superfamilia PPM, presenta el dominio NMPc lo que indica que esta proteína participa en una ruta de transducción de señales donde están implicados adenilato/guanilato ciclasas respondiendo a nucleótidos cíclicos (Yau, 1994). Por otro lado, la fosfatasa MXAN4562, perteneciente a la misma superfamilia, posee el dominio HAMP, típico de proteínas sensoras y quimiotácticas de bacterias e histidina quinasas de eucariotas que participan en la transducción de señales junto con sistemas reguladores de dos componentes (Aravind y Ponting, 1999). Esta organización también aparece en la fosfatasa IcfG de *Synechocystis*, donde esta proteína está implicada en la regulación del metabolismo del carbono y en la modulación de la disponibilidad del factor sigma responsable de la remodelación del metabolismo del crecimiento heterótrofo (Beuf *et al.*, 1994). Por su parte, sólo una fosfatasa perteneciente a la superfamilia PPP posee un dominio EspF, que en *E. coli* está implicado en la inducción de la apoptosis celular del hospedador y posee una secuencia rica en prolina que favorece la interacción proteína-proteína (MXAN4207). Los dominios adicionales al dominio fosfatasa facilitan la formación de redes de señalización, características de organismos eucariotas, donde se interconectan diferentes vías de transducción de señales para la integración de las señales detectadas.

El análisis del patrón de expresión de genes de *M. xanthus* codificantes de proteínas pertenecientes a 3 superfamilias de fosfatasas pone de manifiesto la implicación de estas proteínas en el ciclo de vida de *M. xanthus*. En este sentido, 3 de los 5 genes considerados, correspondientes a MXAN0448, MXAN4562 y MXAN4779, se expresan en las condiciones analizadas, mostrando los dos primeros niveles de expresión similares durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo y siendo la inducción del último dependiente del desarrollo. El momento de expresión de los 3 genes es coincidente, pero no así el nivel de expresión alcanzado, lo que se asocia con el control de diferentes eventos que suceden durante el ciclo de desarrollo.

## E.II. Papel de la fosfatasa MXAN0448 en el ciclo de vida de *M. xanthus*

La tirosina fosfatasa MXAN0448 presenta el Pfam de fosfatasa con especificidad dual y es una proteína soluble. Posee el motivo conservado CX<sub>5</sub>R implicado en la catálisis (Shi, 2004), junto a un residuo de aspártico localizado en posición N-terminal con respecto a la cisteína catalítica. Todos estos residuos conservados se encuentran presentes en las fosfatasas caracterizadas pertenecientes a la superfamilia PTP, lo que indica que la enzima de *M. xanthus* debe ser funcional.

El gen que codifica dicha fosfatasa se expresa durante el desarrollo pero alcanza niveles de expresión superiores durante el crecimiento vegetativo por lo que se trató de construir un mutante de delección en fase para el gen MXAN0448 para tratar de determinar la posible implicación que esta fosfatasa pudiera tener en el ciclo de vida de *M. xanthus*, pero no fue posible conseguirlo, ya que el intermediario merodiploide reversionó a genotipo silvestre en todos los casos.

Por tanto, el hecho de que el gen MXAN0448 se exprese a niveles elevados durante el crecimiento vegetativo unido a la imposibilidad de obtener un mutante de delección para dicho gen hace pensar que la tirosina fosfatasa MXAN0448 es esencial para la viabilidad de *M. xanthus*.

## E.III. Papel de la fosfatasa SpoIIE en el ciclo de vida de *M. xanthus*

El gen MXAN4562, codificante de la fosfatasa SpoIIE, se expresa durante el crecimiento vegetativo de *M. xanthus*. A pesar de ello, no se observó ninguna diferencia entre el mutante de delección para el gen *spoIIE* y la bacteria silvestre en estas condiciones, por lo que estos resultados parecen indicar que la fosfatasa SpoIIE no desempeña un papel fundamental en el crecimiento vegetativo de la mixobacteria.

Durante el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*, el gen que codifica la fosfatasa SpoIIE muestra un patrón de expresión similar al desarrollado durante el crecimiento vegetativo, aunque con niveles ligeramente inferiores. El nivel máximo de expresión en medio CF se alcanza en el momento en el que la bacteria comienza a formar cuerpos fructificantes en este medio. Aunque los cuerpos fructificantes originados por la cepa carente del gen *spoIIE* son muy similares en cuanto a número, morfología, distribución y ritmo de formación, a los originados por la cepa silvestre. Sin embargo, el proceso de formación de los cuerpos fructificantes en medio TPM se encuentra ligeramente adelantado en el mutante  $\Delta spoIIE$  con respecto a la cepa silvestre. Estos medios inductores del desarrollo se diferencian en la cantidad de nutrientes presentes, diferencia que está determinada, fundamentalmente, por la incorporación de una pequeña cantidad de Bacto-casitona al medio CF, lo que constituye, entre otros aspectos, un aporte de aminoácidos al medio, estando ausente ese componente aminoacídico en el medio TPM. El hecho de que las diferencias fenotípicas observadas en las cepas silvestre DZF1 y mutante de delección  $\Delta spoIIE$  se aprecian en medio TPM, pero no en medio CF, apuntan en la dirección de que la señal que podría detectar la fosfatasa SpoIIE, a través de su dominio HAMP, sea el agotamiento general de aminoácidos.

Además, en relación con las diferencias fenotípicas entre las cepas DZF1 y  $\Delta spoIIE$ , el estudio de la esporulación en ambas muestra que la cepa mutante produce

un número considerable de mixósporas tras 32 y 48 horas de incubación, mientras que el número de las mismas es prácticamente nulo en la cepa silvestre. Sin embargo, el número de esporas producido por ambas cepas es similar a partir de las 72 horas de incubación. Este resultado muestra relación con el adelanto observado en la formación de cuerpos fructificantes en medio TPM por parte del mutante que carece de la fosfatasa SpoIIE, dado que al originar los cuerpos fructificantes con antelación forma las mixósporas antes y, por tanto, el número de células de resistencia contadas en los primeros estadios del desarrollo es superior al obtenido en el caso de la cepa silvestre DZF1. Posteriormente, una vez superadas las diferencias fenotípicas iniciales, el número de células de resistencia producidas por ambas cepas presenta la misma tendencia.

Por tanto, los resultados obtenidos indican que existe un ligero adelanto en la evolución del ciclo de desarrollo en la cepa carente del gen *spoIIE*. Cuando esta proteína está presente, el ciclo tiene lugar a un ritmo normal, pero su ausencia origina que el conjunto de eventos que conducen a la formación de cuerpos fructificantes acontezcan de un modo más acelerado. Este resultado está en concordancia con el fenotipo observado para el mutante de la quinasa PksA12 (MXAN4557), cuyo gen se encuentra en el mismo operón que el gen que codifica la fosfatasa SpoIIE. El mutante *pksA12* muestra un bloqueo completo del ciclo de desarrollo de *M. xanthus* (Inouye *et al.*, 2008). Si el gen *spoIIE* forma parte del mismo operón que el gen *pksA12*, las proteínas cifradas por estos genes podrían controlar el mismo proceso y, teniendo en cuenta las funciones contrapuestas de quinasa y fosfatasa, si la ausencia de la quinasa PksA12 retrasa el ciclo de desarrollo hasta el punto de bloquearlo, la ausencia de la fosfatasa SpoIIE podría ejercer el efecto contrario sobre el mismo, esto es, hacer que se desencadene con más celeridad que en la cepa silvestre.

#### **E.IV. Análisis del operón donde se encuentra el gen que codifica la fosfatasa Pph2 de *M. xanthus***

El estudio de la coexpresión de los genes que se encuentran alrededor del sistema regulador de dos componentes *phoPR1* revela la presencia de un operón integrado por seis genes: una proteína con repeticiones de tetratricopéptidos, una posible lipoproteína, el propio sistema regulador de dos componentes PhoPR1, la Ser/Thr fosfatasa Pph2 y la fosfohistidina fosfatasa SixA.

El sistema *phoPR1* se expresa durante el crecimiento vegetativo, pero incrementa sus niveles durante el ciclo de desarrollo y controla parcialmente la expresión del operón. Este sistema está implicado en la diferenciación de los bacilos en mixósporas, y también en el control de la actividad fosfatasa neutra pero, sobre todo, de la actividad fosfatasa ácida. Además, es responsable de la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo energético y en la síntesis de proteínas (Carrero-Lérida, 2004). El momento en el que se produce su máxima expresión, 24 y 8 horas en CF y TPM, respectivamente, coincide con el periodo en que *M. xanthus* comienza a formar agregados en cada uno de estos medios de cultivo. Este hecho puede indicar que el operón está implicado en el proceso de agregación de las células vegetativas y su posterior transformación en células de resistencia (Carrero-Lérida *et al.*, 2005).

Por tanto, la unidad transcripcional responde a señales relacionadas con el desarrollo, por lo que es probable que alguno de los productos de este operón participe en la misma ruta de transducción de señales que el sistema PhoPR1. En este sentido, las fosfatasa Pph2 y SixA podrían estar implicadas en los mismos procesos que el sistema PhoPR1 y, por tanto, estar relacionadas funcionalmente, regulando los niveles de fosforilación del sistema PhoPR1. De ser así, SixA de *M. xanthus* podría actuar sobre la histidina quinasa PhoR1 de modo similar a la fosfohistidina fosfatasa arquetipo SixA de *E. coli* (Matsubara y Mizuno, 2000). Por su parte, la Ser/Thr fosfatasa Pph2 podría mostrar actividad frente a residuos de histidina igualmente fosforilados, como se ha descrito en otras fosfatasas de la misma superfamilia (Zhuo *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1999b). Además, la fosfatasa Pph2 podría controlar el nivel de fosforilación de las proteínas reguladas por el sistema PhoPR1. Esta relación funcional entre sistemas reguladores de dos componentes y quinasas/fosfatasas de tipo eucariota ha sido descrita en levaduras y plantas, donde los sistemas reguladores de dos componentes pueden actuar como sensores controlando la actividad de quinasas, como ocurre en la cascada de MAP quinasas durante la respuesta a la elevada osmolaridad en *S. cerevisiae* (Hohmann, 2002; Santos y Shiozaki, 2004), mientras que las quinasas pueden controlar los sistemas de dos componentes mediante la fosforilación del regulador de respuesta, como ocurre en *S. agalactiae* entre la quinasa Stk1 y el sistema CovR/CovS para regular la expresión de citotoxinas implicadas en la virulencia bacteriana (Rajagopal *et al.*, 2006).

En *M. xanthus* se ha comprobado que un mismo proceso puede ser regulado a distinto nivel por estos dos mecanismos de señalización (Sun y Shi, 2001a; Sun y Shi, 2001b; Nariya e Inouye, 2005). Así, el regulador transcripcional del desarrollo MrpC se induce traduccionalmente por el sistema de dos componentes MrpA/MrpB, mientras que se inhibe a nivel posttraduccional mediante fosforilación por la ruta de quinasas Pkn8 y Pkn14 (Nariya e Inouye, 2006). Asimismo, el hecho de que Pkn4 active la fosfofructoquinasa mediante fosforilación (Nariya e Inouye, 2003) y que el sistema PhoPR1 de *M. xanthus* regule la expresión de piruvato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa durante el ciclo de desarrollo (Carrero-Lérida, 2004), indica que la ruta de oxidación de los azúcares está regulada por estos dos tipos de rutas de transducción de señales. Considerando la implicación de la fosforilación en estos procesos, las fosfatasas de *M. xanthus* podrían contribuir en los mismos controlando el nivel de fosforilación de los sistemas reguladores de dos componentes, de las quinasas o de los sustratos fosforilados por éstas.

### **E.V. Papel de la fosfohistidina fosfatasa SixA en el ciclo de vida de *M. xanthus***

A pesar de que el operón del que forma parte el gen *sixA* se expresa durante el crecimiento vegetativo, la fosfohistidina fosfatasa SixA no parece ejercer una función esencial durante esta etapa del ciclo de vida de *M. xanthus*, probablemente porque, aunque la proteína SixA esté presente se encuentre en estado inactivo.

Sin embargo, durante el ciclo de desarrollo, el gen que cifra la fosfatasa SixA se induce de forma considerable respecto a los niveles mostrados durante el crecimiento vegetativo y la cepa mutante  $\Delta sixA$  muestra un ligero retraso en la formación de los cuerpos fructificantes en medio TPM, fenotipo que se confirma con lo observado en

medio CTT con cantidades decrecientes de Bacto-casitona, donde el ciclo de desarrollo transcurre más pausadamente. En este último medio, el retraso es un poco más acusado pero el mutante  $\Delta sixA$  forma agregados y esporula de un modo similar a la cepa silvestre. El ligero retraso observado en la fase inicial de formación de cuerpos fructificantes por parte de la cepa  $\Delta sixA$  apoya la idea de que la fosfatasa SixA está implicada en los procesos de agregación celular de *M. xanthus*.

El hecho de que las diferencias fenotípicas entre la cepa  $\Delta sixA$  y la cepa silvestre sean casi insignificantes se podría explicar por: i) la existencia en el genoma de *M. xanthus* de otro gen que codifica una fosfatasa de tipo SixA (MXAN5338) que podría ejercer la función de ésta, ii) que el papel de SixA sea desempeñado por otra fosfatasa perteneciente a la superfamilia PPP, como se ha descrito en otros microorganismos (Zhuo *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1999b), y/o iii) que el propio sistema regule su nivel de fosforilación, al menos en parte, a través de la actividad autofosfatasa de la histidina quinasa (Igo *et al.*, 1989; Makino *et al.*, 1989; Zhu *et al.*, 2000) o del regulador de respuesta (West y Stock, 2001) cuando la fosfatasa SixA está ausente.

Para tratar de demostrar que SixA de *M. xanthus* actúa como una fosfohistidina fosfatasa funcional se trató de demostrar la actividad de SixA hacia la histidina quinasa del sistema regulador de dos componentes PhoPR1, ya que los genes que codifican ambas proteínas se encuentran formando parte del mismo operón. De esta manera se pudo determinar que PhoR1 es una histidina quinasa funcional, puesto que incorpora  $P^{32}$  a partir de ATP marcado radiactivamente mediante autofosforilación. Además, se pudo determinar la actividad fosfohistidina fosfatasa de SixA sobre dicha histidina quinasa ya que parece que SixA la desfosforila, al menos parcialmente. Este resultado podría deberse a que SixA requiera de algún cofactor para llevar a cabo de forma eficiente tal proceso o que muestre dependencia de alguna proteína que establezca la interacción entre SixA y PhoR1. También hay que tener en cuenta que no se ha expresado la proteína PhoR1 completa, sino solamente la porción citoplasmática, lo que podría alterar la estructura nativa de la misma e influir en que el proceso de desfosforilación no sea muy eficiente.

Por tanto, parece probable que SixA funciona como un regulador del nivel de fosforilación de al menos la histidina quinasa PhoR1.

## **E.VI. Papel de la Ser/Thr fosfatasa Pph2 en el ciclo de vida de *M. xanthus***

El gen que codifica la fosfatasa Pph2, al formar parte del mismo operón que los genes que cifran el sistema regulador de dos componentes PhoPR1 y la fosfohistidina fosfatasa SixA se expresa durante el crecimiento vegetativo de *M. xanthus* a niveles constantes y, al igual que ellos, no desempeña un papel fundamental en el crecimiento vegetativo de *M. xanthus*.

Para determinar el posible papel que esta fosfatasa juega en el ciclo de desarrollo de la mixobacteria se construyó un mutante de delección para el gen que la codifica y se observó que la cepa mutante presenta un acusado retraso en el proceso de formación de cuerpos fructificantes con respecto a la cepa silvestre.



## Discusión

Estas manifestaciones fenotípicas también se relacionan con el perfil de expresión del gen codificante de esta fosfatasa, dado que *pph2* se expresa constitutivamente pero, al inicio del ciclo de desarrollo, coincidiendo con el momento en el que se están formando los agregados, se dispara su expresión para retornar posteriormente a los niveles iniciales cuando los cuerpos fructificantes alcanzan su madurez. De este modo, a  $DO_{600}$  inicial de 15 en medio CF, el mutante  $\Delta pph2$  presenta un evidente retraso en la formación de cuerpos fructificantes con respecto a la cepa silvestre, siendo este retraso aún más acusado a  $DO_{600}$  de partida de 60, debido a que la misma cantidad de nutrientes está disponible en estas circunstancias para un número 4 veces mayor de células, lo que determina que la cepa silvestre lleve a cabo el ciclo de desarrollo de manera aún más rápida que cuando la densidad celular inicial es menor. La posible implicación de Pph2 en el ciclo de desarrollo de *M. xanthus* se ve respaldada por las modificaciones fenotípicas observadas en medio TPM. Este medio es muy pobre en nutrientes, lo que determina que las células entren en el ciclo de desarrollo rápidamente. Si, además, la densidad celular es elevada, los nutrientes disponibles para cada una de las células son aún más escasos, de manera que el retraso en la formación de los cuerpos fructificantes por parte del mutante  $\Delta pph2$  es aún más acusado.

Por otro lado, el mutante  $\Delta pph2$ , al presentar retraso en la formación de cuerpos fructificantes con respecto a la cepa silvestre, produce menos mixósporas que la cepa DZF1 en el mismo periodo de tiempo. Esta diferencia entre ambas cepas es esperable ya que la formación de esporas se produce tras 16-48 horas de la detección de la escasez de nutrientes (Curtis *et al.*, 2007) y, en ese periodo, el mutante  $\Delta pph2$  apenas ha comenzado a agregarse. Además, el mutante  $\Delta pph2$  presenta reducida la capacidad de germinación de las mixósporas. Este hecho puede ser debido a que el grado de maduración de las esporas en el interior del cuerpo fructificante, respecto a la de las células de resistencia producidas por la cepa silvestre en ese mismo período, será menor y, por tanto, su capacidad de germinación se puede ver reducida. Además, aproximadamente el 10% de las mixósporas formadas por la cepa mutante no presentan la morfología ovoidea característica de las mixósporas silvestres, sino que manifiestan forma alargada. Estas esporas muestran la refringencia característica y, observadas al microscopio electrónico de transmisión, se comprueba que poseen el grosor de sus cubiertas similar al que presentan las mixósporas de la cepa silvestre. Por tanto, la ausencia de la fosfatasa Pph2 también podría tener como consecuencia que las mixósporas de la cepa mutante no adquieran la morfología característica de estas formas de resistencia y esta forma anormal podría estar relacionada con la menor eficiencia de germinación que presentan las esporas del mutante  $\Delta pph2$ .

Estos resultados parecen indicar que la fosfatasa Pph2 podría estar implicada en la detección del agotamiento de nutrientes que desencadena el inicio de la agregación celular y, por tanto, el ciclo de desarrollo. En consecuencia, cuando Pph2 está ausente *M. xanthus* no puede detectar la escasez de nutrientes y, por tanto, la agregación celular se retrasa. Además, la relación de la fosfatasa Pph2 y del sistema PhoPR1 en la detección del nivel de nutrientes disponible en el medio se pone de manifiesto por la dependencia de la expresión de los genes que codifican ambas proteínas con respecto al nivel de nutrientes presente. En este sentido, existe una correlación inversa entre el nivel de expresión de los genes *pph2* y *phoP1-phoR1*, y la cantidad de nutrientes disponibles para la bacteria. Así, la expresión de los genes que forman parte del operón aumenta a medida que disminuye la disponibilidad de nutrientes. También se produce aumento en el nivel de expresión de *pph2* cuando, durante el crecimiento vegetativo, se adicionan

agentes inductores de estrés nutricional, tales como el desacoplante de la fosforilación oxidativa CCCP. Este compuesto produce el mismo efecto que el agotamiento de nutrientes desencadenante del ciclo de desarrollo, esto es, una ausencia de energía celular. Dicha escasez de energía se consigue mediante el transporte pasivo de protones a través de la membrana, con la consiguiente disipación del potencial quimiosmótico de membrana (Jovanovic *et al.*, 2006). Por tanto, el estímulo inductor que dispara la expresión de los genes que forman parte de este operón es el agotamiento de energía como sucede durante el desarrollo.

La fosfatasa Pph2 y el sistema PhoPR1 son necesarios para afrontar el agotamiento de nutrientes que desencadena el ciclo de desarrollo. Así, se ha comprobado que la agregación celular en los mutantes  $\Delta pph2$  y JM12IF se ve comprometida de manera dependiente de la concentración de nutrientes presente en el medio. La dependencia respecto al estado nutricional también se pone de manifiesto por la hipersensibilidad que muestran ambos mutantes frente al CCCP. En este sentido, la reducción en el crecimiento de los mutantes en comparación con la cepa silvestre en presencia de este agente revela que, tanto la fosfatasa Pph2, como el sistema regulador de dos componentes PhoPR1, 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.

Igualmente, la necesidad de ambas proteínas para afrontar la carencia en el aporte de nutrientes es revelada por el marcado retraso experimentado por los mutantes carentes de *pph2* y del sistema *phoPR* en relación con la cepa 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, la fosfatasa Pph2 y el sistema PhoPR1 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.

Además, la histidina quinasa PhoR1 posee un dominio PAS implicado en la detección de cambios en la luz, el potencial redox, el nivel de oxígeno, pequeñas moléculas y, sobre todo, en el nivel de energía de la célula (Taylor *et al.*, 1999). Por tanto, para facilitar la adaptación ante la limitación de nutrientes, el sistema PhoPR1 podría detectar la escasez de los mismos a través del dominio PAS de su histidina quinasa e incrementar la eficiencia de obtención de energía a partir de los nutrientes disponibles para la célula. Esto se podría conseguir a través de la inducción de la expresión de genes implicados en el metabolismo energético, algunos de los cuales se ha comprobado que están bajo el control del sistema PhoPR1 (Carrero-Lérida, 2004).

Con respecto a la participación de la fosfatasa Pph2 en este proceso, es posible que alguno de los genes regulados por el sistema PhoPR1 codifiquen proteínas implicadas en el transporte de nutrientes o en la utilización de recursos alternativos para la célula que permitan sostener el crecimiento celular y cuya actividad venga regulada por fosforilación. Para ello, se trató de determinar la actividad fosfatasa de Pph2.

En este sentido, el dominio catalítico de la fosfatasa Pph2 posee los 3 motivos altamente conservados que definen a la superfamilia PPP (Barton *et al.*, 1994; Zhuo *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 2001), salvo una sustitución en el motivo III, así como el resto de

residuos clave necesarios para la actividad (Jackson y Denu, 2001). Por lo que la proteína Pph2 debe ser funcional.

El ensayo de la actividad catalítica de la proteína fosfatasa Pph2 purificada indica que esta enzima presenta actividad hacia el *p*NPP, un sustrato genérico de las fosfatasas. Mediante el mencionado ensayo se pudo determinar que la actividad de la fosfatasa Pph2 es dependiente de  $Mn^{2+}$  y que la hidrólisis del *p*NPP ocurre, principalmente, a pH cercano a la neutralidad, del mismo modo que ocurre con la fosfatasa Pph1 de *M. xanthus* (Treuner-Lange *et al.*, 2001). Por tanto, esta reacción indica que la proteína Pph2 es una fosfatasa que presenta actividad catalítica *in vitro* dependiente de  $Mn^{2+}$ .

La baja actividad mostrada por la fosfatasa Pph2 hacia el *p*NPP podría deberse a que éste no es su sustrato idóneo. En este sentido, existen fosfatasas que presentan actividad reducida frente al *p*NPP, como la fosfatasa PphA de *Synechocystis* sp PCC6803 (Kloft *et al.*, 2005). Es posible que la proteína Pph2 presente una alta especificidad de sustrato y muestre discreta actividad hacia cualquier otro distinto del idóneo. Además, como se ha mencionado anteriormente, la proteína Pph2 presenta una sustitución importante en el motivo III conservado de la superfamilia PPP de Ser/Thr fosfatasas (Barton *et al.*, 1994; Zhuo *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 2001). Esta sustitución consiste en la presencia de un residuo de treonina en Pph2 de *M. xanthus* en lugar del residuo de histidina conservado. La histidina conservada está implicada en la catálisis y unión de metales, de manera que su sustitución en la fosfatasa Pph2 podría ser otra causa de la baja actividad mostrada hacia el *p*NPP.

## E.VII. Transducción de señales de la fosfatasa Pph2 de *M. xanthus*

Dado que las rutas de transducción de señales en las que intervienen las fosfatasas de tipo eucariota es prácticamente desconocida se recurrió al rastreo de una genoteca de expresión de *M. xanthus*, mediante el empleo del sistema del doble híbrido de levadura, para tratar de determinar las proteínas que interacciona con la Ser/Thr fosfatasa Pph2 y, por tanto, que podrían intervenir en la misma ruta de transducción de señales que ella. De esta manera, se determinó que la fosfatasa Pph2 interacciona fuertemente y de forma específica con la proteína hipotética MXAN1875 y con la glutamina sintetasa GlnA4 (MXAN5630).

### E.VII.1. Interacción Pph2-MXAN1875

Resulta complicado determinar cuál puede ser el papel de MXAN1875 en el ciclo de vida de *M. xanthus*, y relacionarlo con la fosfatasa Pph2, al tratarse de una proteína hipotética, aunque muestra baja similitud con reguladores transcripcionales, y formar parte de un operón en el que la mayoría de los genes codifican proteínas hipotéticas, si bien algunas de ellas presentan baja homología con enzimas implicadas en la replicación y transcripción del ADN.

Para ello, se trató de determinar el perfil de expresión del gen MXAN1875 mediante la construcción de una fusión con el gen *lacZ* de *E. coli*, pero no se detectó expresión durante el crecimiento vegetativo ni tampoco durante el ciclo de desarrollo.

Por su parte, la cepa mutante de delección para el gen MXAN1875 presenta un ligero adelanto en la formación de cuerpos fructificantes durante el ciclo de desarrollo con respecto a la cepa silvestre que se mantiene tan sólo hasta las 24 horas de incubación. Esto supone que el mutante  $\Delta$ MXAN1875 muestra un fenotipo opuesto al de la cepa carente de la fosfatasa Pph2, dado que  $\Delta$ pph2 presenta un desarrollo retrasado respecto a la cepa silvestre.

Además, el mutante  $\Delta$ MXAN1875 produce un mayor número de células de resistencia que la cepa silvestre en el mismo periodo de tiempo y la capacidad de germinación de éstas se encuentra notablemente reducida. Estos resultados guardan relación con el adelanto observado en la formación de cuerpos fructificantes por parte de  $\Delta$ MXAN1875, dado que el hecho de que las mixósporas se tengan que formar en un período de tiempo más corto que en el caso de la cepa silvestre puede determinar que presenten alteraciones en las cubiertas y, que por tanto, su capacidad de germinación se vea comprometida.

No se ha podido determinar en qué momento del ciclo de vida de *M. xanthus* interaccionan las proteínas Pph2 y MXAN1875, ni el proceso en el que intervienen. Si MXAN1875 es realmente un regulador transcripcional, éste podría estar regulado por fosforilación y, por tanto, la fosfatasa Pph2 podría contribuir en este proceso desfosforilándolo.

#### E.VII.2. Interacción Pph2-GlnA4

Debido a que una de las proteínas que interaccionan con la fosfatasa Pph2 resultó ser una glutamina sintetasa, se analizó la presencia de otros genes de este tipo en el genoma de *M. xanthus* para comprobar si Pph2 también interacciona con las proteínas codificadas por ellos, ya que el metabolismo del nitrógeno no ha sido estudiado en esta bacteria.

Así, se determinó que *M. xanthus* posee 2 genes que codifican proteínas de tipo glutamina sintetasa, MXAN5630 (detectado durante el rastreo de la genoteca de expresión de *M. xanthus*), que codifica la proteína GlnA4, y MXAN0912, que codifica la proteína GlnA. Mediante el análisis de interacciones proteicas directas utilizando el sistema del doble híbrido de levadura se pudo determinar que Pph2 tan sólo interacciona con GlnA4 de forma específica.

Como se ha comentado, la glutamina sintetasa juega un papel clave en el metabolismo del nitrógeno, ya que cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato y amonio. Las enzimas caracterizadas que llevan a cabo esta función suelen poseer, además del dominio catalítico glutamina sintetasa, un dominio de tipo anclaje  $\beta$  (PF03951) que está presente en GlnA pero no en GlnA4 de *M. xanthus*. Además, GlnA de *M. xanthus* posee todos los residuos conservados propios de estas enzimas. Por todo ello, GlnA podría ser la enzima encargada de asimilar amonio. Por tanto, a pesar de que las proteínas GlnA y GlnA4 de *M. xanthus* comparten homología de secuencia podrían ser funcionalmente diferentes y, por tanto, Pph2 no tendría por qué interaccionar con ambas, lo que refuerza aún más la especificidad de la interacción entre Pph2 y GlnA4.

E.VII.2.1. Papel de GlnA4 en el ciclo de vida de *M. xanthus* y su relación con Pph2

Para determinar la relación funcional entre la fosfatasa Pph2 y la glutamina sintetasa GlnA4 se determinó el perfil de expresión del gen codificante de esta última y el efecto de la delección del mismo, así como de la delección conjunta de los genes *pph2* y *glnA4* sobre el ciclo de vida de *M. xanthus*.

De esta manera, se determinó que el gen *glnA4* se expresa a muy bajos niveles durante el ciclo de desarrollo mostrando un máximo de expresión tras 72 horas de incubación. Estos bajos niveles de expresión no son extraños ya que el momento en el que el gen *glnA4* muestra su máxima expresión coincide con una etapa avanzada del desarrollo, cuando los cuerpos fructificantes están culminando la maduración, con el proceso de esporulación prácticamente completado y, por tanto, con la célula de resistencia en estado latente. Esta expresión tardía es muy interesante ya que GlnA4 podría estar relacionada con la detección del nivel nutricional del entorno, al igual que la fosfatasa Pph2 pero, a diferencia de ésta, actuaría en una etapa tardía del desarrollo cuando los cuerpos fructificantes se encuentran plenamente maduros, por lo que la enzima GlnA4 podría estar implicada en la maduración de la espora o en la preparación de la misma para la germinación si retornan las condiciones favorables, aportando la fuente de nitrógeno necesaria para que todo el proceso finalice con éxito.

Por tanto, las proteínas Pph2 y GlnA4 parecen funcionar como reguladores 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, 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).

Para determinar si el gen *glnA4* se induce ante el agotamiento de nutrientes, de la misma forma que el gen *pph2*, se cuantificó su nivel de expresión en la cepa portadora de la fusión *glnA4-lacZ* durante el crecimiento vegetativo y el ciclo de desarrollo en presencia de CCCP. De esta manera, se pudo determinar que los niveles de expresión alcanzados por el gen *glnA4* en medio CTT con CCCP se asemejan a los mostrados durante el ciclo de desarrollo, mientras que durante el ciclo de desarrollo no se observó incremento de la expresión del gen *glnA4* originada por la adición del compuesto posiblemente por la imposibilidad de emplear concentraciones elevadas del mismo. Por tanto, la incorporación de CCCP al medio de cultivo produce durante el crecimiento vegetativo un efecto similar sobre la expresión de *glnA4* y *pph2* al ejercido por el agotamiento de nutrientes que desencadena el ciclo de desarrollo, ya que ambas situaciones representan una ausencia de energía celular.

Por otro lado, la carencia del gen *glnA4*, por separado, o en conjunción con la ausencia de *pph2*, tiene influencia sobre el transcurso del desarrollo multicelular de *M. xanthus*. De este modo, la cepa mutante  $\Delta$ *glnA4* muestra un ligero adelanto en la formación de cuerpos fructificantes en medio TPM, de manera contraria a lo que le ocurre al mutante  $\Delta$ *pph2*, el cual muestra retraso en la formación de los mismos. Para tratar de confirmar el adelanto mostrado por la cepa  $\Delta$ *glnA4* en la formación de los cuerpos fructificantes se utilizó el medio CTT con diferentes concentraciones de Bactocasitona, que ocasiona que el ciclo de desarrollo transcurra más lentamente y, en consecuencia, que las diferencias entre las cepas silvestre y mutante se prolonguen en el

tiempo. De esta manera se pudo determinar que la cepa mutante  $\Delta glnA4$  forma cuerpos fructificantes antes que la bacteria silvestre. Un comportamiento similar ha sido observado en otros mutantes de *M. xanthus*, tales como el que carece de la permeasa para el glicerol 3-fosfato (Moraleda-Muñoz *et al.*, 2001) y en mutantes en los que se han deletado componentes de sistemas de transducción de señales, como es el caso del mutante que no presenta la quinasa *pkn5* (Zhang *et al.*, 1996a). Por su parte, el mutante  $\Delta pph2\Delta glnA4$  presenta un acusado retraso en la formación de los cuerpos fructificantes, tanto en medio TPM como en medio CF, de mayor grado que el ofrecido por el mutante sencillo  $\Delta pph2$ , y la magnitud de tal retraso depende, al igual que en el caso del mutante  $\Delta pph2$ , de la concentración de nutrientes presente en el medio. Por tanto, la mutación de *pph2* ejerce un efecto epistático sobre la mutación de *glnA4*.

El número de esporas producidas por la cepa carente de *glnA4* es muy similar al de la cepa silvestre, mientras que el del mutante doble  $\Delta pph2\Delta glnA4$  es considerablemente inferior. Además, las mixósporas producidas por ambos mutantes muestran reducida viabilidad. El hecho de que el mutante  $\Delta glnA4$  produzca un número similar de esporas al de la cepa silvestre, pero de viabilidad reducida, podría deberse a que la proteína GlnA4 esté implicada en la maduración de las células de resistencia, de manera que al no estar presente las esporas producidas por el mutante podrían ser defectuosas. Por otro lado, es consecuente que el mutante doble  $\Delta pph2\Delta glnA4$  presente un número reducido de estructuras de resistencia, dado que muestra un acusado retraso en la formación de cuerpos fructificantes y la mayoría de las células presentes en los cuerpos fructificantes son bacilos vegetativos que todavía no han madurado a esporas en el momento de efectuar el recuento. Debido a ese escaso grado de maduración, estas esporas también presentan reducida capacidad de germinación.

Estos resultados evidencian que tanto la fosfatasa Pph2 como la glutamina sintetasa GlnA4 controlan, con efecto opuesto, el transcurso de los distintos eventos que se suceden durante el ciclo de desarrollo. De esta manera, la fosfatasa Pph2 promovería que la bacteria se agregue y se diferencie ante el agotamiento de nutrientes. En este sentido, en *M. xanthus* tiene lugar un estrecho control del 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). Por ello, 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 latentes a la espera de que se den nuevamente condiciones nutricionales favorables (Kaiser, 2004). En este último proceso podría estar implicada la glutamina sintetasa GlnA4.

#### E.VII.2.2. Actividad de GlnA4 de *M. xanthus*

Como se ha comentado, la glutamina sintetasa es la enzima que desempeña el papel clave en la asimilación de amonio en numerosos procariontes y, debido a ello, está sujeta a una compleja regulación (Leigh y Dodsworth, 2007). Dicha regulación puede consistir en la adenilación de la enzima, como ocurre en enterobacterias, o mediante ADP ribosilación como ocurre en *Synechocystis* (Merrick y Edwards, 1995).

## Discusión

El amonio es la fuente de nitrógeno preferida para el crecimiento bacteriano ya que proporciona una tasa de crecimiento mayor que otras fuentes de nitrógeno. Sin embargo, las bacterias tienen que utilizar un amplio rango de fuentes alternativas y, para conseguirlo, son capaces de sintetizar numerosas enzimas. La síntesis, y en algunos casos la actividad de estas enzimas, está estrechamente relacionada con la disponibilidad de su sustrato correspondiente (Merrick y Edwards, 1995).

El metabolismo del nitrógeno no ha sido estudiado en *M. xanthus*, por lo que se desconoce el papel que puede desempeñar GlnA4 en este proceso. Además, como se ha comentado anteriormente, *M. xanthus* posee otro gen de tipo *glnA* de manera que alguno de ellos o ambos, podrían estar implicados en la asimilación de amonio. Como GlnA4 de *M. xanthus* posee el dominio catalítico propio de las enzimas glutamina sintetasa, se trató de determinar si poseía esta actividad. Para ello, se purificó la enzima y se midió actividad glutamina sintetasa, mediante reacción de transferencia, empleando amonio como sustrato. De esta manera, se determinó una actividad enzimática específica muy baja si se compara con la actividad glutamina sintetasa de GlnA de *E. coli* implicada en el metabolismo del nitrógeno (Woolfolk *et al.*, 1966). Esta baja actividad puede ser debida a que GlnA4 de *M. xanthus* carece de 3 de los 19 residuos estrictamente conservados que juegan un papel clave en la catálisis y unión de sustratos en las enzimas glutamina sintetasa de procariotas y eucariotas (Eisenberg *et al.*, 2000). Además, GlnA4 de *M. xanthus* carece del dominio de anclaje tipo  $\beta$  que suelen poseer las enzimas que llevan a cabo esta función. Sin embargo, la elevada homología de la proteína GlnA4 de *M. xanthus* con la proteína  $\gamma$ -glutamil isopropilamida sintetasa IpuC de *Pseudomonas* KIE171 nos llevó a determinar si GlnA4 presentaba esta actividad. La enzima IpuC muestra un 30% de identidad con glutamina sintetasa y posee el dominio catalítico típico de este tipo de proteínas. Además, esta enzima muestra un amplio rango de sustratos ya que puede utilizar aminoalcanos, aminoalcoholes y aminoésteres (de Azevedo *et al.*, 2002).

Para tratar de determinar si GlnA4 de *M. xanthus* presenta esta actividad alternativa se empleó el método de biosíntesis utilizado para la medida de actividad glutamina sintetasa, pero sustituyendo amonio por isopropilamina como sustrato. De esta manera, la actividad mostrada por GlnA4 fue de  $560.5 \pm 140.7$  nmoles Pi por mililitro de reacción, un valor muy similar al mostrado por IpuC de *Pseudomonas* KIE171 (de Azevedo *et al.*, 2002).

Al igual que IpuC de *Pseudomonas* KIE171 y GlnA4 de *M. xanthus*, otras proteínas que muestra similitud con glutamina sintetasa y poseen el dominio catalítico, pero carecen de los residuos críticos de este tipo de enzimas y no exhiben actividad glutamina sintetasa, como es el caso de GlnA2, GlnA3 y GlnA4 de *S. coelicolor* (Rexer *et al.*, 2006), podrían catalizar reacciones similares a la reacción de biosíntesis de la glutamina sintetasa, pero usando sustratos diferentes al amonio y/o al glutamato.

### E.VII.2.3. Influencia de Pph2 sobre la actividad de GlnA4

Una vez determinada la actividad de GlnA4 se analizó cómo la fosfatasa Pph2 podría modificar dicha actividad. Las pruebas llevadas a cabo permitieron establecer que la actividad de la proteína GlnA4 disminuye por la adición de la fosfatasa Pph2. Este resultado podría deberse a que durante el proceso de sobreproducción para su purificación las proteínas de *E. coli* fosforilan a GlnA4 lo que originaría que la proteína

de *M. xanthus* muestre actividad, pero la adición de Pph2 produce su desfosforilación y, por tanto, se produce una disminución de la misma. Sin embargo, la mayor actividad de GlnA4 se obtiene cuando esta enzima es fosforilada por acción del extracto de esporas procedente del mutante  $\Delta pph2$ . Además, cuando GlnA4 es fosforilada y, a continuación, desfosforilada por acción de Pph2, se produce una disminución importante de la actividad. Por tanto, la fosfatasa Pph2 interacciona con la glutamina sintetasa GlnA4 de forma específica inhibiéndola, determinando que su actividad se apague.

La interacción de las proteínas Pph2 y GlnA4 de *M. xanthus* es puesta de manifiesto por diversos resultados obtenidos en este trabajo de investigación: i) la detección de dicha interacción de forma específica mediante el sistema del doble híbrido de levadura, ii) los resultados obtenidos en la medida de actividad de GlnA4 en presencia y ausencia de la fosfatasa Pph2, así como de extractos de esporas procedentes del mutante  $\Delta pph2$  de *M. xanthus*, y iii) la coincidencia en la inducción de la expresión de los genes que codifican ambas proteínas durante el desarrollo de *M. xanthus*. A ello se puede añadir que GlnA4 de *M. xanthus* carece de los residuos conservados presentes en el extremo C-terminal que forman un motivo de adenilación cuya secuencia conservada es K-[LIVM]-X(5)-[LIVMA]-D-[RK]-[DN]-[LI]-Y, que está presente en otras glutamina sintetetasas y, por tanto, la regulación de su actividad no se va a ejercer a través de ese mecanismo, siendo la fosforilación una firme posibilidad para llevar a cabo esa regulación dado que en *M. xanthus* la fosforilación es un proceso ampliamente utilizado para la regulación de la actividad de numerosas proteínas. En este sentido, el análisis del fosfoproteoma de la mixobacteria *S. cellulosum* ha permitido determinar que su glutamina sintetasa GlnA2 se fosforila (Schneiker *et al.*, 2007). Igualmente, en la cianobacteria *Synechocystis* sp PCC6803 la fosfatasa PphA desfosforila a la proteína sensora PII implicada en la asimilación del nitrógeno (Forchhammer y Tandeau de Marsac, 1994), mientras que en la mayoría de las bacterias la regulación de la actividad de dicha proteína se efectúa mediante uridilación de un residuo de tirosina conservado (Ninfa y Atkinson, 2000; Arondeguy *et al.*, 2001). Todo lo anteriormente expuesto indica que es altamente probable que la proteína GlnA4 de *M. xanthus* esté regulada por fosforilación y que sea la fosfatasa Pph2 la que se encargue de su desfosforilación.





## **F. CONCLUSIONES**



1. La identificación de genes que codifican proteínas fosfatasa en el genoma de *M. xanthus* ha revelado la presencia de proteínas pertenecientes a 3 superfamilias de fosfatasas, un hecho poco frecuente en la mayoría de procariotas, siendo las fosfatasas pertenecientes a la superfamilia PPP las más abundantes en esta bacteria. El estudio del perfil de expresión de un conjunto de ellas ha puesto de manifiesto que sus genes codificantes poseen perfiles de expresión muy diversos.
2. El gen que codifica la tirosina fosfatasa MXAN0448 de *M. xanthus* se expresa principalmente durante el crecimiento vegetativo. Este hecho unido a la imposibilidad de obtener un mutante de delección para dicho gen apunta en la dirección de que la tirosina fosfatasa MXAN0448 es esencial para la viabilidad de *M. xanthus*.
3. *M. xanthus* codifica tan solo una fosfatasa de tipo SpoIIE, y la ausencia de este gen ocasiona que el conjunto de eventos que conducen a la formación de cuerpos fructificantes acontezca de un modo acelerado.
4. El análisis del operón donde se encuentra el gen que codifica la Ser/Thr fosfatasa Pph2 de *M. xanthus* ha revelado que está constituido por 6 genes, entre los que se encuentran los genes que cifran la fosfohistidina fosfatasa SixA y el sistema regulador de dos componentes PhoPR1. La expresión de estos genes está regulada parcialmente por el propio sistema PhoPR1. Estos genes se expresan durante el crecimiento vegetativo, pero aumentan sus niveles de forma considerable durante el ciclo de desarrollo, coincidiendo con el momento en el que las células están formando agregados.
5. La fosfatasa SixA de *M. xanthus*, que en otras bacterias se ha descrito que funciona como una fosfohistidina fosfatasa, desfosforila parcialmente a la histidina quinasa PhoR1.
6. La fosfatasa Pph2 de *M. xanthus* está implicada en el control del ciclo de desarrollo y colabora en la respuesta de la célula frente a condiciones de estrés energético, ya que el mutante de delección para el gen *pph2* fructifica de forma tardía. Asimismo, este mutante presenta defectos en la esporulación mostrando algunas mixósporas de morfología bacilar.
7. La proteína Pph2 presenta actividad frente al sustrato genérico de las fosfatasas *pNPP* en presencia de iones  $Mn^{2+}$  y a pH preferentemente neutro.
8. Mediante el rastreo de una genoteca de expresión de *M. xanthus* se ha determinado que la fosfatasa Pph2 interacciona con una proteína hipotética y con la glutamina sintetasa GlnA4.
9. El gen *glnA4* de *M. xanthus* se expresa a bajos niveles durante el desarrollo tardío, cuando el proceso de esporulación está culminando, y su expresión se induce en presencia de estrés energético. Así mismo, el mutante de delección para dicho gen muestra agregación prematura durante el ciclo de desarrollo e hipersensibilidad a compuestos inductores de estrés energético, así como

## *Conclusiones*

producción reducida de mixósporas y notable disminución de la viabilidad de las mismas.

10. La proteína GlnA4 muestra actividad  $\gamma$ -glutamil isopropilamida sintetasa que aumenta en presencia de extractos de esporas procedentes del mutante  $\Delta pph2$  y disminuye por acción de la fosfatasa Pph2 de *M. xanthus*.

## **G. BIBLIOGRAFÍA**



- Agrigoni, F., Duncan, L., Alper, S., Losick, R. y Stragier, P. (1996)** SpoIIE governs the phosphorylation state of a protein regulating transcription factor  $\sigma^F$  during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:3238-3242.
- Alber, M.S., Kiskowski, M.A. y Jiang, Y. (2004)** Two-stage aggregate formation via streams in myxobacteria. *Phys. Rev. Lett.* **93**:068102.
- Alex, L.A. y Simon, M.I. (1994)** Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet.* **10**:133-138.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Anderson, A.R. y Vasiev, B.N. (2005)** An individual based model of rippling movement in a myxobacteria population. *J. Theor. Biol.* **234**:341-349.
- Aravind, L. y Koonin, E.V. (1998)** Phosphoesterase domains associated with DNA polymerases of diverse origins. *Nucleic Acids Res.* **26**:3746-3752.
- Aravind, L. y Ponting, C.P. (1999)** The cytoplasmic helical linker domain of the receptor histidine kinase and methyl-accepting protein is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **176**:111-116.
- Arcondeguy, T., Jack, R. y Merrick, M. (2001)** PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**:80-105.
- Ausubel, M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (1988)** Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA.
- Autero, M. y Gahmberg, C.G. (1987)** Phorbol diesters increase the phosphorylation of the leukocyte common antigen CD45 in human T cells. *Eur. J. Immunol.* **17**:1503-1506.
- Bagu, J.R., Sonnichsen, F.D., Williams, D., Anderson, R.J., Sykes, B.D. y Holmes, C.F.B. (1995)** Comparison of the solution structures of microcystin-LR and motuporin. *Nat. Struct. Biol.* **2**:114-116.
- Baker, M.E. (1994)** *Myxococcus xanthus* C-factor, a morphogenetic paracrine signal similar to *Escherichia coli* 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase and human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem. J.* **301**:311-312.
- Baker, D.A. y Kelly, J.M. (2004)** Structure, function and evolution of microbial adenyl and guanylyl cyclases. *Mol. Microbiol.* **52**:1229-1242.
- Barak, I., Behari, J., Olmedo, G., Guzman, P., Brown, D.P., Castro, E., Walker, D., Westpheling, J. y Youngman, P. (1996)** Structure and function of the *Bacillus* SpoIIE protein and its localization to sites of sporulation septum assembly. *Mol. Microbiol.* **19**:1047-1060.



## Bibliografía

**Barak, M. y Youngman, P. (1996)** SpoIIE mutants of *Bacillus subtilis* comprise two distinct phenotypic classes consistent with a dual function roles for the SpoIIE protein. *J. Bacteriol.* **178**:4984-4989.

**Barford, D. (1996)** Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.* **21**:407-412.

**Barford, D., Das, A.K. y Egloff, M.P. (1998)** The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**:133-164.

**Barton, G.J., Cohen, P.T.W. y Barford, D. (1994)** Conservation analysis and structure prediction of the protein serine/threonine phosphatases. Sequence similarity with diadenosine tetraphosphatase from *Escherichia coli* suggests homology to the protein phosphatases. *Eur. J. Biochem.* **220**:225-237.

**Behmlander, R.M. y Dworkin, M. (1994)** Integral proteins of the extracellular matrix fibrils of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **176**:6304-6311.

**Bekker, M., Teixeira de Mattos, M.J. y Hellingwerf, K.J. (2006)** The role of two-component regulation systems in the physiology of the bacterial cell. *Sci. Prog.* **89**:213-242.

**Bender, M.H. y Yother, J. (2001)** CpsB is a modulator of capsule-associated tyrosine kinase activity in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **276**:47966-47974.

**Bennett, M.S., Guan, Z., Laurber, M. y Su, X.D. (2001)** *Bacillus subtilis* arsenate reductase is structuraly and functionally similar to low molecular weight protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:13577-13582.

**Berleman, J.E., Chumley, T., Cheung, P. y Kirby, J.R. (2006)** Rippling is a predatory behavior in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **188**:5888-5895.

**Beuf, L., Bedu, S., Durand, M.C. y Joset, F. (1994)** A protein involves in co-ordinated regulation of inorganic carbon and glucose metabolism in the facultative photoautotrophic cyanobacterium *Synochocystis* PCC6803. *Plant. Mol. Biol.* **25**:855-864.

**Bhaduri, A. y Sowdhamini, R. (2005)** Genome-wide survey of prokaryotic O-protein phosphatases. *J. Mol. Biol.* **352**:736-752.

**Bibb, M.J., Findlay, P.R. y Johnson, M.W. (1984)** The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein coding sequences. *Gene* **30**:157-166.

**Black, D.S. y Bliska, J.B. (1997)** Identification of p130Cas as a substrate of *Yersinia* YopH (Yop51), a bacterial protein tyrosine phosphatase that translocates into mammalian cells and targets focal adhesions. *EMBO J.* **16**:2730-2744.

- Black, D.S., Montagna, L.G., Zitsmann, S. y Bliska, J.B. (1998)** Identification of an amino-terminal substrate-binding domain in the *Yersinia* tyrosine phosphatase that is required for efficient recognition of focal adhesion targets. *Mol. Microbiol.* **29**:1263-1274.
- Black, W.P., Xu, Q. y Yang, Z. (2006)** Type IV pili function upstream of the Dif chemotaxis pathway in *Myxococcus xanthus* EPS regulation. *Mol. Microbiol.* **61**:447-456.
- Black, W.P. y Yang, Z. (2004)** *Myxococcus xanthus* chemotaxis homologs DifD and DifG negatively regulate fibril polysaccharide production. *J. Bacteriol.* **186**:1001-1008.
- Blackhart, B.D. y Zusman, D.R. (1985a)** Cloning and complementation analysis of the “frizzy” genes of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* **198**:243-254.
- Blackhart, B.D. y Zusman, D.R. (1985b)** “Frizzy” genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:8767-8770.
- Blattner, F.R., Plunkett 3<sup>rd</sup>, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. y Shao, Y. (1997)** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1474.
- Bliska, J.B. y Falkow, S. (1993)** The role of host tyrosine phosphorylation in bacterial pathogenesis. *Trends Genet.* **9**:85-89.
- Bliska, J.B., Guan, K., Dixon, J.E. y Falkow, S. (1991)** Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:1187-1191.
- Boitel, B., Ortiz-Lombardía, M., Durán, R., Pompeo, F., Cole, S.T., Cerveñansky, C. y Alzari, P.M. (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**:1493-1508.
- Bonner, P.J., Black, W.P., Yang, Z. y Shimkets, L.J. (2006)** FibA and PilA act cooperatively during fruiting body formation of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **61**:1283-1293.
- Bonner, P.J. y Shimkets, L.J. (2001)** Piecing together a puzzling pathway: new insights into C-signaling. *Trends Microbiol.* **9**:462-464.
- Bonner, P.J., Xu, Q., Black, W.P., Li, Z., Yang, Z. y Shimkets, L.J. (2005)** The Dif chemosensory pathway is directly involved in phosphatidylethanolamine sensory transduction in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **57**:1499-1508.
- Bork, P., Brown, N.P., Hegyi, H. y Shultz, J. (1996)** The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues. *Protein Sci.* **5**:1421-1425.

## Bibliografía

**Boylan, S.A., Redfield, A.R. y Price, C.W. (1993)** Transcription factor sigma B of *Bacillus subtilis* controls a large stationary-phase regulon. *J. Bacteriol.* **175**:3957-3963.

**Boysen, A., Ellehauge, E., Julien, B. y 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**:1540-1546.

**Brady-Kalnay, S.M., Rimm, D.L. y Tonks, N.K. (1995)** Receptor protein tyrosine phosphatase PTP $\mu$  associates with cadherins and catenins in vivo. *J. Cell Biol.* **130**:977-986.

**Brenner, M., Garza, A.G. y Singer, M. (2004)** *nsd*, a locus that affects the *Myxococcus xanthus* cellular response to nutrient concentration. *J. Bacteriol.* **186**:3461-3471.

**Bretscher, A.P. y Kaiser, D.T. (1978)** Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium. *J. Bacteriol.* **133**:763-768.

**Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I.T., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., DeBoy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Daugherty, S.C., Brinkac, L.M., Beanan, M.J., Haft, D.H., Nelson, W.C., Davidsen, T.M., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H.M., Fedorova, N.B., Tran, B., Russell, D., Berry, K.J., Utterback, T.R., Van Aken, S.E., Feldblyum, T.V., D'Ascenzo, M., Deng, W.L., Ramos, A.R., Alfano, J.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., Delaney, T.P., Lazarowitz, S.G., Martin, G.B., Schneider, D.J., Tang, X., Bender, C.L., White, O., Fraser, C.M. y Collmer, A. (2003)** The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:10181-10186.

**Burnette, W.N. (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.

**Campos, J.M., Geisselsoder, J. y Zusman, D.R. (1978)** Isolation of bacteriophage MX4, a generalized transducing phage for *Myxococcus xanthus*. *J. Mol. Biol.* **119**:167-178.

**Carmichael, W.W. (1997)** The cyanotoxins. *Adv. Botanical Res.* **27**:211-256.

**Carrero-Lérida, J. (2004)** Análisis de tres sistemas reguladores de dos componentes de *Myxococcus xanthus*: caracterización de mutantes sencillos y múltiples. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada.

**Carrero-Lérida, J., Moraleda-Muñoz, A., García-Hernández, R., Pérez, J. y Muñoz-Dorado, J. (2005)** PhoR1-PhoP1, a third two-component system of the family PhoRP from *Myxococcus xanthus*: role in development. *J. Bacteriol.* **187**:4976-4983.

**Cashin, P., Goldsack, L., Hall, D. y O'Toole, R. (2006)** Contrasting signal transduction mechanisms in bacterial and eukaryotic gene transcription. *FEMS Microbiol. Lett.* **261**:155-64.

**Castañeda-García, A. (2007)** Análisis de las proteínas quinasas de tipo eucariota de *Myxococcus xanthus*: caracterización molecular de la proteína quinasa Pksa (MXAN5696). Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada.

**Chater, K.F. y Hopwood, D.A. (1989)** *Genetics of Bacterial Diversity*. London Academic. pp:129-150.

**Chen, M.X. y Cohen, P.T.W. (1997)** Activation of protein phosphatase 5 by limited proteolysis or the binding of polyunsaturated fatty acids to the TPR domain. *FEBS Lett.* **400**:136-140.

**Chen, M.X., McPartlin, A.E., Brown, L., Chen, Y.H., Barker, H.M. y Cohen, P.T.W. (1994)** A novel human protein serine/threonine phosphatase which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localises to the nucleus. *EMBO J.* **13**:4278-4290.

**Cheng, Y.L. y Kaiser, D. (1989a)** *dsg*, a gene required for cell-cell interactions early in *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **171**:3719-3726.

**Cheng, Y.L. y Kaiser, D. (1989b)** *dsg*, a gene required for *Myxococcus* development, is necessary for cell viability. *J. Bacteriol.* **171**:3727-3731.

**Cheng, Y.L., Kalman, L.V. y Kaiser, D. (1994)** The *dsg* gene of *Myxococcus xanthus* encodes a protein similar to translation initiation factor IF3. *J. Bacteriol.* **176**:1427-1433.

**Cheng, J., Wu, K., Armanini, M., O'Rourke, N., Dowbenko, D. y Lasky, L.A. (1997)** A novel protein-tyrosine phosphatase related to the homotypically adhering kappa and mu receptors *J. Biol. Chem.* **272**:7264-7277.

**Cho, K. y Zusman, D.R. (1999a)** AsgD, a new two-component regulator required for A-signalling and nutrient sensing during early development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **34**:268-281.

**Cho, K. y Zusman, D.R. (1999b)** Sporulation timing in *Myxococcus xanthus* is controlled by the *espAB* locus. *Mol. Microbiol.* **34**:714-725.

**Chopra, P., Singh, B., Singh, R., Vohra, R., Koul, A., Meena, L.S., Koduri, H., Ghildiyal, M., Deol, P., Das, T.K., Tyagi, A.K. y Singha, Y. (2003)** Phosphoprotein phosphatase of *Mycobacterium tuberculosis* dephosphorylates serine-threonine kinases PknA and PknB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**:112-120.

**Chu, Y., Lee, E.Y.C. y Schlender, K.K. (1996)** Activation of protein phosphatase 1. Formation of a metalloenzyme. *J. Biol. Chem.* **271**:2574-2577.

## Bibliografía

**Cieslewicz, M.J., Kasper, D.L., Wang, Y. y Wessels, M.R. (2001)** Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci. *J. Biol. Chem.* **276**:139-146.

**Cohen, P. (1989)** The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58**:453-508.

**Cohen, P. (1991)** Classification of protein-serine/threonine phosphatases: identification and quantitation in cell extracts. *Meth. Enzymol.* **201**:389-398.

**Cohen, P. (2000)** The regulation of protein function by multisite phosphorylation a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* **25**:596-601.

**Cohen, P.T.W. y Cohen, P. (1989)** Discovery of a protein phosphatase activity encoded in the genome of bacteriophage  $\lambda$ . Probable identity with open reading frame 221. *Biochem. J.* **260**:931-934.

**Cohen, P.T.W., Collins, J.F., Coulson, A.F.W., Berndt, N. y da Cruz e Silva, O.B. (1988)** Segments of bacteriophage  $\lambda$  (orf 221) and  $\Phi$ 80 are homologous to genes encoding for mammalian protein phosphatases. *Gene* **69**:131-134.

**Cormack, B.P., Valdivia, R.H. y Falkow, S. (1996)** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**:33-38.

**Cozzone, A.J. (1993)** ATP-dependent protein kinases in bacteria. *J. Cellular Biochem.* **51**:7-13.

**Cozzone, A.J. (1988)** Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**:97-125.

**Cozzone, A.J. (1998)** Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in enteric bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:127-164.

**Cozzone, A.J., Grangeasse, C., Doublet, P. y Duclos, B. (2004)** Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. *Arch. Microbiol.* **181**:171-181.

**Crawford, E.W. y Shimkets, L.J. (2000a)** The *Myxococcus xanthus* *socE* and *csgA* genes are regulated by the stringent response. *Mol. Microbiol.* **37**:788-799.

**Crawford, E.W. y Shimkets, L.J. (2000b)** The stringent response in *Myxococcus xanthus* is regulated by SocE and the CsgA C-signaling protein. *Genes Dev.* **14**:483-492.

**Curtis, P.D., Taylor, R.G., Welch, R.D. y Shimkets, L.J. (2007)** Spatial organization of *Myxococcus xanthus* during fruiting body formation. *J. Bacteriol.* **189**:9126-9130.

**Cusick, J.K. y Gill, R.E. (2005)** The *bcsA* gene influences multiple aspects of development in *Myxococcus xanthus*. *Curr. Microbiol.* **51**:336-343.

- Cusick, J.K., Hager, E. y Gill, R.E. (2002)** Characterization of *bcsA* mutations that bypass two distinct signaling requirements for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **184**:5141-5150.
- Dahl, J.L., Tengra, F.K., Dutton, D., Yan, J., Andacht, T.M., Coyne, L., Windell, V. y Garza, A.G. (2007)** Identification of major sporulation proteins of *Myxococcus xanthus* using a proteomic approach. *J. Bacteriol.* **189**:3187-3197.
- Das, A.K., Cohen, P.W. y Barford, D. (1995)** The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* **17**:1192-1199.
- Das, A.K., Helps, N.R., Cohen, P.T.W. y Barford, D. (1998)** Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J.* **15**:6798-6809.
- Davis, J.M., Mayor, J. y Plamann, L. (1995)** A missense mutation in *rpoD* results in an A-signalling defect in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **18**:943-952.
- Dawid, W. (2000)** Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:403-427.
- de Azevedo Wäsch, S.I., van der Ploeg, J.R., Maire, T., Lebreton, A., Kiener, A. y Leisinger, T. (2002)** Transformation of isopropylamine to L-alaninol by *Pseudomonas* sp. strain KIE171 involves N-glutamylated intermediates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2368-2375.
- den Hertog, J., Pals, C.E., Peppelenbosch, M.P., Tertoolen, L.G., de Laat, S.W. y Kruijer, W. (1993)** Receptor protein tyrosine phosphatase alpha activates pp60c-src and is involved in neuronal differentiation. *EMBO J.* **12**:3789-3798.
- Denu, J.M. y Dixon, J.E. (1995)** A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:5910-5914.
- Denu, J.M., Lohse, D.L., Vijayalakshmi, J., Saper, M.A. y Dixon, J.E. (1996a)** Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:2493-2498.
- Denu, J.M., Stuckey, J.A., Saper, M.A. y Dixon, J.E. (1996b)** Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* **87**:361-364.
- Denu, J.M. y Tanner, K.G. (1998)** Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* **37**:5633-5642.
- Desai, D.M., Sap, J., Silvennoinen, O., Schlessinger, J. y Weiss, A. (1994)** The catalytic activity of the CD45 membrane-proximal phosphatase domain is required for TCR signaling and regulation. *EMBO J.* **13**:4002-4010.

## Bibliografía

**Deutscher, J., Küster, E., Bergstedt, U., Charrier, V. y Hillen, W. (1995)** Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **15**:1049-1053.

**Dossonnet, V., Monedero, V., Zagorec, M., Galinier, A., Pérez-Martínez, G. y Deutscher, J. (2000)** Phosphorylation of HPr by the bifunctional HPr kinase/P-Ser-HPr phosphatase from *Lactobacillus casei* controls catabolic repression and inducer exclusion but not inducer expulsion. *J. Bacteriol.* **182**:2582-2590.

**Downard, J., Ramaswamy, S.V. y Kil, K.S. (1993)** Identification of *esg*, a genetic locus involved in cell-cell signaling during *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **175**:7762-7770.

**Downard, J. y Toal, D. (1995)** Branched chain fatty acids: the case for a novel form of cell-cell signaling during *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* **16**:171-175.

**Downard, J. y Zusman, D.R. (1985)** Differential expression of protein S genes during *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **161**:1146-1151.

**Duncan, L., Alper, S., Arigoni, F., Losick, R. y Stragier, P. (1995)** Activation of cell-specific transcription by a serine phosphatase at the site of asymmetric division. *Science* **270**:641-644.

**Dunphy, W.G. (1994)** The decision to enter mitosis. *Trends Cell Biol.* **4**:202-207.

**Durocher, D., Taylor, I.A., Sarbassova, D., Haire, L.F., Westcott, S.L., Jackson, S.P., Smerdon, S.J. y Yaffe, M.B. (2000)** The molecular basis of FHA domain: phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Mol. Cell* **6**:1169-1182.

**Dworkin, M. (1962)** Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **84**:250-257.

**Dworkin, M. (1963)** Nutritional regulation of morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **86**:67-72.

**Dworkin, M. (1993)** Cell surfaces and appendages. En: *Myxobacteria II*. ASM Press, Washington D.C. pp:63-83.

**Dworkin, M. (1996)** Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol. Rev.* **60**:70-102.

**Dworkin, M. y Gibson, S.M. (1964)** A system for studying microbial morphogenesis: rapid formation of microcysts in *Myxococcus xanthus*. *Science* **146**:243-244.

**Egloff, M.P., Cohen, P.T.W., Reinemer, P. y Barford, D. (1995)** Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J. Mol. Biol.* **254**:942-959.

- Eisenberg, D., Gill, H.S., Pfluegl, G.M. y Rotstein, S.H. (2000)** Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochem. Biophys. Acta* **1477**:122-145.
- Elías, M. y Murillo, F.J. (1991)** Induction of germination in *Myxococcus xanthus* fruiting body spores. *J. Gen. Microbiol.* **137**:381-388.
- Ellehaug, E., Norregaard-Madsen, M. y 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**:807-817.
- Errington, J. (1996)** Determination of cell fate in *Bacillus subtilis*. *Trends Genet.* **12**:31-34.
- Evans, P.R., Farrants, G.W. y Hudson, P.J. (1981)** Phosphofructokinase: structure and control. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **293**:53-62.
- Fabret, C., Feher, V.A. y Hoch, A. (1999)** Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J. Bacteriol.* **181**:1975-1983.
- Fauman, E.B., Cogswell, J.P., Lovejoy, B., Rocque, W.J., Holmes, W., Montana, V.G., Piwnica-Worms, H., Rink, M.J. y Saper, M.A. (1998)** Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A. *Cell* **93**:617-625.
- Fauman, E.B., Yuvaniyama, C., Schubert, H.L., Stuckey, J.A. y Saper, M.A. (1996)** The X-ray crystal structures of *Yersinia* tyrosine phosphatase with bound tungstate and nitrate. Mechanistic implications. *J. Biol. Chem.* **271**:18780-18788.
- Feucht, A., Magnin, T., Yudkin, M.D. y Errington, J. (1996)** Bifunctional protein required for asymmetric cell division and cell-specific transcription in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **10**:794-803.
- Fiegna, F. y Velicer, G.J. (2005)** Exploitative and hierarchical antagonism in a cooperative bacterium. *PLoS Biol.* **3**:e370.
- Finn, R.D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P.C., Sammut, J.S., Hotz, H.R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L. y Bateman, A. (2008)** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res. Database Issue* **36**:D281-D288.
- Fischer, E.H. y Krebs, E.G. (1989)** Commentary on "The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle". *Biochim. Biophys. Acta* **1000**:297-301.
- Fjeld, C.C. y Denu, J.M. (1999)** Kinetic analysis of human serine/threonine protein phosphatase 2C alpha. *J. Biol. Chem.* **274**:20336-20343.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G.G., FitzHugh, W., Fields, C.A., Gocayne, J.D., Scott, J.D., Shirley, R., Liu, L.I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen,**



## Bibliografía

**D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O. y Venter, J.C. (1995)** Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Rd. Science* **269**:496-512.

**Forchhammer, K. y Tandeau de Marsac, N. (1994)** The PII protein in cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. *J. Bacteriol.* **176**:84-91.

**Fu, Y. y Galán, J.E. (1998)** The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol. Microbiol.* **27**:359-368.

**Fuchs, M., Muller, T., Lerch, M.M. y Ullrich, A. (1996)** Association of human protein-tyrosine phosphatase kappa with members of the armadillo family. *J. Biol. Chem.* **271**:16712-16719.

**Gaidenko, T., Kim, T.J. y Price, C.W. (2002)** The PrpC serine-threonine phosphatase and PrkC kinase have opposing physiological roles in stationary-phase *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* **184**:6109-6114.

**Gallego, M. y Virshup, D.M. (2005)** Protein serine/threonine phosphatases: life, death, and sleeping. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**:197-202.

**Galperin, M.Y. (2005)** A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol.* **5**:35.

**Galperin, M.Y. (2006)** Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J. Bacteriol.* **188**:4169-4182.

**Gao, R., Mack, T.R. y Stock, A.M. (2007)** Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends Biochem. Sci.* **32**:225-234.

**Garza, A.G., Harris, B.Z., Pollack, J.S. y Singer, M. (2000)** The *asgE* locus is required for cell-cell signalling during *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* **35**:812-824.

**Gaylov, E.E., Hakansson, S., Forsberg, A. y Wolf-Watz, H. (1993)** A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**:730-732.

**Geng, Y., Yang, Z., Downard, J., Zusman, D.R. y Shi, W. (1998)** Methylation of FrzCD defines a discrete step in the developmental program of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **180**:5765-5768.

**Gerth, K., Bedorf, N., Hofle, G., Irschik, H. y Reichenbach, H. (1996)** Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **49**:560-563.

**Gerth, K., Bedorf, N., Irschik, H., Hofle, G. y 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. y Trowitzsch, W. (1982)** The myxovirescins, a family of antibiotics from *Myxococcus virescens* (Myxobacterales). *J. Antibiot.* **35**:1454-1459.

**Gerth, K. y Müller, R. (2005)** Moderately thermophilic Myxobacteria: novel potential for the production of natural products isolation and characterization. *Environ. Microbiol.* **7**:874-880.

**Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S. y 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**:233-253.

**Gevers, D., Vandepoele, K., Simillon, C. y Van de Peer, Y. (2004)** Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. *Trends Microbiol.* **12**:148-154.

**Gill, R.E. y Bornemann, M.C. (1988)** Identification and characterization of the *Myxococcus xanthus* *bsgA* gene product. *J. Bacteriol.* **170**:5289-5297.

**Gill, R.E., Karlok, M. y 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.

**Goldberg, J., Huang, H.B., Kwon, Y.G., Greengrad, P., Nairn, A.C. y Kuriyan, J. (1995)** Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* **376**:745-753.

**Goldman, B., Bhat, S. y Shimkets, L.J. (2007)** Genome evolution and the emergence of fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *PLoS ONE* **26**:e1329.

**Goldman, B.S., Nierman, W.C., Kaiser, D., Slater, S.C., Durkin, A.S., Eisen, J.A., Ronning, C.M., Barbazuk, W.B., Blanchard, M., Field, C., Halling, C., Hinkle, G., Iartchuk, O., Kim, H.S., Mackenzie, C., Madupu, R., Miller, N., Shvartsbeyn, A., Sullivan, S.A., Vaudin, M., Wiegand, R. y Kaplan, H.B. (2006)** Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:15200-15205.

**Gottesman, S. y Maurizi, M.R. (2001)** Cell biology. Surviving starvation. *Science* **293**:614-615.

**Gräf, W. y Pelka, G. (1979)** Aquatic myxobacteria as indicators in the evaluation of drinking water quality. *Zentralbl. Bakteriol.* **169**:225-239.

## Bibliografía

- Grangeasse, C., Obadia, B., Mijakovic, I., Deutscher, J., Cozzone, A.J. y Doublet, P. (2003)** Autophosphorylation of the *Escherichia coli* protein kinase Wzc regulates tyrosine phosphorylation of Ugd, a UDP-glucose dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **278**:39323-39329.
- Griffith, J.P., Kim, J.L., Kim, E.E., Sintchak, M.D., Thomson, J.A., Fitzgibbon, M.J., Fleming, M.A., Caron, P.R., Hsiao, K. y Navia, M.A. (1995)** X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* **82**:507-522.
- Gronewold, T.M. y Kaiser, D. (2001)** The *act* operon controls the level and time of C-signal production for *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* **40**:744-756.
- Gronewold, T.M. y Kaiser, D. (2007)** Mutations of the *act* promoter in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **189**:1836-1844.
- Grundner, C., Perrin, D., van Huijsduijnen, R.H., Swinnen, D., González, J., Gee, C.L., Wells, T. y Alber, T. (2007)** Structural basis for selective inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpB. *Structure* **15**:499-509.
- Guan, K., Broyles, S.S. y Dixon, J.E. (1991)** A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature* **350**:359-362.
- Guan, K. y Dixon, J.E. (1990)** Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* **249**:553-556.
- Guan, K. y Dixon, J.E. (1991)** Evidence for protein-tyrosine phosphatase catalysis proceeding via a cystein-phosphatate intermediate. *J. Biol. Chem.* **266**:17026-17030.
- Guo, D., Bowden, M.G., Pershad, R. y Kaplan, H.B. (1996)** The *Myxococcus xanthus* *rfaABC* operon encodes an ATP-binding cassette transports homolog required for O-antigen biosynthesis and multicellular development. *J. Bacteriol.* **178**:1631-1639.
- Hagen, D.C., Bretscher, A.P. y Kaiser, D. (1978)** Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **64**:284-296.
- Hager, E., Tse, H. y Gill, R.E. (2001)** Identification and characterization of *spdR* mutations that bypass the BsgA protease-dependent regulation of developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **39**:765-780.
- Hamada, K., Kato, M., Shimizu, T., Ihara, K., Mizuno, T. y Hakoshima, T. (2005)** Cristal structure of the protein histidine phosphatase SixA in the multistep His-Asp phosphorelay. *Genes Cell.* **10**:1-11.
- Hamid, N., Gustavsson, A., Andersson, K., McGee, K., Persson, C., Rudd, C.E. y Fällman, M. (1999)** YopH dephosphorylates Cas and Fyn-binding protein in macrophages. *Microb. Pathog.* **27**:231-242.
- Hanahan, D. (1983)** Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.

- Hanks, S.K. (2003)** Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol.* **4**:111.
- Hanks, S.K. y Hunter, H. (1995)** The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**:576-596.
- Hanlon, W.A., Inouye, M. e Inouye, S. (1997)** Pkn9, a Ser/Thr protein kinase involved in the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **23**:459-471.
- Hanson, C.W. y Dworkin, M. (1974)** Intracellular and extracellular nucleotides and related compounds during the development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **118**:486-496.
- Harris, B.Z., Kaiser, D. y Singer, M. (1998)** The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev.* **12**:1022-1035.
- Harris, R.A., Popov, K.M., Zhao, Y., Kedishvili, N.Y., Shimomura, Y. y Crabb, D.A. (1995)** A new family of protein kinases – the mitochondrial protein kinases. *Adv. Enzyme Regul.* **35**:147-162.
- Harth, G., Maslesa-Galić, S., Tullius, M.V. y Horwitz M.A. (2005)** All tour *Mycobacterium tuberculosis glnA* genes encode glutamine synthetase activities but only *glnA1* is abundantly expressed and essential for bacterial homeostasis. *Mol. Microbiol.* **58**:1157-1172.
- Hartzell, P. y Kaiser, D. (1991a)** Function of MglA, a 22-kilodalton protein essential for gliding in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **173**:7615-7624.
- Hartzell, P. y Kaiser, D. (1991b)** Upstream gene of the *mgl* operon controls the level of MglA protein in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **173**:7625-7635.
- Hartzell, P., Shi, W. y Youderian, P. (2008)** Gliding motility of *Myxococcus xanthus*. En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. ASM Press, Washington, D.C. pp:103-122.
- Hecht, D. y Zick, Y. (1992)** Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and vanadate in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**:773-779.
- Hecker, M., Schumann, W. y Volker, U. (1996)** Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**:417-428.
- Heffetz, D., Bushkin, I., Dror, R. y Zick, Y. (1990)** The insulinomimetic agents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells. *J. Biol. Chem.* **265**:2896-2902.
- Hellingwerf, K.J. (2005)** Bacterial observations: a rudimentary form of intelligence? *Trends Microbiol.* **13**:152-158.

## Bibliografía

**Hemphil, H.E. y Zahler, S.A. (1968)** Nutritional induction and suppression of fruiting in *Myxococcus xanthus* FBa. *J. Bacteriol.* **95**:1018-1023.

**Hendrickson, W.A. (2006)** Transduction of biochemical signals across cell membranes. *Q. Rev. Biophys.* **38**:321-330.

**Henrichsen, J. (1972)** Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* **36**:478-503.

**Higgs, P.I., Jagadeesan, S., Mann, P. y Zusman, D.R. (2008)** EspA, an orphan hybrid histidine protein kinase, regulates the timing of expression of key developmental proteins of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **190**:4416-4426.

**Hillesland, K.L., Lenski, R.E. y Velicer, G.J. (2007)** Ecological variables affecting predatory success in *Myxococcus xanthus*. *Microb. Ecol.* **53**:571-578.

**Hoch, J.A. (2000)** Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:165-170.

**Hoch, J.A. y Silhavy, T.J. (eds.) (1995)** *Two-component signal transduction*. ASM Press, Washington D.C.

**Hodgkin, J. y Kaiser, D. (1977)** Cell-to-cell stimulation of movement in nonmotile mutants of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:2938-2942.

**Hodgkin, J. y 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. y Kaiser, D. (1979b)** Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): two gene systems control movement. *Mol. Gen. Genet.* **171**:177-191.

**Hodgson, D.A. y Murillo, F.J. (1993)** Genetics of regulation and pathway of synthesis of carotenoids. En: *Myxobacteria II*. ASM Press, Washington D.C. pp:157-181.

**Hofmann, K. y Bucher, P. (1995)** The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* **20**:347-349.

**Hohmann, S. (2002)** Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:300-372.

**Hoiczky, E. y Baumeister, W. (1998)** The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. *Curr. Biol.* **8**:1161-1168.

**Howell, L.D., Griffiths, C., Slade, L.W., Potts, M. y Kennelly, P.J. (1996)** Substrate specificity of IphP, a cyanobacterial dual-specificity protein phosphatase with MAP kinase phosphatase activity. *Biochemistry* **35**:7566-7572.

**Huang, H.B., Horiuchi, A., Goldberg, J., Greengard, P. y Nairn, A.C. (1997)** Site-directed mutagenesis of amino acid residues of protein phosphatase 1 involved in catalysis and inhibitor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3530-3535.

**Hubbard, M.J. y Cohen, P. (1993)** On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* **18**:172-177.

**Huitema, E. y Viollier, P.H. (2006)** A myxobacterial S-motility protein dances with poles. *Trends Microbiol.* **14**:247-248.

**Igo, M.M., Ninfa, A.J., Stock, J.B. y Silhavy, T.J. (1989)** Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor. *Genes Dev.* **3**:1725-1734.

**Igoshin, O.A., Goldbeter, A., Kaiser, D. y Oster, G. (2004)** A biochemical oscillator explains several aspects of *Myxococcus xanthus* behavior during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:15760-15765.

**Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R., Hiraishi, A., Ahn, J.W. y 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**:189-195.

**Iizuka, T., Jojima, Y., Fudou, R. y Yamanaka, S. (1998)** Isolation of myxobacteria from the marine environment. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**:317-322.

**Ilan, O., Bloch, Y., Frankel, G., Ullrich, H., Geider, K. y Rosenshine, I. (1999)** Protein tyrosine kinases in bacterial pathogens are associated with virulence and production of exopolysaccharide. *EMBO J.* **18**:3241-3248.

**Inouye, S., Hsu, M.Y., Eagle, S. e Inouye, M. (1989)** Reverse transcriptase associated with the biosynthesis of the branched RNA-linked msDNA in *Myxococcus xanthus*. *Cell* **56**:709-717.

**Inouye, M., Inouye, S. y Zusman, D.R. (1979a)** Gene expression during development of *Myxococcus xanthus*: pattern of protein synthesis. *Dev. Biol.* **68**:579-591.

**Inouye, M., Inouye, S. y Zusman, D.R. (1979b)** Biosynthesis and self-assembly of protein S, a development specific protein of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:209-213.

**Inouye, S., Nariya, H. y Muñoz-Dorado, J. (2008)** Protein Ser/Thr kinases and phosphatases in *Myxococcus xanthus*. En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. ASM Press, Washington, D.C. pp:191-210.

**Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T. y Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997)** Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* **275**:1649-1652.

## Bibliografía

**Iyer, G.H., Garrod, S., Woods, V.L.Jr. y Taylor, S.S. (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**:1110-1122.

**Jackson, M.D. y Denu, J.M. (2001)** Molecular reactions of protein phosphatases-insights from structure and chemistry. *Chem. Rev.* **101**:2313-2340.

**Jackson, M.D., Fjeld, C.C. y Denu, J.M. (2003)** Probing the function of conserved residues in the serine/threonine phosphatase PP2C alpha. *Biochemistry* **42**:8513-8521.

**Jain, V., Kumar, M. y Chatterji, D. (2006)** ppGpp: stringent response and survival. *J. Microbiol.* **44**:1-10.

**Jakobsen, J.S., Jelsbak, L., Jelsbak, L., Welch, R.D., Cummings, C., Goldman, B., Stark, E., Slater, S. y Kaiser, D. (2004)** Sigma54 enhancer binding proteins and *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *J. Bacteriol.* **186**:4361-4368.

**Jakovljevic, V., Leonardy, S., Hoppert, M. y Søgaard-Andersen, L. (2008)** PilB and PilT are ATPases acting antagonistically in type IV pilus function in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **190**:2411-2421.

**James, P., Halladay, J., y Craig, E.A. (1996)** Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**:1425-1436.

**Janson, C.A., Kayne, P.S., Almasy, R.J., Grunstein, M. y Eisenberg, D. (1986)** Sequence of glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium* and implications for the protein structure. *Gene* **46**:297-300.

**Jelsbak, L., Givskov, M. y 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. USA* **102**:3010-3015.

**Jelsbak, L. y 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. USA* **96**:5031-5036.

**Jelsbak, L. y Søgaard-Andersen, L. (2002)** Pattern formation by a cell surface-associated morphogen in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:2032-2037.

**Jenal, U. y Malone, J. (2006)** Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **40**:385-407.

**Jia, Z., Barford, D., Flint, A.J. y Tonks, N.K. (1995)** Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* **268**:1754-1758.

**Jin, H. y Pancholi, V. (2006)** Identification and biochemical characterization of a eukaryotic-type serine/threonine kinase and its cognate phosphatase in *Streptococcus*

*pyogenes*: Their biological functions and substrate identification. *J. Mol. Biol.* **357**:1351-1372.

**Johnson, L.N. y Barford, D. (1993)** The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**:199-232.

**Joseleau-Petit, D., Vinella, D. y D'Ari, R. (1999)** Metabolic alarms and cell division in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:9-14.

**Jovanovic, G., Lloyd, L.J., Stumpf, M.P., Mayhew, A.J. y Buck, M. (2006)** Induction and function of the phage shock protein extracytoplasmic stress response in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **281**:21147-21161.

**Julien, B., Kaiser, D. y Garza, A. (2000)** Spatial control of cell differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:9098-9103.

**Kaiser, D. (1979)** Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5952-5956.

**Kaiser, D. (2004)** Signaling in myxobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:75-98.

**Kaiser, D. y Kroos, L. (1993)** Intercellular signaling. En: *Myxobacteria II*. ASM Press, Washington D.C. pp:257-283.

**Kaiser, C., Michaelis, S. y Mitchell, A. (1994)** Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.

**Kaiser, D. y Welch, R. (2004)** Dynamics of fruiting body morphogenesis. *J. Bacteriol.* **186**:919-927.

**Kalman, L.V., Cheng, Y.L. y Kaiser, D. (1994)** The *Myxococcus xanthus* *dsg* gene product performs functions of translation initiation factor IF3 *in vivo*. *J. Bacteriol.* **176**:1434-1442.

**Kaneko, T., Nakamura, Y., Wolk, C.P., Kuritz, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takazawa, M., Yamada, M., Yasuda, M. y Tabata, S. (2001)** Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120. *DNA Res.* **8**:205-213.

**Kaniga, K., Uralil, J., Bliska, J.B. y Galan, J.E. (1996)** A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **21**:633-641.

**Kannan, N. y Neuwald, A.F. (2005)** Did protein kinase regulatory mechanisms evolve through elaboration of a simple structural component? *J. Mol. Biol.* **351**:956-972.

**Kaplan, H.B. (2003)** Multicellular development and gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:572-577.



## Bibliografía

**Kaplan, H.B. y 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. y Kaiser, D. (2006)** Distinguishing features of delta-proteobacterial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:11352-11357.

**Kashefi, K. y Hartzell, P.L. (1995)** Genetic suppression and phenotypic masking of a *Myxococcus xanthus* *frzF* defect. *Mol. Microbiol.* **15**:483-494.

**Kaufman, R.I. y Nixon, B.T. (1996)** Use of PCR to isolate genes encoding  $\sigma^{54}$ -dependent activators from diverse bacteria. *J. Bacteriol.* **178**:3967-3970.

**Kearns, D.B., Bonner, P.J., Smith, D.R. y Shimkets, L.J. (2002)** An extracellular matrix-associated zinc metalloprotease is required for dilauroyl phosphatidylethanolamine chemotactic excitation in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **184**:1678-1684.

**Kearns, D.B. y Shimkets, L.J. (1998)** Chemotaxis in a gliding bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:11957-11962.

**Kearns, D.B. y Shimkets, L.J. (2001)** Lipid chemotaxis and signal transduction in *Myxococcus xanthus*. *Trends Microbiol.* **9**:126-129.

**Kennelly, P.J. (2001)** Protein phosphatases-A phylogenetic perspective. *Chem. Rev.* **101**:2291-2312.

**Kennelly, P.J. (2002)** Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**:1-8.

**Kennelly, P.J. y Krebs, E.G. (1991)** Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**:15555-15558.

**Kennelly, P.J. y Potts, M. (1996)** Fancy meeting you here! a fresh look at "prokaryotic" protein phosphorylation. *J. Bacteriol.* **178**:4759-4764.

**Kennelly, P.J. y Potts, M. (1999)** Life among the primitives: protein O-phosphatases in prokaryotes. *Front. Biosci.* **4**:D372-385.

**Keseler, I.M. y Kaiser, D. (1995)** An early A-signal-dependent gene in *Myxococcus xanthus* has a sigma 54-like promoter. *J. Bacteriol.* **177**:4638-4644.

**Keyse, S.M. y Ginsburg, M. (1993)** Amino acid sequence similarity between CL100, a dual-specificity MAP kinase phosphatase and *cdc25*. *Trends Biochem. Sci.* **18**:377-378.

**Khan, M.A. e Isaacson, R.E. (2002)** Identification of *Escherichia coli* genes that are specifically expressed in a murine model of septicemic infection. *Infect. Immun.* **70**:3404-3412.

- Khorchid, A. e Ikura, M. (2006)** Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**:307-312.
- Kim, D. y Forst, S. (2001)** Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology* **147**:1197-1212.
- Kim, S.K. y Kaiser, D. (1990a)** C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *Myxococcus xanthus*. *Cell* **61**:19-26.
- Kim, S.K. y Kaiser, D. (1990b)** Cell alignment required in differentiation of *Myxococcus xanthus*. *Science* **249**:926-928.
- Kim, S.K. y Kaiser, D. (1991)** C-factor has distinct aggregation and sporulation thresholds during *Myxococcus* development. *J. Bacteriol.* **173**:1722-1728.
- King, M.M. y Huang, C.Y. (1984)** The calmodulin-dependent activation and deactivation of the phosphoprotein calcineurin and the effect of nucleotides, pyrophosphate, and divalent metal ions. *J. Biol. Chem.* **259**:8847-8856.
- Kiskowski, M.A., Jiang, Y. y Alber, M.S. (2004)** Role of streams in myxobacteria aggregate formation. *Phys. Biol.* **1**:173-183.
- Kissinger, C.R., Parge, H.E., Knighton, D.R., Lewis, C.T., Pelletier, L.A., Tempczyk, A., Kalish, V.J., Tucker, K.D., Showalter, R.E., Moomaw, E.W., Gastinel, L.N., Habuka, N., Chen, X., Maldonado, F., Barker, J.E., Bacquet, R. y Villafranca, J.E. (1995)** Crystal structure of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* **378**:641-644.
- Klig, L.S., Zobel, P.A., Devry, C.G. y Losberger, C. (1994)** Comparison of INO1 gene sequences and products in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**:789-800.
- Kloft, N., Rasch, G. y Forchhammer, K. (2005)** Protein phosphatase PphA from *Synechocystis* sp. PCC6803: the physiological framework of PII-P dephosphorylation. *Microbiology* **151**:1275-1283.
- Klumpp, S. y Krieglstein, J. (2002)** Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur. J. Biochem.* **269**:1067-1071.
- Knebel, A., Rahmsdorf, H.J., Ullrich, A. y Herrlich, P. (1996)** Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* **15**:5314-5325.
- Kokel, M., Borland, C.Z., DeLong, L., Horvitz, H.R. y Stern, M.J. (1998)** *clr-1* encodes a receptor tyrosine phosphatase that negatively regulates an FGF receptor signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* **12**:1425-1437.
- Komano, T., Inouye, S. e Inouye, M. (1980)** Patterns of protein production in *Myxococcus xanthus* during spore formation induced by glycerol, dimethyl sulfoxide and phenethyl alcohol. *J. Bacteriol.* **144**:1076-1081.

**Konstantinidis, K.T. y Tiedje, J.M. (2004)** Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:3160-3165.

**Koonin, E.V. y Deutscher, M.P. (1993)** RNase T shares conserved sequence motifs with DNA proofreading exonucleases. *Nucleic Acids Res.* **21**:2521-2522.

**Kotewicz, M.L., Li, B., Levy, D.D., LeClerc, J.E., Shifflet, A.W. y Cebula, T.A. (2002)** Evolution of multi-gene segments in the *mutS-rpoS* intergenic region of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2. *Microbiology* **148**:2531-2540.

**Koul, A., Choidas, A., Treder, M., Tyagi, A.K., Drlica, K., Singh, Y. y Ullrich, A. (2000)** Cloning and characterization of secretory tyrosine phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **182**:5425-5432.

**Kroos, L. (2005)** Eukaryotic-like signaling and gene regulation in a prokaryote that undergoes multicellular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:2681-2682.

**Kroos, L., Hartzell, P., Stephens, K. y Kaiser, D. (1988)** A link between cell movement and gene expression argues that motility is required for cell-cell signaling during fruiting body development. *Genes Dev.* **2**:1677-1685.

**Kroos, L. y 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. USA* **81**:5816-5820.

**Kroos, L. y Kaiser, D. (1987)** Expression of many developmentally regulated genes in *Myxococcus* depends on a sequence of cell interactions. *Genes Dev.* **1**:840-854.

**Kroos, L., Kuspa, A. y Kaiser, D. (1986)** A global analysis of developmentally regulated genes in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **117**:252-266.

**Kroos, L., Kuspa, A. y Kaiser, D. (1990)** Defects in fruiting body development caused by Tn5 *lac* insertions in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **172**:484-487.

**Krug, D., Zurek, G., Revermann, O., Vos, M., Velicer, G.J. y Müller, R. (2008)** Discovering the hidden secondary metabolome of *Myxococcus xanthus*: a study of intraspecific diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:3058-3068.

**Kruse, T., Lobedanz, S., Berthelsen, N.M.S. y 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**:156-168.

**Kuspa, A., Kroos, L. y Kaiser, D. (1986)** Intercellular signaling is required for developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **117**:267-276.

**Kuspa, A., Plamann, L. y Kaiser, D. (1992a)** Identification of heat-stable A-factor from *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **174**:3319-3326.

- Kuspa, A., Plamann, L. y Kaiser, D. (1992b)** A-Signaling and cell density requirement for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **174**:7360-7369.
- Kwak, S.P., Hakes, D.J., Martell, K.J. y Dixon, J.E. (1994)** Isolation and characterization of a human dual specificity protein-tyrosine phosphatase gene. *J. Biol. Chem.* **269**:3596-3604.
- Lampky, J.R. (1971)** Distribution of *Sorangium cellulosum*. *Appl. Microbiol.* **22**:937-938.
- Lan, Z., Fiedler, F. y Kathariou, S. (2000)** A sheep in wolf's clothing: *Listeria innocua* strains with teichoic acid-associated surface antigens and genes characteristic of *Listeria monocytogenes* serogroup 4. *J. Bacteriol.* **182**:6161-6168.
- LaRossa, R., Kuner, J., Hagen, D., Manoil, C. y Kaiser, D. (1983)** Developmental cell interactions of *Myxococcus xanthus*: analysis of mutants. *J. Bacteriol.* **153**:1394-1404.
- Laurent, S., Forchhammer, K., González, L., Heulin, T., Zhang, C.C. y Bedu, S. (2004)** Cell-type specific modification of PII is involved in the regulation of nitrogen metabolism in the cyanobacterium *Anabaena* PCC7120. *FEBS Lett.* **576**:261-265.
- Lee, B.U., Lee, K., Méndez, J. y Shimkets, L.J. (1995)** A tactile sensory system of *Myxococcus xanthus* involves an extracellular NAD(P)<sup>+</sup>-containing protein. *Genes Dev.* **9**:2964-2973.
- Lee, K. y Shimkets, L.J. (1994)** Cloning and characterization of the *socA* locus which restores development to *Myxococcus xanthus* C-signaling mutants. *J. Bacteriol.* **176**:2200-2209.
- Leigh, J.A. y Dodsworth, J.A. (2007)** Nitrogen regulation in Bacteria and Archaea. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**:349-377.
- Leng, J., Cameron, A.J., Buckel, S. y Kennelly, P.J. (1995)** Isolation and cloning of a protein-serine/threonine phosphatase from an archaeon. *J. Bacteriol.* **177**:6510-6517.
- Leonard, C.J., Aravind, L. y Koonin, E.V. (1998)** Novel families of putative protein kinases in Bacteria and Archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. *Genome Res.* **8**:1038-1047.
- Leonardy, S., Freymark, G., Hebener, S., Ellehauge, E. y Søgaard-Andersen, L. (2007)** Coupling of protein localization and cell movements by a dynamically localized response regulator in *Myxococcus xanthus*. *EMBO J.* **26**:4433-4444.
- Lescop, E., Hu, Y., Xu, H., Hu, W., Chen, J., Xia, B. y Jin, C. (2006)** The solution structure of *Escherichia coli* Wzb reveals a novel substrate recognition mechanism of prokaryotic low molecular weight protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* **281**:19570-19577.

## Bibliografía

**Li, Y., Bustamante, V.H., Lux, R., Zusman, D.R. y Shi, W. (2005)** Divergent regulatory pathways control A and S motility in *Myxococcus xanthus* through FrzE, a CheA-CheY fusion protein. *J. Bacteriol.* **187**:1716-1723.

**Li, S.F., Lee, B.U. y Shimkets, L.J. (1992)** *csgA* expression entrains *Myxococcus xanthus* development. *Genes Dev.* **6**:401-410.

**Li, Y. y Plamann, L. (1996)** Purification and *in vitro* phosphorylation of *Myxococcus xanthus* AsgA protein. *J. Bacteriol.* **178**:289-292.

**Li, Y. y Strohl, W.R. (1996)** Cloning, purification, and properties of a phosphotyrosine protein phosphatase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **178**:136-142.

**Li, Y., Sun, H., Ma, X., Lu, A., Lux, R., Zusman, D. y Shi, W. (2003)** Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:5443-5448.

**Licking, E., Gorski, L. y Kaiser, D. (2000)** A common step for changing cell shape in fruiting body and starvation-independent sporulation of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **182**:3553-3558.

**Linder, J.U. (2006)** Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation. *Cell Mol. Life Sci.* **63**:1736-1751.

**Llamas, M.A., Rodríguez-Herva, J.J., Hancock, R.E., Bitter, W., Tommassen, J. y Ramos, J.L. (2003)** Role of *Pseudomonas putida tol-oprL* gene products in uptake of solutes through the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **185**:4707-4716.

**Lobedanz, S. y Søgaard-Andersen, L. (2003)** Identification of the C-signal, a contact-dependent morphogen coordinating multiple developmental responses in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev.* **17**:2151-2161.

**Loomis, W.F., Shaulsky, G. y Wang, N. (1997)** Histidine kinases in signal transduction pathways in eukaryotes. *J. Cell Sci.* **110**:1141-1145.

**Losick, R. y Dwork, J. (1999)** Linking asymmetric division to cell fate: teaching an old microbe new tricks. *Genes Dev.* **13**:377-381.

**Lu, A., Cho, K., Black, W.P., Duan, X.Y., Lux, R., Yang, Z., Kaplan, H.B., Zusman, D.R. y Shi, W. (2005)** Exopolysaccharide biosynthesis genes required for social motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **55**:206-220.

**Lynch, M. y Conery, J.S. (2003)** The origins of genome complexity. *Science* **302**:1401-1404.

**Maeda, K., Tribble, G.D., Tucker, C.M., Anaya, C., Shizukuishi, S., Lewis, J.P., Demuth, D.R. y Lamont, R.J. (2008)** A *Porphyromonas gingivalis* tyrosine phosphatase is a multifunctional regulator of virulence attributes. *Mol. Microbiol.* **69**:1153-1164.

- Mahmud, T., Bode, H.B., Silakowski, B., Kroppenstedt, R.M., Xu, M., Nordhoff, S., Hofle, G. y Muller, R. (2002)** A novel biosynthetic pathway providing precursors for fatty acid biosynthesis and secondary metabolite formation in myxobacteria. *J. Biol. Chem.* **277**:32768-32774.
- Mai, B., Frey, G., Swanson, R.V., Mathur, E.J. y Stetter, K.O. (1998)** Molecular cloning and functional expression of a protein-serine/threonine phosphatase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium abyssi* TAG11. *J. Bacteriol.* **180**:4030-4035.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M. y Nakata, A. (1989)** Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J. Mol. Biol.* **210**:551-559.
- Manoil, C. y Kaiser, D. (1980)** Guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate accumulation and induction of *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *J. Bacteriol.* **141**:305-315.
- Martínez-Cañamero, M., Ortiz-Codorniu, C., Extremera, A.L., Muñoz-Dorado, J. y Arias, J.M. (2003)** *phoR1*, a gene encoding a new histidine protein kinase in *Myxococcus xanthus*. *Antonie van Leeuwenhoek* **83**:361-368.
- Martínez-Laborda, A., Balsalobre, J.M., Fontes, M. y Murillo, F.J. (1990)** Accumulation of carotenoids in structural and regulatory mutants of the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* **223**:107-114.
- Mascher, T., Helmann, J.D. y Uden, G. (2006)** Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:910-938.
- Matsubara, M. y Mizuno, T. (2000)** The SixA phospho-histidine phosphatase modulates the ArcB phosphorelay signal transduction in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **470**:118-124.
- Mauriello, E.M. y Zusman, D.R. (2007)** Polarity of motility systems in *Myxococcus xanthus*. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**:624-629.
- McCleary, W.R., Esmon, B. y Zusman, D.R. (1991)** *Myxococcus xanthus* protein C is a major spore surface protein. *J. Bacteriol.* **173**:2141-2145.
- Meng, K., Rodríguez-Peña, A., Dimitrov, T., Chen, W., Yamin, M., Noda, M. y Deuel, T.F. (2000)** Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:2603-2608.
- Merrick, M.J. y Edwards, R.A. (1995)** Nitrogen control in Bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**:604-622.
- Mignot, T., Merlie, J.P. y Zusman, D.R. (2005)** Regulated pole-to-pole oscillations of a bacterial gliding motility protein. *Science* **310**:855-857.

## Bibliografía

**Mignot, T., Shaevitz, J.W., Hartzell, P.L. y Zusman, D.R. (2007)** Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. *Science* **315**:853-856.

**Millar, J.A.B. y Russell, P. (1992)** The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell* **68**:407-410.

**Miller, J.H. (1972)** *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

**Missiakas, D. y Raina, S. (1997)** Signal transduction pathways in response to protein misfolding in the extracytoplasmic compartments of *E. coli*: role of two new phosphoprotein phosphatases PrpA and PrpB. *EMBO J.* **16**:1670-1685.

**Mizuno, T. (1997)** Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducer in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* **4**:161-168.

**Mondragón, A., Griffith, E.C., Sun, L., Xiong, F., Armstrong, C. y Liu, J.O. (1997)** Overexpression and purification of human calcineurin alpha from *Escherichia coli* and assessment of catalytic functions of residues surrounding the binuclear metal center. *Biochemistry* **36**:4934-4942.

**Moraleda-Muñoz, A., Carrero-Lérida, J., Extremera, A.L., Arias, J.M. y Muñoz-Dorado, J. (2001)** Glycerol 3-phosphate inhibits swarming and aggregation of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **183**:6135-6139.

**Moraleda-Muñoz, A., Carrero-Lérida, J., Pérez, J. y Muñoz-Dorado, J. (2003)** Role of two novel two-component regulatory systems in development and phosphatase expression in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **185**:1376-1383.

**Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., Fontes, M., Murillo, F.J. y Muñoz-Dorado, J. (2005)** Copper induction of carotenoid synthesis in the bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **56**:1159-1168.

**Morein, S., Trouard, T.P., Hauksson, J.B., Rilfors, L., Arvidson, G. y Lindblom G. (1996)** Two-dimensional <sup>1</sup>H-NMR of transmembrane peptides from *Escherichia coli* phosphatidylglycerophosphate synthase in micelles. *Eur. J. Biochem.* **241**:489-497.

**Morona, J.K., Morona, R., Miller, D.C. y Paton, J.C. (2002)** *Streptococcus pneumoniae* capsule biosynthesis protein CpsB is a novel manganese-dependent phosphotyrosine-protein phosphatase. *J. Bacteriol.* **184**:577-583.

**Morrison, C.E. y Zusman, D.R. (1979)** *Myxococcus xanthus* mutants with temperature-sensitive stage-specific defects: evidence for independent pathways in development. *J. Bacteriol.* **155**:317-329.

**Mueller, C. y Dworkin, M. (1991)** Effects of glucosamine in lysis, glycerol formation, and sporulation in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **173**:7164-7175.

**Mumby, M.C. y Walter, G. (1993)** Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol. Rev.* **73**:673-699.

- Muñoz-Dorado, J., Inouye, S. e Inouye, M. (1991)** A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *Myxococcus xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell* **67**:995-1006.
- Murli, S., Watson, R.O. y Galán, J.E. (2001)** Role of tyrosine kinases and the tyrosine phosphatase SptP in the interaction of *Salmonella* with host cells. *Cell Microbiol.* **3**:795-810.
- Nariya, H. e Inouye, S. (2002)** Activation of 6-phosphofructokinase via phosphorylation by Pkn4, a protein Ser/Thr kinase of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **46**:1353-1366.
- Nariya, H. e Inouye, S. (2003)** An effective sporulation of *Myxococcus xanthus* requires glycogen consumption via Pkn4-activated 6-phosphofructokinase. *Mol. Microbiol.* **49**:517-528.
- Nariya, H. e Inouye, S. (2005)** Identification of a protein Ser/Thr kinase cascade that regulates essential transcriptional activators in *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* **58**:367-379.
- Nariya, H. e 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**:1205-1217.
- Nariya, H. e Inouye, M. (2008)** MazF, an mRNA interferase, mediates programmed cell death during multicellular *Myxococcus* development. *Cell* **132**:55-66.
- Neel, B.G. y Tonks, N.K. (1997)** Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:193-204.
- Nilsson, I. y Hofmann, I. (2000)** Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog. Cell Cycle Res.* **4**:107-114.
- Ninfa, A.J. y Atkinson, M.R. (2000)** PII signal transduction proteins. *Trends Microbiol.* **8**:172-179.
- Nolen, B., Taylor, S. y Ghosh, G. (2004)** Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol. Cell* **15**:661-675.
- Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janecek, J., Novotná, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M.C. y Branny, P. (2005)** Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. *FEBS J.* **272**:1243-1254.
- Nudleman, E., Wall, D. y Kaiser, D. (2005)** Cell-to-cell transfer of bacterial outer membrane lipoproteins. *Science* **309**:125-127.
- O'Connor, K.A. y Zusman, D.R. (1991)** Behavior of peripheral rods and their role in the life cycle of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **173**:3342-3355.



## Bibliografía

**O'Connor, K.A. y Zusman, D.R. (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**:839-850.

**O'Connor, K.A. y Zusman, D.R. (1999)** Induction of beta-lactamase influences the course of development in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **181**:6319-6331.

**Ogawa, M., Fujitani, S., Mao, X., Inouye, S. y Komano, T. (1996)** FruA, a putative transcription factor essential for the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **22**:757-767.

**Ogino, T., Matsubara, M., Kato, N., Nakamura, Y. y Mizuno, T. (1998)** An *Escherichia coli* protein that exhibits phosphohistidine phosphatase activity towards the Hpt domain of the ArcB sensor involved in the multistep His-Asp phosphorelay. *Mol. Microbiol.* **27**:573-585.

**Oke, M., Sarra, R., Ghirlando, R., Farnaud, S., Gorringer, A.R., Evans, R.W. y Buchanan, S.K. (2004)** The plug domain of a neisserial TonB-dependent transporter retains structural integrity in the absence of its transmembrane beta-barrel. *FEBS Lett.* **564**:294-300.

**Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P. y Mann, M. (2006)** Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**:635-648.

**Ostergaard, H.L. y Trowbridge, I.S. (1991)** Negative regulation of CD45 protein tyrosine phosphatase activity by ionomycin in T cells. *Science* **253**:1423-1425.

**Otani, M., Inouye, M. e Inouye, S. (1995)** Germination of myxospores from the fruiting bodies of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **177**:4261-4265.

**Otani, M., Kozaku, S., Xu, C., Umezawa, C., Sano, K. e 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. y Khan, A. (2002)** Bacterial FHA domains: neglected players in the phospho-threonine signalling game? *Trends Microbiol.* **10**:556-563.

**Pancetti, A. y Galán, J.E. (2001)** Characterization of the *mutS*-proximal region of *Salmonella typhimurium* SPI-1 identifies a group of pathogenicity island-associated genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **197**:203-208.

**Parkinson, J.S. (1993)** Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**:857-871.

**Parkinson, J.S. (1995)** Genetics approaches for signaling pathways and proteins. En: *Two-component signal transduction*, ASM Press, Washington D.C. pp:9-24.

**Parkinson, J.S. y Kofoid, E.C. (1992)** Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**:71-112.

- Pato, M.D. y Kerc, E. (1991)** Regulation of smooth muscle phosphatase-II by divalent cations. *Mol. Cell Biochem.* **101**:31-41.
- Pawson, T. y Gish, G.D. (1992)** SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* **71**:359-362.
- Pelling, A.E., Li, Y., Shi, W. y Gimzewski, J.K. (2005)** Nanoscale visualization and characterization of *Myxococcus xanthus* cells with atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:6484-6489.
- Peñalver-Mellado, M., García-Heras, F., Padmanabhan, S., García-Moreno, D., Murillo, F.J. y Elías-Arnanz, M. (2006)** Recruitment of a novel zinc-bound transcriptional factor by a bacterial HMGA-type protein is required for regulating multiple processes in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **61**:910-926.
- Pérez, J., Castañeda-García, A., Jenke-Kodama, H., Müller, R. y Muñoz-Dorado, J. (2008)** Eukaryotic-like protein kinases in prokaryotes and the myxobacterial kinome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* En prensa.
- Perraud, A.L., Weiss, V. y Gross, R. (1999)** Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends Genet.* **15**:15-19.
- Pham, V.D., Shebelut, C.W., Zumstein, E.J. y Singer, M. (2005)** BrgE is regulator of *Myxococcus xanthus*. *Microbiology* **151**:1865-1874.
- Plamann, L., Davis, J.L., Cantwell, B. y Mayor, J. (1994)** Evidences that *asgB* encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **176**:2013-2020.
- Plamann, L., Kuspa, A. y Kaiser, D. (1992)** Proteins that rescue A-signal-defective mutants of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **174**:3311-3318.
- Plamann, L., Li, Y., Cantwell, B. y Mayor, J. (1995)** The *Myxococcus xanthus asgA* gene encodes a novel signal transduction protein required for multicellular development. *J. Bacteriol.* **177**:2014-2020.
- Ponting, C.P., Aravind, L., Schultz, J., Bork, P. y Koonin, E.V. (1999)** Eukaryotic signalling domain homologues in Archaea and Bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer. *J. Mol. Biol.* **289**:729-745.
- Potts, M., Sun, H., Mockaitis, K., Kennelly, P.J., Reed, D. y Tonks, N.K. (1993)** A protein-tyrosine/serine phosphatase encoded by the genome of the cyanobacterium *Nostoc commune* UTEX 584. *J. Biol. Chem.* **268**:7632-7635.
- Pullen, K.E., Ng, H.L., Sung, P.Y., Good, M.C., Smith, S.M. y Alber, T. (2004)** An alternate conformation and a third metal in PstP/Ppp, the *M. tuberculosis* PP2C-family Ser/Thr protein phosphatase. *Structure* **12**:1947-1954.
- Pushker, R., Mira, A. y Rodríguez-Valera, F. (2004)** Comparative genomics of gene-family size in closely related bacteria. *Genome Biol.* **5**:R27.

**Rajagopal, L., Clancy, A. y Ruhens, C.E. (2003)** A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate a inorganic pyrophosphatase and affects growth, cell segregation, and virulence. *J. Biol. Chem.* **278**:14429-14441.

**Rajagopal, L., Vo, A., Silvestroni, A. y Rubens, C.E. (2006)** Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. *Mol. Microbiol.* **62**:941-957.

**Ramponi, G. y Stefani, M. (1997)** Structural, catalytic, and functional properties of low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. Evidence for a long evolutionary history. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**:279-292.

**Rantanen, M.K., Lehtiö, L., Rajagopal, L., Rubens, C.E. y Goldman, A. (2007)** Structure of *Streptococcus agalactiae* serine/threonine phosphatase: The subdomain conformation is coupled to the binding of a third metal ion. *FEBS J.* **274**:3128-3137.

**Rasmussen, A.A., Porter, S.L., Armitage, J.P. y Søgaard-Andersen, L. (2005)** Coupling of multicellular morphogenesis and cellular differentiation by an unusual hybrid histidine protein kinase in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **56**:1358-1372.

**Rasmussen, A.A. y Søgaard-Andersen, L. (2003)** TodK, a putative histidine protein kinase, regulates timing of fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **185**:5452-5464.

**Rasmussen, A.A., Wegener-Feldbrugge, S., Porter, S.L., Armitage, J.P. y Søgaard-Andersen, L. (2006)** Four signalling domains in the hybrid histidine protein kinase RodK of *Myxococcus xanthus* are required for activity. *Mol. Microbiol.* **60**:525-534.

**Redfield, A.R. y Price, C.W. (1996)** General stress transcription factor  $\sigma^B$  of *Bacillus subtilis* is a stable protein. *J. Bacteriol.* **178**:3668-3670.

**Reichenbach, H. (1993)** Biology of the Myxobacteria: Ecology and Taxonomy. En *Myxobacteria II*. ASM Press, Washington D.C. pp:13-62.

**Reichenbach, H. (1999)** The ecology of the myxobacteria. *Environ. Microbiol.* **1**:15-21.

**Reichenbach, H. (2005)** *Myxococcales*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2ª edición. pp:1059-1144.

**Reichenbach, H. y Dworkin, M. (1991)** The myxobacteria. En: *The Prokaryotes*. Springer, New York. pp:3415-3487.

**Reichenbach, H. y Dworkin, M. (1992)** The myxobacteria. En: *The Prokaryotes (2ª edición) A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Springer-Verlag, New York. pp:3416-3487.

**Reichenbach, H. y Höfle, G. (1993)** Biologically active secondary metabolites from myxobacteria. *Biotechnol. Adv.* **11**:219-277.

- Renhui, L., Potters, M.B., Shi, L. y Kennelly, P.J. (2005)** The protein phosphatases of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: open reading frames *sll1033* and *sll1387* encode enzymes that exhibit both protein-serine and protein-tyrosine phosphatase activity in vitro. *J. Bacteriol.* **187**:5877-5884.
- Rexer, H.U., Schäberle, T., Wohlleben, W. y Engels, A. (2006)** Investigation of the functional properties and regulation of three glutamine synthetase-like genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch. Microbiol.* **186**:447-458.
- Rhee, J.H., Kim, S.Y., Chung, S.S., Kim, J.J., Moon, Y.H., Jeong, H. y Choy, H.E. (2000)** Complete genome sequence of *Vibrio vulnificus* CMCP6. Depositado en las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ.
- Rhie, H.G. y Shimkets, L.J. (1989)** Developmental bypass suppression of *Myxococcus xanthus* *csgA* mutations. *J. Bacteriol.* **171**:3268-3276.
- Robzyk, K. y Kassir, Y. (1992)** A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res.* **20**:3790.
- Rodríguez, A.M. y Spormann, A.M. (1999)** Genetic and molecular analysis of *cglB*, a gene essential for single-cell gliding in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **181**:4381-4390.
- Rodríguez-Soto, J.P. y Kaiser, D. (1997)** The *tgl* gene: social motility and stimulation in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **179**:4361-4371.
- Rosenberg, E., Keller, K.H. y Dworkin, M. (1977)** Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein. *J. Bacteriol.* **129**:770-777.
- Rosenbluh, A. y Rosenberg, E. (1989a)** Autocide AMI rescues development in *dsg* mutants of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **171**:1513-1518.
- Rosenbluh, A. y Rosenberg, E. (1989b)** Sporulation of *Myxococcus xanthus* in liquid shake flask cultures. *J. Bacteriol.* **171**:4521-4524.
- Ruppert, U., Irmeler, A., Kloft, N. y Forchhammer, K. (2002)** The novel protein phosphatase PhpA from *Synechocystis* PCC6803 controls dephosphorylation of the signalling protein PII. *Mol. Microbiol.* **44**:855-864.
- Rusnak, F., Yu, L. y Mertz, P. (1996)** Metalloenzymes and signal transduction: the protein serine/threonine phosphatases, a novel class of binuclear metal-containing enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1**:388-396.
- Sager, B. y Kaiser, D. (1993)** Two cell-density domains within the *Myxococcus xanthus* fruiting body. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3690-3694.
- Saier Jr, J.M. (1993)** Regulatory interactions involving the proteins of the phosphotransferase system in enteric bacteria. *J. Cell. Biochem.* **51**:62-68.

## Bibliografía

**Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Eirlich, H.A. (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.

**Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001)** *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sanford, R.A., Cole, J.R. y Tiedje, J.M. (2002)** Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halo-respiring facultative anaerobic myxobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:893-900.

**Sanger, F., Coulson, A.R., Hong, G.F., Hill, D.F. y Petersen, G.B. (1982)** Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J. Mol. Biol.* **162**:729-773.

**Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain terminators inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

**Santos, J.L. y Shiozaki, K. (2004)** Phosphorelay signaling in yeast in response to changes in osmolarity. *Sci STKE*. **2004**:tr12.

**Sap, J., Jiang, Y.P., Friedlander, D., Grumet, M. y Schlessinger, J. (1994)** Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-kappa mediates homophilic binding. *Mol. Cell Biol.* **14**:1-9.

**Schenk, P.W. y Snaar-Jagalska, B.E. (1999)** Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochem. Biophys. Acta* **1449**:1-24.

**Schiestl, R.H. y Gietz, R.D. (1989)** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**:339-346.

**Schneiker, S., Perlova, O., Kaiser, D., Gerth, K., Alici, A., Altmeyer, M.O., Bartels, D., Bekel, T., Beyer, S., Bode, E., Bode, H.B., Bolten, C.J., Choudhuri, J.V., Doss, S., Elnakady, Y.A., Frank, B., Gaigalat, L., Goesmann, A., Groeger, C., Gross, F., Jelsbak, Kalinowski, J., Kegler, C., Knauber, T., Konietzny, S., Kopp, M., Krause, L., Krug, D., Linke, B., Mahmud, T., Martínez-Arias, R., McHardy, A.C., Merai, M., Meyer, F., Mormann, S., Muñoz-Dorado, J., Pérez, J., Pradella, S., Rachid, S., Raddatz, G., Rosenau, F., Rückert, C., Sasse, F., Scharfe, M., Schuster, S.C., Suen, G., Treuner-Lange, A., Velicer, G.J., Vorhölter, F.J., Weissman, K.J., Welch, R.D., Wenzel, S.C., Whitworth, D.E., Wilhelm, S., Wittmann, C., Blöcker, H., Pühler, A. y Müller, R. (2007)** Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat. Biotechnol.* **25**:1281-1289.

**Schuster-Bockler, B., Schultz, J. y Rahmann, S. (2004)** HMM Logos for visualization of protein families. *BMC Bioinformatics* **5**:7-15.

**Scott, A.E., Simon, E., Park, S.K., Andrews, P. y Zusman, D.R. (2008)** Site-specific receptor methylation of FrzCD in *Myxococcus xanthus* is controlled by a tetra-trico peptide repeat (TPR) containing regulatory domain of the FrzF methyltransferase. *Mol. Microbiol.* **69**:724-735.

**Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R. (1970)** Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Methods Enzymol.* **17**:910-922.

**Sharma, K., Gupta, M., Krupa, A., Srinivasan, N. y Singh, Y. (2006)** EmbR, a regulatory protein with ATPase activity, is a substrate of multiple serine/threonine kinases and phosphatase in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS J.* **273**:2711-2721.

**Shenolikar, S. (1994)** Protein serine/threonine phosphatases—New avenues for cell regulation. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**:55-86.

**Shi, L. (2004)** Manganese-dependent protein O-phosphatases in prokaryotes and their biological functions. *Front. Biosci.* **9**:1382-1397.

**Shi, L., Bischoff, K.M. y Kennelly, P.J. (1999a)** The *icfG* gene cluster of *Synechocystis* sp. strain PCC6803 encodes an Rsb/Spo like protein kinase, protein phosphatase, and two phosphoproteins. *J. Bacteriol.* **181**:4761-4767.

**Shi, L., Carmichael, W.W. y Kennelly, P.J. (1999b)** Cyanobacterial PPP-family protein phosphatases possess multifunctional capabilities and are resistant to microcystin-LR. *J. Biol. Chem.* **274**:10039-10046.

**Shi, L., Kehres, D.G. y Maguire, M.E. (2001)** The PPP-family protein phosphatases PrpA and PrpB of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* possess distinct biochemical properties. *J. Bacteriol.* **183**:7053-7057.

**Shi, W., Kohler, T. y Zusman, D.R. (1993)** Chemotaxis plays a role in the social behavior of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **9**:601-611.

**Shi, W., Kohler, T. y Zusman, D.R. (1994)** Motility and chemotaxis in *Myxococcus xanthus*. En: *Molecular Microbiology Techniques*. Academic Press, San Diego. pp:258-269.

**Shi, L., Potts, M. y Kennelly, P.J. (1998)** The serine, threonine and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:229-252.

**Shi, Z., Resing, K.A. y Ahn, N.G. (2006)** Networks for the allosteric control of protein kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**:686-692.

**Shi, X., Wegener-Feldbrügge, S., Huntley, S., Hamann, N., Hedderich, R. y Søgaard-Andersen, L. (2008)** Bioinformatics and experimental analysis of proteins of two-component systems in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **190**:613-624.

**Shi, W., Yang, Z., Sun, H., Lancero, H. y Tong, L. (2000)** Phenotypic analyses of *frz* and *dif* double mutants of *Myxococcus xanthus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**:211-215.

**Shimkets, L.J. (1984)** Nutrition, metabolism, and the initiation of development. En: *Myxobacteria Development and Cell Interactions*. Springer-Verlag, New York. pp:92.

## Bibliografía

- Shimkets, L.J. (1987)** Control of morphogenesis in myxobacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **14**:195-227.
- Shimkets, L.J. (1993)** The myxobacterial genome. En: *Myxobacteria II*. ASM Press, Washington D.C. pp:85-107.
- Shimkets, L.J. (1999)** Intercellular signaling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**:525-549.
- Shimkets, L.J. y Asher, S.J. (1988)** Use of recombination techniques to examine the structure of the *csg* locus of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* **211**:63-71.
- Shimkets, L.J. y Dworkin, M. (1981)** Excreted adenosine is a cell density signal for the initiation of fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **84**:51-60.
- Shimkets, L.J. y Dworkin, M. (1997)** Myxobacterial multicellularity. En: *Bacteria as multicellular organisms*. Oxford University Press, New York. pp:220-244.
- Shimkets, L.J. y Raffie, H. (1990)** CsgA, an extracellular protein essential for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **172**:5299-5306.
- Shimkets, L.J., Reichenbach, H. y Dworkin, M. (2005)** The Myxobacteria. En: *The Prokaryotes*, 3<sup>a</sup> ed. Springer, New York. pp:31-115.
- Singer, M. y Kaiser, D. (1995)** Ectopic production of guanosine penta- and tetraphosphate can initiate early developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev.* **9**:1633-1644.
- Skorko, R. (1984)** Protein phosphorylation in the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur. J. Biochem.* **145**:617-622.
- Sliusarenko, O., Neu, J., Zusman, D.R. y Oster, G. (2006)** Accordion waves in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:1534-1539.
- Sliusarenko, O., Zusman, D.R. y Oster, G. (2007)** The motors powering A-motility in *Myxococcus xanthus* are distributed along the cell body. *J. Bacteriol.* **189**:7920-7921.
- Søgaard-Andersen, L. (2004)** Cell polarity, intercellular signalling and morphogenetic cell movements in *Myxococcus xanthus*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:587-593.
- Søgaard-Andersen, L. y Kaiser, D. (1996)** C-factor, a cell-surface-associated intercellular signaling protein, stimulates the cytoplasmatic Frz signal transduction system in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:2675-2679.
- Southern, E.M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.
- Sozinova, O., Jiang, Y., Kaiser, D. y Alber, M. (2005)** A three-dimensional model of myxobacterial aggregation by contact-mediated interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:11308-11312.

- Sozinova, O., Jiang, Y., Kaiser, D. y Alber, M. (2006)** A three-dimensional model of myxobacterial fruiting-body formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:17255-17259.
- Spormann, A.M. y Kaiser, D. (1995)** Gliding movements in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **177**:5846-5852.
- Spormann, A.M. y Kaiser, D. (1999)** Gliding mutants of *Myxococcus xanthus* with high reversal frequency and small displacements. *J. Bacteriol.* **181**:2593-2601.
- Stein, E.A., Cho, K., Higgs, P.I. y Zusman, D.R. (2006)** Two Ser/Thr protein kinases essential for efficient aggregation and spore morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **60**:1414-1431.
- Stephens, K., Hartzell, P. y Kaiser, D. (1989)** Gliding motility in *Myxococcus xanthus*: *mgl* locus, RNA, and predicted protein products. *J. Bacteriol.* **171**:819-830.
- Stephens, K. y Kaiser, D. (1987)** Genetic of gliding motility in *Myxococcus xanthus*: molecular cloning of the *mgl* locus. *Mol. Gen. Genet.* **207**:256-266.
- Stock, A.M., Robinson, V.L. y Goudreau, P.N. (2000)** Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**:183-215.
- Stock, J.B., Surette, M.G., Levit, M. y Park, P. (1995)** Two-component signal transduction systems: Structure-function relationships and mechanism of catalysis. En: *Two-component signal transduction*. ASM Press, Washington D.C. pp:25-51.
- Stover, D.R., Charbonneau, H., Tonks, N.K. y Walsh, K.A. (1991)** Protein-tyrosine-phosphatase CD45 is phosphorylated transiently on tyrosine upon activation of Jurkat T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:7704-7707.
- Stragier, P. y Losick, R. (1996)** Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* **30**:297-341.
- Strausfeld, U., Labbe, J.C., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P. y Doree, M. (1991)** Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex *in vitro* by human CDC25 protein. *Nature* **351**:242-245.
- Sullivan, S.G., Chiu, D.T., Errasfa, M., Wang, J.M., Qi, J.S. y Stern, A. (1994)** Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on protein tyrosine phosphatase activity in HER14 cells. *Free Radic. Biol. Med.* **16**:399-403.
- Sun, H. y Shi, W. (2001a)** Analyses of *mrp* genes during *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **183**:6733-6739.
- Sun, H. y Shi, W. (2001b)** Genetic studies of *mrp*, a locus essential for cellular aggregation and sporulation of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **183**:4786-4795.
- Suzuki, Y.J., Forman, H.J. y Sevanian, A. (1997)** Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* **22**:269-285.



## Bibliografía

**Swanson, R.V., Alex, L.A. y Simon, M.I. (1994)** Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem. Sci.* **19**:485-490.

**Taddei, N., Chiarugi, P., Cirri, P., Fiaschi, T., Stefani, M., Camici, G., Rauegi, G. y Ramponi, G. (1994)** Aspartic-129 is an essential residue in the catalytic mechanism of the low M(r) phosphotyrosine protein phosphatase. *FEBS Lett.* **350**:328-332.

**Taylor, S.S., Knighton, D.R., Zheng, J., Sowadski, J.M., Gibbs, C.S. y Zoller, M.J. (1993)** A template for the protein kinase family. *Trends Biochem. Sci.* **18**:84-89.

**Taylor, G.S., Liu, Y., Baskerville, C. y Charbonneau, H. (1997)** The activity of Cdc14p, an oligomeric dual specificity protein phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* **272**:24054-24063.

**Taylor, B.L. y Zhulin, I.B. (1999)** PAS domains: internal sensor of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:479-506.

**Teintze, M., Thomas, R., Furuichi, T., Inouye, M. e Inouye, S. (1985)** Two homologous genes coding for spore-specific proteins are expressed at different times during development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **183**:121-125.

**Thomas, S.H., Wagner, R.D., Arakaki, A.K., Skolnick, J., Kirby, J.R., Shimkets, L.J., Sanford, R.A. y Löffler, F.E. (2008)** The mosaic genome of *Anaeromyxobacter dehalogenans* strain 2CP-C suggests an aerobic common ancestor to the delta-proteobacteria. *PLoS ONE* **7**:e2103.

**Thomasson, B., Link, J., Stassinopoulos, A.G., Burke, N., Plamann, L. y Hartzell, P.L. (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**:1399-1413.

**Thöny-Meyer, L. y Kaiser, D. (1993)** *devRS*, an autoregulated and essential genetic locus for fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **175**:7450-7462.

**Toal, D.R., Clifton, S.W., Roe, B.R. y Downard, J. (1995)** The *esg* locus of *Myxococcus xanthus* encodes de E1 $\alpha$  and E1 $\beta$  subunits of a branched-chain keto acid dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* **16**:177-189.

**Todone, F., Vanoni, M.A., Mozzarelli, A., Bolognesi, M., Coda, A., Curti, B. y Mattevi, A. (1997)** Active site plasticity in D-amino acid oxidase: a crystallographic analysis. *Biochemistry* **36**:5853-5860.

**Treuner-Lange, A., Ward, M.J. y Zusman, D.R. (2001)** Pph1 from *Myxococcus xanthus* is a protein phosphatase involved in vegetative growth and development. *Mol. Microbiol.* **40**:126-140.

**Tse, H. y Gill, R.E. (2002)** Bypass of A- and B-signaling requirements for *Myxococcus xanthus* development by mutations in *spdR*. *J. Bacteriol.* **184**:1455-1457.

- Tzeng, L., Ellis, T.N. y Singer, M. (2006)** DNA replication during aggregation phase is essential for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **188**:2774-2779.
- Tzeng, L. y Singer, M. (2005)** DNA replication during sporulation in *Myxococcus xanthus* fruiting bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:14428-14433.
- Udo, H., Lam, C.K., Mori, S., Inouye, M. e 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**:557-563.
- Udo, H., Muñoz-Dorado, J., Inouye, M. e 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**:972-983.
- Ueki, T. e 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. USA* **100**:8782-8787.
- Ueki, T. e Inouye, S. (2006)** A novel regulation on developmental gene expression of fruiting body formation in Myxobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**:21-29.
- Ueki, T., Inouye, S. e Inouye, M. (1996)** Positive-negative KG cassettes for construction of multi-gene deletions using a single drug marker. *Gene* **183**:153-157.
- Ulrich, L.E., Koonin, E.V. y Zhulin, I.B. (2005)** One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* **13**:52-56.
- Umeyama, T., Naruka, A. y Horinouchi, S. (2000)** Genetic and biochemical characterization of protein phosphatase with dual substrate specificity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **258**:55-62.
- Umeyama, T., Tanabe, Y., Aigle, B.D. y Horinouchi, S. (1996)** Expression of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) *ptpA* gene encoding a phosphotyrosine protein phosphatase leads to overproduction of secondary metabolites in *S. lividans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **144**:177-184.
- Vieira, J. y Messing, J. (1982)** The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**:259-268.
- Vijay, K., Brody, M.S., Fredlund, E. y Price, C.W. (2000)** A PP2C phosphatase containing a PAS domain is required to convey signals of energy stress to the sigmaB transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **35**:180-188.
- Vincent, C., Doublet, P., Grangeasse, C., Vaganay, E., Cozzone, A.J. y Duclos, B. (1999)** Cells of *Escherichia coli* contain a protein-tyrosine kinase, Wzc, and a phosphotyrosine-protein phosphatase, Wzb. *J. Bacteriol.* **181**:3472-3477.

## Bibliografía

**Vincent, C., Duclos, B., Grangeasse, C., Vaganay, E., Riberty, M. y Cozzone, A.J. (2000)** Relationship between exopolysaccharide production and protein-tyrosine phosphorylation in gram-negative bacteria. *J. Mol. Biol.* **304**:311-321.

**Viswanathan, P., Murphy, K., Julien, B., Garza, A.G. y 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**:3738-3750.

**Viswanathan, P., Singer, M. y Kroos, L. (2006)** Role of sigmaD in regulating genes and signals during *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **188**:3246-3256.

**Viswanathan, P., Ueki, T., Inouye, S. y 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. USA* **104**:7969-7974.

**Voegtli, W.C., White, D.J., Reiter, N.J., Rusnak, F. y Rosenzweig, A.C. (2000)** Structure of the bacteriophage  $\lambda$  Ser/Thr protein phosphatase with sulfate ion bound in two coordination modes. *Biochemistry* **39**:15365-15374.

**Wall, D., Kolenbrander, P.E. y Kaiser, D. (1999)** The *Myxococcus xanthus pilQ* (*sglA*) gene encodes a secretin homolog required for type IV pilus biogenesis, social motility, and development. *J. Bacteriol.* **181**:24-33.

**Wang, X., Culotta, V.C. y Lee, C.B. (1996)** Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature* **383**:434-437.

**Wang, S., Taberero, L., Zhang, M., Harms, E., Van Etten, R.L. y Stauffacher, C.V. (2000)** Crystal structures of a low-molecular weight protein tyrosine phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* and its complex with the substrate *p*-nitrophenyl phosphate. *Biochemistry* **39**:1903-1914.

**Ware, J.C. y Dworkin, M. (1973)** Fatty acids of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **115**:253-261.

**Watson, B.F. y Dworkin, M. (1968)** Comparative intermediary metabolism of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **96**:1465-1473.

**Weinberg, R.A. y Zusman, D.R. (1990)** Alkaline, acid, and neutral phosphatase activities are induced during development in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **172**:2294-2302.

**Welch, R. y Kaiser, D. (2001)** Cell behaviour intraveling wave patterns of mixobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:14907-14912.

**West, A.H. y Stock, A.M. (2001)** Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* **26**:369-376.

**White, D. (1993)** Myxospore and fruiting body morphogenesis. En: *Myxobacteria II*. ASM Press, Washington D.C. pp:307-332.

- Whitworth, D.E. y Cock, P.J.A. (2008)** Two-component signal transduction systems of the myxobacteria. En: *Myxobacteria: Multicellularity and differentiation*. ASM Press, Washington, D.C. pp:169-189.
- Wireman, J.W. y Dworkin, M. (1975)** Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria. *Science* **189**:516-523.
- Wolanin, P.M., Thomason, P.A. y Stock, J.B. (2002)** Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* **3**:reviews3013.
- Wolgemuth, C., Hoiczyk, E., Kaiser, D. y Oster, G. (2002)** How myxobacteria glide. *Curr. Biol.* **12**:369-377.
- Wolk, C.P. (2000)** Heterocyst formation. En *Anabaena. Prokaryotic Development*. ASM Press Washington D.C. pp 83-104.
- Woolfolk, C.A., Shapiro, B. y Stadtman, E.R. (1966)** Regulation of glutamine synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.* **116**:177-192.
- Wu, Z.H., Jiang, D.M., Li, P. y Li, Y.Z. (2005)** Exploring the diversity of myxobacteria in a soil niche by myxobacteria-specific primers and probes. *Environ. Microbiol.* **7**:1602-1610.
- Wu, S.S. y Kaiser, D. (1995)** Genetic and functional evidence that type IV pili are required for social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **18**:547-558.
- Wu, S.S. y Kaiser, D. (1996)** Markerless deletions of *pil* genes in *Myxococcus xanthus* generated by counterselection with the *Bacillus subtilis sacB* gene. *J. Bacteriol.* **178**: 5817-5821.
- Wu, S.S., Wu, J., Cheng, Y.L. y Kaiser, D. (1998)** The *pilH* gene encodes an ABC transporter homologue required for type IV pilus biogenesis and social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **29**:1249-1261.
- Wu, S.S., Wu, J. y Kaiser, D. (1997)** The *Myxococcus xanthus pilT* locus is required for social gliding motility although pili are still produced. *Mol. Microbiol.* **23**:109-121.
- Xu, Q., Black, W.P., Cadieux, C.L. y Yang, Z. (2008)** Independence and interdependence of Dif and Frz chemosensory pathways in *Myxococcus xanthus* chemotaxis. *Mol. Microbiol.* **69**:714-723.
- Xu, D., Yang, C. y Kaplan, H.B. (1998)** *Myxococcus xanthus sasN* encodes a regulator that prevents developmental gene expression during growth. *J. Bacteriol.* **180**:6215-6223.
- Yang, Z., Geng, Y., Xu, D., Kaplan, H.B. y Shi, W. (1998)** A new set of chemotaxis homologs is essential for *Myxococcus xanthus* social motility. *Mol. Microbiol.* **30**:1123-1130.

## Bibliografía

**Yang, X., Kang, C.M., Brody, M.S. y Price, C.W. (1996)** Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes Develop.* **10**:2265-2275.

**Yang, C. y Kaplan, H.B. (1997)** *Myxococcus xanthus sasS* encodes a sensor histidine kinase required for early developmental gene expression. *J. Bacteriol.* **179**:7759-7767.

**Yang, Z., Ma, X., Tong, L., Kaplan, H.B., Shimkets, L.J. y Shi, W. (2000)** *Myxococcus xanthus dif* genes are required for biogenesis of cell surface fibrils essential for social gliding motility. *J. Bacteriol.* **182**:5793-5798.

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

**Yau, K.W. (1994)** Cyclic nucleotide-gated channels: an expanding new family of ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:3481-3483.

**Yoshida, Y., Nakano, Y., Nezu, T., Yamashita, Y. y Koga, T. (1999)** A novel NDP-6-deoxyhexosyl-4-ulose reductase in the pathway for the synthesis of thymidine diphosphate-D-fucose. *J. Biol. Chem.* **274**:16933-16939.

**Youderian, P., Burke, N., White, D.J. y Hartzell, P.L. (2003)** Identification of genes required for adventurous gliding motility in *Myxococcus xanthus* with the transposable element mariner. *Mol. Microbiol.* **49**:555-570.

**Youderian, P. y Hartzell, P.L. (2006)** Transposon insertions of magellan-4 that impair social gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Genetics* **172**:1397-1410.

**Young, T.A., Delagoutte, B., Endrizzi, J.A., Falick, A.M. y Alber, T. (2003)** Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nat. Struct. Biol.* **10**:168-174.

**Yu, L., Haddy, A. y Rusnak, F. (1995)** Evidence that calcineurin accommodates an active site binuclear metal center. *J. Am. Chem. Soc.* **117**:10147-10148.

**Yu, R. y Kaiser, D. (2007)** Gliding motility and polarized slime secretion. *Mol. Microbiol.* **63**:454-467.

**Yuvaniyama, J., Denu, J.M., Dixon, J.E. y Saper, M.A. (1996)** Crystal structure of the dual specificity protein phosphatase VHR. *Science* **272**:1328-1331.

**Zhang, C.C. (1996)** Bacterial signalling involving eukaryotic-type protein kinases. *Mol. Microbiol.* **20**:9-15.

**Zhang, H., Dong, H., Zhao, J., Hu, W. y Li, Y.Z. (2005a)** Characterization of developmental autolysis in myxobacterial fruiting body morphogenesis with profiling of amino acids using capillary electrophoresis method. *Amino Acids* **28**:319-325.

- Zhang, C.C., Friry, A. y Peng, L. (1998a)** Molecular and genetic analysis of two closely linked genes that encode, respectively, a protein phosphatase1/2A/2B homolog and protein kinase homolog in the cyanobacterium *Anabaena* sp strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **180**:2616-2622.
- Zhang, C.C., González, L. y Phalip, V. (1998b)** Survey, analysis and genetic organization of genes encoding eukaryote-like signaling proteins on a cyanobacterial genome. *Nucleic Acids Res.* **26**:3619-3625.
- Zhang, W., Inouye, M. e Inouye, S. (1996a)** Reciprocal regulation of the differentiation of *Myxococcus xanthus* by Pkn5 and Pkn6, eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases. *Mol. Microbiol.* **20**:435-447.
- Zhang, C.C., Laurent, S., Sakr, S., Peng, L. y Bédu, S. (2006)** Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria, a chorus of signals. *Mol. Microbiol.* **59**:367-375.
- Zhang, Y.Q., Li, Y.Z., Wang, B., Wu, Z.H., Zhang, C.Y., Gong, X., Qiu, Z.J. y Zhang, Y. (2005b)** Characteristics and living patterns of marine myxobacterial isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3331-3336.
- Zhang, W., y Shi, L. (2004)** Evolution of the PPM-family protein phosphatases in *Streptomyces*: duplication of catalytic domain and lateral recruitment of additional sensory domains. *Mol. Microbiol.* **150**:4189-4197.
- Zhang, M., Stauffacher, C.V., Lin, D. y Van Etten, R.L. (1998c)** Crystal structure of a human low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase. Implications for substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **273**:21714-21720.
- Zhang, J., Zhang, Z., Brew, K. y Lee, E.Y. (1996b)** Mutational analysis of the catalytic subunit of muscle protein phosphatase-1. *Biochemistry* **35**:6276-6282.
- Zhou, G., Denu, J.M., Wu, L. y Dixon, J.E. (1994a)** The catalytic role of Cys124 in the dual specificity phosphatase VHR. *J. Biol. Chem.* **269**:28084-28090.
- Zhu, Y. e Inouye, M. (2002)** The role of the G2 box, a conserved motif in the histidine kinase superfamily, in modulating the function of EnvZ. *Mol. Microbiol.* **45**:653-663.
- Zhu, Y., Qin, L., Yoshida, T. e Inouye, M. (2000)** Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:7808-7813.
- Zhuo, S., Clemens, J.C., Hakes, D.J., Barford, D. y Dixon, J.E. (1993)** Expression, purification, crystallization, and characterization of a recombinant protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* **268**:17754-17761.
- Zhuo, S., Clemens, J., Stone, R. y Dixon, J. (1994)** Mutational analysis of a Ser/thr phosphatase. Identification of residues important in phosphoesterase substrate binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* **269**:26234-26238.

*Bibliografia*

**Zusman, D.R. (1982)** “Frizzy” mutants: a new class of aggregation-defective developmental mutants of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **150**:1430-1437.